

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 674**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2015 PCT/US2015/060989**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016 WO16105696**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2015 E 15801627 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 3237617**

54 Título: **Control biológico de plagas de coleópteros**

30 Prioridad:

23.12.2014 US 201462096491 P

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

08.10.2019

73 Titular/es:

**SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (100.0%)
Schwarzwaldallee 215
4058 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**DONOHUE, KEVIN V.;
LIU, RENSHUI y
CHEN, JENG SHONG**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 726 674 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

Control biológico de plagas de coleópteros

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La invención se refiere en general al control de plagas que provoca daño a las plantas de cultivo por sus actividades de alimentación y más particularmente al control de plagas de coleópteros mediante composiciones que comprenden moléculas de ARN de interferencia. La invención se refiere además a las composiciones y métodos para utilizar dichas composiciones que comprenden las moléculas de ARN de interferencia.

ANTECEDENTES

Las especies de insectos en el género *Diabrotica* (gusanos de la raíz del maíz y escarabajos del pepino) se consideran algunas de las plagas más importantes para las plantas de cultivo. Por ejemplo, especies de gusanos de la raíz del maíz, incluyendo *Diabrotica virgifera virgifera*, el gusano de la raíz del maíz del oeste (WCR), *D. barberi*, el gusano de la raíz del maíz del norte (NCR), *D. undecimpunctata howardi*, el gusano de la raíz del maíz del sur (SCR), y *D. virgifera zea*, el gusano de la raíz del maíz de México (MCR), son las plagas del maíz más destructivas en Norteamérica provocando una pérdida estimada de más de \$1,000 millones anualmente. El gusano de la raíz del maíz del oeste también ha invadido Europa y provoca un estimado de 500 millones de euros en daños cada año. *Diabrotica speciosa* (nombres comunes incluyen, entre otros, escarabajo de la hoja, pequeño escarabajo de Brasil, escarabajo de las cucurbitáceas y escarabajo del crisantemo) es una plaga importante del maíz, soja y maníes en Sudamérica.

La mayoría del daño en el maíz es provocado por la alimentación del gusano de la raíz larval. Las larvas del gusano de la raíz recientemente eclosionadas ubican las raíces del maíz en el suelo y comienzan inicialmente a alimentarse de las cabelleras de la raíz finas y a excavar en las puntas de raíces de la planta de maíz. Mientras las larvas crecen, se alimentan y excavan un túnel hacia las raíces primarias. Cuando los gusanos de la raíz son abundantes, la alimentación larval y el deterioro de las raíces dañadas por los patógenos del pudrimiento de la raíz pueden resultar en raíces podadas hasta la base del tallo. El daño grave a la raíz interfiere con la capacidad de las raíces de transportar agua y nutrientes a la planta, reduce el crecimiento de la planta y resulta en la producción de grano reducida. El daño grave a la raíz también puede resultar en el encamado de las plantas de maíz, haciendo la cosecha mecánica más difícil o imposible. Los gusanos de la raíz del maíz adultos se alimentan principalmente de barba del maíz, polen y granos en las puntas de las espigas expuestas. Si los gusanos de la raíz del maíz adultos comienzan a emerger antes de que los tejidos reproductivos del maíz estén presentes, los adultos pueden alimentarse del tejido de la hoja, raspando el tejido superficial verde y dejando una apariencia de recuadros. La alimentación de seda por adultos puede resultar en el podado en la punta de las espigas, comúnmente denominadas recorte de seda. En el maíz de campo, las poblaciones de escarabajos pueden alcanzar un nivel lo suficientemente alto como para provocar un grave recorte de seda durante el desprendimiento del polen, que puede interferir con la polinización y reducir el rendimiento. Por lo tanto, a diferencia de plagas de lepidópteros de maíz en las cuales sólo las etapas larvales provocan daños, tanto la etapa larval como la adulta del gusano de la raíz del maíz son capaces de provocar daño económico al maíz.

Las plagas de insecto *Diabrotica* son principalmente controladas por aplicaciones intensivas de plaguicidas químicos, que pueden activarse contra las etapas larval y adulta, a través de la inhibición del crecimiento de insectos, prevención de la alimentación o reproducción de insectos o provocar la muerte. De este modo puede alcanzarse el buen control de los insectos, pero estos químicos a veces también pueden afectar a otros insectos beneficiosos. Problemas adicionales ocurren en áreas de alto uso de insecticidas donde las poblaciones de escarabajos del gusano de la raíz del maíz se han vuelto resistentes a ciertos insecticidas. Esto ha sido parcialmente aliviado por varias prácticas de gestión de la resistencia, pero hay una necesidad creciente para agentes de control de plagas alternativos.

Varias proteínas Cry nativas de *Bacillus thuringiensis*, o proteínas Cry manipuladas, han sido expresadas en plantas de cultivo transgénicas y explotadas comercialmente para controlar ciertas plagas de insectos de lepidópteros y coleópteros. Por ejemplo, a partir de 2003, los híbridos de maíz transgénicos que controlan el gusano de la raíz del maíz al expresar una proteína Cry3Bb1, Cry34Ab1/Cry35Ab1, o Cry3A (mCry3A) o Cry3Ab (eCry3.1Ab) modificada han estado disponibles comercialmente en los Estados Unidos.

La industria de las semillas, investigadores universitarios y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos han trabajado juntos para desarrollar planes de gestión para ayudar a mitigar el inicio de la resistencia de insectos a plantas transgénicas que expresan proteínas insecticidas. Se basan principalmente en una alta dosis y estrategia de refugio. Una estrategia de alta dosis para el maíz es utilizar híbridos de maíz que expresan niveles lo suficientemente altos de una proteína insecticida tal como una proteína Cry para destruir incluso los insectos parcialmente resistentes. La hipótesis subyacente es que destruir los insectos parcialmente resistentes y prevenir su apareamiento retrasa en gran medida el desarrollo de la resistencia. El éxito de una estrategia de alta dosis depende en parte de la actividad específica de la proteína insecticida a la especie de insecto particular y cuánto de esa

5 proteína insecticida puede expresarse en la planta de maíz transgénica. Cuánto más alta la actividad específica de una proteína insecticida a una plaga, menor es la cantidad de la proteína insecticida requerida para expresarla en una planta transgénica para alcanzar una estrategia de alta dosis. Por ejemplo, los híbridos de maíz que expresan la proteína Cry activa en lepidópteros, Cry1Ab, son considerados de alta dosis contra la plaga objetivo primaria del gusano barrenador europeo (*Ostrinia nubilalis*). Debido a que Cry1Ab es muy tóxica para las larvas de gusano barrenador europeo con una $LC_{50} < 10 \text{ ng/cm}^2$ (es decir, actividad específica alta), los niveles de expresión de Cry1Ab que son alcanzables en plantas transgénicas colocan fácilmente dichos híbridos de maíz en una categoría de alta dosis. Sin embargo, a diferencia de los productos activos en lepidópteros, los productos para el gusano de la raíz actuales no son considerados de alta dosis. Las proteínas que expresan no son activas contra adultos y tienen actividad limitada contra larvas de estadio tardío. Por lo tanto, los productos para gusanos de la raíz transgénica actuales permiten que algunas larvas de gusanos de la raíz sobrevivan y emerjan como adultos.

15 Por lo tanto, los niveles económicos de desprendimiento de seda por gusanos de la raíz del maíz adultos aun pueden ocurrir incluso en porciones de campos plantados para un híbrido de gusano de la raíz del maíz transgénico. Por ejemplo, las densidades de los gusanos de la raíz del maíz del oeste adultos pueden exceder los niveles económicos en porciones de campos plantados para híbridos de gusano de la raíz del maíz transgénicos debido a la inmigración de escarabajos así como emergencia directa de adultos de sistemas de raíces transgénicas. Han habido muchos informes que confirman la emergencia de gusanos de la raíz del maíz del oeste adultos de ciertos híbridos del gusano de la raíz transgénicos de maíz (Crowder et al. (2005) J. Econ. Entomol. 98:534-551). Otra publicación sugiere que los gusanos de la raíz del maíz del oeste adultos exhibirán similares comportamientos de alimentación cuando se encuentran con algunas plantas de maíz transgénicas o plantas de maíz no transgénicas en el campo y que es improbable que ciertas proteínas insecticidas en plantas transgénicas tendrán efectos significativos en adultos que podrían impactar la gestión de resistencia.

25 Por lo tanto, identificar los agentes de control de insectos alternativos con nuevos modos de acción sería beneficioso. Particularmente útil serían nuevos agentes de control de insectos que pueden ser tóxicos para múltiples etapas de la vida de la plaga de insectos objetivo. Dichos agentes de control de insectos pueden incluir aquellos que se dirigen a elementos genéticos, tales como los genes que son esenciales para el crecimiento y supervivencia de una plaga de insectos objetivos.

30 La organización de elementos de ADN reguladores en estructuras de cromatina precisas es importante para la replicación y transcripción de ADN *in vivo* (Lee et al. 1993. Cell 72:73-84; Felsenfeld (1992) Nature. 355:209). En células eucariota, el ADN nuclear existe como una jerarquía de estructuras de cromatina, resultando en la compactación de ADN nuclear alrededor de 10,000 veces (Davie y Hendzel. 1994. J. Cell. Biochem. 55:98). La unidad estructural de repetición en la forma de fibra de 10 nm extendida de cromatina es el nucleosoma (van Holde. 1988. Chromatin. New York: Springer-Verlag). El nucleosoma consiste en 146 pb de ADN envuelto alrededor de un núcleo de proteína de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, conocidas como las histonas de núcleo. Estas histonas están dispuestas como un tetrámero (H3-H4)₂ y dos dímeros H2A-H2B ubicados en cada cara del tetrámero. El ADN que se une a los nucleosomas se denomina ADN enlazante; es para el ADN enlazante al cual el H1 o histonas enlazantes se unen. La fibra de 10 nm se compacta adicionalmente en la fibra de 30 nm. Las histonas enlazantes y regiones amino-terminales ("colas") de las histonas de núcleo mantienen el pliegue de orden superior de la cromatina (García Ramirez et al. 1992. J. Biol Chem 267:19587). Esta estructura de cromatina debe estar relajada cuando el ADN se transcribe o traduce. Por lo tanto, las histonas son críticas para el procesamiento apropiado de ADN para muchos organismos vivos, incluyendo insectos.

45 La funcionalidad de la histona se modula naturalmente al nivel de la proteína por un número de mecanismos incluyendo metilación, que modula la represión transcripcional y acetilación, que aumenta en general la transcripción génica. Sin embargo, muy pocos estudios han informado el impacto de modular histonas al nivel génico, por ejemplo, al silenciar genes que codifican proteínas de histona utilizando moléculas de ARN de interferencia (ARNi). Boutros et al. (2004; Science 303:832-835) expusieron las células de *Drosophila* a moléculas de ARN de doble hebra (ARNdh) para evaluar la funcionalidad de casi todos los genes en el genoma de las células de *Drosophila* que incluye algunos genes de histona. El fenotipo que se puntuó fue la muerte celular. Los resultados de este estudio indican que el ARNdh dirigido a ciertos genes de histona conducen a la muerte de algunas células en dos líneas celulares de *Drosophila in vitro*. Sin embargo, el efecto de dirigir ciertos genes de histona en dichas líneas celulares de *Drosophila* no fue tan bueno como el ARNdh testigo positivo dirigido a un inhibidor del gen de la apoptosis (*IAP*).

60 Con el número muy limitado de estudios y la variabilidad de los resultados presentados por Boutros et al., no queda claro que todos los genes de histona sean igualmente susceptibles al silenciamiento por ARNi en cualquier organismo dado, particularmente en ciertas especies de insectos, incluyendo especies de plagas de coleópteros como *Diabrotica spp*. También es incierto que los genes de histona en una especie de plaga de *Diabrotica* puedan dirigirse como una estrategia de control de plagas. Más aun, es incluso más incierto que la expresión de dichas proteínas de histona puedan modularse utilizando moléculas de ARN de interferencia y, que si dicha expresión de proteínas puede modularse, si dicha modulación resultará en toxicidad a la plaga de *Diabrotica* objetivo.

65 La interferencia de ARN (ARNi) ocurre cuando un organismo reconoce las moléculas de ARN de doble hebra (ARNdh) y las hidroliza. Los productos de hidrólisis resultantes son pequeños fragmentos de ARN de

aproximadamente 19-24 nucleótidos de longitud, denominados ARN de interferencia pequeños (ARNip). Los ARNip luego se difunden o se transportan a través de todo el organismo, incluyendo en las membranas celulares, donde hibridan a ARNm (u otros ARN) y provocan la hidrólisis del ARN. Los ARN de interferencia son reconocidos por el complejo de silenciamiento de interferencia de ARN (RISC) en el cual se carga una hebra efectora (o "hebra guía") del ARN. Esta hebra guía actúa como una plantilla para el reconocimiento y destrucción de las secuencias dúplex. Este proceso se repite cada vez que el ARNip hibrida a su objetivo de ARN complementario, previniendo de manera efectiva que dichos ARNm sean traducidos y de este modo "silenciando" la expresión de genes específicos de los cuales se transcribieron los ARNm. La mayoría de las microARN (miARN) de plantas muestran un amplio apareo de bases con, y una escisión guía de, su ARNm objetivo (Jones-Rhoades et al. (2006) *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 19-53; Llave et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13401-13406). En otras instancias, los ARN de interferencia pueden unirse a las moléculas de ARN objetivo que tienen complementariedad imperfecta, provocando represión translacional sin degradación de ARNm. La mayoría de las miARN animal estudiadas hasta ahora parecen funcionar de este modo.

Existe una necesidad continua de composiciones y métodos para utilizar dichas composiciones que tienen actividad insecticida, por ejemplo para su uso en la protección de cultivos o el control de una enfermedad mediada por insectos. Las composiciones novedosas son requeridas para superar el problema de resistencia a insecticidas existentes y/o ayudar a mitigar el desarrollo de la resistencia a abordajes de plantas transgénicas existentes. Idealmente, dichas composiciones tienen una alta toxicidad y son efectivas cuando son ingeridas oralmente por la plaga objetivo y tienen aplicabilidad para su uso contra las etapas larval y adulta del insecto de la plaga. Por lo tanto, cualquier invención que proporcione composiciones en las cuales se mejore cualquiera de estas propiedades representaría un paso hacia adelante en la técnica.

COMPENDIO

Las necesidades esbozadas anteriormente son satisfechas por la invención que, en varias realizaciones, proporciona nuevos métodos para controlar las plagas de insectos económicamente importantes. La invención en parte comprende un método para inhibir la expresión de uno o más genes y proteínas objetivo en plagas de insectos tales como miembros del género *Diabrotica*. Específicamente, la invención comprende métodos para modular la expresión de uno o más genes de histona en especies *Diabrotica* tales como *Diabrotica virgifera virgifera* (gusano de la raíz del maíz del oeste), *Diabrotica barberi* (gusano de la raíz del maíz del norte), *Diabrotica undecimpunctata howardi* (gusano de la raíz del maíz del sur), *Diabrotica virgifera zea* (gusano de la raíz del maíz mexicano), *Diabrotica speciosa* (escarabajo del crisantemo) y especies relacionadas, que provoca el cese de la alimentación, crecimiento, desarrollo y reproducción, y eventualmente resulta en la muerte del insecto. El método comprende la introducción de una molécula de ARN de interferencia que comprende un ARN de doble hebra (ARNdh) o sus formas modificadas tales como ARN de interferencia pequeña (ARNip), en células o en el ambiente extracelular, tal como el estómago medio, dentro de un cuerpo del insecto de la plaga en donde el ARNdh o ARNsi ingresa a las células e inhibe la expresión de al menos uno o más genes de histona y en donde la inhibición de uno o más genes de histona ejerce un efecto nocivo en el insecto de la plaga. Se contempla específicamente que los métodos y composiciones de la invención serán útiles para limitar o eliminar la infestación de insectos de la plaga en o sobre cualquier planta al proporcionar una o más composiciones que comprenden moléculas de ARN de interferencia que comprenden moléculas de ARNdh o ARNip en la dieta de la plaga. La invención también proporciona moléculas de ARN de interferencia que cuando se entregan a una plaga de insectos inhiben, a través de un efecto tóxico, la capacidad de la plaga de insectos para sobrevivir, crecer, alimentarse y/o reproducir o limitar el daño relacionado con la plaga o pérdida a las plantas de cultivo. Dicha entrega puede ser a través de la producción del ARN de interferencia en una planta transgénica, por ejemplo, maíz o al aplicar tópicamente una composición que comprende el ARN de interferencia a una planta o semilla de planta, tal como una planta de maíz o semilla de maíz. La molécula de ARN de interferencia comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria para una secuencia de nucleótidos de un ARNm transcribible de un gen de histona o una porción de una secuencia de nucleótidos de un ARNm transcribible de un gen de histona del insecto de la plaga y de este modo inhibe la expresión del gen de *histona*, que provoca el cese de la alimentación, crecimiento, desarrollo, reproducción y eventualmente resulta en la muerte del insecto de la plaga. La invención se realiza adicionalmente para constructos de ácido nucleico, moléculas de ácido nucleico y vectores recombinantes que comprenden o codifican al menos un fragmento de una hebra de una molécula de ARN de interferencia de la invención. La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico químicas que comprenden una hebra antisentido de un ARNdh del ARN de interferencia ligado operablemente con una molécula precursora de microARN de la planta. La invención también proporciona precursores de microARN de planta artificial que comprenden una hebra antisentido de un ARNdh de un ARN de interferencia de la invención.

La invención proporciona además una molécula de ácido ribonucleico (ARN) de interferencia en donde el ARN comprende al menos un ARNdh en donde el ARNdh es una región de ARN de doble hebra que comprende hebras complementarias apareadas, una hebra que comprende una secuencia de al menos 21 nucleótidos contiguos que es al menos parcialmente complementaria con una secuencia de nucleótidos objetivo en un gen objetivo de histona *Diabrotica* spp y en donde la molécula de ARN de interferencia (i) es al menos 95% idéntica a al menos un fragmento de 21 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 47, o su complemento; o (ii) comprende al menos un fragmento de 19

nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 47, o su complemento; o (iii) comprende al menos un fragmento de 19 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 47, o su complemento, en donde la molécula de ARN de interferencia regula hacia abajo el gen objetivo de histona en un insecto *Diabrotica* objetivo. En algunas realizaciones, la molécula de interferencia puede comprender al menos dos ARNdh, en donde cada ARNdh comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos parcialmente complementaria con una secuencia de nucleótidos objetivo en el gen objetivo de histona. En realizaciones adicionales, cada uno de los ARNdh puede comprender una secuencia diferente de nucleótidos que es complementaria con una secuencia de nucleótidos objetivo diferente en el gen objetivo de histona.

La invención proporciona además composiciones que comprenden una o más moléculas de ARN de interferencia que comprenden dos o más moléculas de ARNdh de la invención, en donde dicha o dichas moléculas de ARN cada una comprende una hebra antisentido diferente o que comprende dos o más constructos de ácido nucleico o moléculas de ácido nucleico o precursores de microARN de planta artificial de la invención.

La invención proporciona además composiciones insecticidas para inhibir la expresión de un gen de histona de insectos *Diabrotica* que comprende un ARNdh de la invención y un portador agrícola aceptable. La inhibición de la expresión del gen de histona de *Diabrotica* conduce al cese de la alimentación y crecimiento y en última instancia resulta en la muerte del insecto *Diabrotica*.

La invención se realiza adicionalmente para plantas transgénicas que producen una o más moléculas de ARN de interferencia de la invención que están auto-protégidas contra el daño de alimentación de insectos y para métodos para utilizar las plantas solas o en combinación con otras estrategias de control de insectos para conferir las capacidades de control de insectos máximas. Las plantas y/o partes de plantas que producen una o más moléculas de ARN de interferencia de la invención o tratadas con una composición que comprende una o más moléculas de ARN de interferencia de la invención son altamente resistentes a la infestación de plagas de insectos. Por ejemplo, las plagas de coleópteros económicamente importantes en el género *Diabrotica* pueden controlarse por una planta que produce una molécula de ARN de interferencia de la invención o por una planta o semilla de planta que es tratada con una composición que comprende una molécula de ARN de interferencia de la invención.

La invención también proporciona un método para controlar un insecto *Diabrotica* que comprende poner en contacto el insecto *Diabrotica* con una molécula de ácido nucleico que es o es capaz de producir un ARN de interferencia de la invención para inhibir la expresión de un gen de *histona* en el insecto *Diabrotica* controlando de este modo el insecto *Diabrotica*.

En otros aspectos, la divulgación proporciona un método para reducir una población de insectos *Diabrotica* adultos en una planta transgénica que expresa una proteína Cry, una proteína Cry híbrida o proteína Cry modificada que comprende expresar en la planta transgénica una molécula de ácido nucleico que es o es capaz de producir un ARN de interferencia de la invención capaz de inhibir la expresión de un gen de *histona* en un insecto *Diabrotica* adulto reduciendo así la población del insecto *Diabrotica* adulto.

En otros aspectos, la invención proporciona un método para reducir el desarrollo de la resistencia en una población de insectos *Diabrotica* a un ARN de interferencia de la invención, comprendiendo el método expresar en una planta transgénica alimentada por una población de insectos *Diabrotica* un ARN de interferencia de la invención que es capaz de inhibir la expresión de un gen de *histona* en un insecto *Diabrotica* larval y adulto, reduciendo así el desarrollo de la resistencia en la población de insectos *Diabrotica* en comparación con una población de insectos *Diabrotica* expuesta a un ARN de interferencia capaz de inhibir la expresión de un gen de *histona* sólo en la etapa larval o etapa adulta de un insecto *Diabrotica*.

En otros aspectos, la divulgación proporciona un método para reducir el nivel de un ARN objetivo transcribible de un gen de *histona* en un insecto *Diabrotica* que comprende poner en contacto el insecto *Diabrotica* con una composición que comprende una molécula de ARN de interferencia de la invención, en donde la molécula de ARN de interferencia reduce el nivel del ARN objetivo en una célula del insecto *Diabrotica*.

En aun otros aspectos, la invención proporciona un método para conferir tolerancia del insecto *Diabrotica* a una planta o parte de la misma, que comprende introducir en la planta o parte de la misma, una molécula de ARN de interferencia, una molécula de ARNdh, un constructo de ácido nucleico, una molécula de ácido nucleico quimérica, una molécula precursora de microARN de planta artificial y/o una composición de la invención, confiriendo así a la planta o parte de la misma tolerancia al insecto *Diabrotica*.

En aspectos adicionales, la divulgación proporciona un método para reducir el daño a la raíz de una planta con la que se alimenta un insecto *Diabrotica*, que comprende introducir en células de la planta una molécula de ARN de interferencia, un ARNdh, una molécula de ácido nucleico, un constructo de ácido nucleico, una molécula de ácido nucleico quimérica, una molécula precursora de microARN de planta artificial y/o una composición de la invención, reduciendo así el daño a la raíz a la planta con la que se alimenta un insecto *Diabrotica*.

En otros aspectos, la invención proporciona un método para producir una célula de planta transgénica que tiene toxicidad para un insecto *Diabrotica*, que comprende introducir en células de la planta una molécula de ARN de interferencia, un ARNdh, una molécula de ácido nucleico, un constructo de ácido nucleico, una molécula de ácido nucleico quimérica, una molécula precursora de microARN de planta artificial y/o una composición de la invención, produciendo así la célula de planta transgénica que tiene toxicidad para el insecto *Diabrotica* en comparación con una célula de planta testigo.

En aspectos adicionales, la invención proporciona un método para producir una planta transgénica que tiene tolerancia mejorada para el daño por la alimentación del insecto *Diabrotica*, que comprende introducir en una planta una molécula de ARN de interferencia, un ARNdh, una molécula de ácido nucleico, un constructo de ácido nucleico, una molécula de ácido nucleico quimérica, una molécula precursora de microARN de planta artificial y/o una composición de la invención, produciendo así una planta transgénica que tiene tolerancia mejorada para el daño por la alimentación del insecto *Diabrotica* en comparación con una planta testigo.

En otros aspectos, la invención proporciona un método para mejorar el control de una población de insectos *Diabrotica* que comprende proporcionar una planta transgénica o semilla transgénica de la invención y aplicar a la planta transgénica o la semilla transgénica un plaguicida químico que es insecticida para un insecto *Diabrotica*, mejorando así el control de la población de insectos *Diabrotica*.

En otros aspectos, la divulgación proporciona un método para proporcionar a un cultivador de maíz un medio para controlar una población de plaga de insectos *Diabrotica* por debajo del umbral económico en un cultivo de maíz que comprende (a) vender o proporcionar al cultivador una semilla de maíz transgénica que comprende un ARNdh, una molécula de ácido nucleico, un constructo de ácido nucleico, una molécula de ácido nucleico quimérica, una molécula precursora de microARN de planta artificial y/o una composición de la invención; y (b) explicar al cultivador que la semilla de maíz transgénica produce plantas de maíz transgénicas capaces de controlar una población de plaga de insectos *Diabrotica*.

Estos y otros aspectos de la invención se establecen en mayor detalle en la siguiente descripción de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una alineación de las secuencias que codifican (CDS) la histona H2B de *Diabrotica*. Un “*” por debajo de una base (A, T, G o C) indica una base idéntica como en la secuencia de referencia. Las bases que son diferentes de la secuencia de referencia se indican con un “.”. La alineación se creó utilizando métodos similares a Edgar, 2004. (Nucleic Acids Res 32(5): 1792-97).

La Figura 2 es una alineación de las secuencias que codifican (CDS) la histona H4 de *Diabrotica*. Un “*” por debajo de una base (A, T, G o C) indica una base idéntica como en la secuencia de referencia. Las bases que son diferentes de la secuencia de referencia se indican con un “.”. La alineación se creó utilizando métodos similares a Edgar, 2004. (Nucleic Acids Res 32(5): 1792-97).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS EN LA LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 es una secuencia de nucleótidos de un ADNc de histona H4 (*DvH4*) del gusano de la raíz del maíz del oeste incluyendo las regiones sin traducir (UTR) 5' y 3'.

SEQ ID NO: 2 es una secuencia de nucleótidos de la región de codificación de *DvH4* comprendida en la SEQ ID NO:1.

SEQ ID NO: 3 es una secuencia de nucleótidos de hebra sentido de un ARNm transcribible de un gen *DvH4*.

SEQ ID NO: 4 es una secuencia antisentido de ARNm de *DvH4* designada *DvH4**.

SEQ ID NO: 5 es una secuencia de nucleótidos de ADNc de histona H2B (*DvH2B*) del gusano de la raíz del maíz del oeste incluyendo las regiones sin traducir (UTR) 5' y 3'.

SEQ ID NO: 6 es una secuencia de nucleótidos de la región de codificación de *DvH2B* comprendida en la SEQ ID NO:5.

SEQ ID NO: 7 es una secuencia de nucleótidos de hebra sentido de un ARNm transcribible de un gen *DvH2B*.

SEQ ID NO: 8 es una hebra antisentido de ARNm de *DvH2B* designada *DvH2B**.

SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de *DvH4* codificada por la SEQ ID NO:2.

ES 2 726 674 T3

- SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de DvH2B codificada por la SEQ ID NO:6.
- SEQ ID NO: 11-14 son ejemplos de las 291 secuencias de 19-mero de ARNm de *DvH4* (SEQ ID NO:3) que son posibles objetivos del ARNip.
- 5 SEQ ID NO: 15-18 son ejemplos de las 351 subsecuencias de 19-mero de ARNm de DvH2B (SEQ ID NO:7) que son posibles objetivos del ARNip.
- SEQ ID NO: 19-22 son ejemplos de secuencias de 19-mero de ARNip anti-sentido de DvH4*.
- 10 SEQ ID NO: 23-26 son ejemplos de secuencias de 19-mero de ARNip anti-sentido de DvH2B*.
- SEQ ID NO: 27 es una variante 1 de una secuencia de nucleótidos de un ADNc de histona H4 (*DuH4-1*) del gusano de la raíz del maíz del sur incluyendo las regiones sin traducir (UTR) 5' y 3'.
- 15 SEQ ID NO: 28 es una secuencia de nucleótidos de la región de codificación de *DuH4-1* comprendida en la SEQ ID NO:27.
- SEQ ID NO: 29 es una secuencia de nucleótidos de hebra sentido de un ARNm transcribible de un gen *DuH4* (ARNm de DuH4-1).
- 20 SEQ ID NO: 30 es una secuencia antisentido de ARNm de DuH4-1 designada DuH4-1*.
- SEQ ID NO: 31 es una variante 2 de una secuencia de nucleótidos de un ADNc de histona H4 (*DuH4-2*) del gusano de la raíz del maíz del sur incluyendo las regiones sin traducir (UTR) 5' y 3'.
- 25 SEQ ID NO: 32 es una secuencia de nucleótidos de la región de codificación de *DuH4-2* comprendida en la SEQ ID NO:31.
- SEQ ID NO: 33 es una secuencia de nucleótidos de hebra sentido de un ARNm transcribible de un gen *DuH4* (ARNm de DuH4-2).
- 30 SEQ ID NO: 34 es una hebra antisentido de ARNm de DuH4 designada DuH4-2*.
- SEQ ID NO: 35 es la secuencia de aminoácidos DuH4 codificada por la SEQ ID NO:28 y la SEQ ID NO: 32.
- 35 SEQ ID NO: 36 es una secuencia de nucleótidos de un ADNc de histona H2B (*DuH2B*) del gusano de la raíz del maíz del sur incluyendo las regiones sin traducir (UTR) 5' y 3'.
- SEQ ID NO: 37 es una secuencia de nucleótidos de la región de codificación de *DuH2B* comprendida en la SEQ ID NO:36.
- 40 SEQ ID NO: 38 es una secuencia de nucleótidos de hebra sentido de un ARNm transcribible de un gen *DuH2B*.
- SEQ ID NO: 39 es una secuencia antisentido de ARNm de *DuH2B* designada DuH2B*.
- 45 SEQ ID NO: 40 es la secuencia de aminoácidos DuH2B codificada por la SEQ ID NO:37.
- SEQ ID NO: 41 es una secuencia de nucleótidos de un ADNc de histona H4 (*DbH4*) del gusano de la raíz del maíz del norte incluyendo las regiones sin traducir (UTR) 5' y 3'.
- 50 SEQ ID NO: 42 es una secuencia de nucleótidos de la región de codificación de *DbH4* comprendida en la SEQ ID NO:41.
- SEQ ID NO: 43 es una secuencia de nucleótidos de hebra sentido de un ARNm transcribible de un gen *DbH4*.
- 55 SEQ ID NO: 44 es una secuencia antisentido de ARNm de *DbH4* designada DbH4*.
- SEQ ID NO: 45 es la secuencia de aminoácidos DbH4 codificada por la SEQ ID NO:42.
- 60 SEQ ID NO: 46 es una secuencia de nucleótidos de un ADNc de histona H4 (*DbH2B*) del gusano de la raíz del maíz del norte incluyendo las regiones sin traducir (UTR) 5' y 3'.
- SEQ ID NO: 47 es una secuencia de nucleótidos de la región de codificación de *DbH2B* comprendida en la SEQ ID NO:46.
- 65

SEQ ID NO: 48 es una secuencia de nucleótidos de hebra sentido de un ARNm transcribible de un gen *DbH2B*.

SEQ ID NO: 49 es una secuencia antisentido de ARNm de *DbH2B* designada *DbH2B**.

5 SEQ ID NO: 50 es la secuencia de aminoácidos *DbH2B* codificada por la SEQ ID NO:47.

SEQ ID NO: 51-58 son cebadores útiles para la invención.

10 SEQ ID NO: 59 es un cassette de expresión que comprende el promotor constitutivo *prUbi1-18* (Christensen et al, 1992, PMB 18: 675), el terminador *tZmUbi361-01* (Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US-2012-0198584) y capaz de formar una molécula de H2B de ARNdh de WCR que comprende la SEQ ID NO: 6 (DvH2B) y la SEQ ID NO: 7 (DvH2B*) y el intrón *AthBAF60-01*.

15 SEQ ID NO: 60 es un cassette de expresión que comprende el promotor constitutivo *prUbi1-18*, el terminador *tZmUbi361-01* y capaz de formar una molécula de H4 de ARNdh de WCR que comprende la SEQ ID NO: 3 (DvH4) y la SEQ ID NO: 4 (DvH4*) y el intrón *AthBAF60-01*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

20 La siguiente es una descripción detallada de la invención proporcionada para ayudar a los expertos en la técnica a poner en práctica la invención. La presente descripción no pretende ser un catálogo detallado de todos los modos diferentes en los cuales la invención puede implementarse o todas las características que pueden agregarse a la presente invención. Por ejemplo, las características ilustradas con respecto a una realización pueden incorporarse en otras realizaciones y las características ilustradas con respecto a una realización particular pueden eliminarse de esa realización.

25 A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen los mismos significados, tal como lo entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. La terminología utilizada en la descripción de la invención en la presente es a efectos de describir realizaciones particulares solamente y no pretende ser restrictiva de la invención.

30 Para claridad, ciertos términos utilizados en la memoria descriptiva se definen y presentan de la siguiente forma:

35 Tal como se utiliza en la presente, "un", "uno/una" o "el/la" pueden significar uno o más de uno. Por ejemplo, "una célula" puede significar una única célula o una multiplicidad de células.

Tal como se utiliza en la presente, "y/o" se refiere a y abarca cualquier combinación posible de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa (o).

40 Además, el término "aproximadamente", tal como se utiliza en la presente cuando se refiere a un valor mensurable tal como una cantidad de un compuesto o agente, dosificación, tiempo, temperatura y similar, significa que abarca variaciones de $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0.5\%$ o incluso $\pm 0.1\%$ de la cantidad especificada.

45 Tal como se utiliza en la presente, la expresión transicional "que consiste esencialmente en" significa que debe interpretarse que el alcance de una reivindicación abarca los materiales o etapas especificados descritos en la reivindicación y aquellos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la invención reivindicada. Por lo tanto, la expresión "que consiste esencialmente en" cuando se utiliza en una reivindicación de la presente invención no pretende interpretarse como equivalente a "que comprende".

50 Tal como se utiliza en la presente "ARNdh" o "ARNi" se refiere a una estructura de polirribonucleótidos formada por una hebra de ARN auto-complementaria única o al menos por dos hebras de ARN complementarias. El grado de complementariedad, en otras palabras la identidad porcentual, no necesita ser necesariamente 100%. Por el contrario, debe ser suficiente para permitir la formación de una estructura de doble hebra en las condiciones empleadas. Tal como se utiliza en la presente la expresión "completamente complementario" significa que todas las bases de la secuencia de nucleótidos de la ARNdh son complementarias con o "coinciden" con las bases de la secuencia de nucleótidos objetivo. La expresión "al menos parcialmente complementaria" significa que hay menos de 100% de coincidencia entre las bases de ARNdh y las bases de la secuencia de nucleótidos objetivo. Un experto en la técnica comprenderá que ARNdh necesita sólo ser al menos parcialmente complementario con la secuencia de nucleótidos objetivo para mediar una regulación hacia abajo de la expresión del gen objetivo. Se conoce en la técnica que las secuencias de ARN con inserciones, eliminaciones y no coincidencias con respecto a la secuencia objetivo aun pueden ser efectivas en ARNi. De acuerdo con la invención actual, se prefiere que el ARNdh y la secuencia de nucleótidos objetivo del gen objetivo comparta al menos 80% u 85% de identidad secuencial, preferiblemente al menos 90% o 95% de identidad secuencial, o más preferiblemente al menos 97% o 98% de identidad secuencial y aun más preferiblemente al menos 99% de identidad secuencial. Alternativamente, el ARNdh puede comprender 1, 2 o 3 no coincidencias en comparación con la secuencia de nucleótidos objetivo en cada longitud de 24 nucleótidos parcialmente complementarios. Un experto en la técnica apreciará que el grado de

complementariedad compartido entre el ARNdh y la secuencia de nucleótidos objetivo puede variar dependiendo del gen objetivo a ser regulado hacia abajo o dependiendo de la especie de plaga de insectos en la cual la expresión del gen será controlada.

- 5 Se apreciará que el ARNdh puede comprender o consistir en una región de ARN de doble hebra que comprende hebras complementarias apareadas, una hebra de la misma, la hebra sentido, comprende una secuencia de nucleótidos al menos parcialmente complementaria con una secuencia de nucleótidos objetivo en un gen objetivo.

10 La secuencia de nucleótidos objetivo puede seleccionarse de cualquier región o secuencia de nucleótidos adecuada del gen objetivo o transcripto de ARN de la misma. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos objetivo puede ubicarse en la 5'UTR o 3'UTR del gen objetivo o transcripto de ARN o en regiones exónicas o intrónicas del gen. El experto en la técnica será consciente de los métodos para identificar las secuencias de nucleótido objetivo más adecuadas en el contexto del gen objetivo de longitud completa. Por ejemplo, múltiples ARNdh que se dirigen a diferentes regiones del gen objetivo pueden sintetizarse y evaluarse. Alternativamente, la digestión del transcripto de ARN con enzimas tales como ARNsin H puede utilizarse para determinar sitios en el ARN que están en una conformación susceptible con el silenciamiento del gen. También pueden identificarse sitios objetivos utilizando abordajes *in silico*, por ejemplo, el uso de algoritmos computarizados diseñados para predecir la eficacia del silenciamiento de genes en base a apuntar a diferentes sitios en el gen de longitud completa.

20 Preferiblemente, la identidad porcentual de un polirribonucleótido se determina mediante análisis GAP (programa GCG) (Needleman y Wunsch, 1970) utilizando las configuraciones por defecto, en donde la secuencia de consulta es de al menos aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud, y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos aproximadamente 21 nucleótidos. En otra realización, la secuencia de consulta es al menos 150 nucleótidos de longitud y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 150 nucleótidos. En una realización adicional, la secuencia de consulta es al menos 300 nucleótidos de longitud y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 300 nucleótidos. En aun otra realización, la secuencia de consulta corresponde a la longitud completa del ARN objetivo, por ejemplo ARNm y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre la longitud completa del ARN objetivo.

30 De manera conveniente, el ARNdh puede producirse a partir de un único marco de lectura abierto en una célula huésped recombinante, en donde las secuencias sentido y anti-sentido se flanquean por una secuencia no relacionada que permite a las secuencias sentido y anti-sentido hibridarse para formar la molécula de ARNdh con la secuencia no relacionada que forma una estructura de bucle. Alternativamente, la hebra sentido y hebra antisentido pueden realizarse sin un marco de lectura abierto para asegurar que ninguna proteína será realizada en la célula huésped transgénica. Las dos hebras también pueden expresarse por separado como dos transcriptos, uno que codifica la hebra sentido y uno que codifica la hebra antisentido.

40 La formación dúplex de ARN puede ser iniciada ya sea dentro o fuera de la célula. El ARNdh puede ser parcialmente o completamente de doble hebra. El ARN puede sintetizarse enzimáticamente o químicamente, ya sea *in vitro* o *in vivo*.

45 El ARNdh no necesita ser de longitud completa con respecto al producto de transcripción primario o ARN completamente procesado. En general, la identidad más alta puede utilizarse para compensar el uso de una secuencia más corta. Más aun, el ARNdh también puede comprender regiones de única hebra, por ejemplo, el ARNdh puede ser parcialmente o completamente de doble hebra. La región de doble hebra del ARNdh puede tener una longitud de al menos aproximadamente 18 a aproximadamente 25 pares de bases, opcionalmente una secuencia de aproximadamente 18 a aproximadamente 50 pares de bases, opcionalmente una secuencia de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 pares de bases, opcionalmente una secuencia de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 pares de bases, opcionalmente una secuencia de aproximadamente 200 a aproximadamente 500 y opcionalmente una secuencia de aproximadamente 500 a aproximadamente 1000 o más pares de bases, hasta una molécula que es de doble hebra para su longitud completa, que corresponde en tamaño a una molécula de ARN objetivo de longitud completa.

55 El ARNdh puede contener análogos de nucleótidos conocidos o residuos o enlaces de estructura principal modificada, que son sintéticos, naturales y no naturales. Ejemplos de dichos análogos incluyen, a modo no taxativo, fosforotioatos, fosforamidatos, metilfosfonatos, quiralmetilfosfonatos y 2-O-metil ribonucleótidos.

60 Tal como se utiliza en la presente, la expresión "específicamente reduce el nivel de un ARN objetivo y/o la producción de una proteína objetivo codificada por el ARN" y variaciones de la misma, se refieren a la secuencia de una porción de una hebra del ARNdh siendo suficientemente idéntica al ARN objetivo de modo que la presencia del ARNdh en una célula reduce el nivel del estado estable y/o la producción de dicho ARN. En muchas instancias, el ARN objetivo será ARNm y la presencia del ARNdh en una célula que produce el ARNm resultará en una reducción en la producción de dicha proteína. Preferiblemente, esta acumulación o producción se reduce al menos 10%, más preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 75%, incluso más preferiblemente al menos 95% y más preferiblemente 100%, cuando se compara con una célula natural.

Las consecuencias de la inhibición pueden confirmarse por el examen de las propiedades hacia afuera de la célula u organismo o por las técnicas bioquímicas tales como, a modo no taxativo, hibridación Northern, transcripción inversa, monitoreo de la expresión génica con un microensayo, unión de anticuerpos, ensayo inmunoabsorbente conectado a enzima (ELISA), Western blot, radioinmunoensayo (RIA) y otros inmunoensayos.

5 a. Los ARN de interferencia de la presente invención pueden comprender un ARNdh o múltiples ARNdh, en donde cada ARNdh comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos que es al menos parcialmente complementaria con una secuencia de nucleótidos objetivo en el gen de histona objetivo y que funciona tras la captación por una especie de plaga de insectos para regular hacia abajo la expresión de dicho gen de histona objetivo. Los constructos de ARN concatémico de este tipo se describen en el documento WO2006/046148. En el contexto de la presente invención, el término "múltiple" significa al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, etc. y hasta al menos 10, 15, 20 o al menos 30. En una realización, el ARN de interferencia comprende múltiples copias de un único ARNdh es decir repeticiones de un ARNdh que se une a una secuencia de nucleótidos objetivo particular dentro de un gen de histona objetivo específico. En otra realización, el ARNdh en el ARN de interferencia comprende o consiste en diferentes secuencias de nucleótidos complementarias para diferentes secuencias de nucleótidos objetivo. Cabe aclarar que las combinaciones de múltiples copias del mismo ARNdh combinadas con ARNdh que se unen a diferentes secuencias de nucleótidos objetivo se encuentran en el alcance de la presente invención.

20 b. El ARNdh puede disponerse como una región contigua del ARN de interferencia o puede estar separado por la presencia de secuencias enlazantes. La secuencia enlazante puede comprender una secuencia de nucleótidos aleatoria corta que no es complementaria con ninguna secuencia de nucleótidos objetivo o genes objetivo. En una realización, el enlazante es una secuencia de ARN de auto-escisión condicionalmente, preferiblemente un enlazante sensible a pH o un enlazante sensible a hidrófobos. En una realización, el enlazante comprende una secuencia de nucleótidos equivalente a una secuencia intrónica. Las secuencias enlazantes de la presente invención pueden estar en el rango de longitud de aproximadamente 1 par de bases a aproximadamente 10000 pares de bases, siempre que el enlazantes no afecte la capacidad del ARN de interferencia de regular hacia abajo la expresión de los genes de histona objetivo.

30 Además de ARNdh y cualquier secuencia enlazante, el ARN de interferencia de la invención puede comprender al menos una secuencia de polinucleótidos adicional. En diferentes realizaciones de la invención, la secuencia adicional se elige de (i) una secuencia capaz de proteger el ARN de interferencia contra el procesamiento de ARN, (ii) una secuencia que afecta la estabilidad del ARN de interferencia, (iii) una secuencia que permite la unión de proteínas, por ejemplo para facilitar la captación del ARN de interferencia por células de la especie de plaga de insectos, (iv) una secuencia que facilita la producción a gran escala del ARN de interferencia, (v) una secuencia que es un aptámero que se une a un receptor o a una molécula en la superficie de las células de plaga de insectos para facilitar la captación o (v) una secuencia que cataliza el procesamiento del ARN de interferencia en las células de la plaga de insectos y mejora de este modo la eficacia del ARN de interferencia. Las estructuras para mejorar la estabilidad de las moléculas de ARN son bien conocidas en la técnica y se describen en más detalle en el documento WO2006/046148.

40 El ARN de interferencia puede contener bases de ADN, bases no naturales o enlaces de estructura principal no natural o modificaciones de la estructura principal de azúcar-fosfato, por ejemplo para mejorar la estabilidad durante el almacenamiento o mejorar la resistencia a la degradación por nucleasas. Más aun, el ARN de interferencia puede producirse químicamente o enzimáticamente por un experto en la técnica a través de reacciones manuales o automatizadas. Alternativamente, el ARN de interferencia puede transcribirse de un polinucleótido que codifica el mismo. Por lo tanto, en la presente se proporciona un polinucleótido aislado que codifica cualquiera de los ARN de interferencia de la presente invención.

50 Los microARN (miARN) son ARN que no codifican proteínas, en general de entre aproximadamente 18 y aproximadamente 25 nucleótidos de longitud (comúnmente aproximadamente 20-24 nucleótidos de longitud en plantas). Estos miARN dirigen la escisión en *trans* de transcritos objetivo, regulando de manera negativa la expresión de genes que participan de varias vías de regulación y desarrollo (Bartel, *Cell*, 116:281-297 (2004); Zhang et al. *Dev. Biol.* 289:3-16 (2006)). Como tales, los miARN han demostrado participar en diferentes aspectos del crecimiento de plantas y desarrollo así como en la transducción de señales y degradación de proteínas. Además, pequeños ARNm endógenos incluyendo miARN también pueden participar en las respuestas de estrés biótico tal como ataque de patógenos. Ya que los primeros miARN fueron descubiertos en plantas (Reinhart et al. *Genes Dev.* 16:1616-1626 (2002), Park et al. *Curr. Biol.* 12:1484-1495 (2002)) se han identificado muchos cientos. Más aun muchos miARN de plantas han demostrado ser altamente conservados en taxones muy divergentes. (Floyd et al. *Nature* 428:485-486 (2004); Zhang et al. *Plant J.* 46:243-259 (2006)). Muchos genes de microARN (genes MIR) han sido identificados y se han hecho públicamente disponibles en una base de datos (miRBase; microrna.sanger.ac.uk/sequences). Los miARN también se describen en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos 2005/0120415 y 2005/144669A1.

65 Los genes que codifican miARN proporcionan miARN primarios (denominados un "pri-miARN") de 70 a 300 pb de longitud que pueden formar estructuras de tallo-bucle imperfectas. Un único pri-miARN puede contener de uno a varios precursores de miARN. En animales, los pri-miARN se procesan en el núcleo en ARN de horquilla más cortos

- de aproximadamente 65 nt (pre-miARN) por la enzima RNasIII Drosha y su cofactor DGCR8/Pasha. El pre-miARN se exporta entonces al citoplasma, donde se procesa adicionalmente por otra enzima RNasIII, Dicer, liberando un dúplex miARN/miARN* de aproximadamente 22 nt de tamaño. A diferencia de los animales, en plantas, el procesamiento de pri-miARN en miARN maduros ocurre completamente en el núcleo utilizando una única enzima RNasIII, DCL1 (similar a Dicer 1). (Zhu. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:9851-9852 (2008)). Muchos informes sobre la biogénesis y función de microARN están disponibles, por ejemplo, ver Bartel *Cell* 116:281-297 (2004), Murchison et al. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16:223-229 (2004), Dugas et al. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:512-520 (2004) y Kim *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6:376-385 (2005).
- La expresión "molécula precursora del microARN de planta" tal como se utiliza en la presente describe una pequeña (~70-300 nt) secuencia de ARN no codificante que se procesa por enzimas de plantas para proporcionar un producto de nucleótido de ~19-24 conocido como una secuencia de microARN madura. Las secuencias maduras tienen papeles reguladores a través de complementariedad para el ARN mensajero (ARNm). La expresión "molécula precursora de microARN de planta artificial" describe la secuencia precursora de miARN no codificante antes de procesar que se emplea como una secuencia de estructura principal para la entrega de una molécula ARNip a través de la sustitución del dúplex miARN/miARN* nativo endógeno de la molécula precursora miARN con la de un miARN heterólogo no nativo (amiARN/amiARN*; por ejemplo ARNip/ARNip*) que luego se procesa en la secuencia de miARN madura con la secuencia de ARNip.
- En el contexto de la invención, el término "tóxico" utilizado para describir un ARNdh de la invención significa que las moléculas de ARNdh de la invención y combinaciones de dichas moléculas de ARNdh funcionan como agentes de control de insectos oralmente activos que tienen un efecto negativo en un insecto. Cuando se entrega una composición de la invención al insecto, el resultado es típicamente la muerte del insecto o el insecto no se alimenta de la fuente que hace la composición disponible para el insecto. Dicha composición puede ser una planta transgénica que expresa el ARNdh de la invención.
- Una "secuencia de codificación" es una secuencia de ácido nucleico que se transcribe en ARN tal como ARNm, ARNr, ARNt, ARNpn, ARN sentido o ARN antisentido. Preferiblemente el ARN se traduce entonces en un organismo para producir una proteína.
- Tal como se utiliza en la presente, polinucleótidos "complementarios" son aquellos que son capaces de aparearse en bases de acuerdo con las reglas de complementariedad Watson-Crick estándar. Específicamente, las purinas tendrán pares de bases con pirimidinas para formar una combinación de guanina apareada con citosina (G:C) y adenina apareada con ya sea timina (A:T) en el caso de ADN o adenina apareada con uracilo (A:U) en el caso de ARN. Por ejemplo, la secuencia "A-G-T" se une a la secuencia complementaria "T-C-A." Se comprende que dos polinucleótidos pueden hibridarse entre sí incluso si no son completamente complementarios entre sí, siempre que cada uno tenga al menos una región que es básicamente complementaria con la otra.
- Los términos "complementario" o "complementariedad" tal como se utilizan en la presente se refieren a la unión natural de polinucleótidos en condiciones de sal y temperatura permisivas por apareamiento de bases. La complementariedad entre dos moléculas de única hebra puede ser "parcial", en donde sólo algunos de los nucleótidos se unen o puede ser completa cuando la complementariedad total existe entre las moléculas de única hebra. El grado de complementariedad entre las hebras de ácido nucleico tiene efectos significativos en la eficiencia y resistencia de la hibridación entre hebras de ácido nucleico.
- Tal como se utiliza en la presente las expresiones "básicamente complementaria" o "parcialmente complementaria" significan que dos secuencias de ácido nucleico son complementarias al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de sus nucleótidos. En algunas realizaciones, las dos secuencias de ácido nucleico pueden ser complementarias al menos en un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de sus nucleótidos. Las expresiones "básicamente complementaria" y "parcialmente complementaria" también pueden significar que dos secuencias de ácido nucleico pueden hibridarse en condiciones de alta rigurosidad y que dichas condiciones son bien conocidas en la técnica.
- "Controlar" insectos significa inhibir, a través de un efecto tóxico, la capacidad de una o más plagas de insectos de sobrevivir, crecer, alimentarse y/o reproducirse o limitar el daño relacionado con insectos o pérdida en plantas de cultivo. "Controlar" insectos puede o no significar matar los insectos, aunque significa preferiblemente matar los insectos.
- "Entregar" una composición o ARNdh significa que la composición o ARNdh se pone en contacto con un insecto, resultando en un efecto tóxico y control del insecto. La composición o ARNdh puede entregarse en muchos modos reconocidos, por ejemplo, oralmente por ingestión por un insecto a través de la expresión de la planta transgénica, composiciones formuladas, composiciones pulverizables, un matriz cebo o cualquier otro sistema de entrega de tóxicos reconocida en la técnica.
- "*Diabrotica*" es un género de escarabajos comúnmente denominado "gusanos de la raíz del maíz" o "escarabajos del pepino." Los insectos *Diabrotica* que son plagas de plantas de cultivo, incluyen a modo no taxativo, *Diabrotica*

barberi (gusano de la raíz del maíz del norte; NCR), *D. virgifera virgifera* (gusano de la raíz del maíz del oeste; WCR), *D. undecimpunctata howardii* (gusano de la raíz del maíz del sur; SCR) y *D. virgifera zea* (gusano de la raíz del maíz de México; MCR). En el contexto de la invención, la expresión "gusano de la raíz del maíz" o "escarabajo del pepino" es intercambiable con el término "*Diabrotica*".

5 Una "etapa de vida de *Diabrotica*" o "etapa de vida del gusano de la raíz del maíz" significa la forma de desarrollo de huevo, larva, pupa o adulto de una especie *Diabrotica*.

10 "Cantidad efectiva para controlar insectos" significa la concentración de ARNdh que inhibe a través de un efecto tóxico, la capacidad de insectos de sobrevivir, crecer, alimentarse y/o reproducir o limitar el daño relacionado con insectos o pérdida en plantas de cultivo. "Cantidad efectiva para controlar insectos" puede o no significar una concentración que mata los insectos, aunque preferiblemente significa que mata los insectos.

15 "Cassette de expresión" tal como se utiliza en la presente significa una secuencia de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de una secuencia de ácido nucleico particular en una célula huésped apropiada que comprende un promotor ligado operablemente a la secuencia de ácido nucleico de interés que está ligada operablemente a las secuencias señal de terminación. También comprende típicamente secuencias requeridas para la traducción apropiada de la secuencia de ácido nucleico. El cassette de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico de interés puede ser quimérica, lo que significa que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El cassette de expresión también puede ser uno que es natural pero que ha sido obtenido en una forma recombinante útil para la expresión heteróloga. Sin embargo, típicamente, el cassette de expresión es heterólogo con respecto al huésped, es decir, la secuencia de ácido nucleico particular del cassette de expresión no ocurre naturalmente en la célula huésped y debe ser introducida en la célula huésped o un ancestro de la célula huésped por un evento de transformación. La expresión de la secuencia de ácido nucleico en el cassette de expresión puede ser bajo el control de, por ejemplo, un promotor constitutivo o de un promotor inducible que inicia la transcripción sólo cuando la célula huésped se expone a algún estímulo externo particular. En el caso de un organismo multicelular, tal como una planta, el promotor también puede ser específico a un tejido particular, u órgano, u etapa de desarrollo.

20 30 Un "gen" es una región definida que está ubicada en un genoma y que, además de la secuencia de codificación antemencionada, comprende otras secuencias de ácido nucleico principalmente reguladoras responsables por el control de la expresión, es decir la transcripción y traducción de la porción codificante. Un gen también puede comprender otras secuencias sin traducir 5' y 3' y secuencias de terminación. Elementos adicionales que pueden estar presentes son, por ejemplo, intrones.

35 Tal como se utiliza en la presente, el término "cultivador" significa una persona o entidad que está comprometida con la agricultura, criar organismos vivos, tales como plantas de cultivo, por ejemplo maíz, para alimentos, pienso o materia prima.

40 Una secuencia de ácido nucleico "heteróloga" es una secuencia de ácido nucleico no asociada naturalmente con una célula huésped en la cual se introduce, incluyendo múltiples copias no naturales de secuencia de ácido nucleico natural.

45 Las histonas son proteínas altamente alcalinas encontradas en núcleos eucariotas que empaquetan y ordenan el ADN en unidades estructurales denominadas nucleosomas. Son los componentes de proteína principales de la cromatina y juegan un papel importante en la regulación génica. Las histonas H2A, H2B, H3 y H4 son las histonas núcleo y forman el núcleo del nucleosoma, que comprende dos dímeros H2A-H2B y un tetramero H3-H4. Las cuatro histonas núcleo son relativamente similares en estructura y proporcionan un dominio globular principal y una cola N terminal larga. Las histonas núcleo son sometidas a modificación covalente, incluyendo acetilación y metilación, que pueden alterar la expresión de genes ubicados en ADN asociado con su octámero de histona base.

50 Una secuencia de ácido nucleico "homóloga" es una secuencia de ácido nucleico naturalmente asociada con una célula huésped en la cual se introduce.

55 "Insecticida" se define como una actividad biológica tóxica capaz de controlar insectos, preferiblemente matarlos.

Una molécula de ácido nucleico o secuencia de nucleótidos o constructo de ácido nucleico o molécula de ARNdh o proteína "aislados" de la invención existen en general apartados de su ambiente nativo y no son por lo tanto un producto de la naturaleza. Una molécula de ácido nucleico o secuencia de nucleótidos o constructo de ácido nucleico o molécula de ARNdh o proteína aislados pueden existir en una forma purificada o pueden existir en un ambiente no nativo tal como, por ejemplo, un huésped recombinante o célula huésped tal como una planta transgénica o célula de planta transgénica.

60 65 En el contexto de la invención, un número delante del sufijo "mero" indica un número específico de subunidades. Cuando se aplica a ARN o ADN, este especifica el número de bases en la molécula. Por ejemplo, una subsecuencia de 19 nucleótidos de un ARNm que tiene la secuencia ACUGGUCGCGUUGCAUGCU es un "19-mero".

Una "planta" es cualquier planta en cualquier etapa de desarrollo, particularmente una planta de semilla.

5 Una "célula de planta" es una unidad estructural y fisiológica de una planta que comprende un protoplasma y una pared celular. La célula de planta puede estar en la forma de una única célula aislada o una célula cultivada o como una parte de una unidad organizada superior tal como, por ejemplo, tejido de planta, un órgano de planta o una planta entera.

10 "Cultivo de célula de planta" significa cultivos de unidades de plantas tales como, por ejemplo, protoplastos, células de cultivo de células, células en tejidos de planta, polen, tubos de polen, óvulos, sacos embrionarios, cigotos y embriones en varias etapas de desarrollo.

15 "Material de planta" se refiere a hojas, tallos, raíces, flores o partes de flores, frutas, polen, células del huevo, cigotos, semillas, esquejes, células o cultivos de tejido, o cualquier otra parte o producto de una planta.

Un "órgano de una planta" es una parte visiblemente estructurada y diferenciada de una planta tal como una raíz, tallo, hoja, yema o embrión.

20 "Tejido de planta" tal como se utiliza en la presente significa un grupo de células de plantas organizadas en una unidad estructural y funcional. Se incluye cualquier tejido de una planta en la planta o en el cultivo. Este término incluye, a modo no taxativo, plantas enteras, órganos de plantas, semillas de plantas, cultivo de tejido y cualquier grupo de células de plantas organizadas en unidades estructurales y/o funcionales. El uso de este término en conjunto con o en ausencia de, cualquier tipo específico de tejido de planta como se enumera más adelante o de otro modo abarcado por esta definición no pretende ser exclusivo de cualquier otro tipo de tejido de planta.

25 Un "transcriptoma" del gusano de la raíz del maíz es una colección de todos o casi todos los transcritos de ácido ribonucleico (ARN) en una célula de gusano de la raíz del maíz.

30 La "transformación" es un proceso para introducir ácido nucleico heterólogo en una célula u organismo huésped. En particular, "transformación" significa la integración estable de una molécula de ADN en el genoma de un organismo de interés.

35 "Transformada/transgénica/recombinante" se refiere a un organismo huésped tal como una bacteria o una planta en la cual se ha introducido una molécula de ácido nucleico heteróloga. La molécula de ácido nucleico puede integrarse establemente en el genoma del huésped o la molécula de ácido nucleico también puede estar presente como una molécula extracromosómica. Dicha molécula extracromosómica puede ser autorreplicante. Se comprende que las células, tejidos o plantas transformados abarcan no sólo el producto final de un proceso de transformación, sino también la progenie transgénica del mismo. Un huésped "no transformado", "no transgénico" o "no recombinante" se refiere a un organismo natural, por ejemplo, una bacteria o planta que no contiene la molécula de ácido nucleico heterólogo.

40 La nomenclatura utilizada en la presente para bases de ADN o ARN y aminoácidos se establece en el Artículo 1.822, Título 37 del Código de Reglamentos Federales.

45 La invención se basa en el descubrimiento inesperado de que ARN de doble hebra (ARNdh) o ARN de interferencia pequeña (ARNip) diseñados para apuntar a un ARNm transcribible de un gen de histona de un insecto *Diabrotica* son tóxicos para la plaga de insectos *Diabrotica* y pueden utilizarse para controlar la infestación de *Diabrotica* de una planta y conferir a una planta transgénica tolerancia a una infestación de *Diabrotica*. Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona una molécula de ARN de doble hebra (ARNdh) que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde una secuencia de nucleótidos de la hebra antisentido es complementaria con una porción de un polinucleótido de ARNm transcribible de un gen de *histona* de insectos *Diabrotica*, en donde la molécula de ARNdh es tóxica para un insecto *Diabrotica*.

55 En otros aspectos, la divulgación proporciona una molécula de ARN de interferencia que comprende un ARNdh que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde una secuencia de nucleótidos de la hebra antisentido es complementaria con una porción de un polinucleótido de ARNm transcribible de un gen histona de *Diabrotica* que comprende una secuencia que codifica histona que tiene al menos 90% de identidad, o al menos 91% de identidad, o al menos 92% de identidad, o al menos 93% de identidad, o al menos 94% de identidad, o al menos 95% de identidad, o al menos 96% de identidad, o al menos 97% de identidad, o al menos 98% de identidad, o al menos 99% de identidad con la SEQ ID NO:2 (DvH4) o la SEQ ID NO:6 (DvH2B) y en donde la molécula de ARNdh es tóxica para un insecto *Diabrotica*. En algunas realizaciones, la molécula de ácido ribonucleico (ARN) de interferencia comprende al menos un ARNdh en donde el ARNdh es una región de ARN de doble hebra que comprende hebras complementarias apareadas, una hebra del cual comprende una secuencia de al menos 19 nucleótidos contiguos que es al menos parcialmente complementaria con una secuencia de nucleótidos objetivo en un gen objetivo de histona de *Diabrotica* spp y en donde la molécula de ARN de interferencia (i) es al menos 95% idéntica a al menos un fragmento de 21 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 28,

SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 47, o su complemento; o (ii) comprende al menos un fragmento de 19 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 47, o su complemento; o (iii) comprende al menos un fragmento de 19 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 47, o su complemento, en donde la molécula de ARN de interferencia regula hacia abajo el gen objetivo de histona en un insecto *Diabrotica* objetivo.

En algunas realizaciones, el gen objetivo de histona *Diabrotica* es de un insecto *Diabrotica* seleccionado del grupo que consiste en *Diabrotica barberi* (gusano de la raíz del maíz del norte), *D. virgifera virgifera* (gusano de la raíz del maíz del oeste), *D. undecimpunctata howardi* (gusano de la raíz del maíz del sur), *D. balteata* (escarabajo del pepino rayado), *D. undecimpunctata undecimpunctata* (escarabajo del pepino de manchas del oeste), *D. significata* (escarabajo de la hoja de 3 manchas), *D. speciosa* (escarabajo del crisantemo), *D. virgifera zea* (gusano de la raíz del maíz de México), *D. beniensis*, *D. cristata*, *D. curvipustulata*, *D. dissimilis*, *D. elegantula*, *D. emorsitans*, *D. graminea*, *D. hispanolae*, *D. lemniscata*, *D. linsleyi*, *D. milleri*, *D. nummularis*, *D. occlusa*, *D. porracea*, *D. scutellata*, *D. tibialis*, *D. trifasciata* y *D. viridula*. En realizaciones adicionales, el insecto *Diabrotica* es *D. virgifera virgifera* (gusano de la raíz del maíz del oeste), *D. undecimpunctata howardi* (gusano de la raíz del maíz del sur) o *D. barberi* (gusano de la raíz del maíz del norte). En algunas realizaciones, el gen de histona se selecciona del grupo que consiste en una histona H1, una histona H2A, una histona H2B, una histona H3 y una histona H4. En algunas realizaciones, la histona es una histona H4 o H2B. En algunas realizaciones, la secuencia que codifica histona comprende una secuencia seleccionada del grupo que comprende la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 47.

En algunas realizaciones, la molécula de ARN de interferencia comprende al menos dos ARNdhs, en donde cada ARNdhs comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos parcialmente complementaria con una secuencia de nucleótidos objetivo en el gen objetivo de histona. En algunas realizaciones, cada uno de los ARNdhs comprende una secuencia diferente de nucleótidos que es complementaria con una secuencia de nucleótidos objetivo diferente en el gen objetivo de histona. En otras realizaciones, cada uno de los ARNdhs comprende una secuencia diferente de nucleótidos que es complementaria con una secuencia de nucleótidos objetivo en dos diferentes genes objetivo de histona.

En algunas realizaciones, la molécula de ARN de interferencia comprende un ARNdhs que puede comprender, consistir esencialmente o consistir en de al menos 18 a aproximadamente 25 nucleótidos consecutivos (por ejemplo, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25) a al menos aproximadamente 300 nucleótidos consecutivos. En algunas realizaciones la molécula de ARNdhs puede comprender, consistir esencialmente o consistir en de aproximadamente 309 o aproximadamente 369 nucleótidos consecutivos. Pueden agregarse nucleótidos adicionales al extremo 3', el extremo 5' o ambos extremos 3' y 5' para facilitar la manipulación de la molécula ARNdhs pero que no afecta materialmente las características básicas o función de la molécula ARNdhs en la interferencia de ARN (ARNi).

En algunos aspectos, la molécula de ARN de interferencia comprende un ARNdhs que comprende una hebra antisentido que es complementaria a comprende al menos 18 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 48. En otras realizaciones, la porción de ARNdhs comprende, consiste esencialmente o consiste en al menos de 19, 20 o 21 nucleótidos consecutivos a al menos aproximadamente 300 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 48. En otras realizaciones, la porción de ARNdhs comprende, consiste esencialmente o consiste en al menos aproximadamente 309 nucleótidos de la SEQ ID NO:3, al menos aproximadamente 369 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO: 7, al menos aproximadamente 309 nucleótidos de la SEQ ID NO: 29, al menos aproximadamente 309 nucleótidos de la SEQ ID NO: 33, al menos aproximadamente 369 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO: 38, al menos aproximadamente 309 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO: 43 o al menos aproximadamente 369 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO: 48.

En otras realizaciones, la molécula de ARN de interferencia de la invención comprende un ARNdhs que comprende, consiste esencialmente o consiste en cualquier subsecuencia 19-merica de la SEQ ID NO:3 (ARNm de *DvH4*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al 291 de la SEQ ID NO:3. En otras palabras, la porción del ARNm objetivo comprende, consiste esencialmente o consiste en cualquiera de las 291 subsecuencias de 19 nucleótidos consecutivos (es decir, 19-meros) de la SEQ ID NO:3, por ejemplo, las bases 1-19 (5'-AUGACUGGACGUGGAAAGG-3') (SEQ ID NO:11), bases 2-20 (5'-UGACUGGACGUGGAAAGGG-3') (SEQ ID NO:12), bases 3-21 (5'-GACUGGACGUGGAAAGGGU-3') (SEQ ID NO:13) y demás hasta las bases 291-309 (5'-UUUGUACGGUUUUGGUGGU-3') (SEQ ID NO:14).

En otras realizaciones, la molécula de ARN de interferencia de la invención comprende un ARNdhs que comprende, consiste esencialmente o consiste en cualquier subsecuencia 19-merica de la SEQ ID NO:7 (ARNm de *DvH2B*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 351 de la SEQ ID NO:7. En otras palabras, la porción del ARNm objetivo comprende cualquiera de las 351 subsecuencias de 19 nucleótidos consecutivos (es decir, 19-meros) de la SEQ ID NO:7, por ejemplo, las bases 1-19 (5'-AUGCCUCCUAAGACGAGUG-3') (SEQ ID NO:15), bases 2-20 (5'-UGCCUCCUAAGACGAGUGG-3') (SEQ ID

NO:16), bases 3-21 (5'-GCCUCCUAAGACGAGUGGU -3') (SEQ ID NO:17) y demás hasta las bases 351-369 (5'-UAAAUACACAAGUUCUAAG -3') (SEQ ID NO:18). En otras realizaciones, la molécula de ARN de interferencia de la invención comprende un ARNdh que comprende, consiste esencialmente o consiste en cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 29 (*DuH4-1*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al 291 de la SEQ ID NO: 29; o cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 33 (*DuH4-2*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 291 de la SEQ ID NO: 33; o cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 38 (*DuH2B*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al 351 de la SEQ ID NO: 38; o cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 43 (*DbH4*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 291 de la SEQ ID NO: 43; o cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 48 (*DbH2B*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al 351 de la SEQ ID NO: 48.

En aun otras realizaciones, la molécula de ARN de interferencia de la invención comprende un ARNdh que comprende, consiste esencialmente o consiste en la SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 48.

En realizaciones adicionales de la molécula de ARN de interferencia de la invención, la secuencia de nucleótidos de la hebra antisentido del ARNdh puede comprender, consistir esencialmente o consistir en cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO:4 (*DvH4**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al 291 de la SEQ ID NO:4. En otras palabras, la hebra antisentido comprende, consiste esencialmente o consiste en cualquiera de las 291 subsecuencias de 19 nucleótidos consecutivos (es decir, 19-meros) de la SEQ ID NO:4, por ejemplo, las bases 1-19 (5'-UACUGACCUGCACC UUUC -3') (SEQ ID NO:19), bases 2-20 (5'-ACUGACCUGCACC UUUC -3') (SEQ ID NO:20), bases 3-21 (5'-CUGACCUGCACC UUUC -3') (SEQ ID NO:21) y demás hasta las bases 291-309 (5'-AAACAUGCCAAAACCACCA-3') (SEQ ID NO:22).

En otras realizaciones de la molécula de ARN de interferencia de la invención, la secuencia de nucleótidos de la hebra antisentido del ARNdh puede comprender, consistir esencialmente o consistir en cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO:8 (*DvH2B**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 351 de la SEQ ID NO:8. En otras palabras, la hebra antisentido consiste esencialmente en cualquiera de las 351 subsecuencias de 19 nucleótidos consecutivos (es decir, 19-meros) de la SEQ ID NO:8, por ejemplo, las bases 1-19 (5'-UACGGAGGAUUCUGCUCAC -3') (SEQ ID NO:23), bases 2-20 (5'-ACGGAGGAUUCUGCUCACC -3') (SEQ ID NO:24), bases 3-21 (5'-CGGAGGAUUCUGCUCACCA -3') (SEQ ID NO:25) y demás hasta las bases 351-369 (5'-UGAUUUUAUGUGUUC AAGAU -3') (SEQ ID NO:26). En otras realizaciones, la molécula de ARN de interferencia de la invención, la secuencia de nucleótidos de la hebra antisentido del ARNdh puede comprender, consistir esencialmente o consistir en cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 30 (*DuH4-1**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al 291 de la SEQ ID NO: 30; o cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 34 (*DuH4-2**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 291 de la SEQ ID NO: 34; o cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 39 (*DuH2B**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al 351 de la SEQ ID NO: 39; o cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 44 (*DbH4**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 291 de la SEQ ID NO: 44; o cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 49 (*DbH2B**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 351 de la SEQ ID NO: 49.

En aun otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos de la hebra antisentido de un ARNdh de la invención que es complementaria con una porción de un polinucleótido de ARNm transcribible de un gen de histona de insectos *Diabrotica* comprende, consiste esencialmente o consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 49. Se debe comprender que cualquiera de las secuencias de 19-mero de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 49 puede tener un nucleótido ya sea en el extremo 3' o 5' eliminado o puede tener hasta seis nucleótidos agregados al extremo 3', el extremo 5' o ambos, en cualquier combinación para alcanzar una hebra antisentido que consiste esencialmente en cualquier secuencia de nucleótidos de 19-mero de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 49, se comprenderá que la eliminación de un nucleótido o la adición de hasta seis nucleótidos no afecta materialmente las características básicas o función de la molécula de ARN de doble hebra de la invención. Dichos nucleótidos adicionales pueden ser nucleótidos que extienden la complementariedad de la hebra antisentido junto con la secuencia objetivo y/o dichos nucleótidos pueden ser nucleótidos que facilitan la manipulación de la molécula de ARN o una molécula de ácido nucleico que codifica la molécula de ARN, como comprenderá un experto en la técnica. Por ejemplo, puede estar presente una saliente TT en el extremo 3', que se utiliza para estabilizar el dúplex de ARNip y no afecta la especificidad del ARNip.

En algunas realizaciones de la presente invención, la hebra antisentido del ARN de doble hebra de la molécula de ARN de interferencia puede ser completamente complementaria con el polinucleótido de ARN objetivo o la hebra antisentido puede ser básicamente complementaria o parcialmente complementaria con el polinucleótido de ARN objetivo. El ARNdh de la molécula de ARN de interferencia puede comprender un ARNdh que es una región del ARN de doble hebra que comprende hebras apareadas básicamente complementarias, o que es una región de ARN de doble hebra que comprende hebras apareadas completamente complementarias. Básicamente o parcialmente

complementaria significa que la hebra antisentido y el polinucleótido de ARN objetivo pueden ser no coincidentes en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 apareamientos de nucleótidos. Dichas no coincidencias pueden introducirse en la secuencia de hebra antisentido, por ejemplo, cerca del extremo 3', para mejorar el procesamiento de la molécula de ARN de doble hebra por Dicer, para duplicar un patrón de no coincidencias en una molécula ARNip insertada en una molécula de ácido nucleico quimérica o molécula precursora de microARN artificial de la presente invención (ver la sección Ejemplos) y similares, como comprenderá un experto en la técnica. Dicha modificación debilitará el apareamiento de las bases en un extremo del dúplex y generará asimetría de las hebras, mejorando así la oportunidad de la hebra antisentido, en lugar de hebra sentido, siendo procesada y el silenciamiento del gen pretendido (Geng y Ding "Double-mismatched siRNAs enhance selective gene silencing of a mutant ALS-causing Allele1" *Acta Pharmacol. Sin.* 29:211-216 (2008); Schwarz et al. "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex" *Cell* 115:199-208 (2003)).

En algunas realizaciones de la presente invención, el ARN de interferencia comprende un ARNdh que comprende una molécula de ARN de horquilla pequeña (ARNhp). La expresión de ARNhp en las células se logra típicamente mediante la entrega de plásmidos o vectores recombinantes, por ejemplo en plantas transgénicas tales como maíz transgénico.

La invención abarca un constructo de ácido nucleico que comprende un ARN de interferencia de la invención. La invención abarca además una molécula de ácido nucleico que codifica al menos una molécula de interferencia de la invención. La invención abarca además un constructo de ácido nucleico que comprende al menos una molécula de interferencia de la invención o que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica dicha o dichas moléculas de interferencia de la invención. La invención abarca además un constructo de ácido nucleico en donde el constructo de ácido nucleico es un vector de expresión. La invención abarca además un vector recombinante que comprende una secuencia reguladora ligada operablemente a una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARN de interferencia de la invención. Una secuencia reguladora puede referirse a un promotor, potenciador, sitio de unión del factor de transcripción, aislador, silenciador o cualquier otro elemento de ADN que participa en la expresión de un gen.

La invención abarca además moléculas de ácido nucleico quiméricas que comprenden una molécula de ARN de interferencia con una hebra antisentido de un ARNdh ligado operablemente con una molécula precursora de microARN de la planta. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico quimérica comprende una hebra antisentido que tiene la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las subsecuencias de 19-mero de la SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:8 ligada operablemente con una molécula precursora de microARN de la planta. En algunas realizaciones, la molécula precursora de microARN de planta es un precursor de microARN de maíz.

En algunas realizaciones, la invención abarca una molécula precursora de microARN de planta artificial que comprende una hebra antisentido de un ARNdh de una molécula de ARN de interferencia de la invención. En otras realizaciones, la molécula precursora de microARN de una planta artificial comprende una hebra antisentido que tiene la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las subsecuencias de 19-mero de la SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:8. El uso de las microARN de una planta artificial para entregar una secuencia de nucleótidos de interés (por ejemplo un miARN; ARNip/ARNip* artificial) en una planta es conocido en la técnica (ver, por ejemplo, Schwab et al. 2006. *The Plant Cell* 18:1121-1133 y la sección Ejemplos en la presente). En la invención, los microARN artificiales son moléculas quiméricas o híbridas que tienen una estructura principal precursora de microARN de una planta y una secuencia de ARNip de insecto insertada en la misma. Como comprenderá un experto en la técnica, es típicamente deseable mantener no coincidencias que ocurren normalmente en la secuencia precursora de microARN de planta en cualquier secuencia de nucleótidos que se sustituye en la estructura principal precursora de microARN de planta. En aun otras realizaciones, el precursor de microARN de planta artificial comprende porciones de una molécula precursora de microARN de maíz. Cualquier precursor de microARN (miARN) de maíz es adecuado para las composiciones y método de la invención. Ejemplos no limitantes incluyen miR156, miR159, miR160, miR162, miR164, miR166, miR167, miR168, miR169, miR171, miR172, miR319, miR390, miR393, miR394, miR395, miR396, miR397, miR398, miR399, miR408, miR482, miR528, miR529, miR827, miR1432, así como cualquier otro precursor de miARN de planta ahora conocido o identificado más adelante.

En algunas realizaciones, la invención abarca las moléculas de ARN de interferencia, constructos de ácido nucleico, moléculas de ácido nucleico o vectores recombinantes que comprenden al menos una hebra de un ARNdh de una molécula de ARN de interferencia de la invención o que comprenden una molécula de ácido nucleico quimérica de la invención o que comprenden un microARN de una planta artificial de la invención. En algunas realizaciones, el constructo de ácido nucleico comprende una molécula de ácido nucleico de la invención. En otras realizaciones, el constructo de ácido nucleico es un vector de expresión recombinante.

En algunas realizaciones, la invención abarca composiciones que comprenden una molécula de ARN de interferencia que comprende dos o más ARNdh, en donde los dos o más ARNdh comprenden cada uno una hebra antisentido diferente. En algunas realizaciones la invención abarca composiciones que comprenden al menos dos moléculas de ARN de interferencia más, en donde las dos o más moléculas de ARN de interferencia comprenden cada una un ARNdh que comprende una hebra antisentido diferente. Los dos o más ARN de interferencia pueden estar presentes en el mismo constructo de ácido nucleico en diferentes constructos de ácido nucleico o cualquier

combinación de los mismos. En otras realizaciones, la composición comprende una molécula de ARN que comprende una hebra antisentido que consiste esencialmente en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4 y/o una molécula de ARN que comprende una hebra antisentido que consiste esencialmente en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 8 y/o una molécula de ARN que comprende una hebra antisentido que consiste esencialmente en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 30 y/o una molécula de ARN que comprende una hebra antisentido que consiste esencialmente en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 34 y/o una molécula de ARN que comprende una hebra antisentido que consiste esencialmente en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 39 y/o una molécula de ARN que comprende una hebra antisentido que consiste esencialmente en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 44 y/o una molécula de ARN que comprende una hebra antisentido que consiste esencialmente en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 49. En otras realizaciones, la composición puede comprender dos o más de las moléculas de ácido nucleico, en donde cada una de las dos o más moléculas de ácido nucleico codifica una molécula de ARN de interferencia diferente. En otras realizaciones, la composición puede comprender dos o más de los constructos de ácido nucleico, en donde los dos o más constructos de ácido nucleico comprenden cada uno una molécula de ácido nucleico que codifica un ARN de interferencia diferente.

En otras realizaciones, la composición comprende dos o más constructos de ácido nucleico, dos o más moléculas de ácido nucleico, dos o más moléculas de ácido nucleico quiméricas, dos o más precursores de microARN de planta artificial de la invención, en donde los dos o más constructos de ácido nucleico, dos o más moléculas de ácido nucleico, dos o más moléculas de ácido nucleico quiméricas, o dos o más precursores de microARN de planta artificial, comprenden cada uno una hebra antisentido diferente.

En algunas realizaciones, la invención abarca una composición insecticida para inhibir la expresión de un gen de histona de insectos *Diabrotica* que comprende un ARN de interferencia de la invención y un portador agrícola aceptable. En algunas realizaciones, el portador agrícola aceptable es un organismo transgénico que expresa un ARN de interferencia de la invención. En algunas realizaciones, el organismo transgénico puede ser una planta transgénica que expresa el ARN de interferencia de la invención que cuando es alimentado por una plaga objetivo provoca que la plaga objetivo deje de alimentarse, crecer o reproducirse o provocar la muerte de la plaga objetivo. En otras realizaciones, la planta transgénica es una planta de maíz transgénica y la plaga objetivo es una plaga de insectos *Diabrotica*. En aun otras realizaciones, la plaga de insectos *Diabrotica* se selecciona del grupo que consiste en *Diabrotica barberi* (gusano de la raíz del maíz del norte), *D. virgifera virgifera* (gusano de la raíz del maíz del oeste), *D. undecimpunctata howardi* (gusano de la raíz del maíz del sur), *D. balteata* (escarabajo del pepino rayado), *D. undecimpunctata undecimpunctata* (escarabajo del pepino de manchas del oeste), *D. significata* (escarabajo de la hoja de 3 manchas), *D. speciosa* (escarabajo del crisantemo), *D. virgifera zea* (gusano de la raíz del maíz de México).

En otras realizaciones, el organismo transgénico se selecciona de, a modo no taxativo, el grupo que consiste en: levadura, hongos, algas, bacterias, virus o un artrópodo que expresa la molécula de ARN de interferencia de la invención. En algunas realizaciones, el organismo transgénico es un virus, por ejemplo un baculovirus de insecto que expresa una molécula de ARN de interferencia de la invención tras la infección de un huésped de insecto. Dicho baculovirus es probablemente más virulento contra el insecto objetivo que el baculovirus no transformado natural. En otras realizaciones el organismo transgénico es una bacteria transgénica que se aplica a un ambiente donde una plaga objetivo ocurre o se conoce que haya ocurrido. En algunas realizaciones, se utilizan las bacterias simbióticas no patogénicas, que son capaces de vivir y replicarse en los tejidos de plantas, denominadas endófitos o bacterias simbióticas no patogénicas, que son capaces de colonizar la filósfera o la rizósfera, denominada epífitos. Dichas bacterias incluyen bacterias de los géneros *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clavibacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces* y *Xanthomonas*. Los hongos simbióticos, tales como *Trichoderma* y *Gliocladium* también son posibles huéspedes para la expresión de la molécula de ARN de interferencia de la invención a los mismos efectos.

En algunas realizaciones, un portador agrícola aceptable es una formulación útil para aplicar la composición que comprende la molécula de ARN de interferencia a una planta o semilla. En algunas realizaciones, las moléculas de ARN de interferencia se estabilizan contra la degradación debido a su naturaleza de doble hebra y la introducción de inhibidores Dnasa/Rnasa. Por ejemplo, el ARNdh o ARNip puede estabilizarse al incluir salientes 3' de nucleótido de timidina o uridina. El ARNdh o ARNip contenidos en las composiciones de la invención pueden sintetizarse químicamente a escala industrial en grandes cantidades. Métodos disponibles serían a través de síntesis química o a través del uso de un agente biológico.

En otras realizaciones, la formulación comprende un agente promotor de transfección. En otras realizaciones, el agente promotor de transfección es un compuesto que contiene lípidos. En realizaciones adicionales, el compuesto que contiene lípidos se selecciona del grupo que consiste en Lipofectamina, Celfectina, DMRIE-C, DOTAP y Lipofectina. En otra realización, el compuesto que contiene lípidos es un lípido catiónico Tris.

En algunas realizaciones, la formulación comprende además un agente condensador de ácido nucleico. El agente condensador de ácido nucleico puede ser cualquier compuesto conocido en la técnica. Ejemplos de agentes condensadores de ácido nucleico incluyen, a modo no taxativo, espermidina (N-[3-aminopropil]-1,4-butanodiamina),

sulfato de protamina, poli-lisina así como otros péptidos positivamente cargados. En algunas realizaciones, el agente condensador de ácido nucleico es espermidina o sulfato de protamina.

5 En aun otras realizaciones, la formulación comprende además sacarosa tamponada o solución salina tamponada con fosfato.

10 En algunas realizaciones, la invención abarca plantas transgénicas o partes de las mismas, que comprenden una molécula de ARN de interferencia, un constructo de ácido nucleico, una molécula de ácido nucleico quimérica, una molécula precursora de microARN de planta artificial y/o una composición de la invención, en donde la planta transgénica tiene resistencia mejorada para un insecto *Diabrotica* en comparación con una planta testigo. En otras realizaciones, la planta transgénica o parte de la misma, es una planta de maíz transgénica o parte de la misma. La invención abarca además una semilla transgénica de las plantas transgénicas de la invención, en donde la semilla transgénica comprende una molécula de ARN de interferencia, un constructo de ácido nucleico, una molécula de ácido nucleico quimérica, una molécula precursora de microARN de planta artificial y/o una composición de la invención. En algunas realizaciones la semilla transgénica es una semilla de maíz transgénica.

15 Las plantas transgénicas que expresan un ARN de interferencia de la invención son tolerantes o resistentes al ataque por plagas de insectos objetivo. Cuando el insecto comienza a alimentarse de dicha planta transgénica, también ingiere el ARNdh o ARNip expresado. Esto puede impedir que el insecto siga mordiendo el tejido de la planta o incluso puede lastimar o matar al insecto. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un ARNdh o ARNip de la invención se inserta en un cassette de expresión, que luego preferiblemente se integra establemente en el genoma de la planta. Las secuencias de ácido nucleico del cassette de expresión introducido en el genoma de la planta son heterólogas a la planta y no naturales. Las plantas transformadas de acuerdo con la presente invención puede ser monocotiledóneas o dicotiledóneas e incluyen, a modo no taxativo, maíz, trigo, cebada, centeno, boniato, 20 frijol, arveja, achicoria, lechuga, repollo, coliflor, brócoli, nabo, rábano, espinaca, espárrago, cebolla, ajo, pimienta, apio, calabacín, calabaza, cáñamo, zapallo, manzana, pera, quince, melón, ciruela, cereza, durazno, nectarina, damasco, frutilla, uva, frambuesa, mora, piña, palta, papaya, mango, banana, soja, tomate, sorgo, caña de azúcar, remolacha, girasol, colza, trébol, tabaco, zanahoria, algodón, alfalfa, rice, papa, berenjena, pepino, Arabidopsis, y plantas leñosas tales como árboles de coníferas y caducas. En realizaciones adicionales, la planta transgénica es una planta de maíz transgénica.

25 La expresión de la molécula de ARN de interferencia en plantas transgénicas se realiza mediante secuencias reguladoras que comprenden promotores que funcionan en plantas. La elección de promotor variará dependiendo de los requisitos temporales y espaciales para la expresión y también dependiendo de las especies objetivo de insectos. Por ejemplo, se contempla la expresión de los ARN de interferencia de la presente invención en hojas, en tallos o peciolos, en espigas, en inflorescencias (por ejemplo espigas, panículas, mazorcas, etc.), en raíces y/o plántulas. Sin embargo, en muchos casos, se busca la protección contra más de un tipo de plaga de insectos y por lo tanto es deseable la expresión en múltiples tejidos. Aunque muchos promotores de dicotiledóneas han demostrado ser operacionales en monocotiledóneas y viceversa, idealmente los promotores dicotiledóneos se seleccionan para la expresión en dicotiledóneas y promotores monocotiledóneos para la expresión en monocotiledóneas. Sin embargo, no hay restricción para la procedencia de los promotores seleccionados; es suficiente que sean operacionales para conducir la expresión del ARNdh o ARNip en la célula deseada.

30 Los promotores útiles con la invención incluyen, a modo no taxativo, aquellos que conducen una expresión de una secuencia de nucleótidos constitutivamente, aquellos que conducen la expresión cuando se inducen y aquellos que conducen la expresión de un modo específico de tejido o de desarrollo. Estos tipos diversos de promotores son conocidos en la técnica.

35 Ejemplos de promotores constitutivos incluyen, a modo no taxativo, el promotor del virus de cestrum (cmp) (Patente de los Estados Unidos No. 7,166,770), el promotor de la actina 1 del arroz (Wang *et al.* (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12:3399-3406; así como la Patente de los Estados Unidos No. 5,641,876), promotor 35S del CaMV (Odell *et al.* (1985) *Nature* 313:810-812), promotor 195 del CaMV (Lawton *et al.* (1987) *Plant Mol. Biol.* 9:315-324), un promotor nos (Ebert *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5745-5749), promotor Adh (Walker *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6624-6629), promotor de la sintasa de sacarosa (Yang & Russell (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4144-4148) promotor del virus del mosaico del figwort (fmv) (Govindarajulu *et al.* 2008. *Mol Plant Microbe Interact* 21:1027-35) y un promotor de ubiquitina. El promotor constitutivo derivado de ubiquitina se acumula en muchos tipos celulares. Los promotores de ubiquitina han sido clonados a partir de varias especies de plantas para su uso en plantas transgénicas, por ejemplo, girasol (Binet *et al.*, 1991. *Plant Science* 79: 87-94), maíz (Christensen *et al.*, 1989. *Plant Molec. Biol.* 12: 619-632) y arabis (Norris *et al.* 1993. *Plant Molec. Biol.* 21:895-906). El promotor de ubiquitina de maíz (*UbiP*) ha sido desarrollado en sistemas de monocotiledóneas transgénicas y su secuencia y vectores construidos para la transformación de monocotiledóneas se divulgan en Quail *et al.* (Patente de los Estados Unidos No. 6,020,190).

60 En algunas realizaciones, pueden utilizarse los promotores de tejidos específicos/tejidos preferidos. Patrones de expresión de tejido específico o tejido preferido incluyen, a modo no taxativo, tejido verde específico o preferido, raíz específica o preferida, tallo específico o preferido y flor específica o preferida. Los promotores adecuados para la

- expresión en tejido verde incluyen muchos que regulan los genes que participan en la fotosíntesis y muchos de estos han sido clonados de monocotiledóneas y dicotiledóneas. En una realización, un promotor útil con la invención es el promotor PEPC de maíz del gen de carboxilasa de fosfoenol (Hudspeth & Grula, *Plant Molec. Biol.* 12:579-589 (1989)). Ejemplos no taxativos de promotores específicos de tejidos incluyen aquellos asociados con genes que codifican las proteínas de almacenamiento de semillas (tales como, β -conglucina, cruciferina, napina y faseolina), zeína o proteínas de cuerpo oleoso (tales como oleosina) o proteínas involucradas en biosíntesis de ácidos grasos (incluida la proteína de portador de acilo, esteroil-ACP desaturasa y desaturasa de ácidos grasos (fad 2-1)) y otros ácidos nucleicos expresados durante el desarrollo de embriones (tales como Bce4, *ver, por ejemplo*, Kridl *et al.* (1991) *Seed Sci. Res.* 1:209-219; así como la Patente EP No. 255378). Los promotores de tejido específico o tejido preferencial útiles para la expresión de las secuencias de nucleótidos de la invención en plantas, particularmente maíz, incluyen a modo no taxativo aquellos que dirigen la expresión en raíces o células particulares en raíces, médula, hoja o polen. Dichos promotores se divulgan, por ejemplo a modo no taxativo, en el documento WO 93/07278. Otros ejemplos no taxativos de promotores de tejido específico o tejido preferido útiles con la invención el promotor de la rubisco de algodón divulgado en la Patente de los Estados Unidos 6,040,504; el promotor de sintasa de sacarosa de arroz divulgado en la Patente de los Estados Unidos 5,604,121; el promotor específico de la raíz descrito por de Framond (FEBS 290:103-106 (1991); EP 0 452 269 por Ciba-Geigy); el promotor de tallo específico descrito en la Patente de los Estados Unidos 5,625,136 (por Ciba-Geigy) y que conduce la expresión del gen *trpA* del maíz; y el promotor del virus del rizado de hoja amarilla de *Cestrum* divulgado en el documento WO 01/73087.
- Ejemplos adicionales de promotores de tejido específico/tejido preferido incluyen, a modo no taxativo, los *cis*-elementos de puntas de raíces específicas (RHE) (Kim *et al.* *The Plant Cell* 18:2958-2970 (2006)), los promotores específicos de raíces RCc3 (Jeong *et al.* *Plant Physiol.* 153:185-197 (2010)) y RB7 (Patente de los Estados Unidos No. 5459252), el promotor de lectina (Lindstrom *et al.* (1990) *Dev. Genet.* 11:160-167; y Vodkin (1983) *Prog. Clin. Biol. Res.* 138:87-98), promotor de deshidrogenasa de alcohol de maíz 1 (Dennis *et al.* (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:3983-4000), sintetasa de S-adenosil-L-metionina (SAMS) (Vander Mijnsbrugge *et al.* (1996) *Plant and Cell Physiology*, 37(8):1108-1115), promotor de complejo de cosecha leve de maíz (Bansal *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3654-3658), promotor de proteína de choque térmico de maíz (O'Dell *et al.* (1985) *EMBO J.* 5:451-458; y Rochester *et al.* (1986) *EMBO J.* 5:451-458), promotor de carboxilasa RuBP de subunidad pequeña de arveja (Cashmore, "Nuclear genes encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase" págs. 29-39 en: *Genetic Engineering of Plants*, (Hollaender ed., Plenum Press 1983; y Poulsen *et al.* (1986) *Mol. Gen. Genet.* 205:193-200), promotor de sintasa de manopina de plásmido Ti (Langridge *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3219-3223), promotor de sintasa de nopalina de plásmido Ti (Langridge *et al.* (1989), *supra*), promotor de chalcona isomerasa de petunia (van Tunen *et al.* (1988) *EMBO J.* 7:1257-1263), promotor de proteína rica en glicina de arveja 1 (Keller *et al.* (1989) *Genes Dev.* 3:1639-1646), promotor de CaMV 35S truncado (O'Dell *et al.* (1985) *Nature* 313:810-812), promotor de patatina de papa (Wenzler *et al.* (1989) *Plant Mol. Biol.* 13:347-354), promotor de célula de raíz (Yamamoto *et al.* (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:7449), promotor de zeína de maíz (Kriz *et al.* (1987) *Mol. Gen. Genet.* 207:90-98; Langridge *et al.* (1983) *Cell* 34:1015-1022; Reina *et al.* (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:6425; Reina *et al.* (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:7449; y Wandelt *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:2354), promotor de globulina-1 (Belanger *et al.* (1991) *Genetics* 129:863-872), promotor cab de α -tubulina (Sullivan *et al.* (1989) *Mol. Gen. Genet.* 215:431-440), promotor de PEPCasa (Hudspeth & Grula (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:579-589), promotores asociados con el complejo de genes R (Chandler *et al.* (1989) *Plant Cell* 1:1175-1183) y promotores de chalcona sintasa (Franken *et al.* (1991) *EMBO J.* 10:2605-2612). En algunas realizaciones particulares, las secuencias de nucleótidos de la invención se asocian operablemente con un promotor preferido de las raíces. Es particularmente útil para la expresión específica de semillas el promotor de vicilina de arveja (Czako *et al.* (1992), *Mol. Gen. Genet.*, 235:33-40; así como los promotores específicos de semillas divulgados en la Patente de los Estados Unidos No. 5,625,136. Promotores útiles para la expresión en hojas maduras son aquellos que se activan al comienzo de la senescencia, tales como el promotor SAG de *Arabidopsis* (Gan *et al.* (1995) *Science*, 270:1986-1988).
- Adicionalmente, pueden utilizarse promotores funcionales en plástidos. Ejemplos no taxativos de dichos promotores incluyen el gen 9 T3 bacteriófago de UTR 5' y otros promotores divulgados en la Patente de los Estados Unidos No.7,579,516. Otros promotores útiles con la invención incluyen, a modo no taxativo, el promotor de carboxilasa RuBP de subunidad pequeña S-E9 y el promotor del gen inhibidor de tripsina Kunitz (Kti3).
- En algunas realizaciones de la invención, se pueden utilizar promotores inducibles. Por lo tanto, por ejemplo, los promotores regulados por químicos pueden utilizarse para modular la expresión de secuencias de nucleótidos de la invención en una planta a través de la aplicación de un regulador químico exógeno. La regulación de la expresión de secuencias de nucleótidos de la invención a través de promotores que están químicamente regulados permite que los polipéptidos de la invención se sinteticen sólo cuando las plantas de cultivo son tratadas con los químicos de inducción. Dependiendo del objetivo, el promotor puede ser un promotor inducible por químicos, donde la aplicación de un químico induce la expresión de una secuencia de nucleótidos de la invención o un promotor que puede reprimirse por químicos, donde la aplicación del químico reprime la expresión de una secuencia de nucleótidos de la invención.
- Los promotores inducibles químicos son conocidos en la técnica e incluyen, a modo no taxativo, el promotor *In2-2* del maíz, que es activado por protectores herbicidas de bencenosulfonamida, el promotor GST del maíz, que es

5 activado por compuestos electrofílicos hidrófobos que se utilizan como herbicidas pre-emergentes, y el *PR-1* del tabaco, un promotor que es activado por el ácido salicílico (*por ejemplo*, el sistema *PR1a*), promotores esteroideos de la respuesta de esteroides (*ver, por ejemplo*, el promotor inducible por glucocorticoides en Schena et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10421-10425 y McNellis et al. (1998) *Plant J.* 14, 247-257) y promotores inducibles por tetraciclina y reprimibles por tetraciclina (*ver, por ejemplo*, Gatz et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227, 229-237, y Patente de los Estados Unidos Números 5,814,618 y 5,789,156, promotores de sistema represor de Lac, promotores de sistema inducible por cobre, promotores de sistema inducible por salicilato (*por ejemplo*, el sistema *PR1a*), promotores inducibles por glucocorticoides (Aoyama et al. (1997) *Plant J.* 11:605-612) y promotores del sistema inducible por ecdisona.

10 Otros ejemplos no taxativos de promotores inducibles incluyen promotores inducibles por ABA y turgor, el promotor del gen de la proteína de unión a auxina (Schwob et al., (1993) *Plant J.*, 4:423-432), el promotor de glicosil-transferasa flavonoide de UDP glucosa (Ralston et al. (1988) *Genetics*, 119:185-197), el promotor del inhibidor de MPI proteinasa (Cordero et al. (1994) *Plant J.*, 6:141-150) y el promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Kohler et al. (1995) *Plant Mol. Biol.*, 29:1293-1298; Martínez et al. (1989) *J. Mol. Biol.*, 208:551-565; y Quigley et al. (1989) *J. Mol. Evol.* 29:412-421). También se incluyen sistemas inducibles por benceno sulfonamida (Patente de los Estados Unidos No. 5,364,780) e inducibles por alcohol (Publicación de Solicitud de Patente Internacional Nos. WO 97/06269 y WO 97/06268) y promotores glutatona S-transferasa. Del mismo modo, uno puede utilizar cualquiera de los promotores inducibles descritos en Gatz (1996) *Current Opinion Biotechnol.* 7:168-172 y Gatz (1997) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:89-108. Otros promotores químicamente inducibles útiles para dirigir la expresión de las secuencias de nucleótidos de la presente invención en plantas se divulgan en la Patente de los Estados Unidos 5,614,395. La inducción química de la expresión génica también se detalla en la solicitud publicada EP 0 332 104 (por Ciba-Geigy) y Patente de los Estados Unidos 5,614,395. En algunas realizaciones, un promotor para la inducción química puede ser el promotor *PR-1a* de tabaco.

25 En aspectos adicionales, las secuencias de nucleótidos de la invención pueden asociarse operablemente con un promotor que es inducible por lesiones o inducible por infección de plaga o patógeno (*por ejemplo*, un plaga de planta de insectos o nemátodos). Se han descrito numerosos promotores que se expresan en sitios de lesiones y/o en sitios de ataque de plagas (*por ejemplo*, alimentación de insectos/nemátodos) o infección de fitopatógenos. Idealmente, dicho promotor debería activarse sólo localmente o adyacente a los sitios de ataque, y de este modo la expresión de las secuencias de nucleótidos de la invención estará enfocada en las células que están siendo invadidas o siendo alimentadas. Dichos promotores incluyen, a modo no taxativo, aquellos descritos por Stanford et al., *Mol. Gen. Genet.* 215:200-208 (1989), Xu et al. *Plant Molec. Biol.* 22:573-588 (1993), Logemann et al. *Plant Cell* 1:151-158 (1989), Rohrmeier y Lehle, *Plant Molec. Biol.* 22:783-792 (1993), Firek et al. *Plant Molec. Biol.* 22:129-142 (1993), Warner et al. *Plant J.* 3:191-201 (1993), Patente de los Estados Unidos No. 5,750,386, Patente de los Estados Unidos No. 5,955,646, Patente de los Estados Unidos No. 6,262,344, Patente de los Estados Unidos No. 6,395,963, Patente de los Estados Unidos No. 6,703,541, Patente de los Estados Unidos No. 7,078,589, Patente de los Estados Unidos No. 7,196,247, Patente de los Estados Unidos No. 7,223,901 y Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2010043102.

40 En algunas realizaciones de la presente invención, se utiliza un "promotor mínimo" o "promotor basal". Un promotor mínimo es capaz reclutar y unir el complejo de ARN polimerasa II y sus proteínas accesorias para permitir la iniciación y elongación transcripcional. En algunas realizaciones, un promotor mínimo se construye para comprender sólo los nucleótidos/secuencias de nucleótidos de un promotor seleccionado que son requeridos para la unión de los factores de transcripción y transcripción de una secuencia de nucleótidos de interés que está operablemente asociada con el promotor mínimo incluyendo a modo no taxativo secuencias de caja TATA. En otras realizaciones, el promotor mínimo carece de secuencias cis que reclutan y unen factores de transcripción que modulan (*por ejemplo*, mejoran, reprimen, confieren especificidad de tejido, confieren inducibilidad o la capacidad de reprimirse) transcripción. Un promotor mínimo se coloca en general corriente arriba (es decir, 5') de una secuencia de nucleótidos a ser expresada. Por lo tanto, nucleótidos/secuencias de nucleótidos de cualquier promotor utilizable con la presente invención pueden seleccionarse para su uso como un promotor mínimo.

55 En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención puede ser un "cassette de expresión". Tal como se utiliza en la presente, "cassette de expresión" significa una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos de interés (*por ejemplo*, las secuencias de nucleótidos de la invención), en donde la secuencia de nucleótidos está asociada operablemente con al menos una secuencia testigo (*por ejemplo*, un promotor). Por lo tanto, algunas realizaciones de la invención proporcionan cassettes de expresión diseñados para expresar secuencias de nucleótidos que codifican el ARNdh o ARNip de la invención. De este modo, *por ejemplo*, uno o más promotores de planta asociados operablemente con una o más secuencias de nucleótidos de la invención se proporcionan en los cassettes de expresión para la expresión en una planta de maíz, parte de planta y/o célula de planta.

65 Un cassette de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérica, lo que significa que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. Un cassette de expresión también puede ser uno que comprende un promotor nativo que conduce su

gen nativo. Sin embargo, se ha obtenido en una forma recombinante útil para la expresión heteróloga. Dicho uso de un cassette de expresión lo hace de este modo no natural en la célula en la cual ha sido introducido.

Un cassette de expresión también puede incluir opcionalmente una región de terminación transcripcional y/o translacional (es decir, región de terminación) que es funcional en plantas. Una variedad de terminadores transcripcionales están disponibles para su uso en cassettes de expresión y son responsables por la terminación de la transcripción más allá de la secuencia de nucleótidos heterólogos de interés y poliadenilación de ARNm correcta. La región de terminación puede ser nativa con la región de iniciación transcripcional, puede ser nativa para la secuencia de nucleótidos ligada operablemente, puede ser nativa al huésped de la planta o puede derivar de otra fuente (es decir, ajena o heteróloga al promotor, la secuencia de nucleótidos de interés, el huésped de la planta o cualquier combinación del mismo). Terminadores transcripcionales apropiados incluyen, a modo no taxativo, el terminador CAMV 35S, el terminador tml, el terminador sintasa de nopalina y/o el terminador rbcs E9 de arveja. Estos pueden utilizarse en ambas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Además, puede utilizarse un terminador de transcripción nativo de la secuencia codificante.

Un cassette de expresión de la invención también puede incluir una secuencia de nucleótidos para un marcador seleccionable, que puede utilizarse para seleccionar una planta transformada, parte de planta y/o célula de planta. Tal como se utiliza en la presente, "marcador seleccionable" significa una secuencia de nucleótidos que cuando se expresa imparte un fenotipo distinto a la planta, parte de planta y/o célula de planta que expresa el marcador y de este modo permite que dichas plantas transformadas, partes de plantas y/o células de plantas se distingan de aquellas que no tienen el marcador. Dicha secuencia de nucleótidos puede codificar ya sea un marcador seleccionable o evaluable, dependiendo de si el marcador confiere un rasgo que puede seleccionarse por medios químicos, tales como al utilizar un agente selectivo (por ejemplo, un antibiótico, herbicida o similar) o si el marcador es simplemente un rasgo que uno puede identificar a través de la observación o evaluación, tal como por detección (por ejemplo, el rasgo de locus R). Por supuesto, se conocen muchos ejemplos de marcadores seleccionables adecuados en la técnica y pueden utilizarse en los cassettes de expresión descritos en la presente.

Ejemplos de marcadores seleccionables incluyen, a modo no taxativo, una secuencia de nucleótidos que codifica *neo* o *npII*, que confiere resistencia a kanamicina, G418 y similares (Potrykus *et al.* (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199:183-188); una *barra* que codifica secuencias de nucleótidos, que confiere resistencia a la fosfotricina; una secuencia de nucleótidos que codifica una sintasa 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) alterada, que confiere resistencia al glifosato (Hinchey *et al.* (1988) *Biotech.* 6:915-922); una secuencia de nucleótidos que codifica una nitrilasa tal como *bxn* de *Klebsiella ozaenae* que confiere resistencia a bromoxinil (Stalker *et al.* (1988) *Science* 242:419-423); una secuencia de nucleótidos que codifica un acetolactato de sintasa alterado (ALS) que confiere resistencia a la imidazolinona, sulfonilurea u otros químicos que inhiben ALS (Solicitud de Patente EP No. 154204); una secuencia de nucleótidos que codifica una reductasa de dihidrofolato resistente a metotrexato (DHFR) (Thillet *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* 263:12500-12508); una secuencia de nucleótidos que codifica dalapon dehalogenasa que confiere resistencia a dalapon; una secuencia de nucleótidos que codifica una isomerasa manosa-6-fosfato (también denominada fosfomanosa isomerasa (PMI)) que confiere una capacidad de metabolizar manosa (Patente de los Estados Unidos Nos. 5,767,378 y 5,994,629); una secuencia de nucleótidos que codifica una antranilato sintasa alterada que confiere resistencia a 5-metil triptófano; y/o una secuencia de nucleótidos que codifica *hph* que confiere resistencia a la higromicina. Un experto en la técnica es capaz de elegir un marcador seleccionable adecuado para el uso en un cassette de expresión de la invención.

Marcadores seleccionables adicionales incluyen, a modo no taxativo, una secuencia de nucleótidos que codifica β -glucuronidasa o *uidA* (GUS) que codifica una enzima para la cual se conocen varios sustratos cromogénico; una secuencia de nucleótidos locus R que codifica un producto que regula la producción de pigmentos de antocianina (color rojo) en tejidos de plantas (Dellaporta *et al.*, "Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon-tagging with Ac," págs. 263-282 In: *Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts*, 18th Stadler Genetics Symposium (Gustafson & Appels eds., Plenum Press 1988)); una secuencia de nucleótidos que codifica β -lactamasa, una enzima para la cual se conocen varios sustratos cromogénicos (por ejemplo, PADAC, una cefalosporina cromogénica) (Sutcliffe (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3737-3741); una secuencia de nucleótidos que codifica *xyIE* que codifica una catecol dioxigenasa (Zukowsky *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1101-1105); una secuencia de nucleótidos que codifica tirosinasa, una enzima capaz de oxidar tirosina a DOPA y dopaquinona, que a su vez se condensa para formar melanina (Katz *et al.* (1983) *J. Gen. Microbiol.* 129:2703-2714); una secuencia de nucleótidos que codifica β -galactosidasa, una enzima para la cual hay sustratos cromogénicos; una secuencia de nucleótidos que codifica luciferasa (*lux*) que permite la detección por bioluminiscencia (Ow *et al.* (1986) *Science* 234:856-859); una secuencia de nucleótidos que codifica aequorina, que puede emplearse en detección de bioluminiscencia sensible al calcio (Prasher *et al.* (1985) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 126:1259-1268); o una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína fluorescente verde (Niedz *et al.* (1995) *Plant Cell Reports* 14:403-406). Un experto en la técnica es capaz de elegir un marcador seleccionable adecuado para el uso en un cassette de expresión de la invención.

Un cassette de expresión de la invención también puede incluir polinucleótidos que codifican otros rasgos deseados. Dichos rasgos deseados pueden ser otros polinucleótidos que confieren resistencia a insectos o que confieren resistencia a nemátodos, u otros rasgos agrícolamente deseables. Dichos polinucleótidos pueden apilarse con

cualquier combinación de secuencias de nucleótidos para crear plantas, partes de plantas o células de plantas que tienen el fenotipo deseado. Las combinaciones apiladas pueden crearse mediante cualquier método incluyendo, a modo no taxativo, plantas de fertilización cruzada por cualquier metodología convencional o mediante transformación genética. Si se apilan transformando genéticamente las plantas, las secuencias de nucleótidos que codifican rasgos deseados adicionales pueden combinarse en cualquier momento y en cualquier orden. Por ejemplo, un único transgén puede comprender múltiples cassettes de expresión, de modo que los cassettes de expresión múltiples se introducen en el genoma de una célula transformada en una ubicación genómica única. Alternativamente, una planta transgénica que comprende uno o más rasgos deseados puede utilizarse como el objetivo para introducir rasgos adicionales mediante transformación posterior. Las secuencias de nucleótidos adicionales pueden introducirse simultáneamente en un protocolo de co-transformación con una secuencia de nucleótidos, molécula de ácido nucleico, constructo de ácido nucleico y/u otra composición de la invención, proporcionada por cualquier combinación de cassettes de expresión. Por ejemplo, si se introducirán dos secuencias de nucleótidos, puede incorporarse en cassettes separados (*trans*) o pueden incorporarse en el mismo cassette (*cis*). La expresión de las secuencias de nucleótidos puede ser conducida por el mismo promotor o por diferentes promotores. Se reconoce adicionalmente que las secuencias de nucleótidos pueden apilarse en una ubicación genómica deseada utilizando un sistema de recombinación de sitio específico. Ver, por ejemplo, Publicación de solicitud de Patente Internacional Nos. WO 99/25821; WO 99/25854; WO 99/25840; WO 99/25855 y WO 99/25853.

Por lo tanto, un cassette de expresión puede incluir una secuencia de codificación para uno o más polipéptidos para rasgos agronómicos que principalmente son de beneficio para una compañía de semillas, cultivador o procesador de granos. Un polipéptido de interés puede ser cualquier polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótidos de interés. Ejemplos no taxativos de polipéptidos de interés que son adecuados para la producción en plantas incluyen aquellos que resultan en rasgos agrícolamente importantes tales como resistencia a herbicidas (también denominado "tolerancia a herbicidas"), resistencia a virus, resistencia a patógeno bacteriano, resistencia a insectos, resistencia a nemátodos y/o resistencia fúngica. Ver, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,569,823; 5,304,730; 5,495,071; 6,329,504; y 6,337,431.

Los vectores adecuados para la transformación de plantas se describen en otros lados en esta memoria descriptiva. Para la transformación mediada por *Agrobacterium*, son adecuados los vectores binarios o vectores que portan al menos una secuencia límite de ADN-T, mientras para la transferencia génica directa cualquier vector es adecuado y puede ser preferido ADN lineal que contiene sólo el constructo de interés. En el caso de transferencia génica directa, puede utilizarse la transformación con una única especie de ADN o co-transformación (Schocher *et al.* *Biotechnology* 4:1093-1096 (1986)). Para la transferencia génica directa y transferencia mediada por *Agrobacterium*, la transformación es a menudo (pero no necesariamente) realizada con un marcador seleccionable que puede proporcionar resistencia a un antibiótico (kanamicina, higromicina o metotrexato) o un herbicida (basta). Los vectores de transformación de planta de la invención también pueden comprender otros genes marcadores seleccionables, por ejemplo, fosfomanosa isomerasa (*pmi*), que proporciona selección positiva de las plantas transgénicas como se divulga en las Patentes de los Estados Unidos 5,767,378 y 5,994,629, o fosfinotricina acetiltransferasa (*pat*), que proporciona tolerancia al herbicida fosfinotricina (*glufosinato*). Sin embargo, la elección de marcador seleccionable no es crítica para la invención.

En otras realizaciones, una secuencia de ácido nucleico de la invención se transforma directamente en el genoma de plástidos. La tecnología de transformación de plástidos se describe extensivamente en la Patente de los Estados Unidos Nos. 5,451,513, 5,545,817 y 5,545,818, en la solicitud PCT no. WO 95/16783, y en McBride *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7301-7305. La técnica básica para la transformación de cloroplastos implica introducir regiones de ADN de plástidos clonados que flanquea un marcador seleccionable junto con el gen de interés en un tejido objetivo adecuado, por ejemplo, utilizando biolística o transformación de protoplastos (por ejemplo, cloruro de calcio o transformación mediada por PEG). Las regiones que flanquean 1 a 1.5 kb, denominadas secuencias objetivo, facilitan la recombinación homóloga con el genoma de plástidos y de este modo permiten el reemplazo o modificación de regiones específicas del plástoma. Inicialmente, las mutaciones puntuales en los genes 16S ARNr de cloroplasto y *rps12* que confieren resistencia a la espectinomicina y/o estreptomycinina se utilizan como marcadores seleccionables para la transformación (Svab, Z., Hajdukiewicz, P., y Maliga, P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8526-8530; Staub, J. M., y Maliga, P. (1992) *Plant Cell* 4, 39-45). Esto resultó en transformantes homoplásmicos estables a una frecuencia de aproximadamente uno por 100 bombardeos de hojas objetivo. La presencia de sitios de clonación entre estos marcadores permitió la creación de un vector que apunta a plástidos para la introducción de genes ajenos (Staub, J.M., y Maliga, P. (1993) *EMBO J.* 12, 601-606). Los aumentos sustanciales en la frecuencia de transformación se obtienen mediante el reemplazo de genes de resistencia antibiótica recesivos de ARNr o proteína *r* con un marcador seleccionable dominante, el gen *aadA* bacteriano que codifica la enzima aminoglicósido-3'-adeniltransferasa que cletoxicifica espectinomicina (Svab, Z., y Maliga, P. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 913-917). Previamente, este marcador ha sido utilizado de manera exitosa para la transformación de alta frecuencia del genoma de plástidos de las algas verdes *Chlamydomonas reinhardtii* (Goldschmidt- Clermont, M. (1991) *Nucl. Acids Res.* 19:4083-4089). Otros marcadores seleccionables útiles para la transformación de plástidos son conocidos en la técnica y están abarcados dentro del alcance de la invención. Típicamente, se requieren aproximadamente 15-20 ciclos de división celular luego de la transformación para alcanzar un estado homoplásmico. La expresión de plástidos, en la cual los genes se insertan mediante recombinación homóloga en todas las diversas copias de copias del genoma de plástido circular presente en cada célula de planta, toma ventaja del enorme

número de copias ventaja sobre los genes de expresión nuclear para permitir los niveles de expresión que puede exceder fácilmente 10% de la proteína de planta soluble total. En una realización preferida, una secuencia de ácido nucleico de la presente invención se inserta en un vector que apunta a plástidos y se transforma en el genoma de plástidos de un huésped de planta deseada. Se obtienen las plantas homoplásticas para genomas de plástidos que contienen una secuencia de ácido nucleico de la presente invención y son preferentemente capaces de expresión alta de la secuencia de ácido nucleico.

Las plantas o semilla transgénicas que comprenden un ARN de interferencia de la invención también pueden tratarse con un insecticida o recubrimiento de semilla con insecticida como se describe en la Patente de los Estados Unidos Nos. 5,849,320 y 5,876,739. Donde el insecticida o recubrimiento de semillas con insecticida y la planta o semilla transgénica de la invención están activas contra el mismo insecto objetivo, por ejemplo una plaga objetivo *Diabrotica*, la combinación es útil (i) en un método para mejorar adicionalmente la actividad de la composición de la invención contra el insecto objetivo y (ii) en un método para prevenir el desarrollo de la resistencia a la composición de la invención al proporcionar otro mecanismo de acción contra el insecto objetivo. Por lo tanto, la invención proporciona un método para mejorar el control de una población de insectos *Diabrotica* que comprende proporcionar una planta o semilla transgénica de la invención y aplicar a la planta o la semilla un insecticida o recubrimiento de semilla con insecticida a una planta o semilla transgénica de la invención. Ejemplos de dichos insecticidas y/o recubrimientos de semillas con insecticidas incluyen, a modo no taxativo, un carbamato, un piretroide, un organofosfato, un friprol, un neonicotinoide, un organocloruros, una nereistoxina, o una combinación de los mismos. En otra realización, el insecticida o recubrimiento de semillas con insecticida se seleccionan del grupo que consiste en carbofurán, carbarilo, metomilo, bifentrina, teflutrina, permetrina, ciflutrina, lambda-cihalotrina, cipermetrina, deltametrina, clorpirifós, cloretoxifós, dimetoato, etoprofós, malatión, metil-paratión, forato, terbufos, tebupirimifos, fipronil, acetamiprid, imidacloprid, tiacloprid, tiametoxám, endosulfán, bensultap y una combinación de los mismos. Los productos comerciales que contienen dichos insecticidas y recubrimientos de semillas con insecticidas incluyen, a modo no taxativo, Furadan®, Lanate®, Sevin®, Talstar®, Force®, Ammo®, Cymbush®, Delta Gold®, Karate®, Ambush®, Pounce®, Brigade®, Capture®, ProShield®, Warrior®, Dursban®, Fortress®, Mocap®, Thimet®, AStar®, Rampart®, Counter®, Cygon®, Dicap®, Regent®, Cruiser®, Gaucho®, Prescribe®, Poncho® y Aztec®.

Las composiciones de la invención también pueden combinarse con otros agentes de control biológico para mejorar el control de poblaciones de insectos *Diabrotica*. Por lo tanto, la invención proporciona un método para mejorar el control de una población de insectos *Diabrotica* mediante la proporción de una planta transgénica que produce un ARN de interferencia de la invención y comprende además un polinucleótidos que codifica un agente plaguicida, tal como por ejemplo una patatina, una proteasa, una proteína insecticida, una proteína insecticida derivada de bacterias, una proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis*, una proteína insecticida o complejo de proteína de *Xenorhabdus*, una proteína insecticida o complejo de proteína de *Photorhabdus*, una proteína insecticida o complejo de proteína de *Bacillus laterosporus* y una proteína insecticida de *Bacillus sphaericus*. En algunas realizaciones, la proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis* se selecciona del grupo que consiste en una proteína Cry1, una proteína Cry3, una proteína Cry 7, una proteína Cry8, una proteína Cry 23, una proteína Cry 36, una proteína Cry37, una proteína Cry34 junto con una proteína Cry35, una proteína Cry3A modificada y proteínas híbridas preparadas a partir de ellas. En otras realizaciones, la proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis* se selecciona del grupo que consiste en Cry3Bb1, Cry34Ab1 junto con Cry35Ab1, mCry3A y eCry3.1Ab. En otra realización, la planta transgénica y semilla transgénica es una planta de maíz o semilla de maíz. En otra realización, la planta de maíz transgénica se proporciona al cruzar una primera planta de maíz transgénica que comprende un ARNdh de la invención con una planta de maíz transgénica que comprende un evento transgénico seleccionado del grupo que consiste en MIR604, Evento 5307, DAS51922-7, MON863 y MON88017.

Incluso donde el insecticida o recubrimiento de semillas con insecticida está activo contra un insecto diferente, el insecticida o recubrimiento de semillas con insecticida es útil para expandir el rango de control de insectos, por ejemplo al agregar un insecticida o recubrimiento de semilla de insecticidas que tiene actividad contra insectos lepidópteros con la planta o semilla transgénica de la invención, que tiene actividad contra insectos coleópteros, la planta tratada o semilla transgénica recubierta controla las plagas de insectos lepidópteros y coleópteros.

En realizaciones adicionales, la invención abarca una muestra biológica de una planta transgénica, semilla o partes de la misma, de la invención, en donde la muestra comprende un ácido nucleico que es o codifica al menos una hebra de ARNdh de la invención. En otras realizaciones, la invención abarca un producto básico derivado de una planta transgénica, semilla o partes de la misma, de la invención. En algunas realizaciones, el producto básico se selecciona del grupo que consiste en semillas, frijoles, granos, cáscaras, comidas, polvos, harinas, azúcares, azúcares, almidones, concentrados de proteína, aislados de proteínas, ceras, aceites, extractos, jugos, concentrados, líquidos, jarabes, pienso, ensilado, fibra, papel u otro alimento o producto producido a partir de plantas entero o procesado. En otras realizaciones, la muestra biológica o producto básico es tóxico para insectos. En otras realizaciones, la planta transgénica es una planta de maíz transgénica.

La invención abarca además un método para controlar un insecto *Diabrotica* que comprende poner en contacto el insecto *Diabrotica* con una molécula de ácido nucleico que es o es capaz de producir una molécula de ARN de interferencia de la invención para inhibir la expresión de un gen de *histona* en el insecto *Diabrotica* controlando de este modo el insecto *Diabrotica*. En algunas realizaciones, el gen de *histona* comprende una secuencia que codifica

histona (i) que tiene al menos 95% de identidad, con al menos un fragmento de 21 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 47, o el complemento de las mismas; o (ii) que comprende al menos un fragmento de 19 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 47, o el complemento de las mismas; o (iii) que comprende al menos un fragmento de 19 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 47, o el complemento de las mismas. En algunas realizaciones la secuencia que codifica *histona* comprende la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 47. En otras realizaciones, la molécula de ARN de interferencia de la invención es complementaria con una porción de un polinucleótido de ARNm transcribible del gen de histona de *Diabrotica*.

En algunas realizaciones del método para controlar una plaga de insectos *Diabrotica*, la molécula de ARN de interferencia comprende, consiste esencialmente o consiste en 18, 19, 20 o 21 nucleótidos consecutivos a al menos aproximadamente 300 nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 48. En otras realizaciones, el ARN de interferencia de la invención comprende, consiste esencialmente o consiste en (a) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 3 (ARNm de *DvH4*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 291 de la SEQ ID NO: 3; (b) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 7 (ARNm de *DvH2B*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 351 de la SEQ ID NO: 7; (c) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 29 (ARNm de *DuH4-1*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 291 de la SEQ ID NO: 29; (d) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 33 (ARNm de *DuH4-2*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 291 de la SEQ ID NO: 33; (e) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 38 (ARNm de *DuH2B*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 351 de la SEQ ID NO: 38; (f) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 43 (ARNm de *DbH4*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 291 de la SEQ ID NO: 43; o (f) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 48 (ARNm de *DbH2B*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 351 de la SEQ ID NO: 48. En otras palabras, el método para controlar una plaga de insectos *Diabrotica* comprende un ARN de interferencia que comprende, consiste esencialmente o consiste en cualquiera de, por ejemplo, 291 subsecuencias de 19 nucleótidos consecutivos (es decir, 19-meros) de la SEQ ID NO:3, por ejemplo, las bases 1-19 (5'- AUGACUGGACGUGGAAAGG-3') (SEQ ID NO:11), bases 2-20 (5'- UGACUGGACGUGGAAAGGG-3') (SEQ ID NO:12), bases 3-21 (5'- GACUGGACGUGGAAAGGGU -3') (SEQ ID NO:13) y demás hasta las bases 291-309 (5'- UUUGUACGGUUUUGGUGGU -3') (SEQ ID NO:14). En otras realizaciones, el método para controlar una plaga de insectos *Diabrotica* comprende un ARN de interferencia que comprende, consiste esencialmente o consiste en cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO:7 (ARNm de *DvH2B*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 351 de la SEQ ID NO:4. En otras palabras, la porción del ARNm objetivo comprende, consiste esencialmente o consiste en cualquiera de las 351 subsecuencias de 19 nucleótidos consecutivos (es decir, 19-meros) de la SEQ ID NO:7, por ejemplo, las bases 1-19 (5'- AUGCCUCCUAAGACGAGUG -3') (SEQ ID NO:15), bases 2-20 (5'- UGCCUCCUAAGACGAGUGG -3') (SEQ ID NO:16), bases 3-21 (5'- GCCUCCUAAGACGAGUGGU -3') (SEQ ID NO:17) y demás hasta las bases 351-369 (5'- UAAAUACACAAGUUCUAAG -3') (SEQ ID NO:18). En aun otras realizaciones, el método para controlar una plaga de insectos *Diabrotica*, comprende un ARN de interferencia que el ARN de interferencia de la invención comprende, consiste esencialmente o consiste en la SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 48.

En algunas realizaciones del método para controlar una plaga de insectos *Diabrotica*, la molécula de ARN de interferencia comprende, consiste esencialmente o consiste en (a) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 4 (*DvH2B**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 291 de la SEQ ID NO: 4; (b) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 8 (*DvH2B**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 351 de la SEQ ID NO: 7; (c) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 30 (*DuH4-1**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 291 de la SEQ ID NO: 30; (d) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 34 (*DuH4-2**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 291 de la SEQ ID NO: 34; (e) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 39 (*DuH2B**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 351 de la SEQ ID NO: 39; (f) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 44 (*DbH4**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 291 de la SEQ ID NO: 44; o (f) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 49 (*DbH2B**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 351 de la SEQ ID NO: 49.

En otras palabras, el método para controlar una plaga de insectos *Diabrotica* comprende un ARN de interferencia que comprende, consiste esencialmente o consiste, por ejemplo, en cualquiera de 291 subsecuencias de 19 nucleótidos consecutivos (es decir, 19-meros) de la SEQ ID NO:4, por ejemplo, las bases 1-19 (5'- UACUGACCUGCACCUUUC -3') (SEQ ID NO:19), bases 2-20 (5'- ACUGACCUGCACCUUUC -3') (SEQ ID NO:20), bases 3-21 (5'- CUGACCUGCACCUUUC -3') (SEQ ID NO:21) y demás hasta las bases 291-309 (5'- AAACAUGCCAAAACCA -3') (SEQ ID NO:22). En otras realizaciones, el método para controlar una plaga de insectos *Diabrotica*, comprende un ARN de interferencia que puede comprender, consistir esencialmente o consistir en la secuencia de nucleótidos de cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO:8 (*DvH2B**) que consiste en

N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 351 de la SEQ ID NO:8. En otras palabras, la hebra antisentido comprende, consiste esencialmente o consiste en cualquiera de las 351 subsecuencias de 19 nucleótidos consecutivos (es decir, 19-meros) de la SEQ ID NO:8, por ejemplo, las bases 1-19 (5'-UACGGAGGAUUCUGCUCAC -3') (SEQ ID NO:23), bases 2-20 (5'-ACGGAGGAUUCUGCUCACC -3') (SEQ ID NO:24), bases 3-21 (5'-CGGAGGAUUCUGCUCACCA -3') (SEQ ID NO:25) y demás hasta las bases 351-369 (5'-UGAUUUUAUGUGUCAAGAU -3') (SEQ ID NO:26). En otras realizaciones, el método para controlar una plaga de insectos *Diabrotica*, comprende un ARN de interferencia que puede comprender, consistir esencialmente o consistir en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 49.

En algunas realizaciones del método para controlar una plaga de insectos *Diabrotica*, el insecto *Diabrotica* se selecciona del grupo que consiste en *D. barberi* (gusano de la raíz del maíz del norte), *D. virgifera virgifera* (gusano de la raíz del maíz del oeste), *D. undecimpunctata howardi* (gusano de la raíz del maíz del sur), *D. balteata* (escarabajo del pepino rayado), *D. undecimpunctata undecimpunctata* (escarabajo del pepino de manchas del oeste), *D. signifcata* (escarabajo de la hoja de 3 manchas), *D. speciosa* (escarabajo del crisantemo) y *D. virgifera zaeae* (gusano de la raíz del maíz de México).

En otras realizaciones del método para controlar el insecto *Diabrotica*, el contacto comprende (a) plantar una semilla transgénica capaz de producir una planta transgénica que expresa la molécula de ácido nucleico, en donde el insecto *Diabrotica* se alimenta de la planta transgénica, o parte de la misma; o (b) aplicar una composición que comprende la molécula de ácido nucleico a una semilla o planta, o parte de la misma, en donde el insecto *Diabrotica* se alimenta de la semilla, la planta o una parte de la misma. En algunas realizaciones, la semilla transgénica y la planta transgénica es una semilla de maíz o una planta de maíz. En otras realizaciones, la semilla o planta es una semilla de maíz o una planta de maíz.

La invención también abarca un método para reducir una población de insectos *Diabrotica* adultos en una planta transgénica que expresa una proteína Cry, una proteína Cry híbrida o proteína Cry modificada que comprende expresar en la planta transgénica una molécula de ácido nucleico que es o es capaz de producir un ARN de interferencia capaz de inhibir la expresión de un gen de histona en un insecto *Diabrotica* adulto reduciendo así la población del insecto *Diabrotica* adulto.

En algunos aspectos, la divulgación abarca un método para reducir el nivel de un ARNm objetivo transcribible de un gen de *histona* en un insecto *Diabrotica* que comprende poner en contacto el insecto *Diabrotica* con una composición que comprende la molécula de ARN de interferencia de la invención, en donde la molécula de ARN de interferencia reduce el nivel del ARNm objetivo en una célula del insecto *Diabrotica*. En algunos aspectos, el ARN de interferencia del método comprende al menos un ARNdH en donde el ARNdH es una región de ARN de doble hebra que comprende hebras complementarias apareadas, una hebra del cual comprende una secuencia de al menos 19 nucleótidos contiguos que es al menos parcialmente complementaria con una secuencia de nucleótidos objetivo en un gen objetivo de la histona de *Diabrotica* spp y en donde la molécula de ARN de interferencia (i) es al menos 95% idéntica a al menos un fragmento de 21 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 47, o su complemento; o (ii) comprende al menos un fragmento de 19 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 47, o su complemento; o (iii) comprende al menos un fragmento de 19 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 47, o su complemento, en donde la molécula de ARN de interferencia regula hacia abajo el gen objetivo de la histona en un insecto *Diabrotica* objetivo. En otra realización, el contacto se logra por la alimentación del insecto *Diabrotica* de la composición. En otras realizaciones, se reduce la producción de una proteína de histona codificada por el ARNm objetivo. En otras realizaciones, la proteína de histona es una histona H4 o una histona H2B. En otras realizaciones, la proteína de histona comprende un aminoácido que tiene al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98% o al menos aproximadamente 99% de identidad con la SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 50. En otras realizaciones, la proteína de histona comprende la SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:10. En otras realizaciones, el ARN de interferencia se pone en contacto con un insecto *Diabrotica* a través de un organismo transgénico que expresa el ARN de interferencia. En otras realizaciones, el organismo transgénico es una planta transgénica, una bacteria transgénica o un endófito transgénico. En otras realizaciones, el ARN de interferencia se pone en contacto con un insecto *Diabrotica* aplicando tópicamente un ARN de interferencia en un portador agrícola aceptable a una planta o parte de planta sobre la cual se alimentan los insectos *Diabrotica*. En algunas realizaciones, el ARN de interferencia que reduce el nivel de un ARNm objetivo transcribible de un gen de histona en un insecto *Diabrotica* es letal para el insecto *Diabrotica*. En algunas realizaciones, el insecto *Diabrotica* se selecciona del grupo que consiste en *D. barberi* (gusano de la raíz del maíz del norte), *D. virgifera virgifera* (gusano de la raíz del maíz del oeste), *D. undecimpunctata howardi* (gusano de la raíz del maíz del sur), *D. balteata* (escarabajo del pepino rayado), *D. undecimpunctata undecimpunctata*

(escarabajo del pepino de manchas del oeste), *D. significata* (escarabajo de la hoja de 3 manchas), *D. speciosa* (escarabajo del crisantemo) y *D. virgifera zea* (gusano de la raíz del maíz de México).

5 En algunas realizaciones, la invención abarca un método para conferir tolerancia al insecto *Diabrotica* a una planta, o parte de la misma, que comprende introducir en la planta o parte de la misma, una molécula de ARN de interferencia, una molécula de ARNdh, un constructo de ácido nucleico, una molécula de ácido nucleico quimérica, una molécula precursora de microARN de planta artificial y/o una composición de la invención, en donde la molécula de ARNdh, constructo de ácido nucleico, una molécula de ácido nucleico quimérica, molécula precursora de microARN de planta artificial y/o composición de la invención son tóxicos para el insecto *Diabrotica*, confiriendo así tolerancia de la planta o parte de la misma al insecto *Diabrotica*. En otras realizaciones, el paso de introducción se realiza transformando una célula de planta y produciendo la planta transgénica a partir de la célula de planta transformada. En otras realizaciones, el paso de introducción se realiza mediante la reproducción de dos plantas juntas.

15 En otros aspectos, la divulgación abarca un método para reducir el daño a la raíz de una planta con la que se alimenta un insecto *Diabrotica*, que comprende introducir en células de la planta una molécula de ARN de interferencia, un ARNdh, una molécula de ácido nucleico, un constructo de ácido nucleico, una molécula de ácido nucleico quimérica, una molécula precursora de microARN de planta artificial y/o una composición de la invención, en donde el ARNdh, molécula de ácido nucleico, molécula de ácido nucleico quimérica, molécula precursora de microARN de planta artificial y/o composición de la invención son tóxicos para el insecto *Diabrotica*, reduciendo así el daño a la raíz de la planta. En otros aspectos, el paso de introducción se realiza transformando una célula de planta y produciendo la planta transgénica a partir de la célula de planta transformada. En aun otros aspectos, el paso de introducción se realiza mediante la reproducción de dos plantas juntas.

25 En aun otras realizaciones, la invención abarca un método para producir una célula de planta transgénica que tiene toxicidad para un insecto *Diabrotica*, que comprende introducir en células de la planta una molécula de ARN de interferencia, un ARNdh, una molécula de ácido nucleico, un constructo de ácido nucleico, una molécula de ácido nucleico quimérica, una molécula precursora de microARN de planta artificial y/o una composición de la invención, produciendo así la célula de planta transgénica que tiene toxicidad para el insecto *Diabrotica* en comparación con una célula de planta testigo. En algunas realizaciones, la invención abarca una pluralidad de células de plantas transgénicas producidas por el presente método. En otras realizaciones, la pluralidad de células de plantas transgénicas se cultivan en condiciones que incluyen luz solar natural. En otras realizaciones, el paso de introducción se realiza transformando una célula de planta y produciendo la planta transgénica a partir de la célula de planta transformada. En aun otras realizaciones, el paso de introducción se realiza mediante la reproducción de dos plantas juntas.

40 En algunas realizaciones, la invención abarca un método para producir una planta transgénica que tiene tolerancia mejorada para el daño por la alimentación del insecto *Diabrotica*, que comprende introducir en una planta una molécula de ARN de interferencia, un ARNdh, una molécula de ácido nucleico, un constructo de ácido nucleico, una molécula de ácido nucleico quimérica, una molécula precursora de microARN de planta artificial y/o una composición de la invención, produciendo así una planta transgénica que tiene tolerancia mejorada para el daño por la alimentación del insecto *Diabrotica* en comparación con una planta testigo. En otras realizaciones, el paso de introducción se realiza transformando una célula de planta y produciendo la planta transgénica a partir de la célula de planta transformada. En otras realizaciones, el paso de introducción se realiza mediante la reproducción de dos plantas juntas.

50 En algunos aspectos, la divulgación abarca un método para proporcionar a un cultivador de maíz un medio para controlar una población de plaga de insectos *Diabrotica* en un cultivo de maíz que comprende (a) vender o proporcionar al cultivador semillas de maíz transgénicas que comprenden un ARN de interferencia, una molécula de ácido nucleico, un constructo de ácido nucleico, una molécula de ácido nucleico quimérica, una molécula precursora de microARN de planta artificial y/o una composición de la invención; y (b) explicar al cultivador que la semilla de maíz transgénica produce plantas de maíz transgénicas que controlan una población de plaga de *Diabrotica*.

EJEMPLOS

55 La presente invención se describirá adicionalmente en referencia a los siguientes ejemplos detallados. Estos ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos solamente y no pretenden ser limitativos, a menos que se especifique de otra forma.

60 Ejemplo 1. Identificación de genes de histona en *Diabrotica virgifera virgifera*

Este ejemplo describe la clonación y secuenciación de genes de histona y secuencias de codificación de insectos *Diabrotica*.

65 **Aislamiento de ARN de *Diabrotica virgifera virgifera* (gusano de la raíz del maíz del oeste; WCR) y *Diabrotica undecimpunctata howardi* (gusano de la raíz del maíz del sur; SCR)**

Se adquirieron huevos de WCR y SCR comercialmente disponibles (Crop Characteristics, Inc, Farmington, MN) y se incubaron a aproximadamente 30°C y humedad relativa ambiente. Se recolectaron SCR neonatos recién emergidos (aproximadamente 100-200) y se extrajo ARN total con un kit de aislamiento de ARN PicoPure™ (Life Technologies, Carlsbad, CA) básicamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN se midió mediante espectrofotometría y la pureza se evaluó mediante las relaciones de absorbancia $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$.

Aislamiento de ARN de *Diabrotica barberi* (gusano de la raíz del maíz del norte; NCR)

Se obtuvieron huevos de NCR de las instalaciones de cría de insectos del NCARL del ARS del USDA (Brookings, SD) y se incubaron a aproximadamente 30°C y humedad relativa ambiente. Se recolectaron neonatos recién emergidos (aproximadamente 20 en total) y se extrajo ARN total con un kit de aislamiento de ARN PicoPure™ (Life Technologies, Carlsbad, CA) básicamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN se midió mediante espectrofotometría y la pureza se evaluó mediante las relaciones $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$.

Preparación y secuenciación de bibliotecas por pirosecuenciación de *Diabrotica virgifera virgifera*

Se secuenció un transcriptoma de WCR neonatos de cuerpo completo mediante pirosecuenciación en una plataforma 454 (454 Life Sciences, Branford, CT) básicamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las lecturas resultantes (es decir, fragmentos cortos de secuencia de ácidos nucleicos) se recortaron y ensamblaron usando un ensamblador MIRA (ver, por ejemplo, Chevreur et al. 2004. Genome Res. 14:1147-1159).

Preparación y secuenciación de bibliotecas de *Diabrotica virgifera virgifera*, *D. undecimpunctata howardii* y *D. barberi* Illumina

Se secuenciaron transcriptomas de neonatos de cuerpo completo en un Illumina Hi-Seq 2000 y la biblioteca final apareada con 100 pb se construyó básicamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las lecturas 2x100 de Hi-Seq resultantes se recuperaron y unieron para su procesamiento. Las lecturas se ensamblaron usando ABySS versión 1.3.5 en un grupo SGE que permite el uso de MPI. Se llevó a cabo un barrido de k-mero para cada muestra para optimizar los ensamblajes que variaron entre R y R/2 (donde R es la longitud de la lectura, ~2 por paso). Los caminos únicos ("unipaths") de ABySS se recuperaron de cada k-mero y se deshizo la redundancia en un 98 % por ciento de identidad usando Cd-Hit-Est versión 4.6. El conjunto de caminos únicos sin redundancia se procesó usando Cap3 con una exigencia de superposición de 100 bases. La redundancia de los ensamblajes resultantes se deshizo usando Cd-Hit-Est. Luego los datos se sometieron a andamiaje usando el programa de andamiaje de abyss (independiente del flujo de trabajo de ABySS pero que utiliza mucha de las herramientas). El ensamblaje se finalizó cerrando los huecos con SOAPdenovo GapCloser versión 1.10. Las lecturas se alinearon con el ensamblaje final usando BWA para asegurar una buena incorporación de las secuencias leídas y observar los perfiles de cobertura y las estructuras de apareadas.

Identificación de los genes H2B y H4 de *Diabrotica* spp.

Se compraron secuencias contiguas ensambladas (denominadas en la presente cóntigos) para cada una de las tres especies de *Diabrotica* vía BLASTX (traducciones de nucleótidos buscadas en una base de datos de proteínas) con las bases de datos Uniprot Sprot, Uniprot Trembl y Genbank NR. Los cóntigos con coincidencias con genes de histona con un valor esperado de $1e-10$ o inferior se consideraron posibles coincidencias significativas. Se identifican genes H2B y H4 de longitud completa en cada una de las tres especies. Las secuencias de ADNc de WCR H4 y H2B son las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6, respectivamente.

Las secuencias de H2B de WCR y H4 de WCR fueron confirmadas por secuenciación de Sanger (usando métodos estándar) con cebadores directos e inversos para amplificar la secuencia codificadora completa de cada gen (Tabla 1).

Tabla 1. Cebadores utilizados para amplificar las regiones de codificación de H2b de WCR y H4 de WCR.

Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')	Identificador de secuencia
WCR H2B FP01	ATGCCTCCTAAGACGAGTGG	SEQ ID NO: 51
WCR H2B RP01	CTTAGAACTTGTGTATTTAG	SEQ ID NO: 52
WCR H4 FP02	ATGACTGGACGTGGAAAGGG	SEQ ID NO: 53
WCR H4 RP02	ACCACCAAACCGTACAAAG	SEQ ID NO: 54

Ejemplo 2. Construcción de moléculas de ARN de interferencia

Este ejemplo describe la construcción de moléculas de ARN de interferencia diseñadas para dirigirse a ARNm transcribible de genes de histona de *Diabrotica*.

Construcción de ARNdh de histona H2b e histona H4 de WCR

Los genes de H2B y H4 se amplificaron a partir de ADNc que se transcribió inversamente usando métodos estándar a partir de ARNm aislado de los neonatos recientemente emergidos de cuerpo completo. Se usaron cebadores que contenían secuencias promotoras T7 (Tabla 2) para amplificar la región de codificación de longitud completa de los genes con posterior transcripción *in vitro*, usando métodos estándar, para sintetizar ARNdH, también denominado moléculas de ARN de interferencia. El ARN se purificó mediante precipitación con volúmenes iguales de acetato de amonio 5 M, con posterior lavado con al menos 2 volúmenes de etanol al 70% y luego resuspensión del granulado de ARN seco con agua doblemente destilada.

Tabla 2. Cebadores utilizados para amplificar las regiones de codificación de H2b de WCR y H4 de WCR e incorporar secuencias promotoras T7 para facilitar la transcripción *in vitro*

Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')	Identificador de secuencia
WCR_H2B_FP03	TAATACGACTCACTATAGGG ATGCCTCCTAAGACGAGTGG	SEQ ID NO: 55
WCR_H2B_RP03	TAATACGACTCACTATAGGG CTTAGAAGTTGTGTATTTAG	SEQ ID NO: 56
WCR_H4_FP04	TAATACGACTCACTATAGGG ATGACTGGACGTGGAAAGGG	SEQ ID NO: 57
WCR_H4_RP04	TAATACGACTCACTATAGGG ACCACCAAACCGTACAAAG	SEQ ID NO: 58

Ejemplo 3. Actividad de ARNdH contra *Diabrotica virgifera*

Este ejemplo describe la evaluación de moléculas de ARN de interferencia de la invención para evaluar la actividad biológica contra *Diabrotica virgifera*.

Se evaluó la toxicidad contra *Diabrotica virgifera* de las moléculas de ARN de interferencia que comprenden el ARNdH descrito anteriormente en bioensayos de laboratorio. Los bioensayos se realizaron usando un método de dieta artificial tratada con ARN. Brevemente, dieta artificial fundida, modificada a partir de la dieta de Marrone et al. 1985 (J. Econ. Entomol. 78:290-293), se vertió en cada pocillo de placas de 24 pocillos y se dejó que se solidificara. Se diluyeron moléculas de ARN de interferencia hasta la concentración apropiada de forma que 60 µl de la solución se agregaron a la superficie de la dieta en cada pocillo, con una concentración de recubrimiento final de 100 ng de ARNdH/cm². Se agregó una larva de *Diabrotica* a cada pocillo y cada placa de 24 pocillos se mantuvo a aproximadamente 28°C y un fotoperíodo de 16:8 de luz:oscuridad. La mortalidad se registró a los 9 y 12 d postinfestación. Se usaron moléculas de ARN de interferencia que comprendían ARNdH diseñado para dirigirse a la proteína fluorescente verde (GFP) en todos los bioensayos como testigo negativo. El bioensayo se repitió dos veces.

Las moléculas de ARN de interferencia que comprendían ARN de doble hebra diseñados para la secuencia de codificación completa de ARNm de H2B y H4 de *Diabrotica virgifera* se evaluaron con respecto a larvas del gusano de la raíz del maíz del oeste. Los resultados, que se muestran en la Tabla 3, demuestran que una molécula de ARN de interferencia diseñada para dirigirse a ARNm transcribible de un gen de histona de insecto *Diabrotica* es altamente tóxica para *Diabrotica virgifera* (gusano de la raíz del maíz del oeste). En estos bioensayos, *histona2b* de *wcr*/*histona2b* de *wcr** (SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 8) e *histona4* de *wcr*/*histona4* de *wcr** (SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 4) produjeron 89 y 98% de mortalidad, respectivamente, después de 12 d.

Tabla 3. Actividad de ARNdH contra *Diabrotica virgifera* (gusano de la raíz del maíz del oeste), 12 d después del tratamiento

Tratamiento de ARNdH	Tamaño de muestra		Mortalidad % de WCR		
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Media
H2B de <i>wcr</i> / H2B de <i>wcr*</i>	24	23	87.5	91.3	89.4
H4 de <i>wcr</i> / H4 de <i>wcr*</i>	24	24	100	95.8	97.9

Ejemplo 4. Actividad de moléculas de ARN de interferencia contra *Diabrotica undecimpunctata howardi*

Este ejemplo describe la evaluación de moléculas de ARN de interferencia de la invención para evaluar la actividad biológica contra *Diabrotica undecimpunctata howardi*.

Se evaluó la toxicidad contra *Diabrotica undecimpunctata* de las moléculas de ARN de interferencia descritas anteriormente en bioensayos de laboratorio. Los bioensayos se realizaron usando un método de dieta artificial tratada con ARN. Brevemente, dieta artificial fundida, modificada a partir de la dieta de Marrone et al. 1985 (J. Econ. Entomol. 78:290-293), se vertió en cada pocillo de placas de 48 pocillos y se dejó que se solidificara. Las moléculas de ARNdH se diluyeron hasta la concentración apropiada de forma que 20 µl de solución se agregaron a la superficie de la dieta en cada pocillo, con una serie de concentración de recubrimiento final de 8 concentraciones entre 0.5µg/pocillo y 0.00022µg/pocillo en pasos de dilución 3x. Se agregó una larva de *Diabrotica* a cada pocillo y cada

placa de 48 pocillos se mantuvo a aproximadamente 25°C y un fotoperíodo de 16:8 de luz:oscuridad. La mortalidad se registró a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 14 días postinfestación. Se usó ARNdh para dirigirse a la proteína fluorescente verde (GFP) en todos los bioensayos como testigo negativo.

5 Las moléculas de ARN de interferencia que comprendían ARN de doble hebra diseñados para la secuencia de codificación de ARNm de H2B y H4 de *Diabrotica virgifera* se evaluaron con respecto a larvas del gusano de la raíz del maíz del sur. Los resultados, que se muestran en la Tabla 4, demuestran que una molécula de ARN de interferencia que comprende ARNdh diseñada para dirigirse a ARNm transcribible de un gen de histona de insecto
10 *Diabrotica* es altamente tóxica para *Diabrotica undecimpunctata howardi* (gusano de la raíz del maíz del sur). En estos bioensayos, *histona2b* de *wcr*/ *histona2b* de *wcr** (SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 8) e *histona4* de *wcr*/ *histona4* de *wcr** (SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 4) produjeron 69.7 y 84.8% de mortalidad, respectivamente, después de 14 d. El testigo positivo se diseñó para dirigirse a un gen altamente expresado del gusano de la raíz del maíz del sur. El LT₅₀ es el tiempo (cantidad de días) necesario para matar la mitad de los integrantes de una población evaluada tras el tratamiento. La LC₅₀ es la concentración (en µg/pocillo) necesaria para matar la mitad de los integrantes de una
15 población evaluada el día 14. Las estimaciones de LT₅₀ y LC₅₀ se obtienen mediante análisis de la curva aplicado a datos corregidos con la fórmula de Abbott.

Tabla 4: Actividad de ARNdh contra *Diabrotica undecimpunctata howardi* (gusano de la raíz del maíz del sur), 14 d después del tratamiento

ARN de interferencia	% mortalidad el día 14	LT ₅₀ a 0.5µg/pocillo	LC ₅₀ el día 14
GFP	8.33	NA	NA
testigo positivo de scr	100.00	5.6	0.0209
histona2B de <i>wcr</i>	72.22	12	0.0855
histona4 de <i>wcr</i>	86.11	11.5	0.0444

20 **Ejemplo 5. Expresión de una molécula de ARN de interferencia que comprende ARNdh de histona en plantas de maíz**

Este ejemplo describe la introducción de un constructo que expresa una molécula de ARN de interferencia en células vegetales.

25 **Construcción de vectores**

Los vectores de expresión diseñados para producir ARN de horquilla (ARNh) consistieron en un cassette que contenía un promotor, una hebra sentido, un intrón funcionando como secuencia de bucle, una hebra antisentido y un terminator. Se diseñaron dos cassettes para dirigirse a genes de H2B de WCR o H4 de WCR; un cassette (SEQ ID NO: 59) que contenía las hebras sentido y antisentido para *DvH2B* (SEQ ID NO: 7) y *DvH2B** (SEQ ID NO: 8). Otro cassette (SEQ ID NO: 60) contenía las hebras sentido y antisentido para *DvH4* (SEQ ID NO: 3) y *DvH4** (SEQ ID NO: 4). Las secuencias de hebra sentido y hebra antisentido se flanquearon mediante sitios de endonucleasa de restricción para facilitar la clonación. Los cassettes de expresión resultantes (SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60) se
35 clonaron separadamente en un vector binario adecuado para la transformación vegetal. Cada vector binario completo contenía un segundo cassette entre los límites izquierdo y derecho diseñado para expresar la fosfomanosa isomerasa (*pmi*) como un marcador seleccionable durante la transformación vegetal. El plásmido también contenía marcadores seleccionables para selección en bacterias.

40 **Preparación de *Agrobacterium***

Cada plásmido resultante que contenía el cassette de horquilla se transformó en *Agrobacterium tumefaciens* usando técnicas de biología molecular estándar conocidas para los expertos en la técnica. Para preparar las *Agrobacterias* para la transformación se cultivaron células en medio YPC líquido a 28°C y 220 rpm durante toda la noche.

45 Los vectores descritos anteriormente se transformaron en maíz. La transformación de *Agrobacterium* de embriones de maíz inmaduros se llevó a cabo básicamente como se describe en Negrotto *et al.*, 2000, Plant Cell Reports 19: 798-803. Para este ejemplo, todos los constituyentes son básicamente como se describen en Negrotto *et al.*, *supra*. Sin embargo, pueden sustituirse varios constituyentes del medio conocidos en la técnica.

50 Luego de la transformación, selección y regeneración se evaluó la presencia del gen *pmi* gene y la molécula de ARN de interferencia de ARNdh horquilla en las plantas. Las plantas positivas del ensayo de PCR se transfirieron al invernadero y se evaluó su resistencia a al menos *Diabrotica virgifera* (gusano de la raíz del maíz del oeste).

55 **Ensayo de planta total**

Se infestaron plantas que crecían en macetas de 4" con aproximadamente 200 larvas de gusanos de la raíz del maíz por planta. Para cada ensayo se usaron 3 plantas como testigos sin infestar. Esto incluyó un solo evento de copia

representativo de las plantas de prueba infestadas en el bioensayo, una planta homocigótica que expresa un rasgo de proteína de WCR (testigo positivo) y una planta testigo negativo. Estas plantas actuaron como testigos para las condiciones de crecimiento durante el transcurso del ensayo. Los datos se recolectaron 10-14 días después de la infestación. Las evaluaciones fueron principalmente medidas subjetivas que comparaban plantas de prueba infestadas con las de plantas testigo sin infestar e infestadas. Una evaluación visual clave realizada fue la que evaluó si las plantas mostraron signos de encamado, una condición indicativa de daño grave causado por una alimentación considerable del sistema radicular por parte del gusano de la raíz del maíz. “+” indica que no hay daño radicular aparente; “-” indica fuertes raíces de anclaje, algunos signos de alimentación de raíces secundarias; “--” indica falta de raíces de anclaje fuertes o falta de crecimiento de raíces secundarias, posiblemente por daño por alimentación; ‘---’ indica masa radicular significativamente más pequeña en al menos 2-3 raíces de anclaje.

Tabla 5. Evaluaciones visuales de maíz transgénico infestado con gusano de la raíz del maíz del oeste

Planta	No. de eventos	+	-	--	---
Sin ARNdh	2	0	0	0	2
ARNdh de histona2B	15	8	3	4	0
ARNdh de histona4	15	7	5	3	0

Los datos en la Tabla 5 indican que las plantas de maíz transgénicas que expresaban ARNdh dirigidos a genes que codifican H2B o H4 sufrieron menos daño radicular en comparación con plantas testigo negativo.

Debería comprenderse que los ejemplos y las realizaciones descritos en la presente tienen fines ilustrativos solamente.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Syngenta Participations AG	
5	Donohue, Kevin	
	Liu, Renshui	
	Chen, Jeng Shong	
	<120> Control biológico de plagas de coleópteros	
	<130> 80291-WO-REG-ORG-P-1	
10	<150> 62/096491	
	<151> 2014-12-23	
	<160> 60	
	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
15	<211> 399	
	<212> ADN	
	<213> Diabrotica virgifera	
	<400> 1	
	aattgagtaa ttccaggaca actgaactga ttgtaccatg actggacgtg gaaaggggtg	60
	taaaggtttg ggcaaagggtg gcgctaaacg tcaccgtaaa gtattacgtg acaacatcca	120
	aggtattacc aagcctgcta taagaagatt agctcgtcgc ggaggtgtaa aacgtatctc	180
	tggtttaatc tatgaggaaa cgcgaggtgt attgaaagta tttttggaaa acggtattag	240
	agatgccgtt acctatactg agcagccaa aaggaaaaca gtaactgcta tggatgttgt	300
	atatgcactt aaacgacaag gtogtacttt gtacggtttt ggtgggtaat tgctattaat	360
	ttccatcctt aaaaaaacg gttcttttca gaaccacgt	399
20	<210> 2	
	<211> 309	
	<212> ADN	
	<213> Diabrotica virgifera	
	<400> 2	

ES 2 726 674 T3

atgactggac gtgaaaggg tggtaaaggt ttgggcaaag gtggcgctaa acgtcaccgt 60
aaagtattac gtgacaacat ccaaggtatt accaagcctg ctataagaag attagctcgt 120
cgcggagggtg taaaacgtat ctctggttta atctatgagg aaacgcgagg tgtattgaaa 180
gtatttttgg aaaacgttat tagagatgcc gttacctata ctgagcacgc caaaaggaaa 240
acagtaactg ctatggatgt tgtatatgca cttaaacgac aaggtcgtac tttgtacggt 300
tttggtggt 309

<210> 3

<211> 309

<212> ARN

5 <213> Diabrotica virgifera

<400> 3

augacuggac guggaaaggg ugguaaaggu uugggcaaag guggcgcuua acgucaccgu 60
aaaguauuac gugacaacau ccaagguauu accaagccug cuauaagaag auuagcucgu 120
cgcggaggug uaaaacguau cucugguuua aucuauagagg aaacgcgagg uguauugaaa 180
guauuuuugg aaaacguuau uagagaugcc guuaccuaua cugagcacgc caaaaggaaa 240
acaguaacug cuauggaugu uguauaugca cuuaaacgac aaggucguac uuuguacggu 300
uuugguggu 309

<210> 4

<211> 309

10 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Hebra antisentido de ARNm de DvH4

<400> 4

uacugaccug cacuuuucc accauuucca aaccgguuuc caccgcgauu ugcaguggca 60
uuucauaaag cacuguugua gguuccauaa ugguucggac gauauucuuc uaucgagca 120
gcccuccac auuuugcaua gagacaaau uagauacucc uuugcgucc acauaacuuu 180
cauaaaaacc uuugcaua aucucuacgg caauggauu gacucgugcg guuuuccuuu 240
ugucauugac gauaccuaca acauauacgu gaauuugcug uuccagcaug aaacaugcca 300
aaaccacca 309

15 <210> 5

<211> 478

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

ES 2 726 674 T3

<400> 5

tcgggkagk tttcacttg attttcaaag agtaagcgtc attttgttt tgcgatgcct 60
 cctaagacga gtggtaaagc tgctaaaaa gcagggaaag cccagaagaa catttcaaaa 120
 accgataaga aaaagaagcg aaagaggaag gaaagytag ctatttacat ttataaagta 180
 ctcaacaag tgcacctga taccggtatt tccagtaagg ctatgagtat catgaacagt 240
 tttgtaaatg atatttttga aagaatcgca gctgaagctt ctcgtttagc tcattataat 300
 aaacgttcta caattacaag cagagaaatt caaaccgag tacgtttatt acttcctgga 360
 gaattagcta aacacgctgt cagtgaaggt accaaagctg ttactaaata cacaagtctt 420
 aagtaatcaa gaabtttcat ctattaatta taacmaaagc gttcttttca gaaccaac 478

<210> 6

<211> 369

5

<212> ADN

<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 6

atgcctccta agacgagtgg taaagctgct aaaaaagcag ggaaagccca gaagaacatt 60
 tcaaaaaccg ataagaaaa gaagcgaaag aggaaggaaa gytatgctat ttacatttat 120
 aaagtactca aacaagtgca tcttgatacc ggtatttcca gtaaggctat gagtatcatg 180
 aacagttttg taaatgatat ttttgaaaga atcgcagctg aagcttctcg ttttagctcat 240
 tataataaac gttctacaat tacaagcaga gaaattcaaa ccgcagtagc tttattactt 300
 cctggagaat tagctaaaca cgctgtcagt gaaggtacca aagctgttac taaatacaca 360
 agttctaag 369

<210> 7

10

<211> 369

<212> ARN

<213> *Diabrotica virgifera*

<400> 7

augccuccua agacgagugg uaaagcugcu aaaaaagcag ggaaagccca gaagaacauu 60
 ucaaaaaccg auaagaaaa gaagcgaaag aggaaggaaa gyuaugcuau uuacauuuau 120
 aaaguacuca aacaagugca uccugauacc gguauuucca guaaggcuau gaguaucag 180
 aacaguuuug uaaaugauau uuuugaaaga aucgcagcug aagcuucucg uuuagcucau 240
 uauaauaaac guucuacaau uacaagcaga gaaauucaa ccgcaguacg uuuauuacuu 300
 ccuggagaau uagcuaaaca cgcugucagu gaagguacca aagcuguuac uaaaucaca 360
 aguucuaag 369

<210> 8

15

ES 2 726 674 T3

<211> 369

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Hebra antisentido de ARNm de DvH4

<400> 8

```

uacggaggau ucugcucacc auuucgacga uuuuuucguc ccuuucgggu cuucuuguaa      60
aguuuuuggc uauucuuuuu cuucgcuuuc uccuuccuuu crauacgaua aauguaaaaua      120
uuucaugagu uuguucacgu aggacuaugg ccauaaaggu cauuccgaua cucauaguac      180
uugucaaaac auuuacuaua aaaacuucuu uagcgucgac uucgaagagc aaaucgagua      240
auuuuuuug caagauguua auguucgucu cuuuuaguuu ggcgucaugc aaauaugaa      300
ggaccucuua aucgauuguu gcgacaguca cuuccauggu uucgacaug auuuauugugu      360
ucaagauuc                                     369
    
```

<210> 9

<211> 103

10 <212> PRT

<213> Diabrotica virgifera

<400> 9

```

Met Thr Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala
 1           5           10
Lys Arg His Arg Lys Val Leu Arg Asp Asn Ile Gln Gly Ile Thr Lys
          20           25           30
Pro Ala Ile Arg Arg Leu Ala Arg Arg Gly Gly Val Lys Arg Ile Ser
          35           40           45
Gly Leu Ile Tyr Glu Glu Thr Arg Gly Val Leu Lys Val Phe Leu Glu
 50           55           60
Asn Val Ile Arg Asp Ala Val Thr Tyr Thr Glu His Ala Lys Arg Lys
65           70           75           80
Thr Val Thr Ala Met Asp Val Val Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg
          85           90           95

Thr Leu Tyr Gly Phe Gly Gly
          100
    
```

<210> 10

15 <211> 122

<212> PRT

ES 2 726 674 T3

<213> Diabrotica virgifera

<400> 10

Met Pro Pro Lys Thr Ser Gly Lys Ala Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ala
1 5 10 15

Gln Lys Asn Ile Ser Lys Thr Asp Lys Lys Lys Lys Arg Lys Arg Lys
20 25 30

Glu Tyr Ala Ile Tyr Ile Tyr Lys Val Leu Lys Gln Val His Pro Asp
35 40 45

Thr Gly Ile Ser Ser Lys Ala Met Ser Ile Met Asn Ser Phe Val Asn
50 55 60

Asp Ile Phe Glu Arg Ile Ala Ala Glu Ala Ser Arg Leu Ala His Tyr
65 70 75 80

Asn Lys Arg Ser Thr Ile Thr Ser Arg Glu Ile Gln Thr Ala Val Arg
85 90 95

Leu Leu Leu Pro Gly Glu Leu Ala Lys His Ala Val Ser Glu Gly Thr
100 105 110

Lys Ala Val Thr Lys Tyr Thr Ser Ser Lys
115 120

5

<210> 11

<211> 19

<212> ARN

<213> Diabrotica virgifera

10

<400> 11

augacuggac guggaaagg 19

<210> 12

<211> 19

<212> ARN

15

<213> Diabrotica virgifera

<400> 12

ugacuggacg uggaaaggg 19

<210> 13

<211> 19

20

<212> ARN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 13
 gacuggacgu ggaaaggu 19
 <210> 14
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> *Diabrotica virgifera*
 <400> 14
 uuuguacgu uuugguggu 19
 <210> 15
 10 <211> 19
 <212> ARN
 <213> *Diabrotica virgifera*
 <400> 15
 augccuccua agacgagug 19
 15 <210> 16
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> *Diabrotica virgifera*
 <400> 16
 20 ugccuccuaa gacgagugg 19
 <210> 17
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> *Diabrotica virgifera*
 25 <400> 17
 gccuccuaag acgaguggu 19
 <210> 18
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> *Diabrotica virgifera*
 <400> 18
 uaaauacaca aguucuaag 19

<210> 19
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
5 <220>
<223> DvH4*-1-19mero
<400> 19
uacugaccug caccuuucc 19
<210> 20
10 <211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> DvH4*-2-ARNip de 19-mero
15 <400> 20
acugaccugc accuuuccc 19
<210> 21
<211> 19
<212> ARN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> DvH4*-3-ARNip de 19-mero
<400> 21
cugaccugca ccuuuccca 19
25 <210> 22
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial
<220>
30 <223> DvH4*-291-ARNip de 19-mero
<400> 22
aaacaugcca aaaccacca 19

<210> 23
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> DvH2B8-1-ARNip de 19-mero
 <400> 23
 uacggaggau ucugcucac 19
 <210> 24
 10 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> DvH2B*-2-ARNip de 19-mero
 15 <400> 24
 acggaggauu cugcucacc 19
 <210> 25
 <211> 19
 <212> ARN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> DvH2B*-3-ARNip de 19-mero
 <400> 25
 cggaggauuc ugcucacca 19
 25 <210> 26
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> DvH2B*-351-ARNip de 19-mero
 <400> 26
 auuuugugu ucaagauuc 19

ES 2 726 674 T3

	<210> 27	
	<211> 363	
	<212> ADN	
	<213> Diabrotica undecimpunctata	
5	<400> 27	
	cgaaactaat ttaccctaa aaatgactgg acgtggaaaa ggtggtaaag gtttgggaaa	60
	aggtggcgct aaacgtcatc gtaaagtatt acgtgataac atccaaggta ttaccaagcc	120
	tgctatcaga agactagctc gtgcgagg agtaaaacgt atttctggtt taatctatga	180
	ggaaacgaga ggtgtattga aagtattttt ggagaacgtc attagagatg cagttaccta	240
	tactgagcac gccaaaagga aaacagtaac tgctatggat gttgtatatg cacttaaacg	300
	gcaaggtcgt acgttatatg gttttggtgg ttaattgcta tgaatatgat tcttaaaaca	360
	acg	363
	<210> 28	
10	<211> 309	
	<212> ADN	
	<213> Diabrotica undecimpunctata	
	<400> 28	
	atgactggac gtggaaaagg tggtaaaggt ttgggaaaag gtggcgctaa acgtcatcgt	60
	aaagtattac gtgataacat ccaaggtatt accaagcctg ctatcagaag actagctcgt	120
	cgcgaggag taaaacgtat ttctggttta atctatgagg aaacgagagg tgtattgaaa	180
	gtatTTTTGG agaacgtcat tagagatgca gttacctata ctgagcacgc caaaaggaaa	240
	acagtaactg ctatggatgt tgtatatgca cttaaacggc aaggtcgtac gttatatggt	300
	tttgggtggt	309
15	<210> 29	
	<211> 309	
	<212> ARN	
	<213> Diabrotica undecimpunctata	
	<400> 29	

ES 2 726 674 T3

augacuggac guggaaaagg ugguaaaggu uugggaaaag guggcgcuaa acgucaucgu 60
 aaaguauuac gugauaacau ccaagguuuu accaagccug cuaucagaag acuagcucgu 120
 cgcggaggag uaaaacguau uucugguuua aucuaugagg aaacgagagg uguauugaaa 180
 guauuuuugg agaacgucau uagagaugca guuaccuaua cugagcacgc caaaaggaaa 240
 acaguaacug cuauggaugu uguauaugca cuuaaacggc aaggucguac guuauauggu 300
 uuugguggu 309

<210> 30

<211> 309

<212> ARN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Hebra antisentido de ARNm de la variante 1 de DuH4

<400> 30

uacugaccug caccuuuucc accauuucca aaccuuuuc caccgcgauu ugcaguagca 60
 uuucauaaug cacuaugua gguuccaua ugguucggac gauagucuuc ugaucgagca 120
 gcgccuccuc auuuugcaua aagaccaaau uagauacucc uuugcucucc acauaacuuu 180

10

cauaaaaacc ucuugcagua aucucuacgu caauggauu gacucgugcg guuuuccuuu 240
 ugucauugac gauaccuaca acauauacgu gaauuugccg uuccagcaug caauauacca 300
 aaaccacca 309

<210> 31

<211> 420

<212> ADN

15 <213> Diabrotica undecimpunctata

<400> 31

caagtacgtc gacacttatt ttaccgtaa aatgactgga cgtggaaaag gtggtaaagg 60
 tttgggaaa ggtggcgcta aacgtcatcg taaagttttg cgtgataaca tccaaggtat 120
 taccaagcct gctatcagaa gattggctcg tcgaggagga gtaaacgta tttctggctt 180
 aatctatgag gaaacgagag gtgtattgaa agtatttttg gaaaacgta ttagagatgc 240
 tgttacctat actgaacacg ccaagaggaa aacagtaact gctatggatg ttgtgtatgc 300
 acttaaacgc caaggtcgta ctttgtacgg ttttgggtgt taatttataa taacaccatc 360
 aacttattta aacaaacggt tcttttcaga gccacaatta attgcttatg tatagaattc 420

<210> 32

<211> 309

ES 2 726 674 T3

<212> ADN

<213> Diabrotica undecimpunctata

<400> 32

atgactggac	gtggaaaagg	tggtaaaggt	ttgggaaaag	gtggcgctaa	acgtcatcgt	60
aaagttttgc	gtgataacat	ccaaggtatt	accaagcctg	ctatcagaag	attggctcgt	120
cgaggaggag	taaaacgtat	ttctggctta	atctatgagg	aaacgagagg	tgtattgaaa	180
gtatTTTTGG	aaaacgttat	tagagatgct	gttacctata	ctgaacacgc	caagaggaaa	240
acagtaactg	ctatggatgt	tgtgtatgca	cttaaaccgc	aaggtcgtac	tttgtacggt	300
tttgggtggt						309

5

<210> 33

<211> 309

<212> ARN

<213> Diabrotica undecimpunctata

<400> 33

augacuggac	guggaaaagg	ugguaaaggu	uugggaaaag	guggcgcuua	acgucaucgu	60
aaaguuuugc	guguaacau	ccaagguuu	accaagccug	cuaucagaag	auuggcucgu	120
cgaggaggag	uaaaacguau	uucuggcuua	aucuaugagg	aaacgagagg	uguauugaaa	180
guauuuuugg	aaaacguuau	uagagaugcu	guuaccuua	cugaacacgc	caagaggaaa	240
acaguaacug	cuauggaugu	uguguaugca	cuuaaacgcc	aaggucguac	uuuguacggu	300

10

uuugguggu

309

<210> 34

<211> 309

15

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Hebra antisentido de ARNm de la variante 2 de DuH4

<400> 34

ES 2 726 674 T3

uacugaccug cacuuuuucc accauuuca aaccuuuuuc caccgcgauu ugcaguagca 60
 uuucaaaacg cacuauugua gguuccauaa ugguucggac gauagucuuc uaaccgagca 120
 gcuccuccuc auuuugcaua aagaccgaau uagauacucc uuugcucucc acauaacuuu 180
 cauaaaaacc uuuugcaua aucucuacga caauggauau gacuugugcg guucuccuuu 240
 ugucauugac gauaccuaca acacauacgu gaauuugcgg uuccagcaug aaacaugcca 300
 aaaccacca 309

<210> 35

<211> 103

<212> PRT

5 <213> Diabrotica undecimpunctata

<400> 35

Met Thr Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Lys Arg His Arg Lys Val Leu Arg Asp Asn Ile Gln Gly Ile Thr Lys
 20 25 30

Pro Ala Ile Arg Arg Leu Ala Arg Arg Gly Gly Val Lys Arg Ile Ser
 35 40 45

Gly Leu Ile Tyr Glu Glu Thr Arg Gly Val Leu Lys Val Phe Leu Glu
 50 55 60

Asn Val Ile Arg Asp Ala Val Thr Tyr Thr Glu His Ala Lys Arg Lys
 65 70 75 80

Thr Val Thr Ala Met Asp Val Val Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg
 85 90 95

Thr Leu Tyr Gly Phe Gly Gly
 100

<210> 36

<211> 690

10 <212> ADN

<213> Diabrotica undecimpunctata

<220>

<221> característica_misc

<222> (504)..(504)

15 <223> n e s a , c , g , o t

<400> 36

ES 2 726 674 T3

ggggcttacg cegtattact cattttatta taaaaaaaaa ctgaaagtcg cggaagctag 60
 ttttcgtccg actttcaaag agtaaactgc aatttattcg caatgcctcc taagactagt 120
 ggtaaagctg ctaaaaaagc aggaaaagct cagaagaata tttccaagac cgataagaaa 180
 aagaagcgtg agaggaagga aagttatgcc atttaccatct ataaagtatt gaaacaagtg 240
 catcctgata ctggtatttc cagtaaggct atgagtatca tgaacagttt tgtaaatgat 300
 atttttgaaa gaattgctgc tgaagcttct cgttttagctc attacaataa acgggtcaaca 360
 attacaagca gagaaattca aaccgccgta cgtttattac ttctgggaga gtttagctaaa 420
 cacgccgtta gtgaaggtac caaagctggt actaaatata caagttctaa gtaattataa 480
 ttttctcttt tataaatata acangaagct tctcgttttag ctattacaa taaacggtca 540
 acaattacaa gcagagaaat tcaaaccgcc gtacgtctat tacttctctgg agagttagct 600
 aaacacgccg tcagtgaagg taccaaagct gttactaaat atacaagttc taagtaatcc 660
 cactacttca tcttacaat ataaaaaacg 690

<210> 37

<211> 369

<212> ADN

5 <213> Diabrotica undecimpunctata

<400> 37

atgcctccta agactagtgg taaagctgct aaaaaagcag gaaaagctca gaagaatatt 60
 tccaagaccg ataagaaaa gaagcgtaag aggaaggaaa gttatgccat ttacatctat 120
 aaagtattga aacaagtgca tcttgatact ggtatttcca gtaaggctat gagtatcatg 180
 aacagttttg taaatgatat ttttgaaaga attgctgctg aagcttctcg ttttagctcat 240
 tacaataaac ggtcaacaat tacaagcaga gaaattcaaa ccgccgtacg tttattactt 300
 cctggagagt tagctaaaca cgccgtagt gaaggtacca aagctgttac taaatatata 360
 agttctaag 369

<210> 38

<211> 369

10 <212> ARN

<213> Diabrotica undecimpunctata

<400> 38

augccuccua agacuagugg uaaagcugcu aaaaaagcag gaaaagcuca gaagaauuu 60

ES 2 726 674 T3

uccaagaccg auaagaaaa gaagcguaag aggaaggaaa guuaugccau uuacaucuaa 120
 aaaguauuga aacaagugca uccugauacu gguauuucca gaaaggcuau gagaucaug 180
 aacaguuuug uaaaugauau uuuugaaaga auugcugcug aagcuucucg uuuagcucua 240
 uacaauaaac ggucaacaau uacaagcaga gaaaucaaa ccgccguacg uuuauuacuu 300
 ccuggagagu uagcuaaaca cgccguuagu gaagguacca aagcuguuac uaaaauaaca 360
 aguucuaag 369

<210> 39

<211> 369

<212> ARN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Hebra antisentido de ARNm de DuH2B

<400> 39

uacggaggau ucugaucacc auuucgacga uuuuuucguc cuuuucgagu cuucuuaaaa 60
 agguucuggc uauucuuuuu cuucgcauuc uccuuccuuu caauacggua aauguagaua 120
 uuucuaaacu uuguucacgu aggacuauga ccauaaaggu cauuccgua cucuaguac 180
 uugucaaaac auuuacuuaa aaaacuucuu uaacgacgac uucgaagagc aaaucgagua 240
 auguuuuug ccaguuguua auguucgucu cuuuuaguuu ggcggcaugc aaauaugaa 300
 ggaccucuca aucgauuugu gcggaauca cuuccauggu uucgacaug auuuauaugu 360
 ucaagauuc 369

<210> 40

<211> 123

<212> PRT

<213> Diabrotica undecimpunctata

<400> 40

Met Pro Pro Lys Thr Ser Gly Lys Ala Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ala
 1 5 10 15

Gln Lys Asn Ile Ser Lys Thr Asp Lys Lys Lys Lys Arg Lys Arg Lys
 20 25 30

Glu Ser Tyr Ala Ile Tyr Ile Tyr Lys Val Leu Lys Gln Val His Pro
 35 40 45

Asp Thr Gly Ile Ser Ser Lys Ala Met Ser Ile Met Asn Ser Phe Val
 50 55 60

Asn Asp Ile Phe Glu Arg Ile Ala Ala Glu Ala Ser Arg Leu Ala His
 65 70 75 80

10

15

ES 2 726 674 T3

Tyr Asn Lys Arg Ser Thr Ile Thr Ser Arg Glu Ile Gln Thr Ala Val
 85 90 95

Arg Leu Leu Leu Pro Gly Glu Leu Ala Lys His Ala Val Ser Glu Gly
 100 105 110

Thr Lys Ala Val Thr Lys Tyr Thr Ser Ser Lys
 115 120

<210> 41

<211> 495

5

<212> ADN

<213> Diabrotica barberi

<400> 41

ggggtacatc ttaatttggg ttggtcgttt ttcgatttgg aggtgtgtca ataattttaa 60
 agtacggata tttaaaggtc gaaagacgaa tgcaattcag taattccagg acaactgaac 120
 tgattgtatc atgactggac gtggaaaggg tggtaaaggt ttgggaaaag gtggcgctaa 180
 acgtcaccgt aaagtgttac gtgacaacat ccaaggtatt accaagcctg ctataagaag 240
 attagctcgt cgcggagggtg taaaacgtat ctctggttta atctatgagg aaacgcgagg 300
 tgtattgaaa gtatTTTTGG aaaacgttat tagagatgcc gttacctata ctgagcacgc 360
 caaaaggaaa acagtaactg ctatggatgt tgtatatgca cttaaacgac aaggtcgtac 420
 tttgtacggg tttggagggt aattgctatt aatttccatc cttaaaaaaa cggttctttt 480
 cagaaccaca aaaaa 495

<210> 42

10

<211> 309

<212> ADN

<213> Diabrotica barberi

<400> 42

atgactggac gtggaaaggg tggtaaaggt ttgggaaaag gtggcgctaa acgtcaccgt 60
 aaagtgttac gtgacaacat ccaaggtatt accaagcctg ctataagaag attagctcgt 120
 cgcggagggtg taaaacgtat ctctggttta atctatgagg aaacgcgagg tgtattgaaa 180
 gtatTTTTGG aaaacgttat tagagatgcc gttacctata ctgagcacgc caaaaggaaa 240
 acagtaactg ctatggatgt tgtatatgca cttaaacgac aaggtcgtac tttgtacggg 300
 tttggagggt 309

<210> 43

15

<211> 309

<212> ARN

ES 2 726 674 T3

<213> Diabrotica barberi

<400> 43

augacuggac guggaaaggg ugguaaaggu uugggaaaag guggcgcuaa acgucaccgu	60
aaaguguuac gugacaacau ccaagguauu accaagccug cuauaagaag auuagcucgu	120
cgcgaggug uaaaacguau cucugguuua aucuaugagg aaacgagagg uguauugaaa	180
guauuuuugg aaaacguuau uagagaugcc guuaccuaua cugagcacgc caaaaggaaa	240
acaguaacug cuauggaugu uguauaugca cuuaaacgac aaggucguac uuuguacggu	300
uuuggaggu	309

<210> 44

5

<211> 309

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Hebra antisentido de ARNm de DH4B

10

<400> 44

uacugaccug caccuuuccc accauuucca aaccuuuuuc caccgcgauu ugcaguggca	60
uuucacaaug cacuguugua gguuccauaa ugguucggac gauauucuuc uaaucgagca	120
gcgccuccac auuuugcaua gagaccaaau uagauacucc uuugcgucc acauaacuuu	180
cauaaaaacc uuuugcaua aucucuacgg caauggauau gacucgugcg guuuuccuuu	240
ugucauugac gauaccuaca acauauacgu gaauuugcug uuccagcaug aaacaugcca	300
aaaccucca	309

<210> 45

<211> 103

<212> PRT

15

<213> Diabrotica barberi

<400> 45

ES 2 726 674 T3

Met Thr Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu Gly Lys Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Lys Arg His Arg Lys Val Leu Arg Asp Asn Ile Gln Gly Ile Thr Lys
 20 25 30

Pro Ala Ile Arg Arg Leu Ala Arg Arg Gly Gly Val Lys Arg Ile Ser
 35 40 45

Gly Leu Ile Tyr Glu Glu Thr Arg Gly Val Leu Lys Val Phe Leu Glu
 50 55 60

Asn Val Ile Arg Asp Ala Val Thr Tyr Thr Glu His Ala Lys Arg Lys
 65 70 75 80

Thr Val Thr Ala Met Asp Val Val Tyr Ala Leu Lys Arg Gln Gly Arg

85

90

95

Thr Leu Tyr Gly Phe Gly Gly
 100

<210> 46

<211> 448

<212> ADN

<213> Diabrotica barberi

<400> 46

cgtcagtttg tttttgcat gctcctaag acgagtggta aagctgctaa aaaggcagga 60
 aaagcccaga agaacatttc aaaaaccgat aagaaaaaga agcgaagag gaaggaaagc 120
 tatgctattht acatttataa agtactcaaa caagtgcctc ctgataccgg tatttccagt 180
 aaggctatga gtatcatgaa cagttttgta aatgatattht ttgaaagaat cgctgccgaa 240
 gcttcccgtt tagctcatta taataaacgt tctacaatta caagcagaga aattcaaacg 300
 gccgtacgtt tattacttcc tggagaatta gctaaacacg ctgtcagtga aggcacacaa 360
 gctgttacta aatacacaag ttctaagtaa tcagaacgct tcatctatta attataacaa 420
 acggttcttt tcagaaccac aaaaaaaaa 448

<210> 47

<211> 369

<212> ADN

<213> Diabrotica barberi

<400> 47

5

10

ES 2 726 674 T3

atgcctccta agacgagtgg taaagctgct aaaaaggcag gaaaagccca gaagaacatt 60
 tcaaaaaccg ataagaaaa gaagcgaaag aggaaggaaa gctatgctat ttacatttat 120
 aaagtactca aacaagtgca tcctgatacc ggtatttcca gtaaggctat gagtatcatg 180
 aacagttttg taaatgatat ttttgaaaga atcgctgccg aagcttcccg tttagctcat 240
 tataataaac gttctacaat tacaagcaga gaaattcaaa cggccgtacg tttattactt 300
 cctggagaat tagctaaaca cgctgtcagt gaaggcacca aagctgttac taaatacaca 360
 agttctaag 369

<210> 48

<211> 369

<212> ARN

5 <213> Diabrotica barberi

<400> 48

augccuccua agacgagugg uaaagcugcu aaaaaggcag gaaaagccca gaagaacauu 60
 ucaaaaaccg auaagaaaa gaagcgaaag aggaaggaaa gcuaugcuau uuacauuuau 120
 aaaguacuca aacaagugca uccugauacc gguauuucca guaaggcuau gaguaucaug 180

 aacaguuuug uaaaugauau uuuugaaaga aucgcugccg aagcuucccg uuuagcucau 240
 uauaauaaac guucuacaau uacaagcaga gaaaucaaa cggccguacg uuuauuacuu 300
 ccuggagaau uagcuaaaca cgcugucagu gaaggcacca aagcuguuac uaaaucaca 360
 aguucuaag 369

10 <210> 49

<211> 369

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Hebra antisentido de ARNm de DbH2B

<400> 49

uacggaggau ucugcucacc auuucgacga uuuuuccguc cuuuucgggu cuucuuguaa 60
 aguuuuuggc uauucuuuuu cuucgcuuuc uccuuccuuu cgauacgaua aauguaaaaua 120
 uuucaugagu uuguucacgu aggacuaugg ccuaaaaggu cauuccgaua cucauaguac 180
 uugucaaaac auuuacuaua aaaacuuuu uagcgcagggc uucgaagggc aaaucgagua 240
 auuuuuuuug caagauguua auguucgucu cuuuuaguuu gccggcaugc aaauaauaaua 300
 ggaccucuua aucgauuuugu gcgacaguca cuuccguggu uucgacaaug auuuuugugu 360
 ucaagaauuc 369

ES 2 726 674 T3

<210> 50

<211> 123

<212> PRT

<213> Diabrotica barberi

5

<400> 50

Met Pro Pro Lys Thr Ser Gly Lys Ala Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ala
1 5 10 15

Gln Lys Asn Ile Ser Lys Thr Asp Lys Lys Lys Lys Arg Lys Arg Lys
20 25 30

Glu Ser Tyr Ala Ile Tyr Ile Tyr Lys Val Leu Lys Gln Val His Pro
35 40 45

Asp Thr Gly Ile Ser Ser Lys Ala Met Ser Ile Met Asn Ser Phe Val
50 55 60

Asn Asp Ile Phe Glu Arg Ile Ala Ala Glu Ala Ser Arg Leu Ala His
65 70 75 80

Tyr Asn Lys Arg Ser Thr Ile Thr Ser Arg Glu Ile Gln Thr Ala Val
85 90 95

Arg Leu Leu Leu Pro Gly Glu Leu Ala Lys His Ala Val Ser Glu Gly
100 105 110

Thr Lys Ala Val Thr Lys Tyr Thr Ser Ser Lys
115 120

<210> 51

10

<211> 20

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 51

atgcctccta agacgagtgg 20

15

<210> 52

<211> 20

<212> ADN

<213> Diabrotica virgifera

<400> 52

20

cttagaactt gtgtatttag 20

<210> 53

ES 2 726 674 T3

<211> 20
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera
<400> 53
5 atgactggac gtggaaaggg 20
<210> 54
<211> 20
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera
10 <400> 54
accacaaaa ccgtacaaag 20
<210> 55
<211> 40
<212> ADN
15 <213> Diabrotica virgifera
<400> 55
taatacgact cactataggg atgcctccta agacgagtgg 40
<210> 56
<211> 40
20 <212> ADN
<213> Diabrotica virgifera
<400> 56
taatacgact cactataggg cttagaactt gtgtatttag 40
<210> 57
25 <211> 40
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera
<400> 57
taatacgact cactataggg atgactggac gtggaaaggg 40
30 <210> 58
<211> 40
<212> ADN

ES 2 726 674 T3

<213> Diabrotica virgifera

<400> 58

taatacgact cactataggg accaccaaaa ccgtacaaag 40

<210> 59

5

<211> 4163

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Diabrotica virgifera virgifera, Zea mays, Arabidopsis thaliana

10

<400> 59

ctgcagtgca gcgtagcccg gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcattgcta	60
agttataaaa aattaccaca tttttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta	120
tctttataca tatatttaaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa	180
tatcagtgtt ttagagaatc atataaatga acagttagac atggctctaaa ggacaattga	240
gtattttgac aacaggactc tacagtttta tcttttttagt gtgcattgtgt tctccttttt	300
ttttgcaaat agcttcacct atataaactc tcatccattt tattagtaca tccatttagg	360
gttttaggggt aatgggtttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt	420
agcctctaaa ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttatttaat aatttagata	480
taaaatagaa taaaataaag tgactaaaaa ttaaacaat accctttaag aaattaaaaa	540
aactaaggaa acatttttct tgtttcgagt agataatgcc agcctgtaa acgccgccga	600
cgagtctaac ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtcgggcaa gcaagcaga	660
cggcacggca tctctgtcgc tgctctgga cccctctoga gagttccgct ccaccgttg	720
acttgctccg ctgtcggcat ccagaaattg cgtggcggag cggcagacgt gagccggcac	780
ggcagcggc ctcctcctcc tctcacggca ccggcagcta cgggggattc ctttcccacc	840
gctcctcgc tttcccttcc tggccgccc taataaatag acacccctc cacaccctc	900
ttcccacc tcgtgttggt cggagcgac acacacaaa ccagatctcc cccaaatcca	960
cccgtcggca cctccgcttc aaggtagcc gctcgtcctc cccccccc cctctctacc	1020
ttctctagat cggcgttccg gtccatagtt agggcccggg agttctactt ctgttcatgt	1080

ES 2 726 674 T3

ttgtgtaga tccgtgttg tgtagatcc gtgctgtag cgttcgtaca cggatgacgac 1140
 ctgtacgtca gacacgttct gattgctaac ttgccagtgt ttctctttgg ggaatcctgg 1200
 gatggctcta gccgttccgc agacgggatc gatttcatga tttttttgt ttcgttgcat 1260
 agggtttggg ttgccctttt cctttatttc aatatatgcc gtgcacttgt ttgtcggggtc 1320
 atcttttcat gctttttttt gtcttggtg tgatgatgtg gtctgggtgg gcggtcgttc 1380
 tagatcggag tagaattctg tttcaaacta cctggtggat ttattaattt tggatctgta 1440
 tgtgtgtgcc atacatattc atagttacga attgaagatg atggatggaa atatcgatct 1500
 aggataggta tacatgttga tgcgggtttt actgatgcat atacagagat gctttttgtt 1560
 cgcttggtg tgatgatgtg gtgtggttg gcggtcgttc attcgttcta gatcggagta 1620
 gaatactgtt tcaaaactacc tgggtgattt attaatttt gaactgtatg tgtgtgtcat 1680
 acatcttcat agttacgagt ttaagatgga tggaaatato gatctaggat aggtatacat 1740
 gttgatgtgg gttttactga tgcataatac tgatggcata tgcagcatct attcatatgc 1800
 tctaaccctg agtacctatc tattataata aacaagtatg ttttataatt attttgcctc 1860
 tgataactt ggatgatggc atatgcagca gctatatgtg gattttttta gccctgcctt 1920
 catacgtat ttatttgctt ggtactggtt cttttgtcga tgetcaccct gttggttggg 1980
 gttacttctg cagggatcct gcctcctaag acgagtggtg aagctgctaa aaaagcaggg 2040
 aaagcccaga agaacatttc aaaaaccgat aagaaaaaga agcgaagag gaaggaaagc 2100
 tatgctatth acatttataa agtactcaa caagtgcac ctgataccgg tatttccagt 2160
 aaggctatga gtatcatgaa cagttttgta aatgatattt ttgaaagaat cgcagctgaa 2220
 gcttctcgtt tagctcatta taataaacgt tctacaatta caagcagaga aattcaaacc 2280
 gcagtaogtt tattacttcc tggagaatta gctaaacacg ctgtcagtga agctaccaa 2340
 gctgttacta aatacacaag ttctaagggt accaagctgc gaatcttctg ttttttaagg 2400
 aattctcogat ctttatggtg tataggctct gggttttctg ttttttctat ctcttaggat 2460
 tttgtaaatt ccagatcttt ctatggccac ttagtagtat atttcaaaa ttctccaatc 2520
 gagttcttca ttcgcattht cagtcatttt ctcttcgacg ttgtttttaa gccgtgggtat 2580
 tactcctatt tagttgaact ctgcagcaat cttagaaaat tagggttttg aggtttcgat 2640
 ttctctaggg aaccgatcta ttgcattcat ctgaatttct gcatatatgt cttagatttc 2700
 tgataagctt acgatacgtt aggtgtaatt gaagtttatt tttcaagagt gttatttttt 2760
 gtttctgaat ttttcagtca ctccatggct tagaacttgt gtatttagta acagctttgg 2820
 tagcttcaact gacagcgtgt ttagctaatt ctccaggaag taataaacgt actgogggtt 2880
 gaatttctct gcttgtaatt gtagaacgtt tattataatg agctaaacga gaagcttcag 2940
 ctgcgattct ttcaaaaata tcatttaca aactgttcat gatactcata gccttactgg 3000

ES 2 726 674 T3

aaataccggt atcaggatgc acttgtttga gtactttata aatgtaaata gcatagcttt 3060
 ccttcctcctt tcgcttcttt ttcttatcgg tttttgaaat gttcttctgg gctttccctg 3120
 ctttttttagc agctttacca ctogtcttag gaggcagagc tcgccatcag tcggtgaagc 3180
 tgctgctgta tctgggttat ctagtgtctc tgccattgcc caaggatggg gctgtctttc 3240
 aaagtatttg tatggtttgt gtogtgagtc gtgactgagc tggtttcatg gaccagttgt 3300
 gttctcgta cccaaaacta tcgtgcgacc gcatatggct taatcatgaa taaatgttg 3360
 ttgaatttaa actattogct gaatattgtt gttttttgtc atgtcagtta atgttactaa 3420
 attggtgcc ttctaatttt tgtttactgg tgtttgtcgc accttatctt tttactgtat 3480
 gtttacttca ggttctggca gtctcatttt ttgtgactag ttaaaactta cagctaaaaa 3540
 aatgcagttt ttcattttca tttgaagttt gattagagct attgataccc ggaccatcag 3600
 gttaggttag ttgtgcatag aatcataaat attaatcatg ttttctatga attaagtcaa 3660
 acttgaaagt ctggctgaat atagtttcta tgaatcatat tgatatacat gtttgattat 3720
 ttgttttgct attagctatt tactttggtg aatctatata ggcttatgca gaacctttt 3780
 tttgttcta tataccata tcttagtact cagtagctct atgttttctg gagactagtg 3840
 gcttgctttt tcgtatgtct aattttttgc ttgaccattg caaaacaaaa attacctagt 3900
 gtaatctctt tttataataa tcttgtaatg cgtctaccta taggtcaaag taggttttgt 3960
 ttggaacct tagagctaac tgtagctag ttgataaatt attagctgag ttaagctagc 4020
 taatgaacta gttttgatat tagctgagga tgtttgaaac ctaataatta ttttttatta 4080
 gctaactata ctaaatttta gtagagagat tccaaacagg agttaacatg ggatcagatt 4140
 ggctatgctt ttgcaatccc ata 4163

<210> 60

<211> 4043

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Diabrotica virgifera virgifera, Zea mays, Arabidopsis thaliana

<400> 60

ctgcagtgca gcgtgaccgg gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcattgcta 60
 agttataaaa aattaccaca tatttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta 120
 tctttataca tatatttaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa 180
 tatcagtgtt ttagagaatc atataaatga acagtttagac atggctctaaa ggacaattga 240
 gtattttgac aacaggactc tacagtttta tcttttttagt gtgcattgtt tctccttttt 300
 ttttgcaaat agcttcacct atataaact tcatccattt tattagtaca tccatttagg 360

10

ES 2 726 674 T3

gtttaggggtt aatggttttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt 420
 agcctctaaa ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttatttaaat aatttagata 480
 taaaatagaa taaaataaag tgactaaaaa ttaaacaat accctttaag aaattaaaaa 540
 aactaaggaa acatttttct tgtttcgagt agataatgcc agcctgttaa acgccgccga 600
 cgagtctaac ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtcggggcaa gcgaagcaga 660
 cggcacggca tctctgtcgc tgcctctgga cccctctcga gaggttccgct ccaccgttgg 720
 acttgctccg ctgtcggcat ccagaaattg cgtggcggag cggcagacgt gagccggcac 780
 ggcagggggc ctcctcctcc tctcacggca ccggcagcta cgggggattc ctttcccacc 840
 gctccttcgc tttcccttcc tcgcccgccg taataaatag acaccccctc cacaccctct 900
 ttcccccaacc tcgtgttggt cggagcgcac acacacacaa ccagatctcc cccaaatcca 960
 cccgtcggca cctccgcttc aaggtaacgc gctcgtcctc cccccccccc cctctctacc 1020
 ttctctagat cggcgttccg gtccatagtt agggcccggg agttctactt ctgttcatgt 1080
 ttgtgttaga tccgtgtttg tgtttagatcc gtgctgttag cgttcgtaca cggatgcgac 1140
 ctgtacgtca gacacgttct gattgctaac ttgccagtgt ttctctttgg ggaatcctgg 1200
 gatggctcta gccgttccgc agacgggatc gatttcatga ttttttttgt ttcggtgcat 1260
 agggtttggg ttgccctttt cctttatttc aatatatgcc gtgcacttgt ttgtcgggtc 1320
 atcttttcat gctttttttt gtcttggttg tgatgatgtg gtctggttgg gcggtcgttc 1380
 tagatcggag tagaattctg tttcaaacta cctggtggat ttattaattt tggatctgta 1440
 tgtgtgtgcc atacatattc atagttacga attgaagatg atggatggaa atatcgatct 1500
 aggataggta tacatgttga tcggggtttt actgatgcat atacagagat gctttttggt 1560
 cgcttggttg tgatgatgtg gtgtggttgg gcggtcgttc attcgttcta gatcggagta 1620
 gaatactggt tcaaactacc tgggtgattt attaattttg gaactgatg tgtgtgtcat 1680
 acatcttcat agttacgagt ttaagatgga tggaaatac gatctaggat aggtatacat 1740
 gttgatgtgg gttttactga tgcataatac tgatggcata tgcagcatct attcatatgc 1800
 tctaaccttg agtacctatc tattataata aacaagtatg ttttataatt attttgatct 1860
 tgataactt ggatgatggc atatgcagca gctatatgtg gattttttta gccctgcctt 1920
 catacgtat ttatttgctt ggtactgttt cttttgtcga tgctaccct gttgtttggg 1980
 gttacttctg cagggatcct gactggaagt ggaaaggtg gtaaaggtt gggcaaaggt 2040
 ggcgctaaac gtcaccgtaa agtattacgt gacaacatcc aaggattac caagcctgct 2100
 ataagaagat tagctcgtcg cggaggtgta aaacgtatct ctggtttaaat ctatgaggaa 2160
 acgcgaggtg tattgaaagt atttttggaa aacgttatta gagatgccgt tacctatact 2220
 gagcacgccca aaaggaaaac agtaactgct atggatgttg tatatgcact taaacgacaa 2280

ES 2 726 674 T3

ggtcgtactt tgtacggttt tgggtggtggt accaagctgc gaatcttcgt ttttttaagg 2340
 aattctcgat ctttatgggtg tataggctct gggttttctg ttttttgat ctcttaggat 2400
 tttgtaaatt ccagatcttt ctatggccac ttagtagtat atttcaaaaa ttctccaatc 2460
 gagttcttca ttgcattttt cagtcatttt ctcttcgacg ttgtttttaa gcctgggtat 2520
 tactcctatt tagttgaact ctgcagcaat cttagaaaat tagggttttg aggtttcgat 2580
 ttctctaggt aaccgatcta ttgcattcat ctgaatttct gcatatatgt cttagatttc 2640
 tgataagctt acgatacgtt aggtgtaatt gaagtttatt tttcaagagt gttatttttt 2700
 gtttctgaat ttttcagtca ctccatggac caccaaaacc gtacaaagta cgacctgtc 2760
 gtttaagtgc atatacaaca tccatagcag ttactgtttt ccttttggcg tgctcagtat 2820
 aggtaacggc atctctaata acgttttcca aaaatacttt caatacacct cgcgtttcct 2880
 catagattaa accagagata cgttttacac ctcccgacg agctaactct cttatagcag 2940
 gcttgtaat accttggatg ttgtcacgta atactttacg gtgacgttta gcgccacctt 3000
 tgcccaaacc tttaccacce tttccacgtc cagtcagagc tcgccatcag tcggtgaagc 3060
 tgctgctgta tctgggttat ctagtgtctc tgccattgcc caaggatggt gctgtctttc 3120
 aaagtatttg tatggtttgt gtcgtgagtc gtgactgagc tggtttcatg gaccagtgtg 3180
 gttctcgta cccaaaacta tcgtgcgacc gcatatggct taatcatgaa taaatgttgt 3240
 ttgaatttaa actattcgct gaatattggt gttttttgtc atgtcagtta atgttactaa 3300
 attggtgcc ttctaatttt tgtttactgg tgtttgtcgc accttatctt tttactgtat 3360
 gtttacttca ggttctggca gtctcatttt ttgtgactag ttaaaactta cagctaaaaa 3420
 aatgcagttt ttcattttca tttgaagttt gattagagct attgataccg ggaccatcag 3480
 gttaggttag ttgtgcatag aatcataaat attaatcatg ttttctatga attaagtcaa 3540
 acttgaaagt ctggctgaat atagtttcta tgaatcatat tgatatacat gtttgattat 3600
 ttgttttgct attagctatt tactttgggtg aatctatata ggcttatgca gaaccttttt 3660
 tttgttcta tatatccata tcctagtact cagtagctct atgttttctg gagactagtg 3720
 gcttgctttt tcgtatgtct aattttttgc ttgaccattg caaaacaaaa attacctagt 3780
 gtaatctctt tttataataa tcttgtaatg cgtctaccta taggtcaaag taggttttgt 3840
 ttggaaccct tagagctaac tgtttagctag ttgataaatt attagctgag ttaagctagc 3900
 taatgaacta gttttgatat tagctgagga tgtttgaaac ctaataatta ttttttatta 3960
 gctaactata ctaaatttta gtagagagat tccaaacagg agttaacatg ggatcagatt 4020
 ggctatgctg ttgcaatccc ata 4043

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido ribonucleico (ARN) de interferencia en donde el ARN comprende al menos un ARNdh en donde el ARNdh es una región de ARN de doble hebra que comprende hebras complementarias apareadas, una hebra del cual comprende una secuencia de al menos 19 nucleótidos contiguos que es al menos parcialmente complementaria con una secuencia de nucleótidos objetivo en un gen objetivo de histona de *Diabrotica* spp y en donde la molécula de ARN de interferencia está codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que (i) es al menos 95% idéntica a al menos un fragmento de 21 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 47, o su complemento; o (ii) comprende al menos un fragmento de 19 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 47, o su complemento; o (iii) comprende al menos un fragmento de 19 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 47, o su complemento, en donde la molécula de ARN de interferencia regula hacia abajo el gen objetivo de histona en un insecto *Diabrotica* objetivo.
2. La molécula de ARN de interferencia de la reivindicación 1, en donde la molécula de ARN de interferencia comprende (a) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 3 (*DvH4*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 291 de la SEQ ID NO: 3; (b) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 7 (*DvH2B*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 351 de la SEQ ID NO: 7; (c) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 29 (*DuH4-1*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 291 de la SEQ ID NO: 29; (d) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 33 (*DuH4-2*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 291 de la SEQ ID NO: 33; (e) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 38 (*DuH2B*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 351 de la SEQ ID NO: 38; (f) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 43 (*DbH4*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 291 de la SEQ ID NO: 43; o (f) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 48 (*DbH2B*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 351 de la SEQ ID NO: 48.
3. La molécula de ARN de interferencia de la reivindicación 1, en donde la molécula de ARN de interferencia comprende (a) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 4 (*DvH4**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 291 de la SEQ ID NO: 4; (b) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 8 (*DvH2B**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 351 de la SEQ ID NO: 8; (c) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 30 (*DuH4-1**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 291 de la SEQ ID NO: 30; (d) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 34 (*DuH4-2**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 291 de la SEQ ID NO: 34; (e) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 39 (*DuH2B**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 351 de la SEQ ID NO: 39; (f) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 44 (*DbH4**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 291 de la SEQ ID NO: 44; o (f) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 49 (*DbH2B**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 351 de la SEQ ID NO: 49.
4. La molécula de ARN de interferencia de la reivindicación 1, en donde la molécula de ARN de interferencia comprende la SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 49.
5. La molécula de ARN de interferencia de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el insecto *Diabrotica* se selecciona del grupo que consiste en *D. barberi* (gusano de la raíz del maíz del norte), *D. virgifera virgifera* (gusano de la raíz del maíz del oeste), *D. undecimpunctata howardi* (gusano de la raíz del maíz del sur), *D. balteata* (escarabajo del pepino rayado), *D. undecimpunctata undecimpunctata* (escarabajo del pepino de manchas del oeste), *D. significata* (escarabajo de la hoja de 3 manchas), *D. speciosa* (escarabajo del crisantemo) y *D. virgifera zae* (gusano de la raíz del maíz de México).
6. Un constructo de ácido nucleico que comprende la molécula de ARN de interferencia de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Una molécula de ácido nucleico que codifica la molécula de ARN de interferencia de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
8. Un vector recombinante que comprende una secuencia reguladora ligada operablemente a una secuencia de nucleótidos que codifica la molécula de ARN de interferencia de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
9. Una composición insecticida para inhibir la expresión de un gen de histona de insectos *Diabrotica* que comprende el ARNdh de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un portador agrícolamente aceptable.

10. Una planta transgénica o parte de la misma, que comprende la molécula de ARN de interferencia, el constructo de ácido nucleico y/o la composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes respectivas, en donde la planta transgénica ha mejorado la resistencia a un insecto *Diabrotica* en comparación con una planta testigo.
- 5 11. La semilla transgénica de la planta transgénica de la reivindicación 10, en donde la semilla comprende la molécula ARNdH, el constructo de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico quimérica y/o la composición.
12. Una muestra biológica de la planta transgénica o parte de la misma de las reivindicaciones 10 u 11, en donde dicha muestra biológica comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 7 y en donde dicha muestra
10 biológica es tóxica para los insectos.
13. Un producto básico derivado de la planta transgénica o parte de la misma de las reivindicaciones 10 u 11, en donde dicho producto básico comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 7 y en donde dicho producto básico es tóxico para los insectos.
- 15 14. Un método para controlar un insecto *Diabrotica* que comprende poner en contacto el insecto *Diabrotica* con una molécula de ácido nucleico que es o es capaz de producir una molécula de ARN de interferencia para inhibir la expresión de un gen de *histona* en el insecto *Diabrotica* controlando de este modo el insecto *Diabrotica*, en donde dicha molécula de ARN de interferencia es complementaria con una porción de un polinucleótido de ARNm transcribible de un gen de *histona* y en donde la molécula de ARN de interferencia comprende una secuencia de al
20 menos 19 nucleótidos contiguos que es al menos parcialmente complementaria con una secuencia de nucleótidos objetivo en un gen objetivo de *histona* de *Diabrotica* spp y en donde dicha molécula de ARN de interferencia está codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que
- 25 a. es al menos 95% idéntica a al menos un fragmento de 21 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 47, o complemento de las mismas;
- 30 b. comprende al menos un fragmento de 19 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 47, o complementos de las mismas; o
- 35 c. comprende al menos un fragmento de 19 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 47, o complementos de las mismas.
- 40 15. El método de la reivindicación 14, en donde la porción del polinucleótido de ARNm consiste esencialmente en (a) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 3 (*DvH4*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 291 de la SEQ ID NO: 3; (b) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 7 (*DvH2B*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 351 de la SEQ ID NO: 7; (c) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 29 (*DuH4-1*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 291 de la SEQ ID NO: 29; (d) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 33 (*DuH4-2*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 291 de la SEQ ID NO: 33; (e) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 38 (*DuH2B*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 351 de la SEQ ID NO: 38; (f) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 43 (*DbH4*)
45 que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 291 de la SEQ ID NO: 43; o (f) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 48 (*DbH2B*) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 351 de la SEQ ID NO: 48.
- 50 16. El método de la reivindicación 14, en donde la porción del polinucleótido de ARNm consiste esencialmente en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 48.
- 55 17. El método de la reivindicación 14, en donde la secuencia de nucleótidos de la molécula de ARN de interferencia consiste esencialmente en (a) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 4 (*DvH4**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 291 de la SEQ ID NO: 4; (b) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 8 (*DvH2B**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 351 de la SEQ ID NO: 8; (c) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 30 (*DuH4-1**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 291 de la SEQ ID NO: 30; (d) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 34 (*DuH4-2**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido
60 291 de la SEQ ID NO: 34; (e) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 39 (*DuH2B**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 351 de la SEQ ID NO: 39; (f) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 44 (*DbH4**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 al nucleótido 291 de la SEQ ID NO: 44; o (f) cualquier subsecuencia 19-mérica de la SEQ ID NO: 49 (*DbH2B**) que consiste en N a N+18 nucleótidos, en donde N es el nucleótido 1 a 351 de la SEQ ID NO: 49.
- 65

18. El método de la reivindicación 17, en donde la secuencia de nucleótidos de la molécula de ARN de interferencia consiste esencialmente en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 49.

5 19. El método de las reivindicaciones 14 a 18 en donde el contacto comprende

a. plantar una semilla transgénica capaz de producir una planta transgénica que expresa la molécula de ácido nucleico, en donde el insecto *Diabrotica* se alimenta de la planta transgénica o parte de la misma; o

10 b. aplicar una composición que comprende la molécula de ácido nucleico a una semilla o planta o parte de la misma, en donde el insecto *Diabrotica* se alimenta de la semilla, la planta o una parte de la misma.

15 20. Un método para conferir tolerancia al insecto *Diabrotica* a una planta, o parte de la misma, que comprende introducir en la planta o parte de la misma, la molécula de ARN de interferencia, el constructo de ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico quimérica y/o la composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes respectivas, confiriendo así la tolerancia de la planta o parte de la misma al insecto *Diabrotica*.

20 21. El método de la reivindicación 20, en donde el paso de introducción se realiza transformando una célula de planta y produciendo la planta transgénica que tiene toxicidad para un insecto *Diabrotica* a partir de la célula de planta transformada.

ES 2 726 674 T3

```
Dun_H2B_CDS      ATGCCTCCTAAGACTAGTGGTAAAGCTGCTAAAAAAGCAGGAAAAGCTCAGAAGAATATT
Dvi_H2B_CDS      ATGCCTCCTAAGACGAGTGGTAAAGCTGCTAAAAAAGCAGGAAAAGCCAGAAGAACATT
Dba_H2B_CDS      ATGCCTCCTAAGACGAGTGGTAAAGCTGCTAAAAAAGCAGGAAAAGCCAGAAGAACATT
*****

Dun_H2B_CDS      TCCAAGACCGATAAGAAAAAGAAGCGTAAGAGGAAGGAAAAGTTATGCCATTTACATCTAT
Dvi_H2B_CDS      TCAAAAACCGATAAGAAAAAGAAGCGAAAAGAGGAAAGGAAAAGYTATGCTATTTACATTTAT
Dba_H2B_CDS      TCAAAAACCGATAAGAAAAAGAAGCGAAAAGAGGAAAGGAAAAGCTATGCTATTTACATTTAT
** ** *****

Dun_H2B_CDS      AAAGTATTGAAACAAGTGCATCCTGATACTGGTATTTCCAGTAAGGCTATGAGTATCATG
Dvi_H2B_CDS      AAAGTACTCAAACAAGTGCATCCTGATAACCGGTATTTCCAGTAAGGCTATGAGTATCATG
Dba_H2B_CDS      AAAGTACTCAAACAAGTGCATCCTGATAACCGGTATTTCCAGTAAGGCTATGAGTATCATG
***** * *****

Dun_H2B_CDS      AACAGTTTTGTAAATGATATTTTTGTAAAGAATTGCTGCTGAAGCTTCTCGTTTTAGCTCAT
Dvi_H2B_CDS      AACAGTTTTGTAAATGATATTTTTGTAAAGAATCGCAGCTGAAGCTTCTCGTTTTAGCTCAT
Dba_H2B_CDS      AACAGTTTTGTAAATGATATTTTTGTAAAGAATCGCTGCCGAAGCTTCCCCTTTAGCTCAT
***** ** ** *****

Dun_H2B_CDS      TACAATAAACGGTCAACAATTACAAGCAGAGAAATTCAAACCGCCGTACGTTTATTACTT
Dvi_H2B_CDS      TATAATAAACGTTCTACAATTACAAGCAGAGAAATTCAAACCGCAGTACGTTTATTACTT
Dba_H2B_CDS      TATAATAAACGTTCTACAATTACAAGCAGAGAAATTCAAACCGCCGTACGTTTATTACTT
** ***** ** *****

Dun_H2B_CDS      CCTGGAGAGTTAGCTAAACACGCCGTTAGTGAAGGTACCAAAGCTGTTACTAAATATACA
Dvi_H2B_CDS      CCTGGAGAATTAGCTAAACACGCTGTCAGTGAAGGTACCAAAGCTGTTACTAAATACACA
Dba_H2B_CDS      CCTGGAGAATTAGCTAAACACGCTGTCAGTGAAGGCACCAAAGCTGTTACTAAATACACA
***** ***** ** *****

Dun_H2B_CDS      AGTTCTAAG
Dvi_H2B_CDS      AGTTCTAAG
Dba_H2B_CDS      AGTTCTAAG
*****
```

Fig. 1

ES 2 726 674 T3

```
Dun_H4_CDS_var2 ATGACTGGACGTGGAAAAGGTGGTAAAGGTTTGGGAAAAGGTGGCGCTAAACGTCATCGT
Dun_H4_CDS_var1 ATGACTGGACGTGGAAAAGGTGGTAAAGGTTTGGGAAAAGGTGGCGCTAAACGTCATCGT
Dvi_H4_CDS       ATGACTGGACGTGGAAAAGGTGGTAAAGGTTTGGGCAAAGGTGGCGCTAAACGTCACCGT
Dba_H4_CDS       ATGACTGGACGTGGAAAAGGTGGTAAAGGTTTGGGAAAAGGTGGCGCTAAACGTCACCGT
*****

Dun_H4_CDS_var2 AAAGTTTTGCGTGATAACATCCAAGGTATTACCAAGCCTGCTATCAGAAGATTGGCTCGT
Dun_H4_CDS_var1 AAAGTATTACGTGATAACATCCAAGGTATTACCAAGCCTGCTATCAGAAGACTAGCTCGT
Dvi_H4_CDS       AAAGTATTACGTGACAACATCCAAGGTATTACCAAGCCTGCTATAAGAAGATTAGCTCGT
Dba_H4_CDS       AAAGTGTTACGTGACAACATCCAAGGTATTACCAAGCCTGCTATAAGAAGATTAGCTCGT
*****

Dun_H4_CDS_var2 CGAGGAGGAGTAAAACGTATTTCTGGCTTAATCTATGAGGAAACGAGAGGTGTATTGAAA
Dun_H4_CDS_var1 CGCGGAGGAGTAAAACGTATTTCTGGTTTAATCTATGAGGAAACGAGAGGTGTATTGAAA
Dvi_H4_CDS       CGCGGAGGTGTAAAACGTATCTCTGGTTTAATCTATGAGGAAACGCGAGGTGTATTGAAA
Dba_H4_CDS       CGCGGAGGTGTAAAACGTATCTCTGGTTTAATCTATGAGGAAACGCGAGGTGTATTGAAA
*****

Dun_H4_CDS_var2 GTATTTTTGGAAAACGTTATTAGAGATGCTGTTACCTATACTGAACACGCCAAGAGGAAA
Dun_H4_CDS_var1 GTATTTTTGGAGAACGTCATTAGAGATGCAGTTACCTATACTGAGCACGCCAAAAGGAAA
Dvi_H4_CDS       GTATTTTTGGAAAACGTTATTAGAGATGCCGTTACCTATACTGAGCACGCCAAAAGGAAA
Dba_H4_CDS       GTATTTTTGGAAAACGTTATTAGAGATGCCGTTACCTATACTGAGCACGCCAAAAGGAAA
*****

Dun_H4_CDS_var2 ACAGTAACTGCTATGGATGTTGTATATGCACTTAAACGCCAAGGTCGTACTTTGTACGGT
Dun_H4_CDS_var1 ACAGTAACTGCTATGGATGTTGTATATGCACTTAAACGCCAAGGTCGTACTTTATATGGT
Dvi_H4_CDS       ACAGTAACTGCTATGGATGTTGTATATGCACTTAAACGACAAGGTCGTACTTTGTACGGT
Dba_H4_CDS       ACAGTAACTGCTATGGATGTTGTATATGCACTTAAACGACAAGGTCGTACTTTGTACGGT
*****

Dun_H4_CDS_var2 TTTGGTGGT
Dun_H4_CDS_var1 TTTGGTGGT
Dvi_H4_CDS       TTTGGTGGT
Dba_H4_CDS       TTTGGAGGT
*****
```

Fig. 2