



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105980567 A

(43)申请公布日 2016.09.28

(21)申请号 201480051779.8

B·D·伊兹 L·E·弗拉格尔

(22)申请日 2014.07.18

M·卡普尔 C·M·泰勒

(30)优先权数据

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

61/856,137 2013.07.19 US

11256

61/899,000 2013.11.01 US

代理人 孟凡宏 谢燕军

61/980,800 2014.04.17 US

(51)Int.Cl.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

G12N 15/82(2006.01)

2016.03.18

G07K 14/435(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/047204 2014.07.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/010026 EN 2015.01.22

(71)申请人 孟山都技术有限公司

地址 美国密苏里州

权利要求书5页 说明书94页

(72)发明人 J·L·贝蒂 M·J·克劳福德

序列表(电子公布)

(54)发明名称

用于控制叶甲属的组合物和方法

(57)摘要

本文公开了控制侵扰作物的害虫,尤其是叶甲属种类的方法,以及提供对此类害虫有抗性的植物的方法。还公开了用于此类方法中的多核苷酸和重组DNA分子和构建体,含有杀虫双链RNA的杀虫组合物如局部喷雾剂和对受叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的茄科植物。进一步公开了选择RNAi介导的沉默和叶甲属种类控制的靶基因的方法。

1. 一种用于控制植物受叶甲属种类侵扰的方法,其包括:

(a)使所述叶甲属种类与多核苷酸接触,所述多核苷酸包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补的核苷酸序列,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或

(b)在所述叶甲属种类的食物中提供多核苷酸,所述多核苷酸包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补的核苷酸序列,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或

(c)通过在所述叶甲属种类的幼虫的食物中提供包含至少一个沉默元件的至少一种多核苷酸而在所述幼虫中引起死亡或生长受阻,所述沉默元件包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA互补的21个连续核苷酸,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或

(d)向所述植物局部施用包含至少一种多核苷酸的组合物,所述多核苷酸包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补的核苷酸序列,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或

(e)以使得有效量的至少一种多核苷酸被以所述植物为食的叶甲属种类摄取的方式向所述植物局部施用包含所述多核苷酸的组合物,所述多核苷酸包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA互补的至少21个连续核苷酸,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或

(f)在所述植物中表达至少一种多核苷酸,所述多核苷酸包含与具有选自以下的序列的DNA的至少21个连续核苷酸相同或互补的至少一个片段:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或

(g)向所述植物提供至少一种多核苷酸,所述多核苷酸包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸相同或互补的至少一个片段,其中所述靶基因选自:在靶基因序列组中标识的基因或由所述靶基因转录的RNA;或

(h)使所述叶甲属种类与有效量的双链RNA接触,其中一条链与编码核糖体蛋白的基因的至少21个连续核苷酸互补,其中RNA干扰被诱导并且发生死亡;或

(i)使所述叶甲属种类与多核苷酸接触,所述多核苷酸包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸相同或互补的至少一个片段,所述靶基因选自:在靶基因序列组中标识的基因。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多核苷酸为双链RNA。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述双链RNA经化学合成或通过微生物中表达或在植物细胞中表达而生成。

4. 根据权利要求2所述的方法,其中所述双链RNA包含含有选自以下的序列的链:SEQ

ID NO:989、1049、831、842、849、898、910、925、928、931、932、937、938、940、941、942、943、944、945、947、948、949、950、951、952、955、956、957、958、960、961、964、966、967、968、969、970、971、973、976、978、979、982、983、985、987、988、991、992、994、995、996、997、999、1006、1007、1008、1009、1010、1013、1018、1019、1020、1022、1025、1029、1030、1033、1035、1036、1037、1038、1039、1040、1041、1042、1043、1045、1046、1047、1050、1053、1054、1058、1060、1061、1064、1065、1066、1067、1068、1070、1073、1074、1075、1077、1078、1080、1081、1082、1084、1085、1095、1096、1097、1098、1099、1100、1101、1102、1103、1104、1105、1110、1111、1112、1113、1114、1118、1119和1124。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法包括向所述植物局部施用包含至少一种多核苷酸的组合物,所述多核苷酸包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补的核苷酸序列,其中所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;并且其中所述组合物还包含选自载体剂、表面活性剂、阳离子脂质、有机硅、有机硅表面活性剂、多核苷酸除草分子、非多核苷酸除草分子、非多核苷酸杀虫剂、安全剂和昆虫生长调节剂的一种或多种组分。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法包括使所述叶甲属种类与有效量的包含双链RNA的溶液接触,其中所述双链RNA的至少一条链与编码核糖体蛋白的基因或由所述基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补,其中所述叶甲属种类为马铃薯叶甲,并且其中RNA干扰被诱导并且发生马铃薯叶甲死亡,并且其中所述核糖体蛋白为核糖体L7蛋白或由SEQ ID NO:730编码的蛋白或其中所述双链RNA包含选自SEQ ID NO:989、988、1104或1105的序列。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述溶液还包含选自有机硅表面活性剂或阳离子脂质的一种或多种组分。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法包括以使得有效量的至少一种多核苷酸被以所述植物为食的叶甲属种类摄取的方式向所述植物局部施用包含所述多核苷酸的组合物,所述多核苷酸包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补的核苷酸序列,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;其中所述叶甲属种类为马铃薯叶甲;并且其中所述靶基因具有SEQ ID NO:730的序列或其中所述多核苷酸为双链RNA,其具有有选自SEQ ID NO:989、988、1104或1105的序列的链。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述叶甲属种类选自:Leptinotarsa behrensi、Leptinotarsa collinsi、马铃薯叶甲(科罗拉多马铃薯甲虫)、Leptinotarsa defecta、Leptinotarsa haldemani(Haldeman绿色马铃薯甲虫)、Leptinotarsa heydeni、Leptinotarsa juncta(伪马铃薯甲虫)、膜苞菊叶甲(菊科灌木甲虫)、蒺藜叶甲、柔毛茄叶甲、胡颓子叶茄叶甲、蒺藜四条叶甲、Leptinotarsa tumamoca和Leptinotarsa typographica。

10. 一种植物,其对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性,通过根据权利要求1所述的方法提供,或所述植物的果实、种子或可繁殖部分。

11. 根据权利要求10所述的植物,其中所述植物选自马铃薯、番茄和茄子。

12. 一种用于控制叶甲属种类的杀虫组合物,其包含:

(a) 杀虫有效量的多核苷酸,所述多核苷酸包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA互补的至少21个连续核苷酸,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或

(b) 杀虫有效量的至少一种多核苷酸,所述多核苷酸包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补的至少一个沉默元件,其中所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或

(c) 杀虫有效量的至少一种RNA,所述RNA包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸相同或互补的至少一个片段,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或

(d) 当被叶甲属种类摄取或接触时在所述叶甲属种类中引起死亡或生长受阻的RNA分子,其中所述RNA分子包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA互补的至少21个连续核苷酸,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或

(e) 当被叶甲属种类摄取或接触时在所述叶甲属种类中引起死亡或生长受阻的杀虫双链RNA分子,其中所述杀虫双链RNA分子的至少一条链包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA互补的21个连续核苷酸,其中所述靶基因具有选自以下的序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或

(f) 杀虫有效量的包含选自以下的序列的至少一种双链RNA:SEQ ID NO:989、1049、831、842、849、898、910、925、928、931、932、937、938、940、941、942、943、944、945、947、948、949、950、951、952、955、956、957、958、960、961、964、966、967、968、969、970、971、973、976、978、979、982、983、985、987、988、991、992、994、995、996、997、999、1006、1007、1008、1009、1010、1013、1018、1019、1020、1022、1025、1029、1030、1033、1035、1036、1037、1038、1039、1040、1041、1042、1043、1045、1046、1047、1050、1053、1054、1058、1060、1061、1064、1065、1066、1067、1068、1070、1073、1074、1075、1077、1078、1080、1081、1082、1084、1085、1095、1096、1097、1098、1099、1100、1101、1102、1103、1104、1105、1110、1111、1112、1113、1114、1118、1119和1124。

13. 根据权利要求12所述的杀虫组合物,其中所述杀虫组合物呈选自以下的至少一种的形式:固体、液体、粉剂、混悬液、乳液、喷雾剂、封装剂、微珠、载体微粒、薄膜、基质、种子处理剂、土壤浇灌剂、可植入制剂和沟灌制剂。

14. 根据权利要求12所述的杀虫组合物,其还包含选自载体剂、表面活性剂、阳离子脂质、有机硅、有机硅表面活性剂、多核苷酸除草分子、非多核苷酸除草分子、非多核苷酸杀虫剂、安全剂和昆虫生长调节剂的至少一种组分。

15. 根据权利要求12所述的杀虫组合物,其中所述杀虫组合物包含当被叶甲属种类摄取或接触时在所述叶甲属种类中引起死亡或生长受阻的杀虫双链RNA分子,其中所述杀虫双链RNA分子包含与一个DNA或由所述DNA转录的RNA的21个连续核苷酸互补的至少一个片段,所述DNA具有选自以下的序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094,并且其中所述双链RNA分子长度为至少50个碱基对或长度介于约100至约500个碱基对之间。

16. 一种重组DNA构建体,其包含与以下可操作地连接的异源启动子:

(a) 包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补的核苷酸序列的DNA,所述靶基因具有选自以下的序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或

(b) 包含与一个DNA的等长片段具有100%同一性的21个或更多个连续核苷酸的DNA,所述DNA具有选自以下的序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094或其DNA互补物;或

(c) 编码与靶基因或由所述靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补的至少一个沉默元件的DNA,其中所述靶基因具有选自以下的序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或

(d) 编码包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA互补的至少21个连续核苷酸的至少一个沉默元件的DNA,所述靶基因选自在靶基因序列组中标识的基因;或

(e) 编码包含与一个核苷酸序列,或来自于叶甲属种类或拟谷盗属种类的直系同源核苷酸序列互补的至少21个连续核苷酸的RNA的DNA,所述核苷酸序列选自:SEQ ID NO:989、1049、831、842、849、898、910、925、928、931、932、937、938、940、941、942、943、944、945、947、948、949、950、951、952、955、956、957、958、960、961、964、966、967、968、969、970、971、973、976、978、979、982、983、985、987、988、991、992、994、995、996、997、999、1006、1007、1008、1009、1010、1013、1018、1019、1020、1022、1025、1029、1030、1033、1035、1036、1037、1038、1039、1040、1041、1042、1043、1045、1046、1047、1050、1053、1054、1058、1060、1061、1064、1065、1066、1067、1068、1070、1073、1074、1075、1077、1078、1080、1081、1082、1084、1085、1095、1096、1097、1098、1099、1100、1101、1102、1103、1104、1105、1110、1111、1112、1113、1114、1118、1119和1124或其互补物,其中所述直系同源核苷酸序列与选自以下的核苷酸序列具有至少95%序列同一性:SEQ ID NO:989、1049、831、842、849、898、910、925、928、931、932、937、938、940、941、942、943、944、945、947、948、949、950、951、952、955、956、957、958、960、961、964、966、967、968、969、970、971、973、976、978、979、982、983、985、987、988、991、992、994、995、996、997、999、1006、1007、1008、1009、1010、1013、1018、1019、1020、1022、1025、1029、1030、1033、1035、1036、1037、1038、1039、1040、1041、1042、1043、1045、1046、1047、1050、1053、1054、1058、1060、1061、1064、1065、1066、1067、1068、1070、1073、1074、1075、1077、1078、1080、1081、1082、1084、1085、1095、1096、1097、1098、1099、1100、1101、1102、1103、1104、1105、1110、1111、1112、1113、1114、1118、1119和1124,其中在相同长度上

计算序列同一性百分比;或

(f)编码包含至少一个双链RNA区的RNA的DNA,所述双链RNA区的至少一条链包含与一个核苷酸序列,或来自于叶甲属种类或拟谷盗属种类的直系同源核苷酸序列互补的至少21个连续核苷酸,所述核苷酸序列选自:SEQ ID NO:989、1049、831、842、849、898、910、925、928、931、932、937、938、940、941、942、943、944、945、947、948、949、950、951、952、955、956、957、958、960、961、964、966、967、968、969、970、971、973、976、978、979、982、983、985、987、988、991、992、994、995、996、997、999、1006、1007、1008、1009、1010、1013、1018、1019、1020、1022、1025、1029、1030、1033、1035、1036、1037、1038、1039、1040、1041、1042、1043、1045、1046、1047、1050、1053、1054、1058、1060、1061、1064、1065、1066、1067、1068、1070、1073、1074、1075、1077、1078、1080、1081、1082、1084、1085、1095、1096、1097、1098、1099、1100、1101、1102、1103、1104、1105、1110、1111、1112、1113、1114、1118、1119和1124或其互补物,其中所述直系同源核苷酸序列与选自以下的核苷酸序列具有至少95%序列同一性:SEQ ID NO:989、1049、831、842、849、898、910、925、928、931、932、937、938、940、941、942、943、944、945、947、948、949、950、951、952、955、956、957、958、960、961、964、966、967、968、969、970、971、973、976、978、979、982、983、985、987、988、991、992、994、995、996、997、999、1006、1007、1008、1009、1010、1013、1018、1019、1020、1022、1025、1029、1030、1033、1035、1036、1037、1038、1039、1040、1041、1042、1043、1045、1046、1047、1050、1053、1054、1058、1060、1061、1064、1065、1066、1067、1068、1070、1073、1074、1075、1077、1078、1080、1081、1082、1084、1085、1095、1096、1097、1098、1099、1100、1101、1102、1103、1104、1105、1110、1111、1112、1113、1114、1118、1119和1124,其中在相同长度上计算序列同一性百分比;或

(g)编码包含选自以下的核苷酸序列的RNA的DNA:SEQ ID NO:989、1049、831、842、849、898、910、925、928、931、932、937、938、940、941、942、943、944、945、947、948、949、950、951、952、955、956、957、958、960、961、964、966、967、968、969、970、971、973、976、978、979、982、983、985、987、988、991、992、994、995、996、997、999、1006、1007、1008、1009、1010、1013、1018、1019、1020、1022、1025、1029、1030、1033、1035、1036、1037、1038、1039、1040、1041、1042、1043、1045、1046、1047、1050、1053、1054、1058、1060、1061、1064、1065、1066、1067、1068、1070、1073、1074、1075、1077、1078、1080、1081、1082、1084、1085、1095、1096、1097、1098、1099、1100、1101、1102、1103、1104、1105、1110、1111、1112、1113、1114、1118、1119和1124或其互补物。

17. 一种植物染色体或质体或重组植物病毒载体或重组杆状病毒载体,其包含根据权利要求16所述的重组DNA构建体。

18. 一种转基因茄科植物细胞,其在其基因组中具有根据权利要求16所述的重组DNA构建体。

19. 根据权利要求18所述的转基因茄科植物细胞,其中所述转基因茄科植物细胞在其基因组中还具有编码选自以下的至少一种杀虫剂的DNA:马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白。

20. 一种转基因茄科植物,其包含根据权利要求18所述的转基因茄科植物细胞,或所述转基因茄科植物的果实、种子或可繁殖部分。

用于控制叶甲属的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用和序列表的并入

[0002] 本申请要求2013年7月19日提交的美国临时专利申请第61/856,137号,2013年11月1日提交的美国临时专利申请第61/899,000号和2014年4月17日提交的美国临时专利申请第61/980,800号的优先权,所述申请通过引用整体并入本文。文件中所含的序列表“40-21_60191_A.txt”(2,291千字节,创建于2013年7月19日,随美国临时专利申请第61/856,137号一起于2013年7月19日提交)、“40-21_60191_0001US_ST25.txt”(2,322千字节,创建于2013年10月30日,随美国临时专利申请第61/899,000号一起于2013年11月1日提交)和“40-21_60191_0002_US_ST25.txt”(2,338千字节,创建于2014年4月17日,随美国临时专利申请第61/980,800号一起于2014年4月17日提交)通过引用整体并入本文。文件中所含的序列表“40-21_60191_0003_ST25_new.txt”(2,532,856字节,创建于2014年7月17日)随函提交并且通过引用整体并入本文。

[0003] 领域

[0004] 公开了特别是在植物中,控制无脊椎虫害侵扰的方法,以及用于此类方法中的组合物、多核苷酸和重组DNA构建体。更具体地,本发明涉及特别是通过RNA干扰改变害虫中基因的表的多核苷酸及其使用方法。所关注的害虫种类包括叶甲属种类,尤其是侵扰作物的那些。

[0005] 背景

[0006] 经济作物常常是无脊椎害虫如昆虫攻击的目标。在植物中用于控制昆虫侵扰的组合物通常已经呈化学杀虫剂的形式。然而,使用化学杀虫剂存在几个缺点。例如,化学杀虫剂通常无选择性,并且旨在控制作物中的害虫而施用化学杀虫剂也可对非目标昆虫和其它无脊椎动物发挥其作用。化学杀虫剂常常持续存在于环境中并且只能缓慢降解,从而可能在食物链中积累。此外使用持久性化学杀虫剂可在目标昆虫种类中导致抗性的发展。因此,长期以来感到需要更加环境友好的用于控制或根除植物上或植物中的昆虫侵扰的方法,即,具物种选择性、环境惰性、非持久性且生物可降解,并且非常适合害虫抗性管理方案的方法。

[0007] RNA干扰(RNAi,RNA介导的基因抑制)是用于害虫控制的另一种方法。在无脊椎动物中,首先在线虫中证明了基于RNAi的基因抑制(Fire等,(1998)Nature,391:806-811; Timmons和Fire(1998)Nature,395:854)。后来,已经报道了在许多物种,包括来自于各种昆虫和线虫类群的农业或经济上的重要害虫中,使用重组核酸技术基于RNAi对无脊椎动物基因的抑制。

[0008] 叶甲属种类形成一个属,包括侵扰商业上重要的植物的许多种类,所述商业上重要的植物包括很多茄科植物(例如,马铃薯、番茄、茄子、胡椒、烟草和矮牵牛)。例如,马铃薯叶甲(*Leptinotarsa decemlineata*)(科罗拉多马铃薯甲虫,CPB)是影响茄科植物如马铃薯的早期到中期害虫。科罗拉多马铃薯甲虫主要以所述植物的地上部分为食,并且落叶导致块茎产量降低。需要用于控制侵扰作物的害虫,尤其是叶甲属种类的方法和组合物。

发明概要

[0009] 本实施方案涉及对叶甲属种类,尤其是为经济或农业上的重要害虫的那些的控制。在各个实施方案中,叶甲属种类是选自以下的至少一种:Leptinotarsa behrensi、Leptinotarsa collinsi、马铃薯叶甲(科罗拉多马铃薯甲虫)、Leptinotarsa defecta、Leptinotarsa haldemani(Haldeman绿色马铃薯甲虫)、Leptinotarsa heydeni、Leptinotarsa juncta(伪马铃薯甲虫)、膜苞菊叶甲(Leptinotarsa lineolata)(菊科灌木叶甲虫)、蒺藜叶甲(Leptinotarsa peninsularis)、柔毛茄叶甲(Leptinotarsa rubiginosa)、胡颓子叶茄叶甲(Leptinotarsa texana)、蒺藜四条叶甲(Leptinotarsa tlascalana)、Leptinotarsa tumamoca和Leptinotarsa typographica。在特定实施方案中,叶甲属种类是选自以下的至少一种:马铃薯叶甲(科罗拉多马铃薯甲虫)、Leptinotarsa juncta(伪马铃薯甲虫)、Leptinotarsa haldemani(Haldeman绿色马铃薯甲虫)和膜苞菊叶甲(菊科灌木叶甲虫)。

[0010] 本文所述的组合物和方法包括用于产生对叶甲属种类侵扰有抗性的转基因植物的重组多核苷酸分子,如重组DNA构建体,和用于控制或预防植物受该类叶甲属种类侵扰的单链或双链DNA或RNA分子(本文也称为“触发因子”)。在一些实施方案中,多核苷酸触发因子作为局部施用的试剂而提供,用于控制或预防植物受叶甲属种类侵扰。在一些实施方案中,提供了对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的茄科植物,如表达多核苷酸触发因子的转基因茄科植物(包括种子或可繁殖部分如块茎)。在一些实施方案中,提供了已经用包含多核苷酸触发因子的组合物局部处理的茄科植物(包括种子或可繁殖部分如块茎)(例如,已经喷有dsRNA分子溶液的茄科植物)。还提供了向叶甲属种类或待保护以免受叶甲属种类侵扰的植物、植物部分或种子局部施用的含多核苷酸的组合物。

[0011] 几个实施方案涉及多核苷酸触发因子对叶甲属种类中靶基因的抑制。一些实施方案涉及用于选择可能是RNAi介导的对叶甲属种类控制的有效靶标的叶甲属靶基因的方法。在一些实施方案中,对于RNAi介导的抑制所选择的靶基因是叶甲属种类基因组中非重复且非冗余,或具有低核苷酸多样性,或在进化或功能上受限而具有比非同义(K_a)更多的同义(K_s)核苷酸变化的基因。本文提供了本文称为“靶基因序列组”,由SEQ ID NO:1-725和SEQ ID NO:726-830和SEQ ID NO:1087-1094组成的核苷酸序列。还提供了本文称为“触发因子序列组”,由SEQ ID NO:831、842、849、898、910、925、928、931、932、937、938、940、941、942、943、944、945、947、948、949、950、951、952、955、956、957、958、960、961、964、966、967、968、969、970、971、973、976、978、979、982、983、985、987、988、989、991、992、994、995、996、997、999、1006、1007、1008、1009、1010、1013、1018、1019、1020、1022、1025、1029、1030、1033、1035、1036、1037、1038、1039、1040、1041、1042、1043、1045、1046、1047、1049、1050、1053、1054、1058、1060、1061、1064、1065、1066、1067、1068、1070、1073、1074、1075、1077、1078、1080、1081、1082、1084、1085、1095、1096、1097、1098、1099、1100、1101、1102、1103、1104、1105、1110、1111、1112、1113、1114、1118、1119和1124组成的核苷酸序列。

[0012] 一方面,用于控制植物受叶甲属种类侵扰的方法包括使叶甲属种类与多核苷酸接触,所述多核苷酸包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的相应片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段(例如,序列

具有100%同一性的21个连续核苷酸的片段)。在一个实施方案中,用于控制植物受叶甲属种类侵扰的方法包括使叶甲属种类与多核苷酸接触,所述多核苷酸包含与靶基因或由靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补的核苷酸序列,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094。在一些实施方案中,所述多核苷酸为双链RNA。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含选自触发因子序列组的一个或多个核苷酸序列。在一些实施方案中,与多核苷酸的接触通过直接向叶甲属种类或叶甲属种类所接触的表面或基质(例如,植物或土壤)局部施用所述多核苷酸,或含有所述多核苷酸的组合物或溶液(例如,通过喷洒或扑粉或浸泡)而实现。在一些实施方案中,与多核苷酸的接触通过提供被叶甲属种类摄取的多核苷酸而实现。在一些实施方案中,与多核苷酸的接触通过提供对叶甲属种类表达的转基因植物而实现。

[0013] 几个实施方案涉及一种通过在叶甲属种类的食物中提供包含多核苷酸的试剂而控制植物受叶甲属种类侵扰的方法,所述多核苷酸具有序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的相应片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段(例如,序列具有100%同一性的21个连续核苷酸的片段),并且其中所述试剂对叶甲属种类侵扰起作用以抑制叶甲属种类内的生物功能,从而控制叶甲属种类侵扰。在一个实施方案中,用于控制植物受叶甲属种类侵扰的方法包括在叶甲属种类的食物中提供多核苷酸,所述多核苷酸包含与靶基因或由靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补的核苷酸序列,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含选自触发因子序列组的一个或多个核苷酸序列。在一些实施方案中,所述多核苷酸为双链RNA。在一些实施方案中,含有所述多核苷酸的试剂被配制用于,例如以可喷溶液或乳液、桶混制剂或粉剂的形式,向作物的田间施用。在一些实施方案中,所述试剂以生物方式生成,例如以微生物发酵产物的形式或在转基因植物细胞中表达。

[0014] 另一方面,提供了一种在叶甲属种类幼虫中引起死亡或生长受阻的方法。在一些实施方案中,在叶甲属种类幼虫的食物中提供包含至少一个沉默元件的至少一种RNA,其中所述RNA被叶甲属种类幼虫摄取在叶甲属种类幼虫中导致死亡或生长受阻。在一些实施方案中,沉默元件与叶甲属种类幼虫的靶基因序列的片段基本上相同或基本上互补,其中所述靶基因选自靶基因序列组中的基因。在一个实施方案中,在叶甲属种类幼虫中引起死亡或生长受阻的方法包括在所述幼虫的食物中提供包含至少一个沉默元件的至少一种多核苷酸,所述沉默元件包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA互补的21个连续核苷酸,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094。在一些实施方案中,所述沉默元件包含选自触发因子序列组的一个或多个核苷酸序列。在一些实施方案中,所述多核苷酸为双链RNA。一些实施方案涉及一种在叶甲属种类中引起死亡或繁殖力降低的方法,其包括在叶甲属种类的食物中提供包含与叶甲属种类幼虫的靶基因序列的片段基本上相同或基本上互补的至少一个沉默元件的至少一种RNA,其中所述RNA被叶甲属种类摄取在叶甲属种类中导致死亡或繁殖力降低。在一些实施方案中,所述靶基因

选自靶基因序列组中的基因。在一个实施方案中,所述方法引起变态率降低或摄食活力降低。在一个实施方案中,所述方法用于提供对叶甲属种类侵扰具有增加的抗性的植物。

[0015] 几个实施方案涉及一种提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物的方法,其包括向植物局部施用包含至少一种多核苷酸的组合物,所述多核苷酸具有序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的相应片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段(例如,序列具有100%同一性的21个连续核苷酸的片段)。在一个实施方案中,提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物的方法包括向植物局部施用包含至少一种多核苷酸的组合物,所述多核苷酸包含与靶基因或由靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补的核苷酸序列,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094。在一个实施方案,提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物的方法包括以使得有效量的至少一种多核苷酸被以所述植物为食的叶甲属种类摄取的方式向所述植物局部施用包含所述多核苷酸的组合物,所述多核苷酸包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA互补的至少21个连续核苷酸,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含选自触发因子序列组的一个或多个核苷酸序列。在一些实施方案中,所述多核苷酸为双链RNA。几个实施方案涉及包含所述多核苷酸的组合物,其配制用于,例如以可喷溶液或乳液、桶混制剂或粉剂的形式向作物的田间施用。

[0016] 几个实施方案涉及一种用于控制叶甲属种类的杀虫组合物,其包含杀虫有效量的至少一种多核苷酸分子,所述多核苷酸分子包含与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的相应片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段(例如,序列具有100%同一性或互补性的21个连续核苷酸的片段)。在一些实施方案中,所述多核苷酸分子包含与靶基因或由靶基因转录的RNA互补的至少21个连续核苷酸,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含选自触发因子序列组的一个或多个核苷酸序列。在一些实施方案中,所述多核苷酸分子为重组多核苷酸。在一些实施方案中,所述多核苷酸分子为RNA。在一些实施方案中,所述多核苷酸分子为双链RNA。相关实施方案包括包含多核苷酸分子的杀虫组合物,其配制用于,例如以可喷溶液或乳液、桶混制剂或粉剂的形式向作物的田间施用,并且任选地包含一种或多种附加组分,如载体剂、表面活性剂、阳离子脂质、有机硅、有机硅表面活性剂、多核苷酸除草分子、非多核苷酸除草分子、非多核苷酸杀虫剂、安全剂和昆虫生长调节剂。

[0017] 几个实施方案涉及一种提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物的方法,其包括在植物中表达至少一种多核苷酸,所述多核苷酸包含与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的相应片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段(例如,序列具有100%同一性或互补性的21个连续核苷酸的片段)。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含选自触发因子序列组的一个或多个核苷酸序列。在一些实施方案中,所述多核苷酸为双链RNA。

[0018] 几个实施方案涉及一种重组DNA构建体,其包含与DNA元件可操作地连接的异源启动子,所述DNA元件包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的相应片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段(例如,序列具有100%同一性的21个连续核苷酸的片段)。在一些实施方案中,所述DNA元件编码双链RNA。在一些实施方案中,双链RNA包含选自触发因子序列组的一个或多个核苷酸序列。相关实施方案包括植物染色体或质体或重组植物病毒载体或重组杆状病毒载体,其包含所述重组DNA构建体,或包含所述DNA元件,无异源启动子。

[0019] 几个实施方案涉及一种转基因茄科植物细胞,其在其基因组中具有编码抑制靶基因在接触或摄取RNA的叶甲属种类中表达的RNA的重组DNA,其中所述RNA包含具有与靶基因的片段互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的至少一个沉默元件。在一些实施方案中,靶基因选自靶基因序列组。一个特定实施方案为在其基因组中具有编码使选自泡外基因、核糖体蛋白基因和蛋白体基因的一个或多个靶基因沉默的RNA的重组DNA的转基因茄科植物细胞。在一些实施方案中,所述RNA包含选自触发因子序列组的一个或多个核苷酸序列。

[0020] 几个实施方案涉及当被叶甲属种类摄取或接触时在叶甲属种类中引起死亡或生长受阻的分离的重组RNA分子,其中所述重组RNA分子包含与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的相应片段基本上互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段(例如,序列具有100%互补性的21个连续核苷酸的片段)。在一些实施方案中,所述重组RNA分子为双链RNA。特定实施方案包括用于抑制核糖体蛋白如核糖体L7蛋白或由SEQ ID NO:730编码的蛋白质的表达的分离的重组RNA分子,和具有选自SEQ ID NO:989、988、1104或1105的序列的分离的重组双链RNA分子。

[0021] 几个实施方案涉及一种提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物的方法,其包括向植物提供至少一种多核苷酸,所述多核苷酸包含与选自靶基因序列组的靶基因的相应片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段(例如,序列具有100%同一性或互补性的21个连续核苷酸的片段)。在一个实施方案中,提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物的方法包括向植物提供包含与靶基因或由靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸相同或互补的至少一个片段的至少一种多核苷酸,其中所述靶基因选自靶基因序列组中标识的基因。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含选自触发因子序列组的一个或多个核苷酸序列。在一些实施方案中,所述多核苷酸为双链RNA。

[0022] 几个实施方案涉及一种用于控制植物受叶甲属种类侵扰的方法,其包括使叶甲属种类与多核苷酸接触,所述多核苷酸包含与选自靶基因序列组的靶基因的DNA的相应等长片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段(例如,序列具有100%同一性或互补性的21个连续核苷酸的片段)。在一些实施方案中,所述多核苷酸为双链RNA。在一个实施方案中,用于控制植物受叶甲属种类侵扰的方法包括使叶甲属种类与有效量的双链RNA接触,其中一条链与编码核糖体蛋白的基因的至少21个连续核苷酸互补,其中RNA干扰被诱导并且发生死亡。在一些实施方案中,双链RNA包含选自触发因子序列组的一个或多个核苷酸序列。

[0023] 几个实施方案涉及一种从植物基因组或从动物基因组选择RNAi介导的沉默的靶基因的方法。在各个实施方案中,所述方法提供了在特定基因组中以单或低拷贝数(非重复

且非冗余)存在,或具有低核苷酸多样性,或具有一定比率的同义(K_s)与非同义(K_a)核苷酸变化(其中 $K_s \gg K_a$)的靶基因子集。

[0024] 几个实施方案涉及包含如本文所述的至少一种多核苷酸的人造组合物。在一些实施方案中,提供了用于向需要保护以免受叶甲属种类侵扰的植物或物质局部施用的制剂。在一些实施方案中,提供了用于产生转基因茄科植物细胞和转基因茄科植物的重组构建体和载体。在一些实施方案中,提供了用于处理茄科植物、茄科植物种子或可繁殖部分如块茎的制剂和包衣。在一些实施方案中,提供了由经本文所述的多核苷酸处理或含有本文所述的多核苷酸的此类茄科植物、种子或可繁殖部分生产的商品和粮食(尤其是具有可检测量的如本文所述的多核苷酸的商品和粮食)。几个实施方案涉及结合由选自靶基因序列组的序列或序列片段编码的蛋白质的多克隆或单克隆抗体。另一方面涉及结合由选自触发因子序列组或其互补物的序列或序列片段编码的蛋白质的多克隆或单克隆抗体。此类抗体通过本领域的普通技术人员已知的常规方法制成。

[0025] 在本文所述的各个实施方案中,所述植物可为受叶甲属种类侵扰的任何植物。特别感兴趣的是其中所述植物为茄科植物(茄科)的实施方案。实例包括选自马铃薯、番茄和茄子的植物。实施方案包括其中所述植物为未发芽的茄科植物种子、处于营养阶段的茄科植物或处于生殖阶段的茄科植物的实施方案。实施方案包括其中所述植物为“种用马铃薯”的实施方案,所述“种用马铃薯”意指可以繁殖成新的马铃薯植株的马铃薯块茎或马铃薯块茎块。

[0026] 在以下详述中公开了本发明的其它方面和具体实施方案。

[0027] 发明详述

[0028] 除非另有定义,否则使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域中普通技术人员通常所理解的含义。术语呈单数形式提供时,发明人也考虑到了用该术语的复数描述的本发明的方方面面。术语和通过引用并入本文的参考文献中使用的定义存在矛盾时,本申请中使用的术语应具有本文给出的定义。使用的其它技术术语具有在其所用领域中的普通含义,如各种领域特定词典所例证,例如,“The American Heritage® Science Dictionary”(Editors of the American Heritage Dictionaries,2011,Houghton Mifflin Harcourt,Boston and New York)、“McGraw-Hill Dictionary of Scientific and Technical Terms”(2002年,第6版,McGraw-Hill,New York)或“Oxford Dictionary of Biology”(2008年,第6版,Oxford University Press,Oxford and New York)。发明人并不旨在限于一种作用机制或模式。提供对其的参考仅仅是为了说明的目的。

[0029] 除非另有说明,否则在从左到右,按5'至3'方向阅读时,给出了本说明书上下文中的核酸序列。本领域技术人员应意识到给定DNA序列被理解为限定除DNA的胸腺嘧啶(T)核苷酸被尿嘧啶(U)核苷酸置换外,与DNA序列相同的相应RNA序列。因此,提供特定DNA序列被理解为限定准确RNA等效物。给定的第一多核苷酸序列,无论是DNA还是RNA,都进一步限定了其准确互补物(可为DNA或RNA)的序列,通过形成沃森-克里克碱基对(Watson-Crick base-pair)与第一多核苷酸完美杂交的第二多核苷酸。对于DNA:DNA双链体(杂交链)而言,碱基对为腺嘌呤:胸腺嘧啶或鸟嘌呤:胞嘧啶;对于DNA:RNA双链体而言,碱基对为腺嘌呤:尿嘧啶或鸟嘌呤:胞嘧啶。因此,通过提供一条链的核苷酸序列,无论作为DNA还是RNA给出,都明确地限定了完美杂交(所述链间存在“100%互补性”时或所述链“互补”时)的平端双链

多核苷酸的核苷酸序列。所谓与靶基因或靶基因片段“基本上相同”或“基本上互补”意指一条多核苷酸链(或双链多核苷酸的至少一条链)设计为与靶基因或靶基因片段或与靶基因或靶基因片段的转录物杂交(通常在如活体植物或动物细胞中存在的生理条件下);本领域技术人员将理解此类杂交不一定需要100%序列同一性或互补性。当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时,第一核酸序列与第二核酸序列“可操作地”相连或“连接”。例如,如果启动子用于DNA的转录或表达,则启动子序列与DNA“可操作地连接”。通常,可操作地连接的DNA序列是连续的。

[0030] 术语“多核苷酸”一般是指含有多个核苷酸的DNA或RNA分子并且通常是指“寡核苷酸”(长度为18-25个核苷酸的多核苷酸)和26个或更多个核苷酸的较长多核苷酸两者。如本领域通常所实践那样,多核苷酸还包括含有多个核苷酸,包括非规范核苷酸或经化学修饰的核苷酸的分子;参见,例如,技术手册“RNA Interference(RNAi)and DsiRNAs”,2011(Integrated DNA Technologies Coralville,IA)中公开的化学修饰。通常,如本文所述的多核苷酸,无论是DNA或RNA还是两者,并且无论是单链还是双链,都包括与靶基因DNA或靶基因RNA转录物的同等大小的片段基本上相同或互补的至少一个18个或更多个连续核苷酸(或,在为双链多核苷酸的情况下,为至少18个连续碱基对)的片段。在本公开全篇,“至少18个连续”意为“约18个至约10,000个,包括之间的每个整数点”。因此,本发明的实施方案包括长度为18-25个核苷酸(18-mer、19-mer、20-mer、21-mer、22-mer、23-mer、24-mer或25-mer)的寡核苷酸或长度为26个或更多个核苷酸的中等长度多核苷酸(26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、约65、约70、约75、约80、约85、约90、约95、约100、约110、约120、约130、约140、约150、约160、约170、约180、约190、约200、约210、约220、约230、约240、约250、约260、约270、约280、约290或约300个核苷酸的多核苷酸)或长度大于约300个核苷酸的长多核苷酸(例如,长度介于约300至约400个核苷酸之间、介于约400至约500个核苷酸之间、介于约500至约600个核苷酸之间、介于约600至约700个核苷酸之间、介于约700至约800个核苷酸之间、介于约800至约900个核苷酸之间、介于约900至约1000个核苷酸之间、介于约300至约500个核苷酸之间、介于约300至约600个核苷酸之间、介于约300至约700个核苷酸之间、介于约300至约800个核苷酸之间、介于约300至约900个核苷酸之间,或为约1000个核苷酸,或甚至长度大于约1000个核苷酸,例如达到靶基因,包括靶基因的编码或非编码部分或编码和非编码部分两者在内的整个长度的多核苷酸)。多核苷酸为双链时,可依照碱基对类似地描述其长度。

[0031] 本文所述的多核苷酸可为单链(ss)或双链(ds)。“双链”是指通常在生理相关条件下,在充分互补、反向平行的核酸链之间发生碱基配对以形成双链核酸结构。实施方案包括其中所述多核苷酸选自有义单链DNA(ssDNA)、有义单链RNA(ssRNA)、双链RNA(dsRNA)、双链DNA(dsDNA)、双链DNA/RNA杂交体、反义ssDNA或反义ssRNA的实施方案;可以使用任何这些类型的多核苷酸的混合物。在一些实施方案中,所述多核苷酸为长度大于天然存在的小调控RNA(如内源性产生的siRNA和成熟miRNA)典型长度的双链RNA。在一些实施方案中,所述多核苷酸为长度至少约30个连续碱基对的双链RNA。在一些实施方案中,所述多核苷酸为长度介于约50个至约500个碱基对的双链RNA。在一些实施方案中,所述多核苷酸可包括除标准核糖核苷酸外的组分,例如,实施方案为包含末端脱氧核糖核苷酸的RNA。

[0032] 在各个实施方案中,本文所述的多核苷酸包含天然存在的核苷酸,如DNA和RNA中存在的核苷酸。在某些实施方案中,多核苷酸为核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的组合,例如,合成多核苷酸主要由核糖核苷酸组成,但是具有一个或多个末端脱氧核糖核苷酸或一个或多个末端双脱氧核糖核苷酸或合成多核苷酸主要由脱氧核糖核苷酸组成,但是具有一个或多个末端双脱氧核糖核苷酸。在某些实施方案中,多核苷酸包含非规范核苷酸如次黄嘌呤核苷、硫尿核苷或假尿嘧啶核苷。在某些实施方案中,多核苷酸包含经化学修饰的核苷酸。化学修饰寡核苷酸或多核苷酸的实例在本领域公知;参见,例如,美国专利公布2011/0171287、美国专利公布2011/0171176、美国专利公布2011/0152353、美国专利公布2011/0152346和美国专利公布2011/0160082,其通过引用并入本文。说明性实例包括但不限于可经硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或磷酸甲酯核苷酸间连键修饰部分地或完全地修饰的寡核苷酸或多核苷酸的天然存在的磷酸二酯骨架,经修饰的核苷碱基或经修饰的糖可用于寡核苷酸或多核苷酸合成,并且寡核苷酸或多核苷酸用荧光部分(例如,荧光素或若丹明)或其它标记(例如,生物素)标记。

[0033] 几个实施方案涉及包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的多核苷酸。在一些实施方案中,连续核苷酸计数为至少18个,例如介于18-24个之间、或介于18-28个之间、或介于20-30个之间、或介于20-50个之间、或介于20-100个之间、或介于50-100个之间、或介于50-500个之间、或介于100-250个之间、或介于100-500个之间、或介于200-1000个之间、或介于500-2000个之间或甚至更多。在一些实施方案中,连续核苷酸计数为超过18个,例如19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或大于30个,例如约35个、约40个、约45个、约50个、约55个、约60个、约65个、约70个、约75个、约80个、约85个、约90个、约95个、约100个、约110个、约120个、约130个、约140个、约150个、约160个、约170个、约180个、约190个、约200个、约210个、约220个、约230个、约240个、约250个、约260个、约270个、约280个、约290个、约300个、约350个、约400个、约450个、约500个,或大于500个连续核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有100%同一性的至少一个为至少21个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中,多核苷酸为双链核酸(例如,dsRNA),其中一条链包含与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有100%同一性的至少一个为至少21个连续核苷酸的片段;表示为碱基对,此类双链核酸包含与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段相对应的至少一个为至少21个连续、完美匹配碱基对的片段。在一些实施方案中,多核苷酸中所含的每个片段的长度均大于天然存在的小调控RNA典型的长度,例如,每个片段长度为至少约30个连续核苷酸(或碱基对)。在一些实施方案中,多核苷酸的总长度或多核苷酸中所含的每个片段的长度小于具有选自靶基因序列组的序列的DNA或靶基因的总长度。在一些实施方案中,多核苷酸的总长度介于约50个至约500个核苷酸(对于单链多核苷酸而言)或碱基对(对于双链多核苷酸而言)之间。在一些实施方案中,多核苷酸为介于约100个至约500个碱基对之间的dsRNA,如表3、5、8、9和10中公开的任何dsRNA触发因子的长度的dsRNA。实施方案包括其中在植物中表达的多核苷酸为包含具有选自SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的片段的RNA,或为由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码的RNA发夹的实施方案。在

一些实施方案中,多核苷酸在植物中表达。在一些实施方案中,向植物或叶甲属种类表面局部提供多核苷酸。

[0034] 几个实施方案涉及被设计为通过诱导对叶甲属种类靶基因的调控或抑制而调节表达的多核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸被设计为具有与叶甲属种类靶基因或cDNA(例如,靶基因序列组)的核苷酸序列或与由叶甲属种类靶基因(可为编码序列或非编码序列)转录的RNA序列基本上相同或基本上互补的核苷酸序列。调节表达的这些有效的多核苷酸在本文可称为“多核苷酸”、“多核苷酸触发因子”或“触发因子”。

[0035] 任意大小的有效多核苷酸均可单独或组合用于本文所述的各种方法和组合物中。在一些实施方案中,单一多核苷酸触发因子用于制备组合物(例如,供局部施用的组合物,或用于产生转基因植物的重组DNA构建体)。在其它实施方案中,使用不同多核苷酸触发因子的混合物或汇集物;在此类情况下多核苷酸触发因子可用于单个靶基因或多个靶基因。

[0036] 如本文中所示,术语“分离的”是指将一种分子与在其天然或自然状态下通常与其缔合的其它分子分开。因此术语“分离的”可指已经将DNA分子与在其天然或自然状态下通常与其缔合的其它DNA分子分开。此类DNA分子可呈重组状态存在,如重组DNA分子。因此,例如作为重组技术的结果,与通常不与之缔合的调控或编码序列融合的DNA分子,即使在作为转基因整合到细胞的染色体中或与其它DNA分子一起存在时,也被认为是分离的。

[0037] 如本文中所示,术语“靶基因序列组”是指由SEQ ID NO:1-725和SEQ ID NO:726-830和SEQ ID NO:1087-1094)组成的该组序列。如本文中所示,术语“触发因子序列组”是指由SEQ ID NO:831,842,849,898,910,925,928,931,932,937,938,940,941,942,943,944,945,947,948,949,950,951,952,955,956,957,958,960,961,964,966,967,968,969,970,971,973,976,978,979,982,983,985,987,988,989,991,992,994,995,996,997,999,1006,1007,1008,1009,1010,1013,1018,1019,1020,1022,1025,1029,1030,1033,1035,1036,1037,1038,1039,1040,1041,1042,1043,1045,1046,1047,1049,1050,1053,1054,1058,1060,1061,1064,1065,1066,1067,1068,1070,1073,1074,1075,1077,1078,1080,1081,1082,1084,1085,1095,1096,1097,1098,1099,1100,1101,1102,1103,1104,1105,1110,1111,1112,1113,1114,1118,1119和1124组成的该组序列。

[0038] 在各个实施方案中,叶甲属种类是选自以下的至少一种:Leptinotarsa behrensi、Leptinotarsa collinsi、马铃薯叶甲(科罗拉多马铃薯甲虫)、Leptinotarsa defecta、Leptinotarsa haldemani(Haldeman绿色马铃薯甲虫)、Leptinotarsa heydeni、Leptinotarsa juncta(伪马铃薯甲虫)、膜苞菊叶甲(菊科灌木甲虫)、蒺藜叶甲、柔毛茄叶甲、胡颓子叶茄叶甲、蒺藜四条叶甲、Leptinotarsa tumamoca和Leptinotarsa typographica。在特定实施方案中,叶甲属种类是选自以下的至少一种:马铃薯叶甲(科罗拉多马铃薯甲虫)、Leptinotarsa juncta(伪马铃薯甲虫)、Leptinotarsa haldemani(Haldeman绿色马铃薯甲虫)和膜苞菊叶甲(菊科灌木甲虫)。

[0039] 通过接触多核苷酸控制叶甲属侵扰

[0040] 本文提供了通过使叶甲属种类与多核苷酸接触来控制植物受叶甲属种类侵扰的方法,所述多核苷酸包含与选自靶基因序列组或其DNA互补物的DNA或靶基因的相应片段具有约95%至约100%同一性或互补性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一个实施方案中,用于控制植物受叶甲属种类侵扰的方法包括使叶甲属种类与多核苷酸接

触,所述多核苷酸包含与具有选自以下的DNA序列的靶基因的相应片段具有100%同一性的至少21个连续核苷酸:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094或其DNA互补物。在一些实施方案中,所述多核苷酸为双链RNA。在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如,双链RNA)经化学合成或通过微生物中表达或在植物细胞中表达而生成。实施方案包括其中多核苷酸为包含选自SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的dsRNA,或其中多核苷酸由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码的实施方案。在一个实施方案中,用于控制植物受叶甲属种类侵扰的方法包括使叶甲属种类与多核苷酸接触,所述多核苷酸包含与靶基因或由靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补的核苷酸序列,所述靶基因由选自以下的核苷酸序列编码:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094。实施方案包括其中多核苷酸为包含具有选自触发因子序列组的序列的链的dsRNA的实施方案。在一些实施方案中,所述方法使用多核苷酸,所述多核苷酸包含为由SEQ ID NO:825编码的靶基因的127个连续核苷酸的反义(反向互补)序列的一个127个连续核苷酸(SEQ ID NO:831)的片段。在一些实施方案中,所述方法使用多核苷酸,所述多核苷酸包含分别为由SEQ ID NO:732编码的靶基因的409个和403个连续核苷酸的反义(反向互补)序列的409个和403个连续核苷酸(分别为SEQ ID NO:937和SEQ ID NO:938)的片段。可对多个靶基因设计用于所述方法中的多核苷酸。本发明的相关方面包括用于所述方法中的分离多核苷酸和通过所述方法提供的具有提高的叶甲属抗性的植物。

[0041] 在一些实施方案中,所述连续核苷酸的序列与具有选自:SEQ ID NO:1-725和SEQ ID NO:726-830和SEQ ID NO:1087-1094或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同一性。在一些实施方案中,所述连续核苷酸与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段完全(100%)相同。在一些实施方案中,所述多核苷酸的整体序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同一性。在一个实施方案中,所述多核苷酸包含与靶基因的相应片段具有100%同一性的至少一个为21个连续核苷酸的片段,所述靶基因具有选自以下的DNA序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094或其DNA互补物。在一些实施方案中,所述多核苷酸除包含与靶基因的相应片段具有100%同一性的一个或多个为21个连续核苷酸的片段外,还包含“中性”序列(与靶基因无序列同一性或互补性的序列),并且因此多核苷酸作为一个整体与靶基因具有低得多的整体序列同一性。

[0042] 几个实施方案涉及设计为抑制一个或多个基因(“靶基因”)的多核苷酸。术语“基因”是指用于转录物的表达或编码转录物的核酸的任何部分。“基因”可包括但不限于启动子区、5'非翻译区、可包括内含子区的转录物编码区、3'非翻译区或这些区域的组合。在一些实施方案中,靶基因可包括编码或非编码序列或两者。在其它实施方案中,靶基因具有与信使RNA相同或互补的序列,例如,在一些实施方案中靶基因为cDNA。在特定实施方案中,多核苷酸被设计为抑制一个或多个靶基因,其中每个靶基因由选自靶基因序列组的DNA序列编码。在各个实施方案中,多核苷酸被设计为抑制一个或多个靶基因,其中每个靶基因由选

自靶基因序列组的序列编码,并且可被设计为抑制来自于这个组的多个靶基因,或靶向这些靶基因中的一个或多个的不同区域。在一个实施方案中,多核苷酸包含与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有100%同一性的多个为21个连续核苷酸的片段。在此类情况下,每个片段在大小或序列上可相同或不同,并且相对于靶基因可为有义或反义。例如,在一个实施方案中多核苷酸包含呈串联或重复排列的多个片段,其中每个片段包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有100%同一性的21个连续核苷酸。在一些实施方案中,所述片段可来自于靶基因的不同区域,例如,所述片段可与靶基因的不同外显子区相对应。在一些实施方案中,与靶基因不相对应的“间隔区”核苷酸可任选地用于所述片段之间或附近。

[0043] 用于这种方法中的多核苷酸的总长度可大于18个连续核苷酸,并且可包括除序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有约95%至约100%同一性的连续核苷酸外的核苷酸。换言之,多核苷酸的总长度可大于被设计为抑制一个或多个靶基因的多核苷酸的所述区段或片段的长度,其中每个靶基因具有选自靶基因序列组的DNA序列。例如,多核苷酸可具有侧接抑制靶基因的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的“活性”片段的核苷酸,或包括在活性片段之间的“间隔区”核苷酸,或可在5'末端,或在3'末端,或在5'和3'末端两处具有附加核苷酸。在一个实施方案中,多核苷酸可包括与具有选自:靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因并非特异性相关(具有不与之互补或相同的序列)的附加核苷酸,例如,提供稳定二级结构或为了方便克隆或生产的核苷酸。在一个实施方案中,多核苷酸可包括紧邻序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有约95%至约100%同一性的一个或多个为18个或更多个连续核苷酸的片段定位的附加核苷酸。在一个实施方案中,多核苷酸包含一个此类片段,具有邻近所述片段的附加5'G或附加3'C或两者。在另一个实施方案中,多核苷酸为包含附加核苷酸以形成突出的双链RNA,例如,包含2个脱氧核糖核苷酸以形成3'突出的dsRNA。因此在各个实施方案中,整个多核苷酸的核苷酸序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因中的连续核苷酸序列并非100%相同或互补。例如,在一些实施方案中多核苷酸包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的片段具有100%同一性的至少两个各21个连续核苷酸的片段,其中(1)所述至少两个片段被一个或多个间隔区核苷酸分隔开,或(2)所述至少两个片段按不同于具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA中存在的相应片段的顺序排列。

[0044] 通过本领域人员已知的适合方式提供用于这种方法中的多核苷酸。实施方案包括其中多核苷酸经化学合成(例如,通过体外转录,如使用T7聚合酶或其它聚合酶转录),通过在微生物中或在细胞培养物(如培养物中生长的植物或昆虫细胞)中表达而生成,通过在植物细胞中表达而生成,或通过微生物发酵生成的实施方案。

[0045] 在一些实施方案中用于这种方法中的多核苷酸作为分离的DNA或RNA片段提供。在一些实施方案中用于这种方法中的多核苷酸不是表达构建体的一部分而是缺乏附加元件如启动子或终止子序列)。此类多核苷酸可相对较短,如介于约18个至约300个或介于约50个至约500个核苷酸(对于单链多核苷酸而言)或介于约18个至约300个或介于约50个至约500个碱基对(对于双链多核苷酸而言)的单链或双链多核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸为介于约100个至约500个碱基对的dsRNA,如表3、5、8、9和10中公开的任何dsRNA触发因

子的长度的dsRNA。实施方案包括其中多核苷酸为包含具有选自SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的片段的dsRNA,或其中多核苷酸由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码的实施方案。可选地多核苷酸可在更复杂的构建体中提供,例如,作为重组表达构建体的一部分,或包括在重组载体中,例如在重组植物病毒载体或重组杆状病毒载体中。在一些实施方案中此类重组表达构建体或载体被设计为包括附加元件,如用于表达所关注的基因(例如,杀虫蛋白)的表达盒。

[0046] 在所述方法的各个实施方案中,所述接触包括向叶甲属种类的表面施用包含用于这种方法中的多核苷酸的适合组合物;此类组合物可,例如作为固体、液体(包括均匀混合物,如溶液和非均匀混合物如混悬液、胶体、胶粒和乳液)、粉剂、混悬液、乳液、喷雾剂、封装或微囊制剂,或在微珠或其它载体微粒中或上,在薄膜或包衣中,或在基质上或内,或作为种子处理剂而提供。所述接触可呈种子处理形式,或呈“种用马铃薯”块茎或块茎块处理的形式(例如,通过将种用马铃薯浸泡、包衣或扑粉)。正如熟悉杀虫剂和种子处理剂的技术人员所知,在所述组合物中可任选地包括适合的粘合剂、惰性载体、表面活性剂等。在一些实施方案中,所述接触包括在组合物中提供所述多核苷酸,所述组合物还包含选自载体剂、表面活性剂、阳离子脂质(如通过引用并入本文的美国专利申请公开2011/0296556的实施例18中公开的阳离子脂质)、有机硅、有机硅表面活性剂、多核苷酸除草分子、非多核苷酸除草分子、非多核苷酸杀虫剂、安全剂和昆虫生长调节剂的一种或多种组分。在一些实施方案中,所述接触包括在组合物中提供所述多核苷酸,所述组合物还包含选自马铃薯糖蛋白(patatin)、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)杀虫蛋白、致病杆菌(*Xenorhabdus*)杀虫蛋白、发光杆菌(*Photobacterium*)杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌(*Bacillus laterosporus*)杀虫蛋白和球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)杀虫蛋白的至少一种杀虫剂。在一个实施方案中所述接触包括在可被叶甲属种类摄取或以其它方式内部吸收的组合物中提供所述多核苷酸。

[0047] 预计用于这种方法中的某些多核苷酸(例如,在工作实施例中描述的多核苷酸触发因子)与一种或多种非多核苷酸杀虫剂的组合在叶甲属种类侵扰的预防或控制方面,与用单独的多核苷酸或单独的非多核苷酸杀虫剂获得的效果相比,将产生协同提高。在一个实施方案中,发现含有一种或多种多核苷酸和选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的一种或多种非多核苷酸杀虫剂的组合物实现了协同提高的对叶甲属种类侵扰的预防或控制。

[0048] 通过提供食物多核苷酸控制叶甲属侵扰

[0049] 本发明的另一方面提供了一种用于控制植物受叶甲属种类侵扰的方法,其包括在叶甲属种类的食物中提供一种包含多核苷酸的试剂,所述多核苷酸具有序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段,其中所述试剂对叶甲属种类侵扰起作用以抑制叶甲属种类内的生物功能,从而控制叶甲属种类侵扰。多核苷酸可以比其所含的片段长,但是每个多核苷酸片段和相应DNA片段等长。可对多个靶基因设计用于所述方法中的多核苷酸。实施方案包括其中所述试剂包含dsRNA,dsRNA包含具有选自SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的片段,或其中所述试剂包含由选自SEQ ID NO:1105-1109

的序列编码的多核苷酸或RNA的实施方案。在一个实施方案中,提供了一种用于控制植物受叶甲属种类侵扰的方法,其包括在叶甲属种类的食物中提供多核苷酸,所述多核苷酸包含与靶基因或由靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补的核苷酸序列,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094。在一些实施方案中,所述多核苷酸为双链RNA。在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如,双链RNA)经化学合成或通过微生物中表达或在植物细胞中表达而生成。实施方案包括其中多核苷酸为一条链具有选自触发因子序列组的序列的dsRNA的实施方案。本发明的相关方面包括用于所述方法中的分离多核苷酸和通过所述方法提供的具有提高的叶甲属种类抗性的植物。

[0050] 在各个实施方案中,包含多核苷酸的试剂包含微生物细胞或在微生物中生成。例如,所述试剂可包括细菌或酵母细胞或可在细菌或酵母细胞中生成。在其它实施方案中包含多核苷酸的试剂包含转基因植物细胞或在植物细胞(例如瞬时表达多核苷酸的植物细胞)中生成;此类植物细胞可以是植物中的细胞或在组织培养物或细胞悬浮液中生长的细胞。

[0051] 在各个实施方案中,包含多核苷酸的试剂以适于摄取的形式,例如,作为固体、液体(包括均匀混合物,如溶液和非均匀混合物如混悬液、胶体、胶粒和乳液)、粉剂、混悬液、乳液、喷雾剂、封装或微囊制剂,或在微珠或其它载体微粒中或上,在薄膜或包衣中,或在基质上或内,或作为种子处理剂而提供,供叶甲属种类食物摄入。可通过向受叶甲属种类侵扰的植物施用所述试剂或通过向植物的种子施用所述试剂,例如通过为植物喷洒、扑粉或包衣,或通过施用土壤浇灌剂,或通过人工食物中提供,提供包含多核苷酸的试剂,供叶甲属种类食物摄入。可在为满足特定营养需求以喂养叶甲属种类而配制的人工食物中提供包含多核苷酸的试剂,供叶甲属种类食物摄入,其中所述人工食物补充了一定量的从单独来源如化学合成获得的或由微生物发酵纯化的多核苷酸;这个实施方案可用于,例如确定有效的多核苷酸处理方案的时间和量。在一些实施方案中包含多核苷酸的试剂以植物细胞形式或在植物细胞组分中,或在微生物(如细菌或酵母)或微生物发酵产物中,或在合成或人造食物中提供,供叶甲属种类食物摄入。在一个实施方案中包含多核苷酸的试剂以被叶甲属种类摄取的饵料形式提供。包含多核苷酸的试剂可以种子处理的形式,或以“种用马铃薯”块茎或块茎块处理的形式(例如,通过将种用马铃薯浸泡、包衣或扑粉)而提供。正如熟悉杀虫剂和种子处理制剂的人员所知,在所述试剂中可包括适合的粘合剂、惰性载体、表面活性剂等。在一些实施方案中,包含多核苷酸的试剂还包含选自载体剂、表面活性剂、阳离子脂质(如通过引用并入本文的美国专利申请公开2011/0296556的实施例18中公开的阳离子脂质)、有机硅、有机硅表面活性剂、多核苷酸除草分子、非多核苷酸除草分子、非多核苷酸杀虫剂、安全剂和昆虫生长调节剂的一种或多种组分。在一些实施方案中,包含多核苷酸的试剂还包含选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的至少一种杀虫剂。在一些实施方案中,包含多核苷酸的试剂包含选自植入植物中的微粒、球粒或胶囊的至少一种可植入制剂;在此类实施方案中所述方法包括在植物中植入可植入制剂。在一些实施方案中,包含多核苷酸的试剂包含选自粉剂、颗粒、球粒、胶囊、喷雾剂或浇灌剂或适于向犁沟施用的任何其它形式的至少一种沟灌制剂(in-furrow

formulation);在此类实施方案中,所述方法包括用沟灌制剂进行沟灌处理。在一些实施方案中,所述方法包括用所述试剂处理茄科植物种子、马铃薯块茎或马铃薯块茎块。

[0052] 预计用于这种方法的试剂中使用的某些多核苷酸(例如,工作实施例中描述的多核苷酸触发因子)与一种或多种非多核苷酸杀虫剂的组合在叶甲属种类侵扰的预防或控制方面,与用单独的多核苷酸或单独的非多核苷酸杀虫剂获得的效果相比,将产生协同提高。在一个实施方案中,发现含有一种或多种多核苷酸和选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的一种或多种非多核苷酸杀虫剂的组合物,当在食物中提供给叶甲属种类时,实现了协同提高的对叶甲属种类侵扰的预防或控制。

[0053] 在一些实施方案中,多核苷酸为包含具有选自SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的片段的dsRNA,或其中多核苷酸由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码。

[0054] 在一些实施方案中,连续核苷酸的序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同一性。在一些实施方案中,所述连续核苷酸与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段完全(100%)相同。在一些实施方案中,所述多核苷酸的整体序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同一性。在一个实施方案中,所述多核苷酸包含序列与靶基因的相应片段具有100%同一性的至少一个为21个连续核苷酸的片段,所述靶基因具有选自以下的DNA序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094或其DNA互补物;在一些实施方案中,所述多核苷酸除包含与靶基因的相应片段具有100%同一性的21个连续核苷酸的片段外,还包含“中性”序列(与靶基因无序列同一性或互补性),并且因此多核苷酸作为一个整体与靶基因具有低得多的整体序列同一性。

[0055] 用于这种方法中的多核苷酸通常被设计为抑制一个或多个基因(“靶基因”)。术语“基因”是指用于转录物的表达或编码转录物的核酸的任何部分。“基因”可包括但不限于启动子区、5'非翻译区、可包括内含子区的转录物编码区、3'非翻译区或这些区域的组合。在一些实施方案中,靶基因可包括编码或非编码序列或两者。在其它实施方案中,靶基因具有与信使RNA相同或互补的序列,例如,在一些实施方案中靶基因为cDNA。在特定实施方案中,多核苷酸被设计为抑制一个或多个靶基因,其中每个靶基因具有选自靶基因序列组的DNA序列。在各个实施方案中,多核苷酸被设计为抑制一个或多个靶基因,其中每个靶基因具有选自靶基因序列组的序列,并且可被设计为抑制来自于这个组的多个靶基因,或靶向这些靶基因中的一个或多个的不同区域。在一个实施方案中,多核苷酸包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有100%同一性的多个为21个连续核苷酸的片段。在此类情况下,每个片段在大小或序列上可相同或不同,并且相对于靶基因可为有义的或反义的。例如,在一个实施方案中多核苷酸包含呈串联或重复排列的多个片段,其中每个片段包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有100%同一性的21个连续核苷酸;所述片段可来自于靶基因的不同区域,例如,所述片段可与靶基因的不同外显子区相对应,并且与靶基因不相对应的“间隔

区”核苷酸可任选地用于所述片段之间或附近。

[0056] 用于这种方法中的多核苷酸的总长度可大于18个连续核苷酸,并且可包括除序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有约95%至约100%同一性的连续核苷酸外的核苷酸。换言之,多核苷酸的总长度可大于被设计为抑制一个或多个靶基因的多核苷酸的所述区段或片段的长度,其中每个靶基因具有选自靶基因序列组的DNA序列。例如,多核苷酸可具有侧接抑制靶基因的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的“活性”片段的核苷酸,或包括在活性片段之间的“间隔区”核苷酸,或可在5'末端,或在3'末端,或在5'和3'末端两处具有附加核苷酸。在一个实施方案中,多核苷酸可包括与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因并非特异性相关(具有不与之互补或相同的序列)的附加核苷酸,例如,提供稳定二级结构或为了方便克隆或生产的核苷酸。在一个实施方案中,多核苷酸可包括紧邻序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有约95%至约100%同一性的一个或多个为18个或更多个连续核苷酸的片段定位的附加核苷酸。在一个实施方案中,多核苷酸包含一个此类片段,具有邻近所述片段的附加5'G或附加3'C或两者。在另一个实施方案中,多核苷酸为包含附加核苷酸以形成突出的双链RNA,例如,包含2个脱氧核糖核苷酸以形成3'突出的dsRNA。因此在各个实施方案中,整个多核苷酸的核苷酸序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因中的连续核苷酸序列并非100%相同或互补。例如,在一些实施方案中多核苷酸包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的片段具有100%同一性的至少两个各21个连续核苷酸的片段,其中(1)所述至少两个片段被一个或多个间隔区核苷酸分隔开,或(2)所述至少两个片段按不同于具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA中存在的相应片段的顺序排列。

[0057] 通过本领域人员已知的适合方式提供用于这种方法中的多核苷酸。实施方案包括其中多核苷酸经化学合成(例如,通过体外转录,如使用T7聚合酶或其它聚合酶转录),通过在微生物中或在细胞培养物(如培养物中生长的植物或昆虫细胞)中表达而生成,通过在植物细胞中表达而生成,或通过微生物发酵生成的实施方案。

[0058] 在一些实施方案中用于这种方法中的多核苷酸作为分离的DNA或RNA片段提供。在一些实施方案中用于这种方法中的多核苷酸不是表达构建体的一部分而是缺乏附加元件如启动子或终止子序列。此类多核苷酸可相对较短,如介于约18个至约300个或介于约50个至约500个核苷酸(对于单链多核苷酸而言)或介于约18个至约300个或介于约50个至约500个碱基对(对于双链多核苷酸而言)的单链或双链多核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸为介于约100个至约500个碱基对的dsRNA,如表3、5、8、9和10中公开的任何dsRNA触发因子的长度的dsRNA。可选地多核苷酸可在更复杂的构建体中提供,例如,作为重组表达构建体的一部分,或包括在重组载体中,例如在重组植物病毒载体或重组杆状病毒载体中。在一些实施方案中此类重组表达构建体或载体设计为包括附加元件,如用于表达所关注的基因(例如,杀虫蛋白)的表达盒。

[0059] 通过提供食物RNA控制叶甲属种类侵扰

[0060] 本发明的另一方面提供了一种通过在幼虫的食物中提供包含至少一个沉默元件的至少一种多核苷酸而在叶甲属种类幼虫中引起死亡或生长受阻的方法,所述沉默元件包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA互补的21个连续核苷酸,所述靶基因具有选自以下

的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094。在一些实施方案中,所述多核苷酸为双链RNA。在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如,双链RNA)经化学合成或通过微生物中表达或在植物细胞中表达而生成。在一个实施方案中,提供了一种在叶甲属种类幼虫中引起死亡或生长受阻的方法,其包括在幼虫的食物中提供包含与叶甲属种类幼虫的靶基因序列的片段基本上相同或基本上互补的至少一个沉默元件的至少一种RNA,其中所述靶基因序列选自靶基因序列组,并且其中RNA被叶甲属种类幼虫摄取在叶甲属种类幼虫中导致死亡或生长受阻。本发明的相关方面为包含至少一个沉默元件的RNA,其中所述至少一个沉默元件与叶甲属种类幼虫的靶基因的片段基本上相同或基本上互补,其中所述靶基因序列选自靶基因序列组。所述RNA可以比其所含的沉默元件长,但是每个沉默元件和靶基因序列的相应片段等长。可对多个靶基因设计用于所述方法中的RNA;实施方案包括包含至少一个沉默元件的RNA,沉默元件包含选自SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列,或其中所述沉默元件由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码。实施方案包括其中所述RNA包含一条链具有选自触发因子序列组的序列的dsRNA的实施方案。在一个相关方面,提供了一种在叶甲属种类中引起死亡或繁殖力降低的方法,其包括在叶甲属种类的食物中提供包含与叶甲属种类幼虫的靶基因序列的片段基本上相同或基本上互补的至少一个沉默元件的至少一种RNA,其中所述靶基因序列选自靶基因序列组或其DNA互补物,并且其中RNA被叶甲属种类摄取在叶甲属种类中导致死亡或繁殖力降低。本发明的相关方面包括用于所述方法中的分离的RNA和通过所述方法提供的具有提高的叶甲属种类抗性的植物。

[0061] 在各个实施方案中,提供所述RNA的食物包含微生物细胞或在微生物中生成。例如,提供所述RNA的食物可包括细菌或酵母细胞或可在细菌或酵母细胞中生成。在类似实施方案中,提供所述RNA的食物包含转基因植物细胞或在植物细胞(例如瞬时表达多核苷酸的植物细胞)中生成;此类植物细胞可以是植物中的细胞或在组织培养物或细胞悬浮液中生长的细胞。

[0062] 在一个实施方案中提供所述RNA的食物可以受叶甲属种类侵扰的任何植物的形式提供,其中所述RNA含在所述植物中或上。此类植物可以是表达所述RNA的稳定转基因植物,或瞬时表达所述RNA或已经用所述RNA处理(例如,通过喷洒或包衣)的非转基因植物。稳定转基因植物通常含有整合到其基因组中的编码所述RNA的重组构建体。特别感兴趣的是其中所述植物为茄科植物(茄科)的实施方案。实例包括选自马铃薯、番茄和茄子的植物。实施方案包括其中所述植物为未发芽的茄科植物种子、处于营养阶段的茄科植物或处于生殖阶段的茄科植物的实施方案。实施方案包括其中所述植物为“种用马铃薯”的实施方案,“种用马铃薯”意指可以繁殖成新的马铃薯植株的马铃薯块茎或马铃薯块茎块。

[0063] 在各个实施方案中,提供所述RNA的食物以适于叶甲属种类摄取的形式,例如,作为固体、液体(包括均匀混合物,如溶液和非均匀混合物如混悬液、胶体、胶粒和乳液)、粉剂、混悬液、乳液、喷雾剂、封装或微囊制剂,在微珠或其它载体微粒中或上,在薄膜或包衣中,或在基质上或内,或作为种子处理剂而提供。提供所述RNA的食物可通过向受叶甲属种类侵扰的植物施用所述食物而提供,例如通过为植物喷洒、扑粉或包衣,或通过施用土壤浇灌剂,或通过人工食物中提供。在一个实施方案中提供重组RNA的食物以被叶甲属种类摄

取的饵料形式提供。提供所述RNA的食物可在为满足特定营养需求以喂养叶甲属种类而配制的人工食物中提供,其中所述人工食物补充了一定量的从单独来源如化学合成获得的或由微生物发酵纯化的RNA;这个实施方案可用于,例如确定有效的多核苷酸处理方案的时间和量。在一些实施方案中提供所述RNA的食物以植物细胞形式或在植物细胞组分中,或在微生物(如细菌或酵母)或微生物发酵产物中,或在合成食物中提供。在一个实施方案中提供所述RNA的食物以被叶甲属种类摄取的饵料形式提供。提供所述RNA的食物可以种子处理的形式,或以“种用马铃薯”块茎或块茎块处理的形式(例如,通过将种用马铃薯浸泡、包衣或扑粉)而提供。正如熟悉杀虫剂和种子处理制剂的人员所知,在所述食物中可包括适合的粘合剂、惰性载体、表面活性剂等。在一些实施方案中,提供所述RNA的食物还包含选自载体剂、表面活性剂、阳离子脂质(如通过引用并入本文的美国专利申请公开2011/0296556的实施例18中公开的阳离子脂质)、有机硅、有机硅表面活性剂、多核苷酸除草分子、非多核苷酸除草分子、非多核苷酸杀虫剂、安全剂和昆虫生长调节剂的一种或多种组分。在一些实施方案中,提供所述RNA的食物还包含选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的至少一种杀虫剂。在一些实施方案中,提供所述RNA的食物包括选自植入植物中的微粒、球粒或胶囊的至少一种可植入制剂;在此类实施方案中所述方法包括在植物中植入可植入制剂。在一些实施方案中,提供所述RNA的食物包括选自粉剂、颗粒、球粒、胶囊、喷雾剂或浇灌剂或适于向犁沟施用的任何其它形式的至少一种沟灌制剂;在此类实施方案中,所述方法包括用沟灌制剂进行沟灌处理。在一些实施方案中,所述方法包括用所述试剂处理茄科植物种子、马铃薯块茎或马铃薯块茎块。

[0064] 预计用于这种方法中的某些RNA(例如,工作实施例中描述的dsRNA触发因子)与一种或多种非多核苷酸杀虫剂的组合在叶甲属种类侵扰的预防或控制方面,与用单独的RNA或单独的非多核苷酸杀虫剂获得的效果相比,将导致协同提高。在一个实施方案中,发现含有一种或多种RNA和选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的一种或多种非多核苷酸杀虫剂的组合物实现了对协同提高的叶甲属种类侵扰的预防或控制。

[0065] 用于这种方法中的RNA可为单链(ss)或双链(ds)。所述方法的实施方案包括其中所述RNA为选自有义单链RNA(ssRNA)、反义单链RNA(ssRNA)或双链RNA(dsRNA)的至少一种的实施方案;可以使用任何这些类型的RNA的混合物。在一个实施方案中使用双链DNA/RNA杂交体。所述RNA可包括除标准核糖核苷酸外的组分,例如,实施方案为包含末端脱氧核糖核苷酸的RNA。

[0066] 所述RNA包含至少一个沉默元件,其中所述沉默元件与叶甲属种类幼虫的靶基因片段基本上相同(作为RNA等效物)或基本上互补,其中所述靶基因序列选自靶基因序列组。在一些实施方案中,所述沉默元件的序列与具有选自靶基因序列组的序列的DNA的等长片段具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同一性或互补性。在一些实施方案中所述沉默元件与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段完全(100%)相同或完全(100%)互补(作为RNA等效物)。在一些实施方案中,含有所述沉默元件的RNA的整体序列与具有选自靶基因序列组的序列的DNA的片段具有约95%、约96%、约

97%、约98%、约99%或约100%同一性或互补性。

[0067] 在一些实施方案中,所述沉默元件包含序列与靶基因的等长片段具有约95%至约100%同一性或互补性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中,所述沉默元件包含序列与具有选自靶基因序列组的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性或互补性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中,所述沉默元件包含至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段,例如介于18-24个之间、或介于18-28个之间、或介于20-30个之间、或介于20-50个之间、或介于20-100个之间、或介于50-100个之间、或介于50-500个之间、或介于100-250个之间、或介于100-500个之间、或介于200-1000个之间、或介于500-2000个之间或甚至更多。在一些实施方案中,所述沉默元件包含超过18个连续核苷酸,例如19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或大于30个,例如约35个、约40个、约45个、约50个、约55个、约60个、约65个、约70个、约75个、约80个、约85个、约90个、约95个、约100个、约110个、约120个、约130个、约140个、约150个、约160个、约170个、约180个、约190个、约200个、约210个、约220个、约230个、约240个、约250个、约260个、约270个、约280个、约290个、约300个、约350个、约400个、约450个、约500个,或大于500个连续核苷酸。在特定实施方案中,所述沉默元件包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有100%同一性的至少一个为至少21个连续核苷酸的片段。在特定实施方案中,所述RNA为双链核酸(例如,dsRNA),一条链包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有100%同一性的至少一个为至少21个连续核苷酸的片段;表示为碱基对,此类双链核酸包含与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段相对应的至少一个为至少21个连续、完美匹配碱基对的片段。在特定实施方案中,所述RNA中所含的每个沉默元件的长度均大于天然存在的小调控RNA典型的长度,例如,每个片段长度为至少约30个连续核苷酸(或碱基对)。在一些实施方案中,所述RNA的总长度或所述RNA中所含的每个沉默元件的长度小于所关注的序列(具有选自靶基因序列组的序列的DNA或靶基因)的总长度。在一些实施方案中,所述RNA的总长度介于约50个至约500个核苷酸(对于单链多核苷酸而言)或碱基对(对于双链多核苷酸而言)。在一些实施方案中,所述RNA为介于约100个至约500个碱基对之间的dsRNA,如表3、5、8、9和10中公开的任何dsRNA触发因子的长度的dsRNA。实施方案包括其中所述RNA为包含具有选自SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的片段的dsRNA,或其中所述RNA由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码的实施方案。

[0068] 用于这种方法中的RNA通常被设计为抑制一个或多个基因(“靶基因”)。术语“基因”是指用于转录物的表达或编码转录物的核酸的任何部分。“基因”可包括但不限于启动子区、5'非翻译区、可包括内含子区的转录物编码区、3'非翻译区或这些区域的组合。在一些实施方案中,靶基因可包括编码或非编码序列或两者。在其它实施方案中,靶基因具有与信使RNA相同或互补的序列,例如,在一些实施方案中靶基因为cDNA。在特定实施方案中,所述RNA被设计为抑制一个或多个靶基因,其中每个靶基因具有选自靶基因序列组的DNA序列。在各个实施方案中,所述RNA被设计为抑制一个或多个基因,其中每个基因具有选自靶基因序列组的序列,并且可被设计为抑制来自于这个组的多个基因,或靶向这些基因中的一个或多个的不同区域。在一个实施方案中,所述RNA包含多个沉默元件,其中每一个均包

含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有100%同一性或100%互补性的至少一个为21个连续核苷酸的片段。在此类情况下,每个沉默元件在大小或序列上可相同或不同,并且相对于靶基因可为有义的或反义的。例如,在一个实施方案中所述RNA可包括呈串联或重复排列的多个沉默元件,其中每个沉默元件包含序列与具有选自靶基因序列组的序列的DNA的等长片段具有100%同一性或100%互补性的至少一个为21个连续核苷酸的片段;所述片段可来自于靶基因的不同区域,例如,所述片段可与靶基因的不同外显子区相对应,并且与靶基因不相对应的“间隔区”核苷酸可任选地用于所述片段之间或附近。

[0069] 所述RNA的总长度可大于18个连续核苷酸,并且可包括除序列与具有选自靶基因序列组的序列的DNA或靶基因的等长片段具有约95%至约100%同一性或互补性的沉默元件外的核苷酸。换言之,所述RNA的总长度可大于被设计为抑制一个或多个靶基因的沉默元件的长度,其中每个靶基因具有选自靶基因序列组的DNA序列。例如,所述RNA可具有侧接抑制靶基因的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的“活性”沉默元件的核苷酸,或包括在活性沉默元件之间的“间隔区”核苷酸,或可在5'末端,或在3'末端,或在5'和3'末端两处具有附加核苷酸。在一个实施方案中,所述RNA包含与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因并非特异性相关(具有不与之互补或相同的序列)的附加核苷酸,例如,提供稳定二级结构或为了方便克隆或生产的核苷酸。在一个实施方案中,所述RNA包含紧邻序列与具有选自靶基因序列组的序列的DNA或靶基因的等长片段具有约95%至约100%同一性或互补性的一个或多个18个或更多个连续核苷酸的沉默元件定位的附加核苷酸。在一个实施方案中,所述RNA包含一个此类沉默元件,具有邻近沉默元件的附加5'G或附加3'C或两者。在另一个实施方案中,所述RNA为包含附加核苷酸以形成突出的双链RNA,例如,包含2个脱氧核糖核苷酸以形成3'突出的dsRNA。因此在各个实施方案中,整个RNA的核苷酸序列与具有选自靶基因序列组的序列的DNA或靶基因中的连续核苷酸片段并非100%相同或互补。例如,在一些实施方案中所述RNA包含序列与具有选自靶基因序列组4或其DNA互补物的序列的DNA的片段具有100%同一性的至少两个各21个连续核苷酸的沉默元件,其中(1)所述至少两个沉默元件被一个或多个间隔区核苷酸分隔开,或(2)所述至少两个沉默元件按不同于具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA中存在的相应片段的顺序排列。

[0070] 在一些实施方案中所述RNA由天然存在的核糖核苷酸组成。在某些实施方案中,所述RNA包含除核糖核苷酸外的组分,例如,主要由核糖核苷酸组成,但是具有一个或多个末端脱氧核糖核苷酸或一个或多个末端双脱氧核糖核苷酸的合成RNA。在某些实施方案中,所述RNA包含非规范核苷酸如次黄嘌呤核苷、硫尿核苷或假尿嘧啶核苷。在某些实施方案中,所述RNA包含经化学修饰的核苷酸。

[0071] 通过本领域人员已知的适合方式提供用于这种方法中的RNA。实施方案包括其中所述RNA经化学合成(例如,通过体外转录,如使用T7聚合酶或其它聚合酶转录),通过在微生物中或在细胞培养物(如培养物中生长的植物或昆虫细胞)中表达而生成,通过在植物细胞中表达而生成,或通过微生物发酵生成的实施方案。

[0072] 在一些实施方案中所述RNA作为分离的RNA提供,所述分离的RNA不是表达构建体的一部分而是缺乏附加元件如启动子或终止子序列。此类RNA可相对较短,如介于约18个至

约300个或介于约50个至约500个核苷酸(对于单链RNA而言)或介于约18个至约300个或介于约50个至约500个碱基对(对于双链RNA而言)的单链或双链RNA。可选地所述RNA可在更复杂的构建体中提供,例如,作为重组表达构建体的一部分,或包括在重组载体中,例如在重组植物病毒载体或重组杆状病毒载体中。在一些实施方案中此类重组表达构建体或载体被设计为包括附加元件,如包括编码适配子或核酶的附加RNA或用于表达所关注的基因(例如,杀虫蛋白)的表达盒。

[0073] 提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物的方法及由此提供的植物、植物部分和种子

[0074] 本发明的另一方面提供了一种提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物的方法,其包括以使得经含有多核苷酸的组合物处理的植物相对于未处理的植物,对叶甲属种类侵扰表现出提高的抗性的方式,向植物局部施用包含至少一种多核苷酸的组合物,所述多核苷酸具有序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的靶基因或DNA的片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一个实施方案中,所述至少一种多核苷酸包含与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段基本上相同的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。所述多核苷酸可以比其所含的片段长,但是每个片段和靶基因的相应片段等长。在一个实施方案中,本发明提供了一种提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物的方法,其包括向植物局部施用包含至少一种多核苷酸的组合物,所述多核苷酸包含与靶基因或由靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补的核苷酸序列,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094。在一个实施方案,本发明提供了一种提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物的方法,其包括以使得有效量的所述多核苷酸被以所述植物为食的叶甲属种类摄取的方式,向所述植物局部施用包含至少一种多核苷酸的组合物,所述多核苷酸包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA互补的至少21个连续核苷酸,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094。在一些实施方案中,本发明提供了一种用于控制植物受叶甲属种类侵扰的方法,其包括以使得有效量的所述多核苷酸被以所述植物为食的叶甲属种类摄取的方式,向所述植物局部施用包含至少一种多核苷酸的组合物,所述多核苷酸包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补的核苷酸序列,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列的:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;其中所述叶甲属种类为马铃薯叶甲;并且其中所述靶基因具有SEQ ID NO:730的序列或其中所述多核苷酸为双链RNA,具有序列选自SEQ ID NO:989、988、1104或1105的链。可对多个靶基因设计用于所述方法中的多核苷酸。实施方案包括其中多核苷酸包含具有选自SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的片段,或其中所述多核苷酸由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码的实施方案。实施方案包括其中所述组合物包含一条链具有选自触发因子序列组的序列的dsRNA的实施方案。本发明的相关方面包括供局部施用的组合物和用于所述方法中的分离的多核苷酸,及通过所述方法提供的具有提高的叶甲属种类抗性的植物。

[0075] 所谓“局部施用”意指向物体的表面或外部,如植物的表面或外部施用,如向植物部分如叶片、茎、花、果实、芽、根、种子、块茎、花、花粉囊或花粉的表面施用,或向整株植物,或向植物的地上或地下部分施用。可对非活体表面实行局部施用,如向土壤,或向叶甲属种类昆虫可由此与多核苷酸接触的表面或基质施用。在所述方法的各个实施方案中,包含至少一种多核苷酸的组合物以适合的形式,例如作为固体、液体(包括均匀混合物,如溶液和非均匀混合物如混悬液、胶体、胶粒和乳液)、粉剂、混悬液、乳液、喷雾剂、封装或微囊制剂,或在微珠或其它载体微粒中或上,在薄膜或包衣中,或在基质上或内,或作为种子处理剂向植物局部施用。在所述方法的一些实施方案中,含多核苷酸的组合物局部施用到植物的地上部分,例如喷洒或扑粉到植物的叶片、茎和开花部分上。所述方法的实施方案包括局部施用叶面喷雾剂(例如,在茄科植物的叶片上喷洒含多核苷酸的液体组合物)或叶面粉尘(例如,为茄科植物扑上呈粉剂形式或在载体微粒上的含多核苷酸的组合物)。在其它实施方案中,例如,借助于土壤浇灌剂,向植物的地下部分,例如向根局部施用含多核苷酸的组合物。在其它实施方案中向长成植物的种子局部施用含多核苷酸的组合物。局部施用可以局部处理茄科植物的果实或来自于茄科植物果实的种子的形式,或以局部处理“种用马铃薯”块茎或块茎块的形式(例如,通过将种用马铃薯浸泡、包衣或扑粉)。正如熟悉杀虫剂和种子处理制剂的人员所知,在含多核苷酸的组合物中可包括适合的粘合剂、惰性载体、表面活性剂等。在一些实施方案中,含多核苷酸的组合物是选自局部植入植物中的微粒、球粒或胶囊的至少一种局部可植入制剂;在此类实施方案中所述方法包括在植物中局部植入所述局部可植入制剂。在一些实施方案中,含多核苷酸的组合物是选自粉剂、颗粒、球粒、胶囊、喷雾剂或浇灌剂或适于向犁沟局部施用的任何其它形式的至少一种沟灌制剂;在此类实施方案中,所述方法包括用沟灌制剂进行沟灌处理。在一个实施方案中含多核苷酸的组合物可被叶甲属种类摄取或以其它方式内部吸收。例如,含多核苷酸的组合物可呈饵料的形式。在一些实施方案中,含多核苷酸的组合物还包含选自载体剂、表面活性剂、阳离子脂质(如通过引用并入本文的美国专利申请公开2011/0296556的实施例18中公开的阳离子脂质)、有机硅、有机硅表面活性剂、多核苷酸除草分子、非多核苷酸除草分子、非多核苷酸杀虫剂、安全剂和昆虫生长调节剂的一种或多种组分。在一个实施方案中所述组合物还包含非离子有机硅表面活性剂如SILWET®牌表面活性剂,例如具有CAS编号27306-78-1和EPA编号:CAL.REG.NO.5905-50073-AA,目前可从Momentive Performance Materials,Albany,New York获得的SILWETL-77®牌表面活性剂。在一些实施方案中,局部施用的组合物还包含选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的至少一种杀虫剂。可选地此类附加组分或杀虫剂可单独提供,例如通过单独局部施用或通过植物中转基因表达。可选地用含多核苷酸的组合物以及单独(之前、之后或同时)施用提高含多核苷酸的组合物功效的物质而局部处理植物。例如,可经第一次局部施用含非离子有机硅表面活性剂如SILWET®牌表面活性剂(例如SILWETL-77®牌表面活性剂)的溶液,接着第二次局部施用含多核苷酸的组合物而喷洒植物,或反之亦然。

[0076] 预计用于含多核苷酸的组合物中的某些多核苷酸(例如,在工作实施例中描述的多核苷酸触发因子)与一种或多种非多核苷酸杀虫剂的组合在叶甲属种类侵扰的预防或控制方面,与用单独的多核苷酸或单独的非多核苷酸杀虫剂获得的效果相比,将导致协同提

高。在一个实施方案中,提供含多核苷酸的组合物作为表达一种或多种多核苷酸和编码选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的非多核苷酸杀虫剂的一个或多个基因的转基因植物,其中发现转基因植物对叶甲属种类侵扰表现出协同提高的抗性。

[0077] 通过本领域人员已知的适合方式提供用于含多核苷酸的组合物中的多核苷酸。实施方案包括其中多核苷酸经化学合成(例如,通过体外转录,如使用T7聚合酶或其它聚合酶转录),通过在微生物中或在细胞培养物(如培养物中生长的植物或昆虫细胞)中表达而生成,通过在植物细胞中表达而生成,或通过微生物发酵生成的实施方案。

[0078] 在许多实施方案中用于含多核苷酸的组合物中的多核苷酸作为分离的DNA或RNA片段而提供。在一些实施方案中用于含多核苷酸的组合物中的多核苷酸不是表达构建体的一部分而是缺乏附加元件如启动子或终止子序列)。此类多核苷酸可相对较短,如介于约18个至约300个或介于约50个至约500个核苷酸(对于单链多核苷酸而言)或介于约18个至约300个或介于约50个至约500个碱基对(对于双链多核苷酸而言)的单链或双链多核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸为介于约100个至约500个碱基对的dsRNA,如表3、5、8、9和10中公开的任何dsRNA触发因子的长度的dsRNA。可选地多核苷酸可在更复杂的构建体中提供,例如,作为重组表达构建体的一部分,或包括在重组载体中,例如在重组植物病毒载体或重组杆状病毒载体中。此类重组表达构建体或载体可被设计为包括附加元件,如用于表达所关注的基因(例如,杀虫蛋白)的表达盒。

[0079] 用于含多核苷酸的组合物中的多核苷酸具有序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一个实施方案中,所述多核苷酸包含与具有选自靶基因序列组的序列的DNA的等长片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中,连续核苷酸的序列与具有选自以下的序列的DNA的片段具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同一性:SEQ ID NO:1-725或SEQ ID NO:726-830或SEQ ID NO:1087-1094或其DNA互补物。在一些实施方案中,所述连续核苷酸与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段完全(100%)相同。在一些实施方案中,所述多核苷酸的整体序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的片段具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同一性。

[0080] 用于含多核苷酸的组合物中的多核苷酸包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中所述多核苷酸包含至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段,例如介于18-24个之间、或介于18-28个之间、或介于20-30个之间、或介于20-50个之间、或介于20-100个之间、或介于50-100个之间、或介于50-500个之间、或介于100-250个之间、或介于100-500个之间、或介于200-1000个之间、或介于500-2000个之间或甚至更多。在一些实施方案中所述片段包含超过18个连续核苷酸,例如19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或大于30个,例如约35个、约40个、约45个、约50个、约55个、约60个、约65个、约70个、约75个、约80个、约85个、约90个、约95个、约100个、约110个、约120个、约130个、约140个、约150个、约160个、约170个、约180个、约190个、约200个、约210个、约220

个、约230个、约240个、约250个、约260个、约270个、约280个、约290个、约300个、约350个、约400个、约450个、约500个,或大于500个连续核苷酸。在特定实施方案中,所述多核苷酸包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有100%同一性的至少一个为至少21个连续核苷酸的片段。在特定实施方案中,所述多核苷酸为双链核酸(例如,dsRNA),一条链包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有100%同一性的至少一个为至少21个连续核苷酸的片段;表示为碱基对,此类双链核酸包含与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段相对应的至少一个为至少21个连续、完美匹配碱基对的片段。在特定实施方案中,所述多核苷酸中所含的每个片段的长度均大于天然存在的小调控RNA典型的长度,例如,每个片段长度为至少约30个连续核苷酸(或碱基对)。在一些实施方案中,所述多核苷酸的总长度或所述多核苷酸中所含的每个片段的长度小于所关注的序列(具有选自靶基因序列组的序列的DNA或靶基因)的总长度。在一些实施方案中,所述多核苷酸的总长度介于约50个至约500个核苷酸(对于单链多核苷酸而言)或碱基对(对于双链多核苷酸而言)之间。在一些实施方案中,所述多核苷酸为介于约100个至约500个碱基对之间的dsRNA,如表3、5、8、9和10中公开的任何dsRNA触发因子的长度的dsRNA。在一些实施方案中,所述多核苷酸为包含具有选自SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的片段的dsRNA,或所述多核苷酸由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码。

[0081] 局部施用的多核苷酸通常被设计为抑制一个或多个基因(“靶基因”)。此类靶基因可包括编码或非编码序列或两者。在特定实施方案中,所述多核苷酸被设计为抑制一个或多个靶基因,其中每个靶基因具有选自靶基因序列组的DNA序列。在各个实施方案中,局部施用的多核苷酸被设计为抑制一个或多个基因,其中每个基因具有选自靶基因序列组的序列,并且可被设计为抑制来自于这个组的多个基因,或靶向这些基因中的一个或多个的不同区域。在一个实施方案中,局部施用的多核苷酸包含多个区段或片段,其中每一个均包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有100%同一性的至少一个为21个连续核苷酸的片段。在此类情况下,每个区段在大小或序列上可相同或不同,并且相对于靶基因可为有义的或反义的。例如,在一个实施方案中局部施用的多核苷酸可包括呈串联或重复排列的多个区段,其中每个区段包含序列与具有选自SEQ ID NO:1-725或SEQ ID NO:726-830或SEQ ID NO:1087-1094或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有100%同一性的至少一个为21个连续核苷酸的片段;所述片段可来自于靶基因的不同区域,例如,所述片段可与靶基因的不同外显子区相对应,并且与靶基因不对应的“间隔区”核苷酸可任选地用于所述片段之间或附近。

[0082] 局部施用的多核苷酸的总长度可大于18个连续核苷酸,并且可包括除序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性的连续核苷酸外的核苷酸。换言之,局部施用的多核苷酸的总长度可大于被设计为抑制一个或多个靶基因的多核苷酸的所述区段或片段的长度,其中每个靶基因具有选自靶基因序列组的DNA序列。例如,局部施用的多核苷酸可具有侧接抑制靶基因的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的“活性”片段的核苷酸,或包括在活性片段之间的“间隔区”核苷酸,或可在5'末端,或在3'末端,或在5'和3'末端两处具有附加核苷酸。在一个实施方案中,局部施用的多核苷酸可包含与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因

并非特异性相关(具有不与之互补或相同的序列)的附加核苷酸,例如,提供稳定二级结构或为了方便克隆或生产的核苷酸。在一个实施方案中,局部施用的多核苷酸包含紧邻序列与具有选自靶基因序列组的序列的DNA或靶基因的等长片段具有约95%至约100%同一性的一个或多个为18个或更多个连续核苷酸的片段定位的附加核苷酸。在一个实施方案中,局部施用的多核苷酸包含一个此类片段,具有邻近所述片段的附加5'G或附加3'C或两者。在另一个实施方案中,局部施用的多核苷酸为包含附加核苷酸以形成突出的双链RNA,例如,包含2个脱氧核糖核苷酸以形成3'突出的dsRNA。因此在各个实施方案中,整个局部施用的多核苷酸的核苷酸序列与具有选自靶基因序列组的序列的DNA或靶基因中的连续核苷酸片段并非100%相同或互补。例如,在一些实施方案中局部施用的多核苷酸包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的片段具有100%同一性的至少两个各21个连续核苷酸的片段,其中(1)所述至少两个片段被一个或多个间隔区核苷酸分隔开,或(2)所述至少两个片段按不同于具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA中存在的相应片段的顺序排列。

[0083] 在一个相关方面,本发明涉及通过这种方法提供的对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物,所述方法包括向植物局部施用包含至少一种多核苷酸的组合物,所述多核苷酸具有序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段,由此经多核苷酸组合物处理的植物相对于未处理的植物,对叶甲属种类侵扰表现出提高的抗性。实施方案为与对照植物相比,对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的茄科植物,其通过向植物或长成植物的种子(或,当所述植物为马铃薯植株时,向长成马铃薯植株的种用马铃薯)局部施用具有选自SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的dsRNA触发因子,或由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码的dsRNA触发因子而提供。再一方面,本发明涉及由通过这种方法提供的对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物产生的种子(尤其是转基因后代种子)。还涵盖由通过这种方法提供的对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物生产的商品和由此类植物的转基因后代种子生产的商品。

[0084] 用于控制叶甲属种类的杀虫组合物

[0085] 本发明的另一方面提供了一种用于控制叶甲属种类的杀虫组合物,其包含杀虫有效量的包含与具有选自靶基因序列组的序列的靶基因或DNA的片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的至少一种RNA。关于这一点,“控制”包括在叶甲属种类(成虫或幼虫)中诱导生理或行为变化,如但不限于生长受阻、死亡率增加、生殖能力降低、摄食行为或运动减少或停止或变态期发育减少或停止。所谓“杀虫有效”意指在叶甲属种类(成虫或幼虫)中诱导生理或行为变化方面有效,如但不限于生长受阻、死亡率增加、生殖能力降低或繁殖力降低、摄食行为或运动减少或停止或变态期发育减少或停止;在一些实施方案中,向植物施用杀虫有效量的RNA提高了植物对叶甲属种类侵扰的抗性。所述RNA可以比其所含的片段长,但是每个片段和靶基因的相应片段等长。可对多个靶基因设计用于所述方法中的RNA。实施方案包括以下的那些:其中杀虫组合物包含杀虫有效量的多核苷酸,所述多核苷酸包含与靶基因或由靶基因转录的RNA互补的至少21个连续核苷酸,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或

杀虫有效量的至少一种多核苷酸,所述多核苷酸包含与靶基因或由靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补的至少一个沉默元件,其中所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或杀虫有效量的至少一种RNA,所述RNA包含与靶基因或由靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸相同或互补的至少一个片段,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或当被所述叶甲属种类摄取或接触时在叶甲属种类中引起死亡或生长受阻的RNA分子,其中所述RNA分子包含与靶基因或由靶基因转录的RNA互补的至少21个连续核苷酸,所述靶基因具有选自以下的核苷酸序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或当被所述叶甲属种类摄取或接触时在叶甲属种类中引起死亡或生长受阻的杀虫双链RNA分子,其中所述杀虫双链RNA分子的至少一条链包含与靶基因或由靶基因转录的RNA互补的21个连续核苷酸,其中所述靶基因具有选自以下的序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或杀虫有效量的包含选自触发因子序列组的序列的至少一种双链RNA。在一些实施方案中,所述多核苷酸为双链RNA。在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如,双链RNA)经化学合成或通过微生物中表达或通过植物细胞中表达而生成。实施方案包括包含具有选自SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的dsRNA的杀虫组合物,或其中所述杀虫组合物包含由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码的多核苷酸或RNA。实施方案包括其中杀虫组合物包含一条链具有选自触发因子序列组的序列的dsRNA的实施方案。在一个实施方案中本发明提供了一种用于控制叶甲属种类的杀虫组合物,其包含杀虫有效量的当被所述叶甲属种类摄取或接触时在叶甲属种类中引起死亡或生长受阻的双链RNA分子,其中所述杀虫双链RNA分子包含一个DNA或由DNA转录的RNA的21个连续核苷酸互补的至少一个片段,所述DNA具有选自以下的序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094,并且其中所述双链RNA分子长度为至少50个碱基对或长度介于约100个至约500个碱基对之间。在一个实施方案中本发明提供了一种用于控制叶甲属种类的杀虫组合物,其包含杀虫有效量的双链RNA分子,其中所述双链RNA分子的至少一条链与编码核糖体蛋白的基因或由所述基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补,其中所述叶甲属种类为马铃薯叶甲,并且其中RNA干扰被诱导并且发生马铃薯叶甲死亡,并且其中所述核糖体蛋白为核糖体L7蛋白或由SEQ ID NO:730编码的蛋白或其中所述双链RNA包含选自SEQ ID NO:989、988、1104或1105的序列。本发明的相关方面包括用于所述组合物中的分离的RNA和通过用所述组合物处理而提供的具有提高的叶甲属种类抗性的植物。

[0086] 在各个实施方案中,用于控制叶甲属种类的杀虫组合物呈选自以下的至少一种形式:固体、液体(包括均匀混合物,如溶液和非均匀混合物如混悬液、胶体、胶粒和乳液)、粉剂、混悬液、乳液、喷雾剂、封装或微囊制剂,在微珠或其它载体微粒中或上,在薄膜或包衣中,或在基质上或内,或作为种子处理剂。正如熟悉杀虫剂和种子处理制剂的人员所知,在含多核苷酸的组合物中可任选地包括适合的粘合剂、惰性载体、表面活性剂等。要控制的叶

甲属种类通常是侵扰植物的种类。在一些实施方案中,所述杀虫组合物为选自植入植物中的微粒、球粒或胶囊的至少一种可植入制剂;在此类实施方案中所述方法包括在植物中植入可植入制剂。在一些实施方案中,所述杀虫组合物为选自粉剂、颗粒、球粒、胶囊、喷雾剂或浇灌剂或适于向犁沟施用的任何其它形式的至少一种沟灌制剂;在此类实施方案中,所述方法包括用沟灌制剂进行沟灌处理。在一个实施方案中所述杀虫组合物可被叶甲属种类摄取或以其它方式内部吸收。例如,所述杀虫组合物可呈饵料的形式。在一些实施方案中,所述杀虫组合物还包含选自载体剂、表面活性剂、阳离子脂质(如通过引用并入本文的美国专利申请公开2011/0296556的实施例18中公开的阳离子脂质)、有机硅、有机硅表面活性剂、多核苷酸除草分子、非多核苷酸除草分子、非多核苷酸杀虫剂、安全剂和昆虫生长调节剂的一种或多种组分。在一个实施方案中所述杀虫组合物还包含非离子有机硅表面活性剂如SILWET®牌表面活性剂,例如具有CAS编号27306-78-1和EPA编号:CAL.REG.NO.5905-50073-AA,目前可从Momentive Performance Materials,Albany,New York获得的SILWET L-77®牌表面活性剂。在一些实施方案中,所述杀虫组合物还包含选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的至少一种杀虫剂。可选地此类附加组分或杀虫剂可单独提供,例如通过单独局部施用或通过植物中转基因表达。可选地用所述杀虫组合物以及单独(之前、之后或同时)施用提高杀虫组合物功效的物质而局部处理植物。例如,可经第一次局部施用含非离子有机硅表面活性剂如SILWET®牌表面活性剂(例如SILWET L-77®牌表面活性剂)的溶液,接着第二次局部施用杀虫组合物而喷洒植物,或反之亦然。

[0087] 预计用于这种方法中的某些RNA(例如,工作实施例中描述的dsRNA触发因子)与一种或多种非多核苷酸杀虫剂的组合在叶甲属种类侵扰的预防或控制方面,与用单独的RNA或单独的非多核苷酸杀虫剂获得的效果相比,将导致协同提高。在一个实施方案中,杀虫组合物含有一种或多种RNA和选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的一种或多种非多核苷酸杀虫剂,并且发现实现了协同提高的对叶甲属种类侵扰的预防或控制。

[0088] 要控制的叶甲属种类通常是侵扰植物的种类。所述植物可为受叶甲属种类侵扰的任何植物。特别感兴趣的是其中所述植物为茄科植物(茄科)的实施方案。实例包括选自马铃薯、番茄和茄子的植物。实施方案包括其中所述植物为未发芽的茄科植物种子、处于营养阶段的茄科植物或处于生殖阶段的茄科植物的实施方案。实施方案包括其中所述植物为“种用马铃薯”的实施方案,“种用马铃薯”意指可以繁殖成新的马铃薯植株的马铃薯块茎或马铃薯块茎块。在一些实施方案中,使用杀虫组合物引起对叶甲属种类的控制,例如,引起生长受阻、死亡率增加、生殖能力降低、摄食行为或运动减少或停止或变态期发育减少或停止。在一些实施方案中,观察到对叶甲属种类的控制,如与未用杀虫组合物处理的植物相比,用杀虫组合物处理的茄科植物生长提高或产量提高。在一些实施方案中,观察到对叶甲属种类的控制,如叶甲属种类的卵、幼虫或成虫数量减少,落叶或对植物的其它损伤减少,或可收获的果实(例如,番茄或茄子)或块茎(例如,马铃薯)的产量增加。

[0089] 在各个实施方案中,所述杀虫组合物包含微生物细胞或在微生物中生成。例如,所

述杀虫组合物可包括细菌或酵母细胞或可在细菌或酵母细胞中生成。在类似实施方案中,所述杀虫组合物包含转基因植物细胞或在植物细胞(例如瞬时表达多核苷酸的植物细胞)中生成;此类植物细胞可以是植物中的细胞或在组织培养物或细胞悬浮液中生长的细胞。

[0090] 可通过向受叶甲属种类侵扰的植物或表面施用所述组合物,例如通过为植物或植物种子或种用马铃薯喷洒、扑粉或包衣,或通过施用土壤浇灌剂或沟灌处理剂,或通过人工食物中提供,提供杀虫组合物组合物,供叶甲属种类食物摄入。可在为满足特定营养需求以喂养叶甲属种类而配制的人工食物中提供杀虫组合物,供叶甲属种类食物摄入,其中所述人工食物补充了一定量的从单独来源如化学合成获得的或由微生物发酵纯化的RNA;这个实施方案可用于,例如确定有效的RNA处理方案的时间和量。在一些实施方案中杀虫组合物以植物细胞形式或在植物细胞组分中,或在微生物(如细菌或酵母)或微生物发酵产物中,或在合成食物中提供,供叶甲属种类食物摄入。在一个实施方案中杀虫组合物以被叶甲属种类摄取的饵料形式提供。所述杀虫组合物可以种子(或种用马铃薯)处理剂的形式提供,供叶甲属种类食物摄入。

[0091] 在一个实施方案中杀虫组合物可以受叶甲属种类侵扰的任何植物的形式提供,其中在植物中或上含有所述RNA。此类植物可以是表达所述RNA的稳定转基因植物,或瞬时表达所述RNA或已经用所述RNA(例如,通过喷洒或包衣)处理的非转基因植物。稳定转基因植物通常含有整合到其基因组中的编码所述RNA的重组构建体。特别感兴趣的是其中所述植物为茄科植物(茄科)的实施方案。实例包括选自马铃薯、番茄和茄子的植物。实施方案包括其中所述植物为未发芽的茄科植物种子、处于营养阶段的茄科植物或处于生殖阶段的茄科植物的实施方案。实施方案包括其中所述植物为“种用马铃薯”的实施方案,“种用马铃薯”意指可以繁殖成新的马铃薯植株的马铃薯块茎或马铃薯块茎块。

[0092] 用于杀虫组合物中的RNA可为单链(ss)或双链(ds)。实施方案包括其中所述RNA为选自有义单链RNA(ssRNA)、反义单链RNA(ssRNA)或双链RNA(dsRNA)的至少一种的实施方案;可以使用任何这些类型的RNA的混合物。在一个实施方案中使用双链DNA/RNA杂交体。所述RNA可包括除标准核糖核苷酸外的组分,例如,实施方案为包含末端脱氧核糖核苷酸的RNA。

[0093] 杀虫组合物中的RNA具有序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的靶基因或DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一个实施方案中所述RNA包含与具有选自靶基因序列组的序列的DNA的等长片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中,所述连续核苷酸的序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的片段具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同一性。在一些实施方案中,所述连续核苷酸与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段完全(100%)相同。在一些实施方案中,所述RNA的整体序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的片段具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同一性。

[0094] 杀虫组合物中的RNA包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中,所述RNA包含至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段,例如介于18-24个之间、或介于18-28个之间、或介于20-30个之间、或介于20-50个之间、或介于20-

100个之间、或介于50-100个之间、或介于50-500个之间、或介于100-250个之间、或介于100-500个之间、或介于200-1000个之间、或介于500-2000个之间或甚至更多。在一些实施方案中,所述片段包含超过18个连续核苷酸,例如19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或大于30个,例如约35个、约40个、约45个、约50个、约55个、约60个、约65个、约70个、约75个、约80个、约85个、约90个、约95个、约100个、约110个、约120个、约130个、约140个、约150个、约160个、约170个、约180个、约190个、约200个、约210个、约220个、约230个、约240个、约250个、约260个、约270个、约280个、约290个、约300个、约350个、约400个、约450个、约500个,或大于500个连续核苷酸。在特定实施方案中,所述RNA包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有100%同一性的至少一个为至少21个连续核苷酸的片段。在特定实施方案中,所述RNA为双链核酸(例如,dsRNA),一条链包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有100%同一性的至少一个为至少21个连续核苷酸的片段;表示为碱基对,此类双链核酸包含与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段相对应的至少一个为至少21个连续、完美匹配碱基对的片段。在特定实施方案中,所述RNA中所含的每个片段的长度均大于天然存在的小调控RNA典型的长度,例如,每个片段长度为至少约30个连续核苷酸(或碱基对)。在一些实施方案中,所述RNA的总长度或所述RNA中所含的每个片段的长度小于所关注的序列(具有选自靶基因序列组的序列的DNA或靶基因)的总长度。在一些实施方案中,所述RNA的总长度介于约50个至约500个核苷酸(对于单链多RNA而言)或碱基对(对于双链RNA而言)。在一些实施方案中,所述RNA包含长度介于约50个至约500个核苷酸之间的至少一条RNA链。实施方案包括其中所述RNA包含具有选自:SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的至少一个片段,或其中所述RNA由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码的实施方案。

[0095] 杀虫组合物中的RNA通常被设计为抑制一个或多个基因(“靶基因”)。此类靶基因可包括编码或非编码序列或两者。在特定实施方案中,所述RNA被设计为抑制一个或多个靶基因,其中每个靶基因具有选自靶基因序列组的DNA序列。在各个实施方案中,所述RNA被设计为抑制一个或多个基因,其中每个基因具有选自靶基因序列组的序列,并且可被设计为抑制来自于这个组的多个基因,或靶向这些基因中的一个或多个的不同区域。在一个实施方案中,所述RNA包含多个区段或片段,其中每一个均包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有100%同一性的至少一个为21个连续核苷酸的片段。在此类情况下,每个区段在大小或序列上可相同或不同,并且相对于靶基因可为有义的或反义的。例如,在一个实施方案中所述RNA可包括呈串联或重复排列的多个区段,其中每个区段包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有100%同一性的至少一个为21个连续核苷酸的片段;所述片段可来自于靶基因的不同区域,例如,所述片段可与靶基因的不同外显子区相对应,并且与靶基因不相对应的“间隔区”核苷酸可任选地用于所述片段之间或附近。

[0096] 杀虫组合物中的RNA的总长度可大于18个连续核苷酸,并且可包括除序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性的连续核苷酸外的核苷酸。换言之,所述RNA的总长度可大于被设计为抑制一个或多个靶基因的RNA的所述区段或片段的长度,其中每个靶基因具有选自靶基因序列组的DNA序列。例如,

所述RNA可具有侧接抑制靶基因的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的“活性”片段的核苷酸,或包括在活性片段之间的“间隔区”核苷酸,或可在5'末端,或在3'末端,或在5'和3'末端两处具有附加核苷酸。在一个实施方案中,所述RNA包含与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因并非特异性相关(具有不与之互补或相同的序列)的附加核苷酸,例如,提供稳定二级结构或为了方便克隆或生产的核苷酸。在一个实施方案中,所述RNA包含紧邻序列与具有选自靶基因序列组的序列的DNA或靶基因的等长片段具有约95%至约100%同一性或互补性的一个或多个为18个或更多个连续核苷酸的片段定位的附加核苷酸。在一个实施方案中,所述RNA包含一个此类片段,具有邻近所述片段的附加5'G或附加3'C或两者。在另一个实施方案中,所述RNA为包含附加核苷酸以形成突出的双链RNA,例如,包含2个脱氧核糖核苷酸以形成3'突出的dsRNA。因此在各个实施方案中,整个RNA的核苷酸序列与具有选自靶基因序列组的序列的DNA或靶基因中的连续核苷酸片段并非100%相同或互补。例如,在一些实施方案中所述RNA包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的片段具有100%同一性的至少两个各21个连续核苷酸的片段,其中(1)所述至少两个片段被一个或多个间隔区核苷酸分隔开,或(2)所述至少两个片段按不同于具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA中存在的相应片段的顺序排列。

[0097] 在各个实施方案中杀虫组合物中的RNA由天然存在的核糖核苷酸组成。实施方案包括,例如完全由核糖核苷酸或主要由核糖核苷酸组成,但是具有一个或多个末端脱氧核糖核苷酸或一个或多个末端双脱氧核糖核苷酸的合成RNA。在某些实施方案中,所述RNA包含非规范核苷酸如次黄嘌呤核苷、硫尿核苷或假尿嘧啶核苷。在某些实施方案中,所述RNA包含经化学修饰的核苷酸。(a)通过本领域人员已知的适合方式提供杀虫组合物中的RNA。实施方案包括其中所述RNA经化学合成(例如,通过体外转录,如使用T7聚合酶或其它聚合酶转录),通过在微生物中或在细胞培养物(如培养物中生长的植物或昆虫细胞)中表达而生成,通过在植物细胞中表达而生成,或通过微生物发酵生成的实施方案。

[0098] 在一些实施方案中所述RNA作为并非表达构建体的一部分的分离的RNA而提供。在一些实施方案中所述RNA作为缺乏附加元件如启动子或终止子序列的分离的RNA而提供。此类RNA可相对较短,如介于约18个至约300个或介于约50个至约500个核苷酸(对于单链RNA而言)或介于约18个至约300个或介于约50个至约500个碱基对(对于双链RNA而言)的单链或双链RNA。可选地所述RNA可在更复杂的构建体中提供,例如,作为重组表达构建体的一部分,或包括在重组载体中,例如在重组植物病毒载体或重组杆状病毒载体中。在一些实施方案中此类重组表达构建体或载体被设计为包括附加元件,如包括编码适配子或核酶的附加RNA或用于表达所关注的基因(例如,杀虫蛋白)的表达盒。

[0099] 提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物的方法及由此提供的植物和种子

[0100] 本发明的另一方面涉及提供一种提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物的方法,其包括在植物中表达至少一种多核苷酸,所述多核苷酸包含与具有选自靶基因序列组的序列的靶基因或DNA的片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段,由此所得植物在与其中未表达所述多核苷酸的对照植物相比时,对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性。在一个实施方案中,所述方法包括在植物中表达至少一种多核苷酸,所述多核苷酸包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的靶基因或DNA的

等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一个实施方案中,本发明提供了一种提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物的方法,其包括在植物中表达至少一种多核苷酸,所述多核苷酸包含与具有选自以下的序列的DNA的至少21个连续核苷酸相同或互补的至少一个片段:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094。所谓“在植物中表达一种多核苷酸”通常意指“在植物中表达RNA转录物”,例如,在植物中表达包含与具有选自靶基因序列组的序列的靶基因或DNA的至少一个片段反义或基本上互补的核糖核苷酸序列的RNA。实施方案包括其中在植物中表达的多核苷酸为包含具有选自SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的至少一个片段的RNA,或其中在植物中表达的多核苷酸为由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码的RNA发夹的实施方案。实施方案包括其中在植物中表达的多核苷酸包含一条链具有选自触发因子序列组的序列的dsRNA的实施方案。然而,在植物中表达的多核苷酸也可作为DNA(例如,植物中在基因组复制期间生成的DNA)或由此DNA编码的RNA。本发明的相关方面包括用于所述方法中的分离的多核苷酸和通过所述方法提供的具有提高的叶甲属种类抗性的植物。

[0101] 所述方法包括在植物中表达至少一种多核苷酸,其中所述多核苷酸包含与具有选自靶基因序列组的序列的靶基因或DNA的片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中,第一多核苷酸以DNA形式(例如,以分离的DNA分子的形式,或作为表达构建体,或作为转化载体)向植物提供,并且在植物中表达的多核苷酸为植物中的第二多核苷酸(例如,第一多核苷酸的RNA转录物)。在一个实施方案中,多核苷酸在植物中通过转基因表达而表达,即通过将多核苷酸稳定地整合到植物基因组中,从这里其可以在植物的一个细胞或多个细胞中表达。在一个实施方案中,将第一多核苷酸(例如,包含启动子的重组DNA构建体,启动子与包含与具有选自靶基因序列组的序列的靶基因或DNA的片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的DNA可操作地连接)稳定地整合到植物基因组中,从这里二次生成的多核苷酸(例如,RNA转录物,包含与具有选自靶基因序列组的序列的靶基因或DNA的片段基本上相同或互补的为18个或更多个连续核苷酸的片段的转录物)在植物的一个细胞或多个细胞中表达。在标题为“制备和使用转基因植物细胞和转基因植物”的部分提供了提供经稳定转化的植物的方法。

[0102] 在另一个实施方案中植物中表达的多核苷酸通过瞬时表达而表达(即,并非由序列稳定整合到植物基因组中而引起的表达)。在此类实施方案中所述方法可包括通过本领域已知的常规技术将多核苷酸(例如,dsRNA或dsDNA)引入植物中的步骤。例如,可通过使用无针注射器使多核苷酸溶液渗入植物叶片中实现瞬时表达。

[0103] 在植物中表达的多核苷酸通过瞬时表达而表达的一些实施方案中,第一多核苷酸以RNA或DNA或RNA和DNA两种形式向植物提供,并且二次生成的第二多核苷酸在植物中瞬时表达。在一些实施方案中,第一多核苷酸为选自以下的一种或多种:(a)单链RNA分子(ssRNA),(b)自我杂交以形成双链RNA分子的单链RNA分子,(c)双链RNA分子(dsRNA),(d)单链DNA分子(ssDNA),(e)自我杂交以形成双链DNA分子的单链DNA分子,(f)包含转录为RNA分子的经修饰Pol III基因的单链DNA分子,(g)双链DNA分子(dsDNA),(h)包含转录为RNA分子的经修饰Pol III基因的双链DNA分子,和(i)双链、杂交RNA/DNA分子或其组合。在特定实施

方案中,通过以适合的形式,例如作为固体、液体(包括均匀混合物,如溶液和非均匀混合物如混悬液、胶体、胶粒和乳液)、粉剂、混悬液、乳液、喷雾剂、封装或微囊制剂,在微珠或其它载体微粒中或上,在薄膜或包衣中,或在基质上或内,或以茄科植物种子处理剂或种用马铃薯处理剂的形式,向植物局部施用含多核苷酸的组合物,将第一多核苷酸引入植物中。正如熟悉杀虫剂和种子处理制剂的人员所知,在所述组合物中可任选地包括适合的粘合剂、惰性载体、表面活性剂等。在此类实施方案中,含多核苷酸的组合物还可包含选自载体剂、表面活性剂、阳离子脂质(如通过引用并入本文的美国专利申请公开2011/0296556的实施例18中公开的阳离子脂质)、有机硅、有机硅表面活性剂、多核苷酸除草分子、非多核苷酸除草分子、非多核苷酸杀虫剂、安全剂和昆虫生长调节剂的一种或多种组分;在一个实施方案中所述组合物还包含非离子有机硅表面活性剂如SILWET®牌表面活性剂,例如具有CAS编号27306-78-1和EPA编号:CAL.REG.NO.5905-50073-AA,目前可从Momentive Performance Materials,Albany,New York获得的SILWETL-77®牌表面活性剂。在一些实施方案中,局部施用的组合物还包含选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的至少一种杀虫剂。可选地此类附加组分或杀虫剂可单独提供,例如通过单独局部施用或通过植物中转基因表达。可选地用含多核苷酸的组合物以及单独(之前、之后或同时)施用提高含多核苷酸的组合物功效的物质而局部处理植物。例如,可经第一次局部施用含非离子有机硅表面活性剂如SILWET®牌表面活性剂(例如SILWETL-77®牌表面活性剂)的溶液,接着第二次局部施用含多核苷酸的组合物而喷洒植物,或反之亦然。

[0104] 预计用于这种方法中的某些多核苷酸(例如,在工作实施例中描述的多核苷酸触发因子)与一种或多种非多核苷酸杀虫剂的组合在叶甲属种类侵扰的预防或控制方面,与用单独的多核苷酸或单独的非多核苷酸杀虫剂获得的效果相比,将导致协同提高。在一个实施方案中,发现表达包含与具有选自靶基因序列组的序列的靶基因或DNA的片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的至少一种多核苷酸(例如,在工作实施例中描述的多核苷酸触发因子)和编码选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的非多核苷酸杀虫剂的一个或多个基因的转基因植物对叶甲属种类侵扰表现出协同提高的抗性。

[0105] 在植物中表达的多核苷酸通过瞬时表达而表达的一些实施方案中,第一多核苷酸以RNA或DNA或RNA和DNA两种形式向植物提供,并且二次生成的第二多核苷酸在植物中瞬时表达;第一多核苷酸的施用部位无需为第二多核苷酸瞬时表达的相同部位。例如,可通过向叶片局部施用,或通过注入茎中向植物提供第一多核苷酸,并且第二多核苷酸在植物其它地方,例如在根或整株植物中瞬时表达。在所述方法的一些实施方案中,包含至少一种多核苷酸的组合物局部施用到植物的地上部分,例如喷洒或扑粉到植物的叶片、茎和开花部分上。在其它实施方案中,例如,借助于土壤浇灌剂,向植物的地下部分,例如向根局部施用含至少一种多核苷酸的组合物。在其它实施方案中,向种子局部施用(或,在为马铃薯的情况下,向种用马铃薯局部施用)含至少一种多核苷酸的组合物,种子长成对叶甲属种类侵扰具有提高抗性的植物。在一些实施方案中在植物中表达的多核苷酸为RNA,其可为单链(ss)或双链(ds)RNA或两者的组合。

[0106] 在一些实施方案中向植物提供第一多核苷酸(DNA或RNA或两者)并且随后在植物中表达具有与第一多核苷酸相对应(相同或互补)的序列的第二多核苷酸。在此类实施方案中在植物中表达的多核苷酸为RNA转录物,其可为ssRNA或dsRNA或两者的组合。在多核苷酸通过瞬时表达而表达的一些实施方案中,第一多核苷酸以RNA或DNA或RNA和DNA两种形式向植物提供,并且二次生成的第二多核苷酸在植物中瞬时表达;在此类实施方案中,第一多核苷酸为选自以下的一种或多种:(a)单链RNA分子(ssRNA),(b)自我杂交以形成双链RNA分子的单链RNA分子,(c)双链RNA分子(dsRNA),(d)单链DNA分子(ssDNA),(e)自我杂交以形成双链DNA分子的单链DNA分子,(f)包含转录为RNA分子的经修饰Pol III基因的单链DNA分子,(g)双链DNA分子(dsDNA),(h)包含转录为RNA分子的经修饰Pol III基因的双链DNA分子,和(i)双链、杂交RNA/DNA分子或其组合。在多核苷酸通过瞬时表达而表达的此类实施方案中,第一多核苷酸可由天然存在的核苷酸,如DNA和RNA中存在的核苷酸组成。在多核苷酸通过瞬时表达而表达的此类实施方案中,第一多核苷酸可经化学修饰,或包含经化学修饰的核苷酸。通过本领域人员已知的适合方式提供第一多核苷酸。实施方案包括其中第一多核苷酸经化学合成(例如,通过体外转录,如使用T7聚合酶或其它聚合酶转录),通过在微生物中或在细胞培养物(如培养物中生长的植物或昆虫细胞)中表达而生成,通过在植物细胞中表达而生成,或通过微生物发酵生成的实施方案。第一多核苷酸可作为RNA或DNA片段提供。可选地第一多核苷酸可在更复杂的构建体中提供,例如,作为重组表达构建体的一部分,或包括在重组载体中,例如在重组植物病毒载体或重组杆状病毒载体中;此类重组表达构建体或载体可被设计为包括附加元件,如用于表达所关注的基因(例如,杀虫蛋白)的表达盒。

[0107] 在一些实施方案中在植物中表达的多核苷酸为RNA分子并且可相对较短,如介于约18个至约300个或介于约50个至约500个核苷酸(对于单链RNA而言)或介于约18个至约300个或介于约50个至约500个碱基对(对于双链RNA而言)的单链或双链RNA。可选地所述多核苷酸可在更复杂的构建体中提供,例如,作为重组表达构建体的一部分,或包括在重组载体中,例如在重组植物病毒载体或重组杆状病毒载体中。在一些实施方案中此类重组表达构建体或载体被设计为包括附加元件,如用于表达所关注的基因(例如,杀虫蛋白)的表达盒。

[0108] 在植物中表达的多核苷酸具有序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一个实施方案中在植物中表达的多核苷酸包含与具有选自靶基因序列组的序列的DNA的等长片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中,连续核苷酸的序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的片段具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同一性。在一些实施方案中,所述连续核苷酸与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段完全(100%)相同。在一些实施方案中,在植物中表达的多核苷酸的整体序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的片段具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同一性。

[0109] 在植物中表达的多核苷酸通常被设计为抑制一个或多个基因(“靶基因”)。此类靶基因可包括编码或非编码序列或两者。在特定实施方案中,在植物中表达的多核苷酸被设计为抑制一个或多个靶基因,其中每个靶基因具有选自靶基因序列组的DNA序列。在各个实

实施方案中,在植物中表达的多核苷酸被设计为抑制一个或多个基因,其中每个基因具有选自靶基因序列组的序列,并且可被设计为抑制来自于这个组的多个基因,或靶向这些基因中的一个或多个的不同区域。在一个实施方案中,在植物中表达的多核苷酸包含多个区段或片段,其中每一个均包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有100%同一性的至少一个为21个连续核苷酸的片段。在此类情况下,每个区段在大小或序列上可相同或不同,并且相对于靶基因可为有义的或反义的。例如,在一个实施方案中在植物中表达的多核苷酸可包括呈串联或重复排列的多个区段,其中每个区段包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有100%同一性的至少一个为21个连续核苷酸的片段;所述片段可来自于靶基因的不同区域,例如,所述片段可与靶基因的不同外显子区相对应,并且与靶基因不相对应的“间隔区”核苷酸可任选地用于所述片段之间或附近。

[0110] 在植物中表达的多核苷酸的总长度可大于18个连续核苷酸,并且可包括除序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性的连续核苷酸外的核苷酸。换言之,在植物中表达的多核苷酸的总长度可大于被设计为抑制一个或多个靶基因的多核苷酸的所述区段或片段的长度,其中每个靶基因具有选自靶基因序列组的DNA序列。例如,在植物中表达的多核苷酸可具有侧接抑制靶基因的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的“活性”片段的核苷酸,或包括在活性片段之间的“间隔区”核苷酸,或可在5'末端,或在3'末端,或在5'和3'末端两处具有附加核苷酸。在一个实施方案中,在植物中表达的多核苷酸包含与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因并非特异性相关(即,具有不与之互补或相同的序列)的附加核苷酸,例如,提供稳定二级结构或为了方便克隆或生产的核苷酸。在一个实施方案中,在植物中表达的多核苷酸包含紧邻序列与具有选自靶基因序列组的序列的DNA或靶基因的等长片段具有约95%至约100%同一性或互补性的一个或多个为18个或更多个连续核苷酸的片段定位的附加核苷酸。在一个实施方案中,在植物中表达的多核苷酸包含一个此类片段,具有邻近所述片段的附加5'G或附加3'C或两者。在另一个实施方案中,在植物中表达的多核苷酸为包含附加核苷酸以形成突出的双链RNA,例如,包含2个脱氧核糖核苷酸以形成3'突出的dsRNA。因此在各个实施方案中,在植物中表达的整个多核苷酸的核苷酸序列与具有选自靶基因序列组的序列的DNA或靶基因中的连续核苷酸片段并非100%相同或互补。例如,在一些实施方案中在植物中表达的多核苷酸包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的片段具有100%同一性的至少两个各21个连续核苷酸的片段,其中(1)所述至少两个片段被一个或多个间隔区核苷酸分隔开,或(2)所述至少两个片段按不同于具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA中存在的相应片段的顺序排列。

[0111] 在一个相关方面,本发明涉及通过在植物中表达至少一种多核苷酸而提供的对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物,所述多核苷酸包含与具有选自靶基因序列组的序列的DNA的等长片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段,由此所得植物在与其中未表达所述多核苷酸的对照植物相比时,对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性。在一个相关方面,本发明涉及通过在植物中表达至少一种多核苷酸而提供的对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物,所述多核苷酸包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多

个连续核苷酸的片段,由此所得植物在与其中未表达所述多核苷酸的对照植物相比时,对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性。实施方案为在与对照植物相比时,对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的茄科植物,其通过在植物中表达具有选自SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的RNA,或在植物中表达由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码的RNA发夹而提供。再一方面,本发明涉及由通过这种方法提供的对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物产生的种子(尤其是转基因后代种子)。还涵盖由通过这种方法提供的对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物生产的商品和由此类植物的转基因后代种子生产的商品。

[0112] 用于控制叶甲属种类的重组DNA构建体

[0113] 本发明的另一方面提供了一种重组DNA构建体,其包含与DNA元件可操作地连接的异源启动子,所述DNA元件包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中,重组DNA构建体包含与以下可操作地连接的异源启动子:(a)包含与靶基因或由所述靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补的核苷酸序列的DNA,所述靶基因具有选自以下的序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或(b)包含与具有选自以下的序列的DNA的等长片段具有100%同一性的21个或更多个连续核苷酸的DNA:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094或其DNA互补物;或(c)编码与靶基因或由所述靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补的至少一个沉默元件的DNA,其中所述靶基因具有选自以下的序列:SEQ ID NO:730、SEQ ID NO:807、SEQ ID NO:1-725、SEQ ID NO:726-729、SEQ ID NO:731-806、SEQ ID NO:808-830和SEQ ID NO:1087-1094;或(d)编码包含与选自靶基因序列组中的基因的靶基因或由所述靶基因转录的RNA互补的至少21个连续核苷酸的至少一个沉默元件的DNA;或(e)编码包含与选自触发因子序列组或其互补物的核苷酸序列,或来自于叶甲属种类或拟谷盗属种类(*Tribolium species*)的直系同源核苷酸序列互补的至少21个连续核苷酸的RNA的DNA,其中直系同源核苷酸序列与选自触发因子序列组的核苷酸序列具有至少95%序列同一性,其中在相同长度上计算序列同一性百分比;或(f)编码包含至少一个双链RNA区的RNA的DNA,双链RNA区的至少一条链包含与选自触发因子序列组或其互补物的核苷酸序列,或来自于叶甲属种类或拟谷盗属种类的直系同源核苷酸序列互补的至少21个连续核苷酸,其中直系同源核苷酸序列与选自触发因子序列组的核苷酸序列具有至少95%序列同一性,其中在相同长度上计算序列同一性百分比;或(g)编码包含选自触发因子序列组或其互补物的核苷酸序列的RNA的DNA。实施方案包括一种重组DNA构建体,其包含与编码具有选自:SEQ ID NO:831-1085,1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的RNA的DNA元件可操作地连接的异源启动子,或包含与编码由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码的RNA发夹的DNA元件可操作地连接的异源启动子。实施方案包括一种重组DNA构建体,其包含与编码一条链具有选自触发因子序列组的序列的dsRNA的DNA可操作地连接的异源启动子。所述重组DNA构建体用于提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物,例如,通过在植物中表达此类重组DNA构建体的转录物。所述重组DNA构建体还用于生产用于制备可向植物、种子、可繁殖植物部分、土壤或田间或需要保护免受叶甲属种类侵扰的

表面施用的组合物的多核苷酸。本发明的相关方面包括：包含重组DNA构建体的组合物；包含重组DNA构建体的植物染色体或质体或重组植物病毒载体或重组杆状病毒载体；在其基因组中具有重组DNA构建体，任选地在其基因组中包含编码选自以下的至少一种杀虫剂的DNA的转基因茄科植物细胞：马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白，及转基因茄科植物，包括此类转基因茄科植物细胞或转基因茄科植物的果实、种子或可繁殖部分；和通过重组DNA构建体或其中编码的RNA的表达或处理而提供的具有提高的叶甲属种类抗性的植物。

[0114] 重组DNA构建体包含与DNA可操作地连接的异源启动子，所述DNA包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中，为18个或更多个连续核苷酸的片段的序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的片段具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同一性。在一些实施方案中，所述连续核苷酸与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段完全(100%)相同。在一些实施方案中，所述DNA的整体序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同一性。

[0115] 因此重组DNA构建体包含与DNA可操作地连接的异源启动子，所述DNA包含被设计为抑制具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的靶基因表达的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中所述DNA包含至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段，例如，介于18-24个之间、或介于18-28个之间、或介于20-30个之间、或介于20-50个之间、或介于20-100个之间、或介于50-100个之间、或介于50-500个之间、或介于100-250个之间、或介于100-500个之间、或介于200-1000个之间、或介于500-2000个之间或甚至更多。在一些实施方案中，所述片段包含超过18个连续核苷酸，例如19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或大于30个，例如约35个、约40个、约45个、约50个、约55个、约60个、约65个、约70个、约75个、约80个、约85个、约90个、约95个、约100个、约110个、约120个、约130个、约140个、约150个、约160个、约170个、约180个、约190个、约200个、约210个、约220个、约230个、约240个、约250个、约260个、约270个、约280个、约290个、约300个、约350个、约400个、约450个、约500个，或大于500个连续核苷酸。在特定实施方案中，所述DNA编码含有序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有100%同一性的至少一个为至少21个连续核苷酸的片段的RNA。在特定实施方案中，所述DNA编码双链核酸(例如，dsRNA)，一条链包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有100%同一性的至少一个为至少21个连续核苷酸的片段；表示为碱基对，此类双链核酸包含与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段相对应的至少一个为至少21个连续、完美匹配碱基对的片段。在特定实施方案中，所述DNA中所含的每个片段的长度均大于天然存在的小调控RNA典型的长度。在一些实施方案中，每个片段长度为至少约30个连续核苷酸(或碱基对)。在一些实施方案中，所述DNA的总长度或多核苷酸中所含的每个片段的长度小于所关注的序列(具有选自靶基因序列组的序列的DNA或靶基因)的总长度。在一些实施方案中，所述DNA的总长度介于约50个至约500个之间。在一些实施方案中，所述DNA编码具有选自：SEQ ID NO:831-1085、1095-

1104和1110-1114或其互补物的序列的RNA。在一些实施方案中,重组DNA构建体包含选自SEQ ID NO:1105-1109的序列。

[0116] 重组DNA构建体包含与通常被设计为抑制一个或多个基因(“靶基因”)的DNA可操作地连接的异源启动子。此类靶基因可包括编码或非编码序列或两者。在特定实施方案中,重组DNA构建体被设计为抑制一个或多个靶基因,其中每个靶基因具有选自靶基因序列组的DNA序列。在各个实施方案中,重组DNA构建体被设计为抑制一个或多个基因,其中每个基因具有选自靶基因序列组的序列,并且可被设计为抑制来自于这个组的多个基因,或靶向这些靶基因中的一个或多个的不同区域。在一个实施方案中,重组DNA构建体包含与多个区段或片段可操作地连接的异源启动子,所述区段或片段中的每一个包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有100%同一性的至少一个为21个连续核苷酸的片段。在此类情况下,每个区段在大小或序列上可相同或不同,并且相对于靶基因可为有义的或反义的。例如,在一个实施方案中重组DNA构建体可包括与呈串联或重复排列的多个区段可操作地连接的异源启动子,其中每个区段包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有100%同一性的至少一个为21个连续核苷酸的片段;所述片段可来自于靶基因的不同区域,例如,所述片段可与靶基因的不同外显子区相对应,并且与靶基因不相对应的“间隔区”核苷酸可任选地用于所述片段之间或附近。

[0117] 重组DNA构建体包含与DNA可操作地连接的异源启动子,所述DNA总长度可大于18个连续核苷酸,并且可包括除序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的所述片段外的核苷酸。换言之,所述DNA的总长度可大于被设计为抑制一个或多个靶基因的所述DNA片段的长度,其中每个靶基因具有选自靶基因序列组的DNA序列。例如,所述DNA可具有侧接抑制靶基因的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的“活性”片段的核苷酸,或包括在活性片段之间的“间隔区”核苷酸,或可在5'末端,或在3'末端,或在5'和3'末端两处具有附加核苷酸。在一个实施方案中,异源启动子可与包含附加核苷酸的DNA可操作地连接,所述附加核苷酸与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因并非特异性相关(具有不与之互补或相同的序列),例如,提供稳定二级结构或为了方便克隆或生产的核苷酸。在一个实施方案中,异源启动子可与包含附加核苷酸的DNA可操作地连接,所述附加核苷酸紧邻序列与具有选自靶基因序列组的序列的DNA或靶基因的等长片段具有约95%至约100%同一性或互补性的一个或多个为18个或更多个连续核苷酸的片段定位。在一个实施方案中,异源启动子可与包含一个此类片段的DNA可操作地连接,所述片段具有邻近该片段的附加5'G或附加3'C或两者。在另一个实施方案中,异源启动子可与编码包含附加核苷酸以形成突出的双链RNA的DNA可操作地连接。因此在各个实施方案中,与异源启动子可操作地连接的整个DNA的核苷酸序列与具有选自靶基因序列组的序列的DNA或靶基因中的连续核苷酸片段并非100%相同或互补。例如,在一些实施方案中异源启动子与包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的片段具有100%同一性的至少两个各21个连续核苷酸的片段的DNA可操作地连接,其中(1)所述至少两个片段被一个或多个间隔区核苷酸分隔开,或(2)所述至少两个片段按不同于具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA中存在的相应片段的顺序排列。

[0118] 在重组DNA构建体中,异源启动子与编码可为单链(ss)或双链(ds)或两者的组合

的转录物的DNA可操作地连接。所述方法的实施方案包括其中所述DNA编码包含有义单链RNA(ssRNA)、反义ssRNA或双链RNA(dsRNA)或这些中任一种的组的转录物的实施方案。

[0119] 通过本领域人员已知的适合方式提供重组DNA构建体。实施方案包括其中重组DNA构建体在体外合成,通过在微生物或在细胞培养物(如培养物中生长的植物或昆虫细胞)中表达而生成,通过在植物细胞中表达而生成,或通过微生物发酵生成的实施方案。

[0120] 用于重组DNA构建体中的异源启动子选自植物中具功能性的启动子、原核生物中具功能性的启动子、真菌细胞中具功能性的启动子和杆状病毒启动子。在标题为“启动子”的部分描述了启动子的非限制性实例。

[0121] 在一些实施方案中,重组DNA构建体包含也与所述DNA可操作地连接的第二启动子。例如,包含至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的DNA可由两个启动子侧接,所述两个启动子排列为使得启动子在相反方向上并且以趋同方式转录,产生相互互补并且能够相互杂交形成双链RNA的DNA的相反链转录物。在一个实施方案中,所述DNA位于两个根特异性启动子之间,这使得能够在相反方向上转录DNA,导致dsRNA形成。

[0122] 在一些实施方案中,重组DNA构建体包含除与DNA可操作地连接的异源启动子外的其它DNA元件,所述DNA包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。此类DNA元件在本领域中已知,并且包括但不限于内含子、重组酶识别位点、适配子或核酶、附加和用于表达编码序列(例如,表达转基因如杀虫蛋白或选择标记)或非编码序列(例如,表达附加抑制元件)的附加表达盒。包括供小RNA(例如,仅在特定细胞或组织中表达的miRNA或siRNA)结合和裂解的一个或多个识别位点在植物中允许更精确的表达模式,其中当小RNA表达时,重组DNA构建体的表达受抑制。

[0123] 在一些实施方案中,在重组载体中提供重组DNA构建体。所谓“重组载体”意指用于将遗传信息从一个细胞转移到另一个细胞中的重组多核苷酸分子。适于本发明的实施方案包括但不限于重组质粒、重组粘粒、人工染色体和重组病毒载体如重组植物病毒载体和重组杆状病毒载体。替代实施方案包括包含DNA元件、无异源启动子的重组质粒、重组粘粒、人工染色体和重组病毒载体如重组植物病毒载体和重组杆状病毒载体。

[0124] 在一些实施方案中,在植物染色体或质体中,例如在转基因植物细胞或转基因植物中提供重组DNA构建体。因此,本发明还涵盖在其基因组中具有重组DNA构建体的转基因植物细胞,以及包括此类转基因植物细胞的转基因植物或部分转基因植物。部分转基因植物包括,例如移植到包括转基因植物细胞的转基因砧木上的非转基因幼芽。实施方案包括转基因番茄砧木(包括转基因植物细胞)。所述植物可为受叶甲属种类侵扰的任何植物。特别感兴趣的是其中所述植物为茄科植物(茄科)的实施方案。实例包括选自马铃薯、番茄和茄子的植物。实施方案包括其中所述植物为未发芽的茄科植物种子、处于营养阶段的茄科植物或处于生殖阶段的茄科植物的实施方案。实施方案包括其中所述植物为“种用马铃薯”的实施方案,“种用马铃薯”意指可以繁殖成新的马铃薯植株的马铃薯块茎或马铃薯块茎块。再一方面,本发明涉及由如本文所述在其基因组中具有重组DNA构建体的转基因植物产生的种子(尤其是转基因后代种子)。实施方案还涵盖如本文所述在其基因组中具有重组DNA构建体的转基因种子。还涵盖由此类转基因植物生产的商品和由此类转基因植物的转基因后代种子生产的商品。

[0125] 可以在用于向植物或植物种子的表面局部施用,或用于向需要保护以免受叶甲属种类侵扰的任何基底局部施用的组合物中提供重组DNA构建体。同样,可以在用于向叶甲属种类局部施用的组合物中,或在供叶甲属种类摄取的组合物中提供重组DNA构建体。在各个实施方案中,含有重组DNA构建体的此类组合物以选自以下的至少一种的形式:固体、液体(包括均匀混合物,如溶液和非均匀混合物如混悬液、胶体、胶粒和乳液)、粉剂、混悬液、乳液、喷雾剂、封装或微囊制剂,在微珠或其它载体微粒中或上,在薄膜或包衣中,或在基质上或内,或作为种子处理剂而提供。局部施用可以局部处理茄科植物的果实或来自于茄科植物果实的种子的形式,或以局部处理“种用马铃薯”块茎或块茎块的形式(例如,通过将种用马铃薯浸泡、包衣或扑粉)。正如熟悉杀虫剂和种子处理制剂的人员所知,在含重组DNA构建体的组合物中可包括适合的粘合剂、惰性载体、表面活性剂等。在一些实施方案中,含重组DNA构建体的局部施用组合物是选自局部植入植物中的微粒、球粒或胶囊的至少一种局部可植入制剂;在此类实施方案中所述方法包括在植物中局部植入所述局部可植入制剂。在一些实施方案中,含重组DNA构建体的用于局部施用的组合物是选自粉剂、颗粒、球粒、胶囊、喷雾剂或浇灌剂或适于向犁沟局部施用的任何其它形式的至少一种沟灌制剂;在此类实施方案中,所述方法包括用沟灌制剂进行沟灌处理。在一个实施方案中含重组DNA构建体的用于局部施用的组合物可被叶甲属种类摄取或以其它方式内部吸收。例如,含重组DNA构建体的局部施用组合物可呈饵料的形式。在一些实施方案中,含重组DNA构建体的组合物还包含选自载体剂、表面活性剂、阳离子脂质(如通过引用并入本文的美国专利申请公开2011/0296556的实施例18中公开的阳离子脂质)、有机硅、有机硅表面活性剂、多核苷酸除草分子、非多核苷酸除草分子、非多核苷酸杀虫剂、安全剂和昆虫生长调节剂的一种或多种组分。在一个实施方案中含重组DNA构建体的组合物还包含非离子有机硅表面活性剂如SILWET®牌表面活性剂,例如具有CAS编号27306-78-1和EPA编号:CAL.REG.NO.5905-50073-AA,目前可从Momentive Performance Materials,Albany,New York获得的SILWET L-77®牌表面活性剂。在一些实施方案中,含重组DNA构建体的组合物还包含选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的至少一种杀虫剂。

[0126] 预计如本文所述的某些重组DNA构建体(例如,包括在工作实施例中描述的多核苷酸触发因子的重组DNA构建体)(无论是转基因表达的还是局部施用的)与一种或多种非多核苷酸杀虫剂(无论是转基因表达的还是局部施用的)的组合在叶甲属种类侵扰的预防或控制方面,与用单独的重组DNA构建体或单独的非多核苷酸杀虫剂获得的效果相比,将导致协同提高。在一个实施方案中,发现表达一个或多个多核苷酸以及编码选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的非多核苷酸杀虫剂的一个或多个基因的重组DNA构建体在表达所述重组DNA构建体的植物中对叶甲属种类侵扰提供了协同提高的抗性。一个实施方案涉及表达包含具有选自SEQ ID NO:831-1085和1095的序列的片段的RNA以及编码选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的非多核苷酸杀虫剂的一个或多个基因的重组DNA构建体。

[0127] 可通过向受叶甲属种类侵扰的植物或表面施用所述组合物,例如通过为植物喷洒、扑粉或包衣,或通过施用土壤浇灌剂,或通过人工食物中提供,提供含重组DNA构建体的组合物,供叶甲属种类食物摄入。可在为满足特定营养需求以喂养叶甲属种类而配制的人工食物中提供含重组DNA构建体的组合物,供叶甲属种类食物摄入,其中所述人工食物补充了一定量的从单独来源如体外合成获得的或由微生物发酵或其它生物来源纯化的重组DNA构建体;这个实施方案可用于,例如确定有效处理方案的时间和量。在一些实施方案中含重组DNA构建体的组合物以植物细胞形式或在植物细胞组分中,或在微生物(如细菌或酵母)或微生物发酵产物中,或在合成食物中提供,供叶甲属种类食物摄入。在一个实施方案中含重组DNA构建体的组合物以被叶甲属种类摄取的饵料形式提供。含重组DNA构建体的组合物可以种子处理剂的形式提供,供叶甲属种类食物摄入。

[0128] 在各个实施方案中,含重组DNA构建体的组合物包含微生物细胞或在微生物中生成。例如,含重组DNA构建体的组合物可包括细菌或酵母细胞或可在细菌或酵母细胞中生成。在类似实施方案中含重组DNA构建体的组合物包含转基因植物细胞或在植物细胞(例如瞬时表达重组DNA构建体的植物细胞)中生成;此类植物细胞可以是植物中的细胞或在组织培养物或细胞悬浮液中生长的细胞。

[0129] 转基因茄科植物细胞

[0130] 几个实施方案涉及表达用于本文所述方法中抑制靶基因在叶甲属种类中表达或控制叶甲属种类侵扰的多核苷酸的转基因茄科植物细胞。一方面本发明提供了在其基因组中具有重组DNA的转基因茄科植物细胞,所述重组DNA编码包含序列与具有选自靶基因序列或其DNA互补物组的序列的DNA的片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的RNA。一方面本发明提供了在其基因组中具有重组DNA的转基因茄科植物细胞,所述重组DNA编码包含与叶甲属种类幼虫的靶基因序列的片段基本上相同或基本上互补的至少一个沉默元件的RNA,其中所述靶基因序列选自靶基因序列组或其DNA互补物。一方面本发明提供了在其基因组中具有重组DNA的转基因茄科植物细胞,所述重组DNA编码抑制靶基因在接触或摄取RNA的叶甲属种类中表达的RNA,其中所述RNA包含具有与靶基因的片段互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的至少一个沉默元件,并且其中所述靶基因选自靶基因序列组中的基因。特定实施方案为在其基因组中具有重组DNA的转基因茄科植物细胞,所述重组DNA编码抑制靶基因在接触或摄取RNA的叶甲属种类中表达的RNA,其中所述RNA包含具有与一个或多个泡外靶基因的片段互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的至少一个沉默元件;适合的泡外靶基因包括表4中提供的叶甲属种类泡外基因或从其它昆虫种类中鉴定的同源序列。一方面本发明提供了在其基因组中具有编码具有选自:SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的RNA的重组DNA或选自SEQ ID NO:1105-1109的重组DNA的转基因茄科植物细胞;实施方案包括在其基因组中具有编码一条链具有选自触发因子序列组的序列的dsRNA的重组DNA的转基因茄科植物细胞。此类转基因茄科植物细胞用于提供与缺乏此类植物细胞的对照植物相比,对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的转基因茄科植物。转基因茄科植物细胞可以是分离的转基因茄科植物细胞或培养物中生长的转基因茄科植物细胞,或受叶甲属种类侵扰的任何转基因茄科植物的转基因细胞。实例包括选自马铃薯、番茄和茄子的转基因茄科植物。实施方案包括其中所述转基因茄科植物为未发芽的转基因茄科植物种子、处于营养阶

段的转基因茄科植物或处于生殖阶段的转基因茄科植物的实施方案。实施方案包括其中所述转基因茄科植物是可以繁殖成新的转基因马铃薯植株的马铃薯块茎或马铃薯块茎块(“种用马铃薯”)的实施方案。

[0131] 在一个实施方案中,将重组DNA稳定地整合到转基因茄科植物基因组中,在其中其可以在转基因茄科植物的一个细胞或多个细胞中表达。在标题为“制备和使用转基因植物细胞和转基因植物”的部分中提供了提供经稳定转化的植物的方法。

[0132] 几个实施方案涉及在其基因组中具有重组DNA的转基因茄科植物细胞,所述重组DNA编码抑制靶基因在接触或摄取RNA的叶甲属种类中表达的RNA,其中所述RNA包含与靶基因互补的至少一个沉默元件,并且其中所述靶基因序列选自靶基因序列组或其互补物。在一些实施方案中,所述沉默元件包含序列与具有选自靶基因序列组的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%互补性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中,所述沉默元件包含能够在体内或在生理条件下(例如,通常在叶甲属种类细胞中存在的生理条件下)与具有选自靶基因序列组的序列的DNA的等长片段杂交的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。连续核苷酸为至少18个,例如介于18-24个之间、或介于18-28个之间、或介于20-30个之间、或介于20-50个之间、或介于20-100个之间、或介于50-100个之间、或介于50-500个之间、或介于100-250个之间、或介于100-500个之间、或介于200-1000个之间、或介于500-2000个之间或甚至更多。在一些实施方案中,连续核苷酸计数为超过18个,例如19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或大于30个,例如约35个、约40个、约45个、约50个、约55个、约60个、约65个、约70个、约75个、约80个、约85个、约90个、约95个、约100个、约110个、约120个、约130个、约140个、约150个、约160个、约170个、约180个、约190个、约200个、约210个、约220个、约230个、约240个、约250个、约260个、约270个、约280个、约290个、约300个、约350个、约400个、约450个、约500个,或大于500个连续核苷酸。在特定实施方案中,所述沉默元件包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有100%同一性的至少一个为至少21个连续核苷酸的片段。在特定实施方案中,所述RNA为双链核酸(例如,dsRNA),一条链包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有100%同一性的至少一个为至少21个连续核苷酸的片段;表示为碱基对,此类双链核酸包含与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段相对应的至少一个为至少21个连续、完美匹配碱基对的片段。在特定实施方案中,所述RNA中所含的每个沉默元件的长度均大于天然存在的小调控RNA典型的长度。在一些实施方案中,每个片段长度为至少约30个连续核苷酸(或碱基对)。在特定实施方案中,所述RNA的长度介于约50至约500个核苷酸。在特定实施方案中,所述RNA具有选自SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列,或所述RNA由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码。

[0133] 在一些实施方案中,转基因茄科植物细胞还能够表达附加异源DNA序列。在一个实施方案中,转基因茄科植物细胞具有还包含重组DNA的基因组,所述重组DNA编码选自铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的至少一种杀虫剂。在特定实施方案中,转基因茄科植物细胞在其基因组中稳定整合了(i)编码具有选自SEQ ID NO:831-1085和1095的序列的至少一个RNA的重组DNA和(ii)编码选自铃薯糖蛋

白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的至少一种杀虫剂的DNA。

[0134] 在一个相关方面,本发明涉及包括转基因茄科植物细胞的转基因茄科植物,由转基因茄科植物生产的商品及转基因后代茄科植物种子或转基因茄科植物的转基因可繁殖部分。实施方案包括对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的转基因番茄植物、转基因番茄砧木、转基因茄子或转基因马铃薯植物。还涵盖由转基因茄科植物生产的商品和由此类转基因茄科植物的转基因后代种子生产的商品。

[0135] 用于控制叶甲属种类的杀虫组合物

[0136] 本发明的另一方面提供了一种用于控制叶甲属种类的杀虫组合物,其中所述杀虫组合物基本上由当被所述叶甲属种类摄取或接触时在叶甲属种类中引起死亡或生长受阻的RNA分子组成,并且其中所述RNA分子包含与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA片段基本上互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。关于这一点,“控制”叶甲属种类包括在叶甲属种类(成虫或幼虫)中诱导生理或行为变化,如但不限于生长受阻或死亡率增加。在一些实施方案中,“控制”叶甲属种类是通过在叶甲属种类中降低生殖能力、减少或停止摄食行为或运动,或减少或停止变态期发育而实现的。通常所述RNA分子已经分离,即,从混合物如发酵或体外合成混合物中基本上纯化。在一个实施方案中所述RNA分子包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%互补性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中所述RNA分子包含与具有选自:SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的DNA片段基本上互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段,或其中所述RNA分子由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码。在一些实施方案中所述RNA分子为双链,并且所述至少一个片段的长度介于约50至约500个碱基对之间。在一些实施方案中所述RNA分子为一条链具有选自触发因子序列组的序列的dsRNA。在一些实施方案中,提供杀虫组合物以控制叶甲属种类,其中所述杀虫组合物包含双链RNA,其中所述双链RNA的至少一条链与编码核糖体蛋白的基因或由所述基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补,其中所述叶甲属种类为马铃薯叶甲,并且其中RNA干扰被诱导并且发生马铃薯叶甲死亡,并且其中所述核糖体蛋白为核糖体L7蛋白或由SEQ ID NO:730编码的蛋白或其中所述双链RNA包含选自SEQ ID NO:989、988、1104或1105的序列。

[0137] 所述RNA分子的实施方案包括其中为18个或更多个连续核苷酸的所述片段的序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA片段具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%互补性。在一些实施方案中,所述连续核苷酸与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段完全(100%)互补。在一些实施方案中,所述RNA分子的整体序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%互补性。

[0138] 所述RNA分子的实施方案包括被设计为抑制具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的靶基因表达的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。所述片段的连续核苷酸计数至少18个,例如介于18-24个之间、或介于18-28个之间、或介于20-30个之间、或介于20-50个之间、或介于20-100个之间、或介于50-100个之间、或介于50-500个之间、或介于

100-250个之间、或介于100-500个之间、或介于200-1000个之间、或介于500-2000个之间或甚至更多。在一些实施方案中,连续核苷酸计数超过18个,例如19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或大于30个,例如约35个、约40个、约45个、约50个、约55个、约60个、约65个、约70个、约75个、约80个、约85个、约90个、约95个、约100个、约110个、约120个、约130个、约140个、约150个、约160个、约170个、约180个、约190个、约200个、约210个、约220个、约230个、约240个、约250个、约260个、约270个、约280个、约290个、约300个、约350个、约400个、约450个、约500个,或大于500个连续核苷酸。在特定实施方案中,所述RNA分子包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有100%同一性的至少一个为至少21个连续核苷酸的片段。在特定实施方案中,所述RNA为双链核酸(例如, dsRNA),一条链包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有100%同一性的至少一个为至少21个连续核苷酸的片段;表示为碱基对,此类双链核酸包含与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段相对应的至少一个为至少21个连续、完美匹配碱基对的片段。在特定实施方案中,所述RNA分子中所含的每个片段的长度均大于天然存在的小调控RNA典型的长度。在一些实施方案中,每个片段长度为至少约30个连续核苷酸(或碱基对)。在一些实施方案中,所述RNA分子的总长度或所述RNA分子中所含的每个片段的长度小于所关注的序列(具有选自靶基因序列组的序列的DNA或靶基因)的总长度。在一些实施方案中,所述RNA分子的总长度介于约50个至约500个核苷酸(对于单链多核苷酸而言)或碱基对(对于双链多核苷酸而言)。在一些实施方案中,所述RNA分子为介于约100个至约500个碱基对之间的dsRNA,如表3、5、8、9和10中公开的任何dsRNA触发因子的长度的dsRNA。在一些实施方案中,所述杀虫组合物基本上由杀虫有效量的一条链具有选自SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的双链RNA分子组成,或基本上由杀虫有效量的由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码的RNA发夹。在一些实施方案中,所述杀虫组合物基本上由杀虫有效量的一条链具有选自触发因子序列组的序列的双链RNA分子组成。

[0139] 所述RNA分子通常被设计为抑制一个或多个基因(“靶基因”)。此类靶基因可包括编码或非编码序列或两者。在特定实施方案中,所述RNA分子被设计为抑制一个或多个靶基因,其中每个靶基因具有选自靶基因序列组的DNA序列。在各个实施方案中,所述RNA分子被设计为抑制一个或多个基因,其中每个基因具有选自靶基因序列组的序列,并且可被设计为抑制来自于这个组的多个基因,或靶向这些基因中的一个或多个的不同区域。所述RNA分子的实施方案包括具有被设计为抑制一个或多个基因的序列的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段,其中每个基因具有选自靶基因序列组的序列。在一个实施方案中,所述RNA分子包含多个区段或片段,其中每一个均包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有100%互补性的至少一个为21个连续核苷酸的片段。在此类情况下,每个区段在大小或序列上可相同或不同。例如,在一个实施方案中所述RNA分子包含呈串联或重复排列的多个区段,其中每个区段包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有100%互补性的至少一个为21个连续核苷酸的片段;所述片段可来自于靶基因的不同区域,例如,所述片段可与靶基因的不同外显子区相对应,并且与靶基因不相对应的“间隔区”核苷酸可任选地用于所述片段之间或附近。

[0140] 所述RNA分子的总长度可大于18个连续核苷酸,并且可包括除序列与具有选自靶

基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%互补性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的所述片段外的核苷酸。换言之,所述RNA分子的总长度可大于被设计为抑制一个或多个靶基因的片段的长度,其中每个靶基因具有选自靶基因序列组的DNA序列。例如,所述RNA分子可具有侧接抑制靶基因的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的“活性”片段的核苷酸,或包括在活性片段之间的“间隔区”核苷酸,或可在5'末端,或在3'末端,或在5'和3'末端两处具有附加核苷酸。在一个实施方案中,所述RNA分子包含与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因并非特异性相关(具有不与之互补或相同的序列)的附加核苷酸,例如,提供稳定二级结构或为了方便克隆或生产的核苷酸。在一个实施方案中,所述RNA分子包含紧邻序列与具有选自靶基因序列组的序列的DNA或靶基因的等长片段具有约95%至约100%互补性的一个或多个为18个或更多个连续核苷酸的片段定位的附加核苷酸。在一个实施方案中,所述RNA分子包含一个此类片段,具有邻近所述片段的附加5'G或附加3'C或两者。在另一个实施方案中,所述RNA分子为包含附加核苷酸以形成突出的双链RNA,例如,包含2个脱氧核糖核苷酸以形成3'突出的dsRNA。因此在各个实施方案中,整个RNA分子的核苷酸序列与具有选自靶基因序列组的序列的DNA或靶基因中的连续核苷酸片段并非100%相同或互补。例如,在一些实施方案中所述RNA分子包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的片段具有100%同一性的至少两个各21个连续核苷酸的片段,其中(1)所述至少两个片段被一个或多个间隔区核苷酸分隔开,或(2)所述至少两个片段按不同于具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA中存在的相应片段的顺序排列。

[0141] 所述RNA分子可为单链(ss)或双链(ds)或两者的组合。所述RNA分子的实施方案包括有义单链RNA(ssRNA)、反义ssRNA或双链RNA(dsRNA)或这些中任何的组合。所述RNA可包括除标准核糖核苷酸外的组分,例如,实施方案为包含末端脱氧核糖核苷酸的RNA。在各个实施方案中所述RNA分子由天然存在的核糖核苷酸组成。在某些实施方案中,所述RNA分子为核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的组合,例如,合成RNA分子主要由核糖核苷酸组成,但是具有一个或多个末端脱氧核糖核苷酸或一个或多个末端。在某些实施方案中,所述RNA分子包含非规范核苷酸如次黄嘌呤核苷、硫尿核苷或假尿嘧啶核苷。在某些实施方案中,所述RNA分子包含经化学修饰的核苷酸。

[0142] 通过本领域人员已知的适合方式提供所述RNA分子。实施方案包括其中所述RNA分子在体外合成,通过在微生物或在细胞培养物(如培养物中生长的植物或昆虫细胞)中表达而生成,通过在植物细胞中表达而生成,或通过微生物发酵生成的实施方案。

[0143] 在一些实施方案中所述RNA分子包含其它RNA元件,如RNA适配子或核酶、附加非编码RNA(例如,附加抑制元件)或供小RNA(例如,仅在特定细胞或组织中表达的miRNA或siRNA)结合和裂解的一个或多个识别位点。

[0144] 可以提供杀虫组合物向植物或植物种子的表面局部施用,或向需要保护以免受叶甲属种类侵扰的任何基底局部施用。同样,可以提供杀虫组合物向叶甲属种类局部施用,或在供叶甲属种类摄取的组合物中提供。在各个实施方案中,杀虫组合物以选自以下的至少一种的形式:固体、液体(包括均匀混合物,如溶液和非均匀混合物如混悬液、胶体、胶粒和乳液)、粉剂、混悬液、乳液、喷雾剂、封装或微囊制剂,在微珠或其它载体微粒中或上,在薄膜或包衣中,或在基质上或内提供。正如熟悉杀虫剂和种子处理制剂的人员所知,在杀虫组

合物中可包括适合的粘合剂、惰性载体、表面活性剂等。虽然杀虫组合物基本上由RNA分子组成,但是在一些实施方案中,杀虫组合物还包含选自以下的至少一种非杀虫剂:载体剂、盐、表面活性剂、阳离子脂质(如通过引用并入本文的美国专利申请公开2011/0296556的实施例18中公开的阳离子脂质)、有机硅、有机硅表面活性剂、多核苷酸除草分子、非多核苷酸除草分子和安全剂。在一个实施方案中含重组RNA分子的组合物还包含非离子有机硅表面活性剂如SILWET®牌表面活性剂,例如具有CAS编号27306-78-1和EPA编号:CAL.REG.NO.5905-50073-AA,目前可从Momentive Performance Materials,Albany,New York获得的SILWETL-77®牌表面活性剂。此外,可以与用多核苷酸除草分子、非多核苷酸除草分子、非多核苷酸杀虫剂(例如,选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的至少一种杀虫剂)处理组合,在其之后或之前使用杀虫组合物。相关的组合物包括RNA分子与多核苷酸除草分子、非多核苷酸除草分子、非多核苷酸杀虫剂的组合。

[0145] 可通过向受叶甲属种类侵扰的植物或表面施用所述组合物,例如通过为植物喷洒、扑粉或包衣,或通过施用土壤浇灌剂,或通过人工食物中提供,提供杀虫组合物供叶甲属种类食物摄入。可在为满足特定营养需求以喂养叶甲属种类而配制的人工食物中提供杀虫组合物,供叶甲属种类食物摄入,其中所述人工食物补充了一定量的从单独来源如化学合成获得的或由微生物发酵或其它生物来源纯化的重组RNA分子;这个实施方案可用于,例如确定有效处理方案的时间和量。可以种子处理剂的形式提供杀虫组合物供叶甲属种类食物摄入。

[0146] 提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物的方法及由此提供的植物、植物部分和种子

[0147] 几个实施方案涉及一种提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物的方法,其包括向植物提供至少一种多核苷酸,所述多核苷酸包含与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一个实施方案中,本发明提供了一种提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物的方法,其包括向植物提供至少一种多核苷酸,所述多核苷酸包含与靶基因或由靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸相同或互补的至少一个片段,其中所述靶基因选自靶基因序列组中标识的基因或由靶基因转录的RNA。这些靶基因的实施方案在表1、2和4中用名称标识并且包括具有选自靶基因序列组的序列的基因以及相关基因,包括来自于相关昆虫种类的直系同源物,例如来自于其它叶甲属种类、拟谷盗属种类或其它相关属的相关基因。此类相关靶基因的实例包括表1中所列的赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)基因。在一些实施方案中,所述多核苷酸为双链RNA。在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如,双链RNA)经化学合成或通过在微生物中表达或在植物细胞中表达而生成。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含与选自靶基因序列组的序列基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中所述多核苷酸为dsRNA,一条链具有选自:SEQ ID NO:831-1085,1095-1104和1110-1114或其互补物的序列,或其中所述多核苷酸由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码。在一些实施方案中所述多核苷酸包含一条链具有选自触发因子序列组的序列的dsRNA。

[0148] 在一个实施方案中所述方法包括向植物局部施用包含至少一种多核苷酸的组合物,所述多核苷酸包含与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的DNA等长片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段,由此经所述多核苷酸组合物处理的植物相对于未处理的植物,对叶甲属种类侵扰表现出提高的抗性。所谓“局部施用”意指向物体的表面或外部,如植物的表面或外部施用,如向植物部分如叶片、茎、花、果实、芽、根、种子、块茎、花、花粉囊或花粉的表面施用,或向整株植物,或向植物的地上或地下部分施用。可对非活体表面实行局部施用,如向土壤,或向叶甲属昆虫可由此与多核苷酸接触的表面或基质施用。在所述方法的各个实施方案中,含多核苷酸的组合物以适合形式,例如作为固体、液体(包括均匀混合物,如溶液和非均匀混合物如混悬液、胶体、胶粒和乳液)、粉剂、混悬液、乳液、喷雾剂、封装或微囊制剂,或在微珠或其它载体微粒中或上,在薄膜或包衣中,或在基质上或内,或作为种子处理剂向植物局部施用。在所述方法的一些实施方案中,含多核苷酸的组合物局部施用到植物的地上部分,例如喷洒或扑粉到植物的叶片、茎和开花部分上。所述方法的实施方案包括局部施用叶面喷雾剂(例如,在茄科植物的叶片上喷洒含多核苷酸的液体组合物)或叶面粉尘(例如,为茄科植物扑上呈粉剂形式或在载体微粒上的含多核苷酸的组合物)。在其它实施方案中,例如,借助于土壤浇灌剂,向植物的地下部分,如向根局部施用含多核苷酸的组合物。在其它实施方案中,向长成植物的种子局部施用含多核苷酸的组合物。局部施用可以呈局部处理茄科植物的果实或来自于茄科植物果实的种子的形式,或呈局部处理“种用马铃薯”块茎或块茎块的形式(例如,通过将种用马铃薯浸泡、包衣或扑粉)。正如熟悉杀虫剂和种子处理制剂的人员所知,在含多核苷酸的组合物中可任选地包括适合的粘合剂、惰性载体、表面活性剂等。在一些实施方案中,含多核苷酸的组合物是选自局部植入植物中的微粒、球粒或胶囊的至少一种局部可植入制剂;在此类实施方案中所述方法包括在植物中局部植入所述局部可植入制剂。在一些实施方案中,含多核苷酸的组合物是选自粉剂、颗粒、球粒、胶囊、喷雾剂或浇灌剂或适于向犁沟局部施用的任何其它形式的至少一种沟灌制剂;在此类实施方案中,所述方法包括用沟灌制剂进行沟灌处理。在一个实施方案中含多核苷酸的组合物可被叶甲属种类摄取或以其它方式内部吸收。例如,含多核苷酸的组合物可呈饵料的形式。在一些实施方案中,含多核苷酸的组合物还包含选自载体剂、表面活性剂、阳离子脂质(如通过引用并入本文的美国专利申请公开2011/0296556的实施例18中公开的阳离子脂质)、有机硅、有机硅表面活性剂、多核苷酸除草分子、非多核苷酸除草分子、非多核苷酸杀虫剂、安全剂和昆虫生长调节剂的一种或多种组分。在一个实施方案中所述组合物还包含非离子有机硅表面活性剂如SILWET®牌表面活性剂,例如具有CAS编号27306-78-1和EPA编号:CAL.REG.NO.5905-50073-AA,目前可从Momentive Performance Materials,Albany,New York获得的SILWETL-77®牌表面活性剂。在一些实施方案中,局部施用的组合物还包含选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的至少一种杀虫剂。可选地此类附加组分或杀虫剂可单独提供,例如通过单独局部施用或通过植物中转基因表达。可选地用含多核苷酸的组合物以及单独(之前、之后或同时)施用提高含多核苷酸的组合物功效的物质而局部处理植物。例如,可经第一次局部施用含非离子有机硅表面活性剂如SILWET®牌表面活性剂(例如SILWETL-77®牌表面活性剂)的溶液,接着第二次局部施用含多核苷酸的组合物而喷洒

植物,或反之亦然。

[0149] 预计某些多核苷酸(例如,在工作实施例中描述的多核苷酸触发因子)与一种或多种非多核苷酸杀虫剂的组合在叶甲属种类侵扰的预防或控制方面,与用单独的多核苷酸或单独的非多核苷酸杀虫剂获得的效果相比,将导致协同提高。在一个实施方案中,发现含有一种或多种多核苷酸和选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的一种或多种非多核苷酸杀虫剂的组合物在局部施用到植物时,实现了协同提高的对叶甲属种类侵扰的预防或控制。

[0150] 在一些实施方案中,所述方法包括向植物局部施用包含至少一种多核苷酸的组合物,所述多核苷酸包含与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的DNA等长片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。向植物局部施用的多核苷酸可为单链(ss)或双链(ds)。

[0151] 可通过本领域人员已知的适合方式提供向植物局部施用的多核苷酸。实施方案包括其中多核苷酸经化学合成(例如,通过体外转录,如使用T7聚合酶或其它聚合酶转录),通过在微生物中或在细胞培养物(如培养物中生长的植物或昆虫细胞)中表达而生成,通过在植物细胞中表达而生成,或通过微生物发酵生成的实施方案。

[0152] 在许多实施方案中,向植物局部施用的多核苷酸作为分离的DNA或RNA提供。在一些实施方案中,向植物局部施用的多核苷酸不是表达构建体的一部分而是缺乏附加元件如启动子或终止子序列。此类多核苷酸可相对较短,如介于约18个至约300个或介于约50个至约500个核苷酸(对于单链多核苷酸而言)或介于约18个至约300个或介于约50个至约500个碱基对(对于双链多核苷酸而言)的单链或双链多核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸为介于约100个至约500个碱基对的dsRNA,如表3、5、8、9和10中公开的任何dsRNA触发因子的长度的dsRNA。可选地多核苷酸可在更复杂的构建体中提供,例如,作为重组表达构建体的一部分,或包括在重组载体中,例如在重组植物病毒载体或重组杆状病毒载体中。此类重组表达构建体或载体被设计为包括附加元件,如用于表达所关注的基因(例如,杀虫蛋白)的表达盒。

[0153] 向植物局部施用的多核苷酸具有与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的DNA等长片段基本上相同或互补,或序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的DNA等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一个实施方案中向植物局部施用的多核苷酸包含与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的DNA等长片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中,连续核苷酸的序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的DNA等长片段具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同一性或互补性。在一些实施方案中,所述连续核苷酸与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的DNA等长片段完全(100%)相同或互补。在一些实施方案中,多核苷酸的整体序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因DNA片段具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同一性或互补性。

[0154] 向植物局部施用的多核苷酸通常被设计为抑制一个或多个基因(“靶基因”)。在特定实施方案中,所述多核苷酸被设计为抑制选自靶基因序列组中标识的基因的一个或多个

靶基因。靶基因序列组中标识的基因的实施方式包括但不限于选自靶基因序列组的cDNA序列。在各个实施方式中,向植物局部施用的多核苷酸被设计为抑制一个或多个基因,其中每个基因选自靶基因序列组中标识的基因,并且可被设计为抑制来自于这个组的多个基因,或靶向这些基因中的一个或多个的不同区域。在一个实施方式中,向植物局部施用的多核苷酸包含多个区段或片段,其中每一个均包含序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的DNA等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在此类情况下,每个区段在大小或序列上可相同或不同,并且相对于靶基因可为有义的或反义的。例如,在一个实施方式中向植物局部施用的多核苷酸可包括呈串联或重复排列的多个区段,其中每个区段包含序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的DNA等长片段具有100%同一性或100%互补性的至少一个为21个连续核苷酸的片段;所述片段可来自于靶基因的不同区域,例如,所述片段可与具有选自靶基因序列组的序列的cDNA的不同外显子区相对应,并且与靶基因不相对应的“间隔区”核苷酸可任选地用于所述片段之间或附近。

[0155] 向植物局部施用的多核苷酸的总长度可大于18个连续核苷酸,并且可包括除序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的DNA等长片段基本上相同或互补的至少一个连续核苷酸片段外的核苷酸。换言之,向植物局部施用的多核苷酸的总长度可大于被设计为抑制一个或多个靶基因的多核苷酸的所述区段或片段的长度,其中每个靶基因选自靶基因序列组中标识的基因。例如,向植物局部施用的多核苷酸可具有侧接抑制靶基因的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的“活性”片段的核苷酸,或包括在活性片段之间的“间隔区”核苷酸,或可在5'末端,或在3'末端,或在5'和3'末端两处具有附加核苷酸。在一个实施方式中,向植物局部施用的多核苷酸包含与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因并非特异性相关(具有不与之互补或相同的序列)的附加核苷酸,例如,提供稳定二级结构或为了方便克隆或生产的核苷酸。在一个实施方式中,向植物局部施用的多核苷酸包含紧邻序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因具有约95%至约100%同一性或互补性的一个或多个为18个或更多个连续核苷酸的片段定位的附加核苷酸。在一个实施方式中,向植物局部施用的多核苷酸包含一个此类片段,具有邻近所述片段的附加5'G或附加3'C或两者。在另一个实施方式中,向植物局部施用的多核苷酸为包含附加核苷酸以形成突出的双链RNA,例如,包含2个脱氧核糖核苷酸以形成3'突出的dsRNA。因此在各个实施方式中,向植物局部施用的整个多核苷酸的核苷酸序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因中的连续核苷酸片段并非100%相同或互补。例如,在一些实施方式中向植物局部施用的多核苷酸包含序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的片段具有100%同一性的至少两个各21个连续核苷酸的片段,其中(1)所述至少两个片段被一个或多个间隔区核苷酸分隔开,或(2)所述至少两个片段按不同于选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因中存在的相应片段的顺序排列。

[0156] 在一个相关方面,本发明涉及通过这种方法提供的对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物,所述方法包括向植物局部施用包含至少一种多核苷酸的组合物,所述多核苷酸包含与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的DNA等长片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段,由此经多核苷酸组合物处理的植物相对于未处理的植物,对叶甲属种类侵扰表现出提高的抗性。再一方面,本发明涉及由通过这种方法提

供的对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物产生的种子(尤其是转基因后代种子)。还涵盖由通过这种方法提供的对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物生产的商品和由此类植物的转基因后代种子生产的商品。

[0157] 在另一个实施方案中,所述方法包括在植物中表达至少一种多核苷酸,所述多核苷酸包含与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的等长片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段,由此表达所述多核苷酸的植物相对于不表达所述多核苷酸的植物,对叶甲属种类侵扰表现出提高的抗性。在一个实施方案中,所述方法包括在植物中表达至少一种多核苷酸,所述多核苷酸包含序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的DNA等长片段具有约95%至约100%同一性或互补性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。这些靶基因的实施方案用表1、2和4中的名称标识并且包括具有选自靶基因序列组的序列的基因以及相关基因,包括来自于相关昆虫种类的直系同源物,例如来自于其它叶甲属种类、拟谷盗属种类或其它相关属的相关基因。此类相关靶基因的实例包括表1中所列的赤拟谷盗基因。所谓“在植物中表达多核苷酸”通常意指“在植物中表达RNA转录物”。然而,在植物中表达的多核苷酸也可以是DNA,例如植物中在基因组复制期间生成的DNA。

[0158] 所述方法包括在植物中表达至少一种多核苷酸,其中所述多核苷酸包含与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中,第一多核苷酸以DNA形式(例如,以分离的DNA分子的形式,或作为表达构建体,或作为转化载体)向植物提供,并且在植物中表达的多核苷酸为植物中的第二多核苷酸(例如,第一多核苷酸的RNA转录物)。在一个实施方案中,多核苷酸在植物中表达是通过转基因表达,即通过将多核苷酸稳定地整合到植物基因组中,从这里其可以在植物的一个细胞或多个细胞中表达。在一个实施方案中,将第一多核苷酸(例如,包含启动子的重组DNA构建体,启动子与包含与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的DNA可操作地连接)稳定地整合到植物基因组中,从这里二次生成的多核苷酸(例如, RNA转录物,包括与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的片段基本上相同或互补的为18个或更多个连续核苷酸的片段的转录物)在植物的一个细胞或多个细胞中表达。在标题为“制备和使用转基因植物细胞和转基因植物”的部分提供了提供经稳定转化的植物的方法。

[0159] 在另一个实施方案中植物中表达的多核苷酸通过瞬时表达而表达(即,并非由序列稳定整合到植物基因组中而引起的表达)。在此类实施方案中所述方法可包括通过本领域已知的常规技术将多核苷酸(例如, dsRNA或dsDNA)引入植物中的步骤。例如,可通过使用无针注射器使多核苷酸溶液渗入植物叶片中实现瞬时表达。

[0160] 在其中植物中表达的多核苷酸通过瞬时表达而表达的一些实施方案中,第一多核苷酸以RNA或DNA或RNA和DNA两种形式向植物提供,并且二次生成的第二多核苷酸在植物中瞬时表达。在一些实施方案中,第一多核苷酸为选自以下的一种或多种:(a)单链RNA分子(ssRNA), (b)自我杂交形成双链RNA分子的单链RNA分子, (c)双链RNA分子(dsRNA), (d)单链DNA分子(ssDNA), (e)自我杂交形成双链DNA分子的单链DNA分子, (f)包含转录为RNA分子的经修饰P_o1 III基因的单链DNA分子, (g)双链DNA分子(dsDNA), (h)包含转录为RNA分子的经修饰P_o1 III基因的双链DNA分子,和(i)双链、杂交RNA/DNA分子或其组合。在特定实施方案

中,通过以适合形式,例如作为固体、液体(包括均匀混合物,如溶液和非均匀混合物如混悬液、胶体、胶粒和乳液)、粉剂、混悬液、乳液、喷雾剂、封装或微囊制剂,在微珠或其它载体微粒中或上,在薄膜或包衣中,或在基质上或内,或以茄科植物种子处理剂或种用马铃薯处理剂的形式,向植物局部施用含多核苷酸的组合物,将第一多核苷酸引入植物中。正如熟悉杀虫剂和种子处理制剂的人员所知,在所述组合物中可任选地包括适合的粘合剂、惰性载体、表面活性剂等。在此类实施方案中,含多核苷酸的组合物还可包含选自载体剂、表面活性剂、阳离子脂质(如通过引用并入本文的美国专利申请公开2011/0296556的实施例18中公开的阳离子脂质)、有机硅、有机硅表面活性剂、多核苷酸除草分子、非多核苷酸除草分子、非多核苷酸杀虫剂、安全剂和昆虫生长调节剂的一种或多种组分;在一个实施方案中所述组合物还包含非离子有机硅表面活性剂如SILWET®牌表面活性剂,例如具有CAS编号27306-78-1和EPA编号:CAL.REG.NO.5905-50073-AA,目前可从Momentive Performance Materials,Albany,New York获得的SILWETL-77®牌表面活性剂。在一些实施方案中,局部施用的组合物还包含选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的至少一种杀虫剂。可选地此类附加组分或杀虫剂可单独提供,例如通过单独局部施用或通过植物中转基因表达。可选地用含多核苷酸的组合物以及单独(之前、之后或同时)施用提高含多核苷酸的组合物功效的物质而局部处理植物。例如,可经第一次局部施用含非离子有机硅表面活性剂如SILWET®牌表面活性剂(例如SILWETL-77®牌表面活性剂)的溶液,接着第二次局部施用含多核苷酸的组合物而喷洒植物,或反之亦然。

[0161] 预计用于这种方法中的某些多核苷酸(例如,在工作实施例中描述的多核苷酸触发因子)与一种或多种非多核苷酸杀虫剂的组合在叶甲属种类侵扰的预防或控制方面,与用单独的多核苷酸或单独的非多核苷酸杀虫剂获得的效果相比,将导致协同提高。在一个实施方案中,发现表达包含与选自表1中标识的基因的靶基因的片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的至少一种多核苷酸(例如,在工作实施例中描述的多核苷酸触发因子)和编码选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的非多核苷酸杀虫剂的一个或多个基因的转基因植物表现出协同提高的对叶甲属种类侵扰的抗性。

[0162] 在植物中表达的多核苷酸通过瞬时表达而表达的一些实施方案中,第一多核苷酸以RNA或DNA或RNA和DNA两种形式向植物提供,并且二次生成的第二多核苷酸在植物中瞬时表达;第一多核苷酸的施用部位无需为第二多核苷酸瞬时表达的相同部位。例如,可通过向叶片局部施用,或通过注入茎中向植物提供第一多核苷酸,并且第二多核苷酸在植物其它地方,例如在根或整株植物中瞬时表达。在所述方法的一些实施方案中,包含至少一种多核苷酸的组合物局部施用到植物的地上部分,例如喷洒或扑粉到植物的叶片、茎和开花部分上。在其它实施方案中,例如,借助于土壤浇灌剂,向植物的地下部分,例如向根局部施用至少一种多核苷酸的组合物。在其它实施方案中,向种子局部施用(或,在为马铃薯的情况下,向种用马铃薯局部施用)含至少一种多核苷酸的组合物,种子长成对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物。

[0163] 在一些实施方案中在植物中表达的多核苷酸为RNA,其可为单链(ss)或双链(ds)

RNA或两者的组合。

[0164] 在一些实施方案中向植物提供第一多核苷酸(DNA或RNA或两者)并且随后在植物中表达具有与第一多核苷酸相对应(相同或互补)的序列的第二多核苷酸。在此类实施方案中在植物中表达的多核苷酸为RNA转录物,其可为ssRNA或dsRNA或两者的组合。在多核苷酸通过瞬时表达而表达的一些实施方案中,第一多核苷酸以RNA或DNA或RNA和DNA两种形式向植物提供,并且二次生成的第二多核苷酸在植物中瞬时表达;在此类实施方案中,第一多核苷酸为选自以下的一种或多种:(a)单链RNA分子(ssRNA),(b)自我杂交形成双链RNA分子的单链RNA分子,(c)双链RNA分子(dsRNA),(d)单链DNA分子(ssDNA),(e)自我杂交形成双链DNA分子的单链DNA分子,(f)包含转录为RNA分子的经修饰Pol III基因的单链DNA分子,(g)双链DNA分子(dsDNA),(h)包含转录为RNA分子的经修饰Pol III基因的双链DNA分子,和(i)双链、杂交RNA/DNA分子或其组合。在多核苷酸通过瞬时表达而表达的此类实施方案中,第一多核苷酸可由天然存在的核苷酸,如DNA和RNA中存在的核苷酸组成。在多核苷酸通过瞬时表达而表达的此类实施方案中,第一多核苷酸可经化学修饰,或包含经化学修饰的核苷酸。通过本领域人员已知的适合方式提供第一多核苷酸。实施方案包括其中第一多核苷酸经化学合成(例如,通过体外转录,如使用T7聚合酶或其它聚合酶转录),通过在微生物中或在细胞培养物(如培养物中生长的植物或昆虫细胞)中表达而生成,通过在植物细胞中表达而生成,或通过微生物发酵生成的实施方案。第一多核苷酸可作为RNA或DNA片段提供。可选地第一多核苷酸可在更复杂的构建体中提供,例如,作为重组表达构建体的一部分,或包括在重组载体中,例如在重组植物病毒载体或重组杆状病毒载体中;此类重组表达构建体或载体可被设计为包括附加元件,如用于表达所关注的基因(例如,杀虫蛋白)的表达盒。

[0165] 在一些实施方案中在植物中表达的多核苷酸为RNA分子并且可相对较短,如介于约18个至约300个或介于约50个至约500个核苷酸(对于单链RNA而言)或介于约18个至约300个或介于约50个至约500个碱基对(对于双链RNA而言)的单链或双链RNA。可选地所述多核苷酸可在更复杂的构建体中提供,例如,作为重组表达构建体的一部分,或包括在重组载体中,例如在重组植物病毒载体或重组杆状病毒载体中。在一些实施方案中此类重组表达构建体或载体被设计为包括附加元件,如用于表达所关注的基因(例如,杀虫蛋白)的表达盒。

[0166] 在植物中表达的多核苷酸具有序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的等长片段具有约95%至约100%同一性或互补性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一个实施方案中在植物中表达的多核苷酸包含与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的等长片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中,连续核苷酸的序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的等长片段具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同一性或互补性。在一些实施方案中,所述连续核苷酸与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的等长片段完全(100%)相同或互补。在一些实施方案中,在植物中表达的多核苷酸的整体序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的片段具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同一性或互补性。

[0167] 在植物中表达的多核苷酸通常被设计为抑制一个或多个基因(“靶基因”)。此类靶基因可包括编码或非编码序列或两者。在特定实施方案中,在植物中表达的多核苷酸被设

计为抑制选自靶基因序列组中标识的基因的一个或多个靶基因。在各个实施方案中,在植物中表达的多核苷酸被设计为抑制选自靶基因序列组中标识的基因的一个或多个基因,并且可被设计为抑制来自于这个组的多个基因,或靶向这些基因中的一个或多个的不同区域。在一个实施方案中,在植物中表达的多核苷酸包含多个区段或片段,其中每一个均包含序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的片段具有约95%至约100%同一性或互补性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在此类情况下,每个区段在大小或序列上可相同或不同,并且相对于靶基因可为有义的或反义的。例如,在一个实施方案中在植物中表达的多核苷酸可包括呈串联或重复排列的多个区段,其中每个区段包含序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的片段具有约95%至约100%同一性或互补性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段;所述片段可来自于靶基因的不同区域,例如,所述片段可与靶基因的不同外显子区相对应,并且与靶基因不相对应的“间隔区”核苷酸可任选地用于所述片段之间或附近。

[0168] 在植物中表达的多核苷酸的总长度可大于18个连续核苷酸,并且可包括除序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的片段具有约95%至约100%同一性或互补性的连续核苷酸外的核苷酸。换言之,在植物中表达的多核苷酸的总长度可大于被设计为抑制选自靶基因序列组中标识的基因的一个或多个靶基因的多核苷酸的所述区段或片段的长度。例如,在植物中表达的多核苷酸可具有侧接抑制靶基因的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的“活性”片段的核苷酸,或包括在活性片段之间的“间隔区”核苷酸,或可在5'末端,或在3'末端,或在5'和3'末端两处具有附加核苷酸。在一个实施方案中,在植物中表达的多核苷酸包含与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因并非特异性相关(具有不与之互补或相同的序列)的附加核苷酸,例如,提供稳定二级结构或为了方便克隆或生产的核苷酸。在一个实施方案中,在植物中表达的多核苷酸包含紧邻序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的等长片段具有约95%至约100%同一性或互补性的一个或多个为18个或更多个连续核苷酸的片段定位的附加核苷酸。在一个实施方案中,在植物中表达的多核苷酸包含一个此类片段,具有邻近所述片段的附加5'G或附加3'C或两者。在另一个实施方案中,在植物中表达的多核苷酸为包含附加核苷酸以形成突出的双链RNA,例如,包含2个脱氧核糖核苷酸以形成3'突出的dsRNA。因此在各个实施方案中,在植物中表达的整个多核苷酸的核苷酸序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因中的连续核苷酸片段并非100%相同或互补。例如,在一些实施方案中在植物中表达的多核苷酸包含序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的片段具有100%同一性或100%互补性的至少两个各21个连续核苷酸的片段,其中(1)所述至少两个片段被一个或多个间隔区核苷酸分隔开,或(2)所述至少两个片段按不同于选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因中存在的相应片段的顺序排列。

[0169] 在一个相关方面,本发明涉及通过在植物中表达至少一种多核苷酸而提供的,对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物,所述多核苷酸包含与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的等长片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段,由此所得植物在与其中未表达所述多核苷酸的对照植物相比时,对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性。在一个相关方面,本发明涉及通过在植物中表达至少一种多核苷酸而提供的,对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物,所述多核苷酸包含序列与选自靶基因序列

组中标识的基因的靶基因的片段具有约95%至约100%同一性或互补性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段,由此所得植物在与其中未表达所述多核苷酸的对照植物相比时,对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性。实施方案为在与对照植物相比时,对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的茄科植物,其通过在植物中表达具有选自SEQ ID NO:831-1085和1095的序列的RNA而提供。再一方面,本发明涉及由通过这种方法提供的对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物产生的种子或可繁殖部分(尤其是转基因后代种子或可繁殖部分)。还涵盖由通过这种方法提供的对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物生产的商品和由此类植物的转基因后代种子或可繁殖部分生产的商品。

[0170] 控制植物受叶甲属种类侵扰的方法

[0171] 几个实施方案涉及一种用于控制植物受叶甲属种类侵扰的方法,其包括使叶甲属种类与多核苷酸接触,所述多核苷酸包含与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的DNA等长片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。关于这一点,“控制”包括在叶甲属种类(成虫或幼虫)中诱导生理或行为变化,如但不限于生长受阻、死亡率增加、生殖能力降低、摄食行为或运动减少或停止或变态期发育减少或停止。在一个实施方案中,用于控制植物受叶甲属种类侵扰的方法包括使叶甲属种类与多核苷酸接触,所述多核苷酸包含与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因或由所述靶基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸相同或互补的至少一个片段。在一些实施方案中,所述多核苷酸为双链RNA。在一些实施方案中,所述多核苷酸(例如,双链RNA)经化学合成或通过微生物中表达或在植物细胞中表达而生成。在一些实施方案中,所述多核苷酸为双链RNA,其包含的一条链包含选自触发因子序列组的序列。在一个实施方案中,用于控制植物受叶甲属种类侵扰的方法包括使叶甲属种类与有效量的双链RNA接触,所述双链RNA的一条链与编码核糖体蛋白的基因的至少21个连续核苷酸互补,其中RNA干扰被诱导并且发生死亡。靶基因的实施方案用表1、2和4中的名称标识并且包括具有选自靶基因序列组的序列的基因以及相关基因,包括来自于相关昆虫种类的直系同源物,例如来自于其它叶甲属种类、拟谷盗属种类或其它相关鞘翅目属的相关基因。此类相关靶基因的实例包括表1中所列的赤拟谷盗基因。在一些实施方案中,所述多核苷酸包含与具有选自靶基因序列组的序列的靶基因片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中所述多核苷酸包含具有选自SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的RNA,或为由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码的RNA发夹。在一些实施方案中所述多核苷酸包含一条链具有选自触发因子序列组的序列的dsRNA。在一些实施方案中,本发明提供了一种用于控制植物受叶甲属种类侵扰的方法,其包括使叶甲属种类与有效量的包含双链RNA的溶液接触,其中双链RNA的至少一条链与编码核糖体蛋白的基因或由所述基因转录的RNA的至少21个连续核苷酸互补,其中所述叶甲属种类为马铃薯叶甲,并且其中RNA干扰被诱导并且发生马铃薯叶甲死亡,并且其中所述核糖体蛋白为核糖体L7蛋白或由SEQ ID NO:730编码的蛋白或其中所述双链RNA包含选自SEQ ID NO:989、988、1104或1105的序列;在一些实施方案中,所述溶液还包含选自有机硅表面活性剂或阳离子脂质的一种或多种组分。

[0172] 在一些实施方案中,所述连续核苷酸的序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的等长片段具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同一性或互补性。在一些实施方案中,所述连续核苷酸与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的等

长片段完全(100%)相同或互补。在一些实施方案中,多核苷酸的整体序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的等长片段具有约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%同一性或互补性。在一个实施方案中,多核苷酸包含序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的相应片段具有100%同一性或互补性的至少一个为21个连续核苷酸的片段;在一些实施方案中,所述多核苷酸除包含与靶基因的相应片段具有100%同一性的一个为21个连续核苷酸的片段外,还包含“中性”序列(与靶基因无序列同一性或互补性),因此多核苷酸作为一个整体与靶基因具有低得多的整体序列同一性。

[0173] 用于这种方法中的多核苷酸通常被设计为抑制一个或多个基因(“靶基因”)。术语“基因”是指用于转录物的表达或编码转录物的核酸的任何部分。“基因”可包括但不限于启动子区、5'非翻译区、可包括内含子区的转录物编码区、3'非翻译区或这些区域的组合。在一些实施方案中,靶基因可包括编码或非编码序列或两者。在其它实施方案中,靶基因具有与信使RNA相同或互补的序列,例如,在一些实施方案中靶基因为cDNA。在特定实施方案中,多核苷酸被设计为抑制选自靶基因序列组中标识的基因的一个或多个靶基因。在各个实施方案中,多核苷酸被设计为抑制选自靶基因序列组中标识的基因的一个或多个靶基因,并且可被设计为抑制来自于这个组的多个靶基因,或靶向这些靶基因中的一个或多个的不同区域。在一个实施方案中,多核苷酸包含序列与具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA或靶基因的等长片段具有100%同一性的多个为21个连续核苷酸的片段。在此类情况下,每个片段在大小或序列上可相同或不同,并且相对于靶基因可为有义的或反义的。例如,在一个实施方案中多核苷酸包含呈串联或重复排列的多个片段,其中每个片段包含序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的等长片段具有约95%至约100%同一性的18个或更多个连续核苷酸;所述片段可来自于靶基因的不同区域,例如,所述片段可与靶基因的不同外显子区相对应,并且与靶基因不相对应的“间隔区”核苷酸可任选地用于所述片段之间或附近。

[0174] 用于这种方法中的多核苷酸的总长度可大于18个连续核苷酸,并且可包括除序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的等长片段具有约95%至约100%同一性或互补性的连续核苷酸外的核苷酸。换言之,所述多核苷酸的总长度可大于设计为被抑制选自靶基因序列组中标识的基因的一个或多个靶基因的多核苷酸的所述区段或片段的长度。例如,所述多核苷酸可具有侧接抑制靶基因的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段的“活性”片段的核苷酸,或包括在活性片段之间的“间隔区”核苷酸,或可在5'末端,或在3'末端,或在5'和3'末端两处具有附加核苷酸。在一个实施方案中,所述多核苷酸可包括与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因并非特异性相关(具有不与之互补或相同的序列)的附加核苷酸,例如,提供稳定二级结构或为了方便克隆或生产的核苷酸。在一个实施方案中,所述多核苷酸可包括紧邻序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因的等长片段具有约95%至约100%同一性或互补性的一个或多个为18个或更多个连续核苷酸的片段定位的附加核苷酸。在一个实施方案中,所述多核苷酸包含一个此类片段,具有邻近所述片段的附加5'G或附加3'C或两者。在另一个实施方案中,所述多核苷酸为包含附加核苷酸以形成突出的双链RNA,例如,包含2个脱氧核糖核苷酸以形成3'突出的dsRNA。因此在各个实施方案中,整个多核苷酸的核苷酸序列与选自靶基因序列组中标识的基因的靶基因中的连续核苷酸片段并非100%相同或互补。例如,在一些实施方案中所述多核苷酸包含序列与靶基

因的等长片段具有100%同一性的至少两个各21个连续核苷酸的片段,其中(1)所述至少两个片段被一个或多个间隔区核苷酸分隔开,或(2)所述至少两个片段按不同于具有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA中存在的相应片段的顺序排列。

[0175] 可通过本领域人员已知的适合方式提供用于这种方法中的多核苷酸。实施方案包括其中多核苷酸经化学合成(例如,通过体外转录,如使用T7聚合酶或其它聚合酶转录),通过在微生物中或在细胞培养物(如培养物中生长的植物或昆虫细胞)中表达而生成,通过在植物细胞中表达而生成,或通过微生物发酵生成的实施方案。

[0176] 在一些实施方案中,用于这种方法中的多核苷酸作为分离的DNA或RNA片段提供。在一些实施方案中用于这种方法中的多核苷酸不是表达构建体的一部分而是缺乏附加元件如启动子或终止子序列)。此类多核苷酸可相对较短,如介于约18个至约300个或介于约50个至约500个核苷酸(对于单链多核苷酸而言)或介于约18个至约300个或介于约50个至约500个碱基对(对于双链多核苷酸而言)的单链或双链多核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸为介于约100个至约500个碱基对的dsRNA,如表3、5、8、9和10中公开的任何dsRNA触发因子的长度的dsRNA。实施方案包括其中多核苷酸为包含具有选自SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的片段的dsRNA,或其中多核苷酸是由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码的RNA发夹的实施方案。可选地多核苷酸可在更复杂的构建体中提供,例如,作为重组表达构建体的一部分,或包括在重组载体中,例如在重组植物病毒载体或重组杆状病毒载体中。在一些实施方案中此类重组表达构建体或载体被设计为包括附加元件,如用于表达所关注的基因(例如,杀虫蛋白)的表达盒。

[0177] 在所述方法的各个实施方案中,所述接触包括向叶甲属种类的表面施用包含用于这种方法中的多核苷酸的适合的组合物;此类组合物可,例如作为固体、液体(包括均匀混合物,如溶液和非均匀混合物如混悬液、胶体、胶粒和乳液)、粉剂、混悬液、乳液、喷雾剂、封装或微囊制剂,或在微珠或其它载体微粒中或上,在薄膜或包衣中,或在基质上或内,或作为种子处理剂而提供。所述接触可呈种子处理形式,或呈“种用马铃薯”块茎或块茎块处理的形式(例如,通过将种用马铃薯浸泡、包衣或扑粉)。正如熟悉杀虫剂和种子处理制剂的人员所知,在所述组合物中可任选地包括适合的粘合剂、惰性载体、表面活性剂等。在一些实施方案中,所述接触包括在还包含选自载体剂、表面活性剂、阳离子脂质(如通过引用并入本文的美国专利申请公开2011/0296556的实施例18中公开的阳离子脂质)、有机硅、有机硅表面活性剂、多核苷酸除草分子、非多核苷酸除草分子、非多核苷酸杀虫剂、安全剂和昆虫生长调节剂的一种或多种组分的组合物中提供所述多核苷酸。在实施方案中,所述接触包括在还包含选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的至少一种杀虫剂的组合物中提供所述多核苷酸。在一个实施方案中所述接触包括在可被叶甲属种类摄取或以其它方式内部吸收的组合物中提供所述多核苷酸。

[0178] 预计用于这种方法中的某些多核苷酸(例如,在工作实施例中描述的多核苷酸触发因子)与一种或多种非多核苷酸杀虫剂的组合在叶甲属种类侵扰的预防或控制方面,与用单独的多核苷酸或单独的非多核苷酸杀虫剂获得的效果相比,将导致协同提高。在一个实施方案中,发现含有一种或多种多核苷酸和选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫

蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的一种或多种非多核苷酸杀虫剂的组合物实现了对叶甲属种类侵扰协同提高的预防或控制。

[0179] 选择靶基因的方法

[0180] 本发明的另一方面提供了一种非随机选择RNAi介导的沉默的靶基因的方法。在一个实施方案中,所述方法提供了在特定基因组中以单或低拷贝数(非重复且非冗余)存在的靶基因子集。此类靶基因可为来自于植物基因组的基因或来自于动物基因组的基因。在一些实施方案中,所述靶基因为无脊椎害虫,例如植物的无脊椎害虫或脊椎动物的无脊椎害虫的基因。在一些实施方案中,所述靶基因为植物的昆虫害虫或植物的线虫害虫的基因。在一些实施方案中,所述靶基因为叶甲属种类的基因。另外的方面包括基于通过本文所述的任何方法选择的RNAi介导的沉默的靶基因,生产多核苷酸(例如,ssRNA或dsRNA触发因子,如工作实施例中描述的dsRNA触发因子,或用于生产转基因植物的重组DNA构建体)。

[0181] 在一个实施方案中,所述方法包括鉴定所选基因组中的单或低拷贝数基因,或可选地鉴定来自于相关生物的直系同源数据库中的单或低拷贝数基因以预测所选生物中哪些基因将是单/低拷贝的步骤。选择低拷贝基因,并且尤其是单拷贝基因作为RNAi介导的沉默的靶标。在一个实施方案中,单或低拷贝数基因的鉴定通过来自于第一物种的一组基因与来自于第二物种的一组基因之间的序列比较而进行,其中在第二物种中已经鉴定来自于第二物种的一组基因为单或低拷贝数。在一个实施方案中,单或低拷贝数基因的鉴定通过以下进行:对来自于第一物种的一组基因应用由计算机执行的算法,以鉴定在来自于第一物种的一组基因中的单或低拷贝数基因的子集,然后比较来自于第二物种的一组基因与来自于第一物种的单或低拷贝数基因的子集,以鉴定来自于第二物种的相应单或低拷贝数基因。来自于第二物种的单或低拷贝数基因用作RNAi介导的沉默的靶基因;这些靶基因的序列用于设计多核苷酸(例如,ssRNA或dsRNA触发因子,如工作实施例中描述的dsRNA触发因子,或用于生产转基因植物的重组DNA构建体)及其用于预防或控制受第二物种侵扰的方法。

[0182] 所述方法的实施方案包括估计所选生物群中低/单拷贝基因的核苷酸多样性并选择进一步具有最低核苷酸多样性的那些低/单拷贝基因的另一步骤。选择进一步具有低核苷酸多样性的低/单拷贝基因作为RNAi介导的沉默的靶标。

[0183] 所述方法的实施方案包括比较同义(K_s)与非同义(K_a)核苷酸变化之比作为对功能或进化限制的估计的另一步骤。在一个实施方案中,所述方法包括选择 K_s 至少等于或大于 K_a 的基因的步骤。在一个实施方案中,所述方法包括选择 $K_s \gg K_a$ 的基因的步骤。

[0184] 本发明的一个相关方面是通过本文所述的任何基因选择方法从基因组中鉴定的一组RNAi介导的沉默的靶基因。实施方案涉及通过从来自于基因组的更大一组基因鉴定单或低拷贝数靶基因,而从该基因组中选择的一组RNAi介导的沉默的靶基因。一个实施方案涉及通过从来自于无脊椎动物基因组的更大一组基因鉴定单或低拷贝数靶基因,而从该无脊椎动物基因组选择的一组RNAi介导的沉默的靶基因。特定实施方案涉及通过从来自于叶甲属基因组的较大一组基因鉴定单或低拷贝数靶基因,而从该叶甲属基因组选择的叶甲属种类中的一组RNAi介导的沉默的靶基因。特定实施方案涉及通过从来自于叶甲属基因组的较大一组基因鉴定单或低拷贝数靶基因,而从该叶甲属基因组选择的叶甲属种类中的一组RNAi介导的沉默的靶基因,其中所述一组的序列是由SEQ ID NO:1-725或其DNA互补物组成

的组。

[0185] 本发明的相关方面是利用由SEQ ID NO:1-725或其DNA互补物组成的一组靶基因的方法和组合物。这些包括:(i)一种用于控制植物受叶甲属种类侵扰的方法,其包括使叶甲属种类与多核苷酸接触,所述多核苷酸包含序列与具有选自SEQ ID NO:1-725或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段;(ii)一种用于控制植物受叶甲属种类侵扰的方法,其包括在叶甲属种类的食物中提供包含多核苷酸的试剂,所述多核苷酸具有序列与具有选自SEQ ID NO:1-725或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段,其中所述试剂对由叶甲属种类摄取起作用以抑制叶甲属种类内的生物功能,从而控制叶甲属种类侵扰;(iii)一种在叶甲属种类幼虫中引起死亡或生长受阻的方法,其包括在叶甲属种类幼虫的食物中提供包含与叶甲属种类幼虫的靶基因基本上相同或基本上互补的至少一个沉默元件的至少一种重组RNA,其中所述靶基因选自SEQ ID NO:1-725;(iv)一种提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物的方法,其包括向植物局部施用包含至少一种多核苷酸的组合物,所述多核苷酸具有序列与具有选自SEQ ID NO:1-725或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段;(v)一种用于控制叶甲属种类的组合物,其包含至少一种重组多核苷酸,所述多核苷酸包含与具有选自SEQ ID NO:1-725的序列的DNA的等长片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段;(vi)一种提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物的方法,其包括在植物中表达至少一种多核苷酸,所述多核苷酸包含与具有选自SEQ ID NO:1-725的序列的DNA的等长片段基本上相同或互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段;(vii)一种重组DNA构建体,其包含与DNA可操作地连接的异源启动子,所述DNA包含序列与具有选自SEQ ID NO:1-725或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段;及(viii)一种转基因茄科植物细胞,在其基因组中具有编码抑制靶基因在接触或摄取RNA的叶甲属种类中表达的RNA的重组DNA,其中所述RNA包含与靶基因互补的至少一个沉默元件,并且其中所述靶基因序列为选自SEQ ID NO:1-725或其互补物的序列。

[0186] 另一实施方案涉及选自基因组的一组RNAi介导的沉默的靶基因,选择是通过估计在具有该基因组的物种的一群个体中一组指定基因的核苷酸多样性,并且选择具有最低核苷酸多样性的那些基因实现。一个实施方案涉及选自无脊椎动物基因组的一组RNAi介导的沉默的靶基因,选择是通过估计在具有该基因组的一群无脊椎动物个体中一组指定基因的核苷酸多样性,并且选择具有最低核苷酸多样性的那些基因实现。另一个实施方案涉及选自无脊椎动物基因组的一组RNAi介导的沉默的靶基因,选择是通过估计在具有该基因组的一群无脊椎动物个体中低/单拷贝基因的核苷酸多样性,并且选择具有最低核苷酸多样性的那些低/单拷贝基因实现。

[0187] 另一个实施方案涉及选自基因组的一组RNAi介导的沉默的靶基因,选择是通过比较该基因组的基因中同义(K_s)与非同义(K_a)核苷酸之比变化并且选择 K_s 至少等于或大于 K_a 的基因实现。在一个实施方案中,所述一组RNAi介导的沉默的靶基因是其中 K_s 至少等于或大于 K_a 的基因。在一个实施方案中,所述一组RNAi介导的沉默的靶基因是 $K_s \gg K_a$ 的基因。一个实施方案涉及选自无脊椎动物基因组的一组RNAi介导的沉默的靶基因并且其中对于

所选基因而言 $K_s \gg K_a$ 。

[0188] 在一个实施方案中,单或低拷贝数靶基因是选自来自于第一无脊椎动物物种的较大一组基因的第一无脊椎动物物种的靶基因的子集,其中所述选择是通过在来自于第一无脊椎动物物种的较大一组基因与在第二无脊椎动物物种中已经鉴定为单或低拷贝数的来自于第二无脊椎动物物种的一组基因之间由计算机执行的序列比较实现。在一个特定实施方案中,单或低拷贝数靶基因是从较大一组马铃薯叶甲靶基因选择的马铃薯叶甲靶基因的子集,其中所述选择是通过在较大一组马铃薯叶甲靶基因与在第二无脊椎动物物种中已经鉴定为单或低拷贝数的来自于第二无脊椎动物物种的一组基因之间由计算机执行的序列比较实现。通过所述方法选择的马铃薯叶甲单或低拷贝数靶基因在制备本发明的多核苷酸中特别有用,包括用于(例如)提供对叶甲属种类侵扰具有提高的抗性的植物的重组DNA构建体及用于(例如)制备局部处理植物或叶甲属种类以提供对叶甲属种类侵扰的预防或控制的组合物的分离的重组RNA分子。在一个实施方案中,通过所述方法选择的马铃薯叶甲单或低拷贝数靶基因是具有选自SEQ ID NO:1-725的序列的基因。

[0189] 本发明的另一方面是结合由选自靶基因序列组的序列或序列的片段编码的蛋白质的多克隆或单克隆抗体及结合由选自触发因子序列组或其互补物的序列或序列的片段编码的蛋白质的多克隆或单克隆抗体;此类抗体通过本领域普通技术人员已知的常规方法制备,例如使用“Antibody Methods and Protocols”(Proetzel和Ebersbach编辑,2012, Humana Press, New York)或“Making and Using Antibodies”(Howard和Kaser编辑,2006, CRC Press, Boca Raton)中描述的常规方案。

[0190] 通过“覆瓦(Tiling)”选择有效的多核苷酸

[0191] 用于本文所述实施方案中的多核苷酸无需为全长靶基因,并且在许多实施方案中比靶基因短得多。用于选择有效的多核苷酸的技术的实例为“覆瓦”,或评价与靶基因的相邻或部分重叠片段相对应的多核苷酸。

[0192] 在一些实施方案中,可通过在选定长度的片段中,例如具有(例如)约25个核苷酸的部分重叠区域的长度为200-300个核苷酸的片段中,沿着靶基因的长度为基因靶标“覆瓦”而鉴定有效的多核苷酸触发因子。在一些实施方案中,将多核苷酸触发因子序列设计与靶基因特有的区域相对应(与之具有核苷酸同一性或互补性)。在一些实施方案中,靶基因的选定区域可包括编码序列或非编码序列(例如,启动子区、3'非翻译区、内含子等)或两者的组合。

[0193] 对设计抑制多个靶基因有效的靶标感兴趣时,比对多个靶基因序列并且将多核苷酸触发因子设计为对应于多个靶标间共同具有高序列同源性的区域。相反,对设计选择性抑制多个靶序列中的一个有效的靶标感兴趣时,比对多个靶基因序列并且将多核苷酸触发因子设计为对应于多个靶标间无序列同源性或共同序列同源性较低的区域。

[0194] 有效的多核苷酸选择中的热力学因素

[0195] 在一些实施方案中,可使用热力学因素设计多核苷酸触发因子或优化其序列。例如,可基于热力学控制一条核酸链(例如,多核苷酸触发因子或单独siRNA)与另一条核酸链(例如,靶基因转录物)之间的杂交而选择多核苷酸触发因子。

[0196] 预测可能对RNAi介导的靶基因沉默有效的核苷酸序列的方法和算法在本领域中已知。此类方法和算法的非限制性实例包括Ichihara等(2007)Nucleic Acids Res., 35

(18):123e描述的“i-评分”;在ma.urmc.rochester.edu/servers/oligowalk上公开可用且Lu等(2008)*Nucleic Acids Res.*,36:W104-108描述的“步移法(Oligowalk)”;及Khovorova等(2004)*Nature Biotechnol.*,22:326-330描述的“雷诺兹评分(Reynolds score)”。

[0197] 容许的错配

[0198] 所谓“基本上相同”或“基本上互补”意指多核苷酸(或双链多核苷酸的至少一条链)与靶基因或由靶基因转录的RNA(例如,转录物)具有足够同一性或互补性以抑制靶基因的表达(例如,实现靶基因转录物和/或编码的蛋白质的水平或活性降低)。如本文所述的多核苷酸无需与靶基因或由靶基因转录的RNA具有100%同一性或互补性才能抑制靶基因的表达(例如,实现靶基因转录物和/或编码的蛋白质的水平或活性降低,或提供对叶甲属种类的控制)。在一些实施方案中,多核苷酸或其一部分被设计为与靶基因或由靶基因转录的RNA中为至少18个或19个连续核苷酸的序列基本上相同或基本上互补。在一些实施方案中多核苷酸或其一部分被设计为与靶基因或由靶基因转录的RNA中一个或多个为21个连续核苷酸的序列100%相同或100%互补。在某些实施方案中,“基本上相同”的多核苷酸与内源靶基因或由所述靶基因转录的RNA中为18个或更多个连续核苷酸的序列比较时,具有100%序列同一性或至少约83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列同一性。在某些实施方案中,“基本上互补”的多核苷酸与靶基因或由所述靶基因转录的RNA中为18个或更多个连续核苷酸的序列比较时,具有100%序列互补性或至少约83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%序列互补性。

[0199] 在本文所述组合物和方法的某些实施方案中可以使用含有与靶基因或转录物的错配的多核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸包括与靶基因或靶基因的转录物中的等长片段基本上相同或基本上互补的至少18个或至少19个或至少21个连续核苷酸。在某些实施方案中,与靶基因或靶基因的转录物中的等长片段基本上相同或基本上互补的21个或更多个连续核苷酸的多核苷酸可与靶基因或转录物具有1个或2个错配(即,在多核苷酸的21个连续核苷酸与靶基因或靶基因的转录物中的等长片段之间具有1个或2个错配)。在某些实施方案中,含有与靶基因或靶基因的转录物中的等长片段相同或互补的连续21核苷酸跨度,为约50、100、150、200、250、300、350个或更多个核苷酸的多核苷酸可与靶基因或转录物具有1个或2个错配。

[0200] 在设计与内源靶基因或由所述靶基因转录的RNA具有错配的多核苷酸时,可以使用某些类型和在某些位置很可能容忍的错配。在某些实施方案中,如Du等(2005)*Nucleic Acids Res.*,33:1671-1677所述,使用在腺嘌呤和胞嘧啶或鸟嘌呤核苷和尿嘧啶残基之间形成的错配。在一些实施方案中,如Du等(2005)*Nucleic Acids Res.*,33:1671-1677所述,19个碱基对的重叠区域中的错配位于低容忍位置5、7、8或11(从19-核苷酸靶标的5'末端开始)、中等容忍位置3、4和12-17(从19-核苷酸靶标的5'末端开始)和/或在互补区域末端的高容忍位置,即位置1、2、18和19(从19-核苷酸靶标的5'末端开始)。可在常规测定中,例如在对叶甲属种类幼虫的体外食物测定中由经验确定容忍的错配。

[0201] 在中性序列中嵌入沉默元件

[0202] 在一些实施方案中,包含与靶基因相对应的序列并且是造成所观察到的靶基因抑制的原因的沉默元件嵌入“中性”序列中,即插入与靶基因无序列同一性或互补性的附加核苷酸中。中性序列可以是合意的,例如,以增加多核苷酸的总长度。例如,出于稳定性、生产

的成本有效性或生物活性原因,对于多核苷酸而言具有特定大小是合意的。在一些实施方案中,中性序列也用于在发夹触发因子中形成环或作为触发区域之间的间隔区。

[0203] 已有报道称在另一鞘翅目种类(玉米根虫(*Diabrotica virgifera*))中,在人工食物生物测定中,对于生物活性而言需要大于或等于大约60个碱基对的(bp)的dsRNA;参见Bolognesi等(2012)PLoS ONE 7(10):e47534.doi:10.1371/journal.pone.0047534。因此,在一个实施方案中,与表1中的靶基因相对应并且发现提供了对叶甲属种类侵扰的控制的21-碱基对dsRNA沉默元件嵌入附加39个碱基对的中性序列中,从而形成了约60个碱基对的多核苷酸。在一些实施方案中,dsRNA触发因子包括介于约60个至约500个,或介于约100个至约450个碱基对的中性序列,其中嵌入序列与具有选自SEQ ID NO:1-725和SEQ ID NO:726-830及SEQ ID NO:1087-1094的序列的靶基因的等长片段具有100%同一性或100%互补性的至少一个为21个连续核苷酸的片段。在另一个实施方案中,发现序列与靶基因的等长片段具有100%同一性或100%互补性的单个21-碱基对沉默元件在嵌入中性序列的较大区段中时有效,例如,其中多核苷酸总长度为约60个至约300个碱基对。在另一个实施方案中,选自:SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的序列的至少一个为至少21个连续核苷酸的片段嵌入中性序列的较大区段中以提供有效多核苷酸。在另一个实施方案中,来自于选自:SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其互补物的多个序列的片段(或来自于一个或多个序列的片段的多个拷贝)嵌入中性序列的较大区段中以提供有效的多核苷酸。在多核苷酸包括中性序列区域的实施方案中,多核苷酸与靶基因相比将具有相对较低的整体序列同一性;例如,总长度为210个碱基对、含有嵌入中性序列的附加189个碱基对中的单个21-碱基对触发因子(或与靶基因的21-核苷酸片段具有100%同一性或互补性)的dsRNA将与靶基因具有约10%的整体序列同一性。

[0204] 杀虫双链RNA分子

[0205] 本发明的另一方面提供了当被所述叶甲属种类摄取或接触时在叶甲属种类中引起死亡或生长受阻的杀虫双链RNA分子,其中所述杀虫双链RNA分子包含与具有选自靶基因序列组的序列的靶基因或DNA(cDNA)的等长片段基本上相同或基本上互补的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。在一些实施方案中,杀虫双链RNA分子的长度介于约50至约500个碱基对之间。在一些实施方案中,杀虫双链RNA分子包含长度为至少30个连续核苷酸的至少一个片段。在一些实施方案中,杀虫双链RNA分子包含与具有选自靶基因序列组的序列的靶基因或DNA(cDNA)的等长片段基本上相同或基本上互补的多个为18个或更多个连续核苷酸的片段,其中所述片段来自于靶基因的不同区域(例如,所述片段可与靶基因的不同外显子区相对应,并且与靶基因不相对应的“间隔区”核苷酸可任选地用于所述片段之间或附近),或来自于不同靶基因。在一些实施方案中,杀虫双链RNA分子包含与具有选自靶基因序列组的序列的靶基因或DNA(cDNA)的等长片段基本上相同或基本上互补的多个为18个或更多个连续核苷酸的片段,其中所述片段来自于靶基因的不同区域并且在杀虫双链RNA分子中按不同于靶基因中片段天然存在的顺序排列。在一些实施方案中,杀虫双链RNA分子包含序列与具有选自靶基因序列组的序列的靶基因或DNA(cDNA)的等长片段具有100%同一性或100%互补性的多个各21个连续核苷酸的片段,其中所述片段来自于靶基因的不同区域并且在杀虫双链RNA分子中按不同于靶基因中片段天然存在的顺序排列。在一些实施方案中,杀虫双链RNA分子包含含有选自:SEQ ID NO:831-1085、1095-1104和1110-1114或其

互补物的序列的一条链,或包含由选自SEQ ID NO:1105-1109的序列编码的RNA发夹。在一些实施方案中,杀虫双链RNA包含一条链具有选自触发因子序列组的序列的dsRNA。可向植物,尤其是茄科植物如番茄、茄子或马铃薯局部施用杀虫双链RNA分子,以控制或预防受叶甲属种类侵扰。杀虫双链RNA分子可以适于由叶甲属种类摄食或直接接触的形式,例如以喷雾剂或粉剂或饵料的形式提供。提供杀虫双链RNA分子的其它方法和适合的组合物与前面本发明其它方面的段落中描述的类似。

[0206] 几个实施方案涉及包含一种或多种杀虫多核苷酸和水或其它溶剂,任选地包括阳离子脂质或有机硅表面活性剂或两者的罐混合物。实施方案包括多核苷酸和选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的任选至少一种杀虫剂的罐混合物制剂。此类组合物的实施方案包括其中一种或多种杀虫多核苷酸在活体或死亡微生物如细菌或真菌或酵母细胞中提供,或作为微生物发酵产物提供,或在活体或死亡植物细胞中提供,或作为合成重组多核苷酸提供的实施方案。在一个实施方案中所述组合物包括含有如本文所述的多核苷酸的非致病微生物菌株;摄取或摄入所述微生物导致叶甲属种类生长受阻或死亡;适合的微生物的实例包括大肠杆菌(*E. coli*)、苏云金芽孢杆菌、假单胞菌属种类(*Pseudomonas sp.*)、发光杆菌、致病杆菌、嗜虫沙雷氏菌(*Serratia entomophila*)和相关沙雷氏菌属种类(*Serratia sp.*)、球形芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)、侧孢芽孢杆菌、日本金龟子芽孢杆菌(*B. popilliae*)、双酶梭状芽孢杆菌(*Clostridium bif fermentans*)和其它梭菌属种类或其它形成孢子的革兰氏阳性细菌。在一个实施方案中,所述组合物包括植物病毒载体,其包含如本文所述的多核苷酸;叶甲属种类以经所述植物病毒载体处理的植物为食导致叶甲属种类生长受阻或死亡。在一个实施方案中,所述组合物包括杆状病毒载体,其包括如本文所述的多核苷酸;摄取或摄入所述载体导致叶甲属种类生长受阻或死亡。在一个实施方案中,如本文所述的多核苷酸封装在合成基质如聚合物中或附着于微粒上并局部施用到植物的表面;叶甲属种类以经局部处理的植物为食导致叶甲属种类生长受阻或死亡。在一个实施方案中,如本文所述的多核苷酸以表达所述多核苷酸的植物细胞(例如,本发明的转基因茄科植物细胞)的形式提供;叶甲属种类摄取所述植物细胞或所述植物细胞的内容物导致叶甲属种类生长受阻或死亡。

[0207] 在一些实施方案中,为本文所述的一种或多种多核苷酸提供有效叶面覆盖所需的适当粘着剂和湿润剂以及UV保护剂以保护多核苷酸如dsRNA免受UV损伤。此类添加剂常用于生物杀虫剂工业中并且为本领域技术人员已知。供土壤施用的组合物可包括用作叶甲属种类幼虫的饵料的颗粒制剂。在一些实施方案中,还为本文所述的一种或多种多核苷酸提供有载体剂、表面活性剂、阳离子脂质(如通过引用并入本文的美国专利申请公开2011/0296556的实施例18中公开的阳离子脂质)、有机硅、有机硅表面活性剂、多核苷酸除草分子、非多核苷酸除草分子、非多核苷酸杀虫剂、安全剂和昆虫生长调节剂。在一些实施方案中,所述组合物还包括选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的至少一种杀虫剂。

[0208] 以任何便利方式,例如通过直接向叶甲属种类喷洒或扑粉,或向其中需要预防或控制受该类叶甲属种类侵扰的植物或环境喷洒或扑粉,或通过向植物表面施用包衣,或通

过准备下种的种子(或种用马铃薯)施用包衣,或通过在需要预防或控制受该类叶甲属种类侵扰的植物根部周围施用土壤浇灌剂而施用此类组合物。

[0209] 如本文所述的多核苷酸的有效量是足以提供对叶甲属种类的控制,或预防受叶甲属种类侵扰的量;多核苷酸的有效量的确定是使用常规测定如实施例5和6中描述的测定而进行的。虽然可用于本文提供的方法和组合物中的杀虫多核苷酸的浓度和剂量没有上限,但是为了效率和经济通常将寻找更低的有效浓度和剂量。多核苷酸的有效量的非限制性实施方案包括约10ng/ml至约100 μ g/ml呈液体形式喷洒在植物上的多核苷酸,或约10mg/英亩至约100g/英亩向植物田间施用的多核苷酸,或约0.001至约0.1mg/ml于饲养叶甲属种类的人工食物中的多核苷酸的范围。当向植物局部施用如本文所述的多核苷酸时,考虑到向植物叶片或其它植物部分表面,如花瓣、茎、块茎、果实、花粉囊、花粉、叶片、根或种子施用的喷雾或处理剂的体积,可以调节浓度。在一个实施方案中,使用如本文所述的25-mer多核苷酸对草本植物有用的处理剂为每株植物约1毫微摩尔(nmol)多核苷酸,例如每株植物约0.05至1nmol多核苷酸。草本植物的其它实施方案包括每株植物约0.05至约100nmol,或约0.1至约20nmol,或约1nmol至约10nmol多核苷酸的有用范围。在某些实施方案中,施用约40至约50nmol的ssDNA多核苷酸。在某些实施方案中,施用约0.5nmol至约2nmol的dsRNA。在某些实施方案中,施用含有约0.5至约2.0mg/ml或约0.14mg/ml的dsRNA或ssDNA(21-mer)的组合物。在某些实施方案中,施用约0.5至约1.5mg/ml的本发明约50个至约200个或更多个核苷酸的dsRNA多核苷酸的组合物。在某些实施方案中,向植物施用约1nmol至约5nmol的本发明的dsRNA。在某些实施方案中,向植物局部施用的多核苷酸组合物含有浓度为约0.01至约10mg/ml,或约0.05至约2mg/ml,或约0.1至约2mg/ml的本发明的至少一种多核苷酸。非常大的植物、树或蔓生植物可能需要相应更大量的多核苷酸。当使用本发明的可以加工成多个寡核苷酸(例如,由本发明的重组DNA单分子编码的多个触发因子)的长dsRNA分子时,可以使用较低浓度。有效的多核苷酸处理方案的非限制性实例包括每株植物约0.1至约1nmol多核苷酸分子,或每株植物约1nmol至约10nmol多核苷酸分子,或每株植物约10nmol至约100nmol多核苷酸分子的处理。

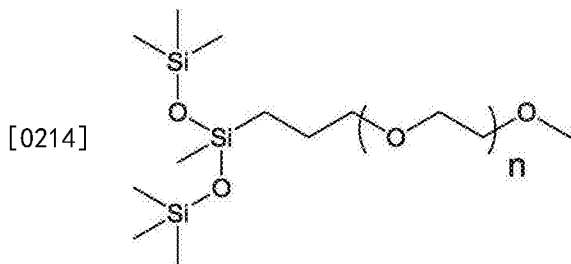
[0210] 在一些实施方案中,为一种或多种多核苷酸提供有“转移剂”,这是使得局部施用的多核苷酸能够进入生物体的细胞的试剂。此类转移剂可并入作为包含本文所述的多核苷酸的组合物的一部分,或在施用所述多核苷酸之前、同时或之后施用。在一些实施方案中,转移剂是提高叶甲属种类对本发明的多核苷酸的摄入量的试剂。在一些实施方案中,转移剂是调节植物组织,例如种子、叶片、茎、根、花或果实的表面以使多核苷酸渗入植物细胞的试剂。在一些实施方案中,转移剂使得多核苷酸通过表皮蜡屏障、气孔和/或细胞壁或膜屏障进入植物细胞的通道成为可能。

[0211] 适合的转移剂包括增加生物体外部渗透性或增加生物体细胞对多核苷酸的渗透性的试剂。适合的转移剂包括化学剂或物理剂或其组合。用于调节或转移的化学剂包括(a)表面活性剂,(b)有机溶剂或有机溶剂的水溶液或含水混合物,(c)氧化剂,(d)酸,(e)碱,(f)油,(g)酶或其任何组合。在一些实施方案中,多核苷酸和转移剂的施用任选地包括孵育步骤、中和步骤(例如,中和酸、碱或氧化剂,或使酶灭活)、冲洗步骤或其组合。适合的转移剂可以呈乳液、反相乳液、脂质体或其它胶束样组合物的形式,或可以使多核苷酸呈乳液、反相乳液、脂质体或其它胶束样组合物的形式。转移剂的实施方案包括反离子或已知会与

核酸分子缔合的其它分子,例如无机铵离子、烷基铵离子、锂离子、聚胺(如精胺、亚精胺或腐胺)和其它阳离子。转移剂的实施方案包括有机溶剂如DMSO、DMF、吡啶、N-吡咯烷、六甲基磷酰胺、乙腈、二噁烷、聚丙二醇或可与水混合或使磷酸核苷酸溶于非水体系(如用于合成反应中)的其它溶剂。转移剂的实施方案包括有或无表面活性剂或乳化剂的天然或合成油,例如植物来源的油、作物油(如herbicide.adjuvants.com在线公开可用的第9版《除草剂佐剂纲要》(Compendium of Herbicide Adjuvants)中列出的那些)、石蜡油、多元醇脂肪酸酯或具有经酰胺或多胺(如聚乙烯亚胺或N-吡咯烷)修饰的短链分子的油。

[0212] 转移剂的实施方案包括有机硅制剂。例如,适合的转移剂是以SILWETL-77®牌表面活性剂商购的有机硅制剂,该表面活性剂具有CAS编号27306-78-1和EPA编号:CAL.REG.NO.5905-50073-AA,并且目前可从Momentive Performance Materials,Albany,New York获得。一个实施方案包括包含多核苷酸和转移剂的组合物,转移剂包括有机硅制剂,如在按重量计约0.015至约2%(wt%)的范围内(例如,约0.01、0.015、0.02、0.025、0.03、0.035、0.04、0.045、0.05、0.055、0.06、0.065、0.07、0.075、0.08、0.085、0.09、0.095、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.5wt%)的Silwet L-77。一个实施方案包括包含本发明的多核苷酸和转移剂的组合物,转移剂包括在按重量计约0.3至约1%(wt%)或按重量计约0.5至约1%(wt%)的范围内的SILWETL-77®牌表面活性剂。

[0213] 用作用于本发明中的转移剂的有机硅化合物包括但不限于包括以下的化合物:(a)与之共价连接的三硅氧烷头基,(b)烷基接头,包括但不限于与之共价连接的正丙基接头,(c)与之共价连接聚二醇链,(d)端基。此类有机硅化合物的三硅氧烷头基包括但不限于七甲基三硅氧烷。烷基接头可包括但不限于正丙基接头。聚二醇链包括但不限于聚乙二醇或聚丙二醇。聚二醇链可以包含提供约“7.5”的平均链长“n”的混合物。在某些实施方案中,平均链长“n”可在约5至约14之间变化。端基可包括但不限于烷基如甲基。用作转移剂的有机硅化合物包括但不限于三硅氧烷乙氧基化物表面活性剂或聚醚改性七甲基三硅氧烷。用于本发明中的转移剂的实例为化合物I:



[0215] (化合物I:聚醚七甲基三硅氧烷,平均 $n=7.5$)。

[0216] 用作转移剂的有机硅化合物,例如以按重量计在约0.015至约2%(wt%)范围内(例如,约0.01、0.015、0.02、0.025、0.03、0.035、0.04、0.045、0.05、0.055、0.06、0.065、0.07、0.075、0.08、0.085、0.09、0.095、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.5wt%)的新制浓度使用。

[0217] 转移剂的实施方案包括一种或多种盐如氯化铵、四丁基溴化磷和硫酸铵,在包括多核苷酸的组合物中提供或与其一起使用。在一些实施方案中,氯化铵、四丁基溴化磷和/或硫酸铵以约0.5%至约5%(w/v),或约1%至约3%(w/v),或约2%(w/v)的浓度使用。在某

些实施方案中,包括多核苷酸的组合物包括浓度大于或等于300毫摩尔的铵盐。在某些实施方案中,包括多核苷酸的组合物包括浓度按重量计为约0.015至约2%(wt%)的有机硅转移剂以及浓度为约80至约1200mM或约150mM至约600mM的硫酸铵。

[0218] 转移剂的实施方案包括磷酸盐。用于包括多核苷酸的组合物中的磷酸盐包括但不限于磷酸钙盐、磷酸镁盐、磷酸钾盐或磷酸钠盐。在某些实施方案中,包括多核苷酸的组合物包括浓度为至少约5毫摩尔、至少约10毫摩尔或至少约20毫摩尔的磷酸盐。在某些实施方案中,包括多核苷酸的组合物包括在约1mM至约25mM的范围内或在约5mM至约25mM的范围内的磷酸盐。在某些实施方案中,包括多核苷酸的组合物包括浓度为至少约5毫摩尔、至少约10毫摩尔或至少约20毫摩尔的磷酸钠。在某些实施方案中,包括多核苷酸的组合物包括浓度为约5毫摩尔、约10毫摩尔或约20毫摩尔的磷酸钠。在某些实施方案中,包括多核苷酸的组合物包括在约1mM至约25mM的范围内或在约5mM至约25mM的范围内的磷酸钠盐。在某些实施方案中,包括多核苷酸的组合物包括在约10mM至约160mM的范围内或在约20mM至约40mM的范围内的磷酸钠盐。在某些实施方案中,包括多核苷酸的组合物包括pH为约6.8的磷酸钠缓冲液。

[0219] 转移剂的实施方案包括表面活性剂和/或其中所含的有效分子。表面活性剂和/或其中所含的有效分子包括但不限于脂肪酸(如牛脂或牛脂胺或磷脂)的钠盐或锂盐和有机硅表面活性剂。在某些实施方案中,包括多核苷酸的组合物配制有反离子或已知会与核酸分子缔合的其它分子。非限制性实例包括四烷基铵离子、三烷基铵离子、铊离子、锂离子和聚胺(如精胺、亚精胺或腐胺)。在某些实施方案中,包括多核苷酸的组合物配制有非多核苷酸除草剂,例如草甘膦(glyphosate)、类生长素(auxin)苯甲酸除草剂(包括麦草畏(dicamba)、草灭平(chloramben)和TBA)、草铵膦(glufosinate)、类生长素除草剂(包括苯氧羧酸除草剂、吡啶羧酸除草剂、喹啉羧酸除草剂、嘧啶羧酸除草剂和草除灵乙酯(benzazolin-ethyl)除草剂)、硫酰脲类、咪唑啉酮类、溴苯腈(bromoxynil)、茅草枯(delapon)、环己二酮(cyclohexanedione)、原卟啉原氧化酶抑制剂和4-羟苯基-丙酮酸双加氧酶抑制类除草剂。在某些实施方案中,包括多核苷酸的组合物配制有非多核苷酸杀虫剂,例如马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白。在一些实施方案中,包括多核苷酸和非多核苷酸杀虫剂的组合物在叶甲属种类侵扰的预防或控制方面,与用单独的多核苷酸或单独的非多核苷酸杀虫剂获得的效果相比,提供了协同提高。在一些实施方案中,包含一条链具有选自触发因子序列组的序列的双链RNA的组合物与非多核苷酸杀虫剂(例如,马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白)组合,其中发现所述组合与用单独的双链RNA或单独的非多核苷酸杀虫剂相比时,实现了对叶甲属种类侵扰协同提高的预防或控制。

[0220] 相关技术

[0221] 如本文所述的多核苷酸和核酸分子的实施方案可包括附加元件,如启动子、小RNA识别位点、适配子或核酶、附加和用于表达编码序列(例如,表达转基因如杀虫蛋白或选择标记)或非编码序列(例如,表达附加抑制元件)的附加表达盒。例如,本发明的一个方面提供了一种重组DNA构建体,其包含与DNA可操作地连接的异源启动子,所述DNA包含序列与具

有选自靶基因序列组或其DNA互补物的序列的DNA的等长片段具有约95%至约100%同一性的至少一个为18个或更多个连续核苷酸的片段。本发明的另一个方面提供了一种重组DNA构建体,其包含与DNA可操作地连接的异源启动子,所述DNA编码具有序列或序列的片段选自触发因子序列组的反义区的RNA发夹。在另一个实施方案中,包含与DNA可操作地连接的启动子的重组DNA构建体,所述DNA编码:(a)抑制选自表1中标识的基因的靶基因的RNA沉默元件,和(b)适配子,稳定整合到植物基因组中,从所述基因组中包括RNA适配子和RNA沉默元件在内的RNA转录物在植物细胞中表达;所述适配子用于将RNA沉默元件导向细胞中的所需位置。在另一个实施方案中,包括供小RNA(例如,仅在特定细胞或组织中表达的miRNA或siRNA)结合和裂解的一个或多个识别位点在植物中允许更精确的表达模式,其中当小RNA表达时,重组DNA构建体的表达受抑制。下面描述了此类附加元件。

[0222] 启动子

[0223] 用于本发明中的启动子在旨在转录所述构建体的细胞中有功能性。通常这些启动子为异源启动子,正如用于重组构建体中那样,即,实际上未发现它们与用于本文所述的构建体中的其它核酸元件可操作地连接。在各个实施方案中,所述启动子选自组成型启动子、空间特异性启动子、时间特异性启动子、发育特异性启动子和诱导型启动子。在许多实施方案中所述启动子是在植物中有功能性的启动子,例如,pol II启动子、pol III启动子、pol IV启动子或pol V启动子。

[0224] 适合与本发明的重组DNA构建体一起使用的非组成型启动子包括空间特异性启动子、时间特异性启动子和诱导型启动子。空间特异性启动子可包括细胞器、细胞、组织或器官特异性启动子(例如,分别用于在质体、根、花粉或种子中表达的质体特异性、根特异性、花粉特异性或种子特异性启动子)。在许多情况下种子特异性、胚特异性、糊粉特异性或胚乳特异性启动子尤其有用。时间特异性启动子可包括倾向于在植物生长周期的某些发育阶段期间,或在白天或夜晚的不同时间期间,或在一年的不同季节促进表达的启动子。诱导型启动子包括受化学药品或环境条件,例如但不限于,生物或非生物胁迫(例如,缺水或干旱、炎热、寒冷、高或低营养或盐水平、高或低光照水平或害虫或病原体感染)诱导的启动子。微RNA启动子有用,尤其是具有时间特异性、空间特异性或诱导型表达模式的那些微RNA启动子;在通过引用明确并入本文的美国专利申请公开2006/0200878、2007/0199095和2007/0300329中提供了miRNA启动子的实例,以及鉴定具有特异性表达模式的miRNA启动子的方法。表达特异性启动子还可包括通常组成型表达,但是表达的程度或“强度”不同的启动子,包括通常被视为“强启动子”或“弱启动子”的启动子。

[0225] 特别感兴趣的启动子包括以下实例:从土壤杆菌(*Agrobacterium*)的T-DNA分离的乳白合酶(opaline synthase)启动子;花椰菜花叶病毒35S启动子;增强启动子元件或嵌合启动子元件,如连接到增强子元件(来自玉米(*Zea mays*)的热休克蛋白70的内含子)上的增强花椰菜花叶病毒(CaMV)35S启动子;根特异性启动子,如美国专利5,837,848、6,437,217和6,426,446中描述的根特异性启动子;美国专利6,433,252中公开的玉米L3油质蛋白启动子;美国专利申请公开2004/0216189中公开的编码质体定位醛缩酶的植物核基因的启动子;美国专利6,084,089中公开的低温诱导型启动子;美国专利号6,140,078中公开的盐诱导型启动子;美国专利6,294,714中公开的光诱导型启动子;美国专利6,252,138中公开的病原体诱导型启动子;以及美国专利申请公开2004/0123347 A1中公开的缺水诱导型启动

子。所有上述公开了启动子及其作用(尤其在植物中具有功能性的重组DNA构建体中)的专利和专利公开通过引用并入本文。

[0226] 感兴趣的植物维管或韧皮部特异性启动子包括发根土壤杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)的rolC或rolA启动子、根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)T-DNA基因5的启动子、水稻蔗糖合酶RSs1基因启动子、鸭跖草(*Commelina*)黄化斑驳杆状DNA病毒启动子、椰子叶腐烂病毒启动子、水稻东格鲁杆状病毒(*tungro bacilliform virus*)启动子、豌豆谷氨酰胺合酶GS3A基因的启动子、土豆转化酶基因的invCD111和invCD141启动子、Kertbundit等(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88:5212-5216证明在烟草中具有韧皮部特异表达的从拟南芥(*Arabidopsis*)分离的启动子、VAHOX1启动子区、豌豆细胞壁转化酶基因启动子、来自胡萝卜的酸性转化酶基因启动子、硫转运蛋白基因Sultr1;3的启动子、植物蔗糖合酶基因的启动子和植物蔗糖转运蛋白基因的启动子。

[0227] 适合与本发明的重组DNA构建体或多核苷酸一起使用的启动子包括聚合酶II (“pol II”)启动子和聚合酶III (“pol III”)启动子。RNA聚合酶II转录通常在长度上短于400个核苷酸的结构或催化RNA,并且将一串简单的T残基识别为终止信号;其已经用于转录siRNA双链体(参见,例如, Lu等(2004)Nucleic Acids Res., 32:e171)。因此在要由本发明的重组DNA构建体生成短RNA转录物的某些实施方案中是Pol II启动子。在一个实施方案中,重组DNA构建体包含pol II启动子以表达由自我裂解的核酶序列(例如,自我裂解的锤头状核酶)侧接的RNA转录物,导致经加工的RNA,如与叶甲属靶基因的转录物结合的单链RNA,具有限定的5'和3'末端,无潜在干扰性侧翼序列。替代方法使用pol III启动子以生成具有相对限定的5'和3'末端的转录物,即转录具有最小5'和3'侧翼序列的RNA。在一些实施方案中,Pol III启动子(例如,U6或H1启动子)是用于添加富含AT的短转录终止位点,其在转录的RNA中产生2个碱基对的突出(UU);例如,对于siRNA类构建体的表达而言,这是有用的。已经报道了pol III启动子用于驱动siRNA构建体的表达的用途;参见van de Wetering等(2003)EMBO Rep., 4:609-615和Tuschl(2002)Nature Biotechnol., 20:446-448。杆状病毒启动子如杆状病毒多角体蛋白和p10启动子在本领域中已知并且可商购;参见,例如, Invitrogen的“Guide to Baculovirus Expression Vector Systems(BEVS)and Insect Cell Culture Techniques”, 2002(Life Technologies, Carlsbad, CA)和F. J. Haines等“Baculovirus Expression Vectors”, 未标日期(Oxford Expression Technologies, Oxford, UK)。

[0228] 启动子元件可以包括并非天然存在的启动子或启动子元件或其同源物,但是可以调节基因的表达的核酸序列。此类“基因独立的”调控序列的实例包括含配体结合区或适配子(参见下面的“适配子”)和调控区(其可为顺式作用)的天然存在或人工设计的RNA序列。参见,例如, Isaacs等(2004)Nat. Biotechnol., 22:841-847; Bayer和Smolke(2005)Nature Biotechnol., 23:337-343; Mandal和Breaker(2004)Nature Rev. Mol. Cell Biol., 5:451-463; Davidson和Ellington(2005)Trends Biotechnol., 23:109-112; Winkler等(2002)Nature, 419:952-956; Sudarsan等(2003)RNA, 9:644-647; 及Mandal和Breaker(2004)Nature Struct. Mol. Biol., 11:29-35。此类“核糖核酸调节子(ribo regulator)”可以对特定的空间或时间特异性进行选择或设计,例如,以仅在给定浓度的适当配体存在(或不存在)的情况下调节编码抑制叶甲属靶基因的沉默元件的DNA的翻译。一个实例是响应在

胁迫下(例如,非生物胁迫,如水、温度或营养胁迫;或者生物胁迫,如被害虫或病原体袭击)时植物产生的内源性配体(例如茉莉酸或水杨酸)的核糖核酸调节子;在胁迫下,内源性配体的水平增加到足以使核糖核酸调节子开始转录编码抑制叶甲属靶基因的沉默元件的DNA的水平。

[0229] 重组酶位点

[0230] 在一些实施方案中,本发明的重组DNA构建体或多核苷酸包含编码一个或多个位点特异性重组酶识别位点的DNA。在一个实施方案中,重组DNA构建体包含至少一对loxP位点,其中介于loxP位点之间的DNA的位点特异性重组由Cre重组酶介导。选择loxP位点的位置和相对方向以实现所需重组;例如,当loxP位点在相同方向上时,以环状形式切除介于loxP位点之间的DNA。在另一个实施方案中,重组DNA构建体包含编码一个loxP位点的DNA;在Cre重组酶和具有loxP位点的另一个DNA的存在下,两个DNA重组。

[0231] 适配子

[0232] 在一些实施方案中,本发明的重组DNA构建体或多核苷酸包含加工成RNA适配子的DNA,即,通过并非主要基于沃森-克里克碱基配对(Watson-Crick base-pairing)(相反,例如,基于互补、反向平行核酸链之间发生的碱基配对以形成双链核酸结构)的结合机制与配体结合的RNA。参见,例如,Ellington和Szostak(1990)Nature, 346:818-822。例如,aptamer.icmb.utexas.edu上在线可用的公开适配子数据库(Aptamer Database)中可以找到适配子的实例(Lee等(2004)Nucleic Acids Res., 32(1):D95-100)。然而,用于本发明的适配子可为单价(结合单个配体)或多价(结合一个以上的单独配体,例如,结合两个或更多个配体的一个单元)。

[0233] 用于本发明的配体包括可以被核酸二级结构通过并非主要基于沃森-克里克碱基配对的机制识别并结合的任何分子(或分子的一部分)。这样,配体和适配子的识别和结合类似于抗原和抗体,或生物效应子和受体的识别和结合。配体可包括单个的分子(或分子的一部分)或两个或更多个分子的组合(或分子的多个部分),并且可包括一个或多个大分子复合物(例如,聚合物、脂质双层、脂质体、细胞膜或其它细胞结构,或细胞表面)。特异性配体的实例包括维生素(如辅酶B₁₂和焦磷酸硫胺素)、黄素单核苷酸、鸟嘌呤、腺苷、S-腺苷甲硫氨酸、S-腺苷高半胱氨酸、辅酶A、赖氨酸、酪氨酸、多巴胺、葡糖胺-6-磷酸、咖啡因、茶碱、抗生素(如氯霉素(chloramphenicol)和新霉素(neomycin))、除草剂(如草甘膦和麦草畏)、蛋白质(包括病毒或噬菌体外壳蛋白和无脊椎动物表皮或消化道表面蛋白)及RNA(包括病毒RNA、转运RNA(t-RNA)、核糖体RNA(rRNA))和RNA聚合酶(如RNA依赖性RNA聚合酶(RdRP))。用于本发明的一类RNA适配子是不结合配体但是具热响应性的“热敏开关(thermoswitch)”,就是说,适配子的构象由温度决定;参见,例如,Box 3 in Mandal and Breaker(2004)Nature Rev.Mol.Cell Biol., 5:451-463。

[0234] 转基因转录单元

[0235] 在一些实施方案中,本发明的重组DNA构建体或多核苷酸包含转基因转录单元。转基因转录单元包含编码所关注的基因,例如天然蛋白或异源蛋白的DNA序列。所关注的基因可为来自于任何物种(包括但不限于非真核生物如细菌和病毒;真菌、原生生物、植物、无脊椎动物和脊椎动物)的任何编码或非编码序列。特定所关注的基因是编码选自马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋

白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白的至少一种杀虫剂的基因。转基因转录单元还可根据转基因转录的需要而包括5'或3'序列或两者。

[0236] 内含子

[0237] 在一些实施方案中,本发明的重组DNA构建体或多核苷酸包含编码可剪接内含子的DNA。所谓“内含子”通常意指位于外显子(DNA或相应转录的RNA的蛋白质编码片段)之间的DNA片段(或由此类片段转录的RNA),其中,在信使RNA成熟期间,存在的内含子经酶促“剪接掉”或通过真核生物的细胞核中发生的裂解/连接过程从RNA链中去除。术语“内含子”也应用于转录为可以从成熟RNA转录物中剪接掉的RNA片段,但并非是在蛋白质编码外显子之间发现的内含子的非编码DNA序列。这些的一个实例为具有增强下游编码序列在植物中(在一些情况下,尤其是在单子叶植物中)的表达的能力的可剪接序列;这些可剪接序列自然地位于一些植物基因的5'非翻译区以及一些病毒基因中(例如,Gallie和Walbot(1992) *Nucleic Acids Res.*,20:4631-4638描述为增强在植物基因中的表达的烟草花叶病毒5'前导序列或“ ω ”前导序列)。这些可剪接序列或“表达增强内含子”可人工插入植物基因介于启动子之间但是在任何蛋白质编码外显子之前的5'非翻译区内。此类表达增强内含子的实例包括但不限于玉米醇脱氢酶(Zm-Adh1)、玉米Bronze-1表达增强内含子、水稻肌动蛋白1(Os-Act1)内含子、Shrunken-1(Sh-1)内含子、玉米蔗糖合酶内含子、热休克蛋白18(hsp18)内含子和82kd热休克蛋白(hsp82)内含子。美国专利5,593,874和5,859,347,通过引用明确并入本文,描述了通过在位于基因启动子3'和第一蛋白质编码外显子5'的非翻译前导序列中包括源自70kd玉米热休克蛋白(hsp70)的表达增强内含子而改进用于植物中的重组DNA构建体的方法。

[0238] 核酶

[0239] 在一些实施方案中,本发明的重组DNA构建体或多核苷酸包含编码一种或多种核酶的DNA。特别感兴趣的核酶包括自我裂解核酶、锤头状核酶或发夹状核酶。在一个实施方案中,重组DNA构建体包含编码用于裂解转录的RNA以提供确定的RNA片段,如用于抑制叶甲属靶基因的沉默元件的一种或多种核酶的DNA。

[0240] 基因抑制元件

[0241] 在一些实施方案中,本发明的重组DNA构建体或多核苷酸包含编码用于抑制除叶甲属靶基因外的靶基因的附加基因抑制元件的DNA。要抑制的靶基因可包括编码或非编码序列或两者。

[0242] 在美国专利申请公开2006/0200878中详细描述了适合的基因抑制元件,其公开通过引用明确并入本文,并且包括以下的一种或多种:

[0243] (a)包含与要抑制的基因的至少一个片段反义的至少一个反义DNA片段的DNA;

[0244] (b)包含与要抑制的基因的至少一个片段反义的至少一个反义DNA片段的多个拷贝的DNA;

[0245] (c)包含是要抑制的基因的至少一个片段的至少一个有义DNA片段的DNA;

[0246] (d)包含是要抑制的基因的至少一个片段的至少一个有义DNA片段的多个拷贝的DNA;

[0247] (e)转录为RNA用于通过形成双链RNA抑制要抑制的基因并且包含与要抑制的基因的至少一个片段反义的至少一个反义DNA片段和是要抑制的基因的至少一个片段的至少一

个有义DNA片段的DNA；

[0248] (f)转录为RNA用于通过形成单个双链RNA抑制要抑制的基因并且包含与要抑制的基因的至少一个片段反义的多个连续反义DNA片段和是要抑制的基因的至少一个片段的多个连续有义DNA片段的DNA；

[0249] (g)转录为RNA用于通过形成多条RNA双链抑制要抑制的基因并且包含与要抑制的基因的至少一个片段反义的多个反义DNA片段和是要抑制的基因的至少一个片段的多个有义DNA片段的DNA,并且其中所述多个反义DNA片段和所述多个有义DNA片段呈一系列反向重复序列排列；

[0250] (h)包含源自植物miRNA的核苷酸的DNA；

[0251] (i)包含siRNA的核苷酸的DNA；

[0252] (j)转录为能够与配体结合的RNA适配子的DNA；及

[0253] (k)转录为能够与配体结合的RNA适配子的DNA,及转录为能够调控要抑制的基因的表达的调控RNA的DNA,其中所述调控依赖于调控RNA的构象,并且调控RNA的构象受RNA适配子的结合状态变构性影响。

[0254] 在一些实施方案中,内含子用于在任何蛋白质编码外显子(编码序列)缺乏时递送基因抑制元件。在一个实例中,内含子,如表达增强内含子因在内含子中嵌入基因抑制元件而中断,其中,转录后,基因抑制元件从内含子中切除。因此,不需要蛋白质编码外显子来提供本文公开的重组DNA构建体的基因抑制功能。

[0255] 转录调控元件

[0256] 在一些实施方案中,本发明的重组DNA构建体或多核苷酸包含编码转录调控元件的DNA。转录调控元件包括调控本发明的重组DNA构建体的表达水平(相对于其在此类调控元件缺乏时的表达)的元件。适合的转录调控元件的实例包括核糖开关(riboswitch)(顺式或反式作用)、转录物稳定序列和miRNA识别位点,如通过引用明确并入本文的美国专利申请公开2006/0200878中所详细描述。

[0257] 制备和使用转基因植物细胞和转基因植物

[0258] 植物的转化可包括几种公知方法和组合物中的任一种。植物转化的适合方法实际上包括可以将DNA引入细胞的任何方法。植物转化的一种方法是微粒轰击(microprojectile bombardment),例如美国专利5,015,580(大豆)、5,538,880(玉米)、5,550,318(玉米)、5,914,451(大豆)、6,153,812(小麦)、6,160,208(玉米)、6,288,312(水稻)、6,365,807(水稻)和6,399,861(玉米)以及6,403,865(玉米)中所说明,所述专利全部通过引用并入以使得转基因植物的产生成为可能。

[0259] 植物转化的另一种有用方法是土壤杆菌介导的转化,其借助于含有二元Ti质粒系统的土壤杆菌属,其中该土壤杆菌属携带第一Ti质粒和含有野生型Ti质粒的至少一个T-DNA边界的第二嵌合质粒,在转化的植物细胞中具有功能性并与本发明的多核苷酸或重组DNA构建体可操作地连接的启动子。参见,例如,美国专利5,159,135中描述的二元系统,其通过引用并入。同时参见De Framond(1983)Biotechnology,1:262-269;和Hoekema等,(1983)Nature,303:179。在此类二元系统中,含有T-DNA边界或多个边界的较小质粒可以方便地构建并且在适合的替代宿主(如大肠杆菌)内操作,然后转移到土壤杆菌属中。

[0260] 土壤杆菌属介导的植物(尤其是农作物)转化的详细过程包括例如美国专利5,

004,863、5,159,135和5,518,908(棉花);5,416,011、5,569,834、5,824,877和6,384,301(大豆);5,591,616和5,981,840(玉米);5,463,174(芸苔类,包括菜籽(canola))、7,026,528(小麦)和6,329,571(水稻)及美国专利申请公开2004/0244075(玉米)和2001/0042257 A1(甜菜)中所公开的过程,其全部通过引用明确并入以使得转基因植物的产生成为可能。美国专利申请公开2011/0296555在实施例5中公开了转化载体(包括载体序列)和转化玉米、大豆、菜籽、棉花和甘蔗的详细方案)并且通过引用明确并入以使得转基因植物的产生成为可能。已经报道了用于许多植物种类(双子叶植物和单子叶植物)的类似方法,这些植物物种尤其包括花生(Cheng等(1996)Plant Cell Rep.,15:653)、芦笋(Bytebier等(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,84:5345)、大麦(Wan和Lemaux(1994)Plant Physiol.,104:37)、水稻(Toriyama等(1988)Bio/Technology,6:10;Zhang等(1988)Plant Cell Rep.,7:379)、小麦(Vasil等(1992)Bio/Technology,10:667;Becker等(1994)Plant J.,5:299)、苜蓿(Masoud等(1996)Transgen.Res.,5:313)及番茄(Sun等(2006)Plant Cell Physiol.,47:426-431)。同时参见通过引用并入的美国专利申请公开2003/0167537 A1中对载体、转化方法和转化的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)植物的产生的描述,其中转录因子通过CaMV35S启动子组成型地表达。对于茄科植物特别有用的转化方法在本领域中公知。参见,例如,公开描述的番茄(Sharma等(2009),J.Biosci.,34:423-433)、茄子(Arpaia等(1997)Theor.Appl.Genet.,95:329-334)、马铃薯(Bannerjee等(2006)Plant Sci.,170:732-738;Chakravarty等(2007)Amer.J.Potato Res.,84:301-311;S.Millam“Agrobacterium-mediated transformation of potato.”第19章(第257-270页),“Transgenic Crops of the World:Essential Protocols”,Ian S.Curtis(编辑),Springer,2004)和胡椒(Li等(2003)Plant Cell Reports,21:785-788)的转化方法。已经在各个地区商业引进了稳定的转基因马铃薯、番茄和茄子;参见,例如,K.Redenbaugh等“Safety Assessment of Genetically Engineered Fruits and Vegetables:A Case Study of the FLAVR SAVR™Tomato”,CRC Press,Boca Raton,1992及GM作物数据库(GM Crop Database)中商业基因修饰作物的大量公开可用的文档;参见:CERA.(2012).GM作物数据库.Center for Environmental Risk Assessment(CERA),ILSI Research Foundation,Washington D.C.,在www.cera-gmc.org/?action=gm_crop_database上以电子方式可用。其它植物物种的各种转化方法在本领域中公知,参见,例如,百科参考文献,“Compendium of Transgenic Crop Plants”,由Chittaranjan Kole和Timothy C.Hall编辑,Blackwell Publishing Ltd.,2008;ISBN 978-1-405-16924-0(在mrw.interscience.wiley.com/emrw/9781405181099/hpt/toc上以电子方式可用),其描述了谷类和饲用牧草(水稻、玉米、小麦、大麦、燕麦、高粱、珍珠粟、指状粟、冷季型饲用牧草和百喜草(bahiangrass))、油料作物(大豆、油籽芸苔、向日葵、花生、亚麻、芝麻和红花)、豆类谷物和草料(菜豆、豇豆、豌豆、蚕豆、小扁豆、宽叶菜豆、亚洲豆、木豆、野豌豆、鹰嘴豆、羽扇豆、苜蓿和三叶草)、温带果实和坚果(苹果、梨、桃子、李子、浆果作物、樱桃、葡萄、橄榄、杏和胡桃)、热带和亚热带果实和坚果(柑橘、葡萄柚、香蕉和大蕉、菠萝、番木瓜、芒果、鳄梨、猕猴桃、百香果和柿子)、蔬菜作物(番茄、茄子、辣椒、蔬菜芸苔、萝卜、胡萝卜、葫芦、葱、芦笋和叶菜类蔬菜)、糖、块茎和纤维作物(甘蔗、甜菜、甜叶菊、马铃薯、甘薯、木薯和棉花)、种植作物、观赏植物和草坪草(烟草、咖啡、可可、茶、橡胶树、药用植物、观赏植物和草坪草)和林木树种的转化程序。

[0261] 提供含有稳定整合的重组DNA的转基因植物细胞和转基因植物的转化方法优选在培养基上和受控环境中的组织培养中进行。“培养基”是指用于在体外(即,完整的活生物体的外部)培养细胞的多种营养混合物。受体细胞靶标包括但不限于分生组织细胞、愈伤组织、未成熟胚或胚的部分和配子细胞(如小孢子、花粉、精子和卵细胞)。可以再生成可繁殖的植物的任何细胞都认为是可用于本发明实践的受体细胞。愈伤组织可由各种组织来源开始,包括但不限于未成熟胚或胚的部分、幼苗顶端分生组织、小孢子等。如愈伤组织一样能够增殖的那些细胞可以用作基因转化的受体细胞。例如,在通过引用明确并入的美国专利6,194,636和6,232,526及美国专利申请公开2004/0216189中公开了用于制备本发明的转基因植物的实用转化方法和材料(例如,各种培养基和受体靶细胞、未成熟胚的转化和后续可繁殖转基因植物的再生)。

[0262] 在通常的转化实践中,DNA在任何一种转化实验中仅被引入到很小百分比的靶细胞中。标记基因通常用于提供鉴定那些通过接受转基因DNA构建体并整合到它们的基因组中而稳定转化的细胞的有效体系。优选的标记基因提供了赋予对选择剂(如抗生素或除草剂)的抗性的选择性标记。植物细胞对其具有抗性的任何抗生素或除草剂可以是用于选择的有用试剂。将潜在转化的细胞暴露于选择剂。存活细胞群体中通常将是赋予抗性的基因整合并以足够水平表达以容许细胞存活的那些细胞。可进一步测试细胞以确认重组DNA的稳定整合。常用的选择标记基因包括赋予对抗生素(如卡那霉素(kanamycin)或巴龙霉素(paromomycin)(nptII)、潮霉素B(hygromycin B)(aph IV)和庆大霉素(gentamycin)(aac3和aac4))的抗性,或者对除草剂(如草铵膦(bar或pat)和草甘膦(EPSPS))的抗性的那些基因。在美国专利5,550,318、5,633,435、5,780,708和6,118,047中说明了有用的选择性标记基因和选择剂的实例,所述专利全部通过引用明确并入。也可以采用可筛选的标记或报告基因,如提供可视化鉴定转化体的能力的标记。有用的可筛选标记的实例包括,表达通过作用于显色底物而产生可检测颜色的蛋白质(例如, β 葡萄糖苷酸酶(GUS)(uidA)或萤光素酶(luc))或者本身可检测的蛋白质(如绿色荧光蛋白(GFP)(gfp))或免疫原性分子的基因。本领域的技术人员将认识到,许多其它有用的标记或报告基因是可以使用的。

[0263] 可以通过任何适合方法实现检测或测量转基因植物细胞中重组DNA构建体的转录,包括蛋白质检测方法(例如,蛋白质印迹法(western blot)、ELISA和其它免疫化学方法)、酶活性测量或核酸检测方法(例如,DNA印迹法(Southern blot)、RNA印迹法(northern blot)、PCR、RT-PCR、荧光原位杂交)。

[0264] 用于检测或测量在植物细胞中本发明的靶向叶甲属种类靶基因的重组多核苷酸的转录的其它适合方法包括:测量作为在叶甲属种类中靶基因的表达水平相对于在重组多核苷酸缺乏时观察到的表达水平的直接或代表指示的任何其它性状,例如,叶甲属种类的生长速率、死亡率、或繁殖或补充率,或测量受叶甲属种类侵扰的植物或植物田间的损伤(例如,根损伤)或产量损失。一般而言,用于检测或测量在植物细胞中目标重组多核苷酸的转录的适合方法包括,例如大的或微观的形态性状、生长速率、产量、繁殖或补充率、对害虫或病原体的抗性或对生物的或非生物的胁迫的抗性(例如,缺水胁迫、盐胁迫、营养胁迫、热或冷胁迫)。此类方法可以使用表型性状的直接测量或代表性测定(例如,在植物中,这些测定包括植物部分的测定,例如叶或根的测定,以测定非生物胁迫的耐受性)。此类方法包括对无脊椎害虫或病原体抗性的直接测量(例如,对植物组织的损害)或代表性测定(例如,植

物产量测定或生物测定,如国际专利申请公开W02005/110068 A2和美国专利申请公开US 2006/0021087 A1(其通过引用明确并入)中描述的西方玉米根虫(玉米根萤叶甲、(*Diabrotica virgifera virgifera*)LeConte)幼虫生物测定,或Steeves等(2006) *Funct.Plant Biol.*,33:991-999中描述的大豆异皮线虫生物测定,其中测量了每一植物的囊孢、每克根的囊孢、每一植物的卵、每克根的卵和每个囊孢的卵,或本文工作实施例中描述的科罗拉多马铃薯甲虫(马铃薯叶甲)生物测定。

[0265] 本发明的重组DNA构建体可以与其它重组DNA叠加以例如,通过表达或抑制其它基因而赋予附加性状(例如,在转化植物的情况下,性状包括除草剂抗性、抗虫性、冷萌芽耐受性、缺水耐受性等)。在通过引用明确并入的美国专利申请公开2004/0126845 A1中公开了用于协调降低和增加基因表达的构建体。

[0266] 可以收获可繁殖的转基因植物的种子并用于培植在其基因组中包括重组DNA构建体的本发明的转基因植物的后代,包括杂交后代。因此,除了用本发明的重组DNA构建体直接转化植物外,本发明的转基因植物可以通过使具有重组DNA的第一植物与缺少该构建体的第二植物杂交而制备。例如,可将所述重组DNA引入易于转化的株系中以产生转基因植物,其可以与第二株系杂交以将重组DNA基因渗入(introgress)到所得后代中。本发明的转基因植物可以与具有赋予一个或多个附加性状(如,但不限于,除草剂抗性、害虫或疾病抗性、环境胁迫耐受性、改变的营养含量和产量提高)的其它重组DNA的株系杂交以产生具有赋予所需靶序列表达性能和附加性状的重组DNA的后代植物。

[0267] 在此类组合性状的繁育中,赠予附加性状的转基因植物可以是父系(传粉者)而携带基本性状的转基因植物是母系。这一杂交后代隔离,使得一些植物将携带两个亲本性状的DNA而一些将携带一个亲本性状的DNA;此类植物可以通过与亲本重组DNA相关的标记鉴定。携带两个亲本性状的DNA的后代植物可以回交到亲本母系中多次,例如,通常为6至8代,以产生具有与一个原始转基因亲本系基本上相同的基因型以及其它转基因亲本系的重组DNA的纯合子后代植物。

[0268] 本发明的再一方面是由本发明的转基因种子(或在马铃薯的情况下,为转基因种用马铃薯)生长的转基因植物。本发明考虑到了由含有重组DNA的转基因种子直接生长的转基因植物以及通过使由转基因种子直接生长的转基因植物与不是由相同转基因种子生长的第二植物杂交而产生的植物后代,包括近交或杂交株系。杂交可以包括,例如,以下步骤:

[0269] (a)种植第一亲本植物(例如,非转基因或转基因)和根据本发明为转基因的第二亲本植物的种子;

[0270] (b)使第一和第二亲本植物的种子长成开花的植物;

[0271] (c)用来自第二亲本的花粉给第一亲本的花授粉;及

[0272] (d)收获在带有受精的花的亲本植物上产生的种子。

[0273] 常常期望将重组DNA基因渗入(例如,通过回交)到优良品种中以将特别期望的性状从一个来源转移到缺少该性状的近交植物或其它植物中。例如,这可以通过首先将优势近交亲本("A")(回交亲本)与携带所讨论的性状的适当基因(例如,根据本发明制备的构建体)的供体近交亲本("B")(非回交亲本)杂交而实现。在所得后代中首先针对从非回交亲本"B"转移的所需性状选择这一杂交的后代,然后使所选后代回配优势回交亲本"A"。在选择了所需性状的五个或更多个回交世代后,后代对于控制被转移的特征的基因座而言基本上

为半合子,但是对于大部分或几乎全部其它基因而言与优势亲本一样。最后一个回交代将自交以产生对于被转移的基因而言为纯系繁育的后代,例如,一个或多个转化事件。

[0274] 通过一系列的繁育操作,可以将所选DNA构建体从一个系移至完全不同的系中,不需要进一步的重组操作。因此可以产生是一个或多个DNA构建体的不分离系(true breeding)的近交植物。通过杂交不同的近交植物,可以产生大量具有DNA构建体的不同组合的不同杂种。这样,可以产生具有经常与杂种相关的期望农艺学特性(“杂种优势”)以及由一个或多个DNA构建体赋予的期望特征的植物。

[0275] 在本发明的某些转基因植物细胞和转基因植物中,有时期望同时表达所关注的基因,同时也调节叶甲属靶基因的表达。因此,在一些实施方案中,转基因植物含有还包含用于表达至少一个所关注的基因的基因表达元件的重组DNA,并且本发明的重组DNA构建体的转录以表达基因元件的同时转录实现。

[0276] 在一些实施方案中,本发明的重组DNA构建体可以在任何植物细胞或组织中或在任何发育阶段的整株植物中转录。转基因植物可源自任何单子叶或双子叶植物,例如但不限于商业或农业利益的植物,如农作物类植物(尤其是用于人食物或动物饲料的农作物类植物)、生产木材或纸浆的树、蔬菜类植物、果树和观赏植物。感兴趣的植物的实例包括谷类作物(如小麦、燕麦、大麦、玉米、黑麦、黑小麦、水稻、粟、高粱、奎奴亚藜(quinoa)、苋菜和荞麦);饲料作物类植物(如饲用牧草和饲用双子叶植物,包括苜蓿、野豌豆、三叶草等);油料作物类植物(如棉花、红花、向日葵、大豆、芥籽、油菜、亚麻、花生和油棕);树坚果(如胡桃、腰果、榛子、山核桃、杏仁等);甘蔗、椰子、海枣、橄榄、甜菜、茶和咖啡;生产木材或纸浆的树;蔬菜作物类植物,如豆类(例如,菜豆、豌豆、扁豆、苜蓿、花生)、莴苣、芦笋、朝鲜蓟、芹菜、胡萝卜、萝卜,芸苔类(例如,甘蓝、羽衣甘蓝、芥菜和其它多叶芸苔、花茎甘蓝、花椰菜、球芽甘蓝、芜菁、球茎甘蓝),可食用葫芦类(例如,黄瓜、甜瓜、西葫芦、笋瓜),可食用葱类(例如,洋葱、大蒜、韭葱、青葱、细香葱),可食用茄科成员(例如,番茄、茄子、马铃薯、辣椒、地樱桃(groundcherry)),以及可食用藜科成员(例如,甜菜、牛皮菜、菠菜、奎奴亚藜、苋菜);果类作物植物,如苹果、梨、柑橘类水果(如桔子、酸橙、柠檬、葡萄柚等)、核果(如杏子、桃子、李子、油桃)、香蕉、菠萝、葡萄、猕猴桃、番木瓜、鳄梨和浆果类;为生物质或生物燃料而种植的植物(例如,芒草(Miscanthus grass)、柳枝稷、麻风树、油棕、真核微藻类(如布朗葡萄藻(Botryococcus braunii)、小球藻(Chlorella spp.)和杜氏藻(Dunaliella spp.))和真核大型藻类(如江蓠(Gracilaria spp.)和马尾藻(Sargassum spp.));和观赏植物,包括观赏性有花植物、观赏性树木和灌木、观赏性地被植物和观赏性草类植物。

[0277] 本发明也提供了由本发明的转基因植物细胞、植物或种子生产的商品,包括但不限于收获的叶片、根、枝条、块茎、茎、果实、种子或植物的其它部分、粗粉、油、提取物、发酵或消化产物、碾碎的或完整谷物或植物种子,或包括由本发明的转基因植物细胞、植物或种子生产的此类商品的任何食物或非食物产品。在本文考虑到的一种或多种商品或商品产品中检测到本发明的重组DNA构建体的一个或多个核酸序列是该商品或商品产品含有或源自本发明的转基因植物细胞、植物或种子的事实证据。

[0278] 通常,在其基因组中具有本发明的重组DNA构建体的转基因植物对叶甲属种类侵扰表现出增加的抗性。在各个实施方案中,例如,当转基因植物表达与赋予附加性状的其它重组DNA叠加的本发明的重组DNA构建体时,转基因植物相对于没有重组DNA构建体的植物,

具有选自下述性状的至少一个附加改变性状：

- [0279] (a)非生物胁迫耐受性提高；
- [0280] (b)生物胁迫耐受性提高；
- [0281] (c)初级代谢物组成改变；
- [0282] (d)次级代谢物组成改变；
- [0283] (e)微量元素、类胡萝卜素或维生素组成改变；
- [0284] (f)产量提高；
- [0285] (g)利用氮、磷酸或其它营养素的能力提高；
- [0286] (h)农艺特征改变；
- [0287] (i)生长和繁殖特征改变；以及
- [0288] (j)收获、贮存或加工质量提高。

[0289] 在一些实施方案中，转基因植物的特征在于：非生物胁迫（例如，对缺水或干旱、炎热、寒冷、非最佳营养物或盐水平、非最佳光照水平）或生物胁迫（例如，拥挤、异种克生或创伤）的耐受性提高；初级代谢物（例如，脂肪酸、油、氨基酸、蛋白质、糖或碳水化合物）组成改变；次级代谢物（例如，生物碱、萜类化合物、聚酮化合物、非核糖体肽及混合生物合成来源的次级代谢物）组成改变；微量元素（例如，铁、锌）、类胡萝卜素（例如， β -胡萝卜素、番茄红素、黄体素、玉米黄素或其它类胡萝卜素和叶黄素）或维生素（例如，生育酚）组成改变；产量提高（例如，在非胁迫条件下的产量提高或在生物或非生物胁迫下的产量提高）；利用氮、磷酸或其它营养物的能力提高；农艺学特征改变（例如，延迟成熟；延迟衰老；更早或更晚成熟；耐荫性提高；抵抗根或秆倒伏的能力提高；抵抗茎“青折(green snap)”的能力提高；光周期反应改变）；生长或繁殖特征改变（例如，有意矮化；用于例如改良杂交过程的有意雄性不育；营养生长率提高；发芽率提高；雄性或雌性育性提高）；收获、贮存或加工质量提高（例如，贮存过程中对害虫的抗性提高，对于断裂的抗性提高，对于消费者的吸引力提高）；或者这些性状的任何组合。

[0290] 在另一个实施方案中，转基因种子或由转基因植物产生的种子的初级代谢物（例如，脂肪酸、油、氨基酸、蛋白质、糖或碳水化合物）组成改变，次级代谢物组成改变，微量元素、类胡萝卜素或维生素组成改变，收获、贮存或加工质量提高或这些的组合。在另一个实施方案中，可能期望改变转基因植物或转基因植物种子的原始组分的水平，例如，以降低变应原性蛋白或糖蛋白或有毒代谢物的水平。

[0291] 通常，进行筛选各自由转基因植物细胞再生的一群转基因植物，以鉴定发育成具有所需性状的转基因植物的转基因植物细胞。测定转基因植物以检测增强的性状，例如，增强的水分利用效率、增强的耐寒性、增加的产量、增强的氮利用效率、增加的种子蛋白和增加的种子油。筛选方法包括在温室或田间试验中直接筛选所述性状或筛选代表性状。此类分析旨在检测植物的化学组成、生物质、生理特性或形态上的变化。通过分析种子组成及蛋白质、游离氨基酸、油、游离脂肪酸、淀粉、生育酚或其它营养物的含量而检测谷物的化学组成如营养组成方面的变化。通过测量植物高度、茎直径、节间长度、根和枝条干重及（对于生产谷物的植物如玉米、水稻或小麦而言）穗或种穗长度和直径而检测生长或生物质特征方面的变化。通过评价对胁迫条件的反应，例如，在强加的胁迫条件下如缺水、缺氮或磷、寒冷或炎热生长条件、病原体或昆虫攻击、光照不足或植物密度增加的测定，鉴定生理特性上的

变化。其它选择特性包括开花天数、花粉散落天数、果实成熟天数、所产果实或块茎的质量或量、玉米抽丝天数、叶片延伸速率、叶绿素含量、叶温、林分、幼苗长势、节间长度、植物高度、叶片数量、叶片面积、分蘖、支持根、持绿、茎秆倒伏、根倒伏、植物健康状况、育性、青折和害虫抗性。另外,可以评价收获的果实、种子或块茎的表型特征;例如,在番茄和茄子中,这可以包括收获的果实的总数量和重量或此类果实的颜色、酸度、含糖量或风味,而在马铃薯中,这可以包括收获的块茎的数量或总重量和此类块茎的质量。

[0292] 用本发明的组合物和方法进行的特定测定可以在茄科植物中进行,包括马铃薯、番茄、茄子和胡椒,为杂交或近交系;此类测定用于,例如鉴定或选择对科罗拉多马铃薯甲虫(幼虫或成虫)具有提高的抗性的植物,测定给定组合物的杀虫有效量,或确定有效治疗方案。此类测定的非限制性实例包括以下实例。

[0293] 在番茄植株中进行植物原位科罗拉多马铃薯甲虫(幼虫或成虫)测定,每次处理重复6次。大的樱桃番茄植株种在含有6磅/立方码14-14-14肥料的Readi-Earth土壤中并且保持在27摄氏度、50%相对湿度的生长箱中三周。在测定当天,将双链RNA稀释到25毫升的喷雾液中(20毫摩尔磷酸钠缓冲液(pH 6.8),任选地含有表面活性剂,例如0.2%Silwet L77)达到所需浓度,并且使用履带式喷雾机以15加仑/英亩的速率向植物施用。最初可以使用较高的浓度(例如,100微克/毫升)测定多核苷酸的活性,在后续测定如测定各种多核苷酸的相对效率的测定中可以使用较低的浓度(例如,介于约0.1至约1微克/毫升)。植物用网套单独笼住,并且受12只新生马铃薯叶甲(科罗拉多马铃薯甲虫)幼虫侵扰。在生长箱(27摄氏度、50%相对湿度)中培育受侵植物12-14天。在这段时期结束时,评价植物的落叶水平,评为“控制百分比”,并且从植物和土壤中收集昆虫以评价“回收的活昆虫百分比”和“回收的活昆虫的平均重量”。

[0294] 在马铃薯植株中进行植物原位科罗拉多马铃薯甲虫(幼虫或成虫)测定,每次处理重复9次。从成熟的大西洋马铃薯植株通过从最幼生长的第二节下面以一定角度切割茎制备插条。将插条浸入生根激素(Rhizopon#1,0.1%IBA)并立即插入含有6磅/立方码14-14-14肥料的预湿Readi-Earth土壤中。遮盖插条平面以减少曝光并置于密封塑料袋中以增加湿度。在下一周,移去遮盖物并且将平面从塑料袋中取出。将6-9英寸高的植物(从切割日计通常为3周)用于所述测定。在测定当天,将双链RNA稀释到25毫升的喷雾液中(20毫摩尔磷酸钠缓冲液(pH 6.8),任选地含有表面活性剂,例如0.2%Silwet L77)达到所需浓度,并且使用履带式喷雾机以15加仑/英亩的速率向植物施用。最初可以使用较高的浓度(例如,100微克/毫升)测定多核苷酸的活性,在后续测定如测定各种多核苷酸的相对效率的测定中可以使用较低的浓度(例如,介于约0.1至约1微克/毫升)。植物用网套单独笼住,并且受6只新生马铃薯叶甲(科罗拉多马铃薯甲虫)幼虫侵扰。在生长箱(27摄氏度、50%相对湿度)中培育受侵植物12-14天。在这段时期结束时,评价植物的落叶水平,评为“控制百分比”,并且从植物和土壤中收集昆虫以评价“回收的活昆虫百分比”和“回收的活昆虫的平均重量”。

[0295] 以下实施例是为了说明的目的而提出而不应视为限制。

实施例

[0296] 实施例1:叶甲属cDNA文库的生成

[0297] 如下,由马铃薯叶甲(科罗拉多马铃薯甲虫,“CPB”)新生幼虫生成cDNA文库。使用

Ambion Totally RNA分离试剂盒(商品目录号AM 1910,Life Technologies,Carlsbad,CA),经任选LiCl沉降过程从800只3龄马铃薯叶甲幼虫(全身)分离总RNA。使用Ambion MicroPoly(A)Purist(商品目录号AM 1919,Life Technologies,Carlsbad,CA)分离多聚腺苷酸化(PolyA)RNA。使用Superscript双链cDNA合成试剂盒(商品目录号11917-010,Life Technologies,Carlsbad,CA)与随机六聚体试剂盒(商品目录号12328-032,Life Technologies,Carlsbad,CA)进行随机引物cDNA合成。如Margulies等(2005)Nature,437:376-380所述,使用商购454技术(454Life Sciences,15Commercial St.,Branford,CT 06405,USA)通过高通量测序获得cDNA文库。这样提供了1,446,014个读数(长度平均为约350个碱基对),补充了来自NCBI公开可用的马铃薯叶甲序列数据(包括8,835个表达序列标签序列、150个全长cDNA、839,061个高通量DNA和RNA存档序列读数),提供总共2294087个组合读数。使用Newbler(2.3版本)软件包(454Life Sciences,15Commercial St.,Branford,CT 06405,USA)将组合序列数据重新组装成重叠群(contig)。从序列数据中鉴定大约38,164个组装重叠群。

[0298] 实施例2:低拷贝靶基因的选择

[0299] 如下,鉴定预计是RNAi介导的沉默的有效靶标的叶甲属靶基因序列。选择低拷贝基因,并且尤其是单拷贝基因,作为RNAi介导的沉默的靶标,因为这些基因不大可能使其功能被旁系同源物再现。过滤直系同源基因的公开数据库,OrthoDB6(在cegg.unige.ch/orthodb6上可用并且在Waterhouse等(2012)Nucleic Acids Res.,PMID:23180791;doi:10.1093/nar/gks1116中有描述)以选择数据库中的在赤拟谷盗(赤拟粉甲,鞘翅目种类)中为单拷贝或低拷贝以及所有可用节肢动物基因组中为单拷贝或低拷贝的766个基因的子集(提交本申请时,另外33个节肢动物基因组可用)。赤拟谷盗为鞘翅目种类并且因此与叶甲属密切相关,这使得至少对于在两种生物之间具有高序列相似性的基因而言,可能赤拟谷盗基因组数据库中存在的单拷贝或低拷贝基因也将是马铃薯叶甲基因组中的单拷贝或低拷贝基因。从得自实施例1中描述的马铃薯叶甲(科罗拉多马铃薯甲虫,CPB)测序和组装的38,164个单基因(unigene),使用翻译核苷酸BLAST搜索(tblastx)鉴定725个基因的子集与OrthoDB数据库中的766个单拷贝或低拷贝赤拟谷盗基因具有高序列相似性(显著性或e值小于或等于 1×10^{-15})的基因。

[0300] 对于序列注释,通过使用NCBI的Blastall 2.2.21软件从公开可用的uniref90.fasta数据库(ftp.uniprot.org/pub/databases/uniprot/current_release/uniref/uniref90/)搜索马铃薯叶甲重叠群而进行SmartBlast注释。blast搜索以blastx模式进行(从uniref90蛋白质数据库搜索的翻译马铃薯叶甲核苷酸查询)。仅保留e值小于或等于 $9e-9$ 的blast命中。对于每个马铃薯叶甲重叠群而言,将来自于uniref90最佳命中的描述行用作注释。当没有发现SmartBlast命中时,将序列进行补充Pfam搜索。为实现这个目标,为每个马铃薯叶甲重叠群鉴定最长开放阅读框(ORF)并用于使用公开可用的HMMER 3.0软件包(hmmer.janelia.org/)查询公开可用的Pfam-A数据库(ftp.sanger.ac.uk/pub/databases/Pfam/current_release)。为有Pfam命中且e值小于或等于 $1e-5$ 的马铃薯叶甲重叠群注释蛋白质家族名称和Pfam标识符。无SmartBlast或Pfam命中的马铃薯叶甲重叠群注释为“新型蛋白质”。

[0301] 如上所述,鉴定为与单拷贝或低拷贝赤拟谷盗基因具有高序列相似性的725个马

铃薯叶甲基因作为SEQ ID NO:1-725而提供,根据与赤拟谷盗和/或OrthoDB序列的序列相似性,或按保守性Pfam结构域注释每个基因。对于每个马铃薯叶甲基因而言,在注释中与每对的相似性e值一起还标识了同源赤拟谷盗基因。

[0302] 实施例3叶甲属靶基因的选择

[0303] 从得自实施例1中描述的马铃薯叶甲(科罗拉多马铃薯甲虫,CPB)测序和组装的序列选择通过RNAi介导的沉默而控制叶甲属种类的有用靶基因相对应的cDNA序列。这个cDNA序列或靶基因子集于SEQ ID NO:726-830中提供。认为可以从本文提到的任何其它叶甲属种类获得类似序列。

[0304] 实施例4通过“覆瓦”选择多核苷酸触发因子

[0305] 用于选择在转基因植物中表达或用于向转基因或非转基因植物表面局部施用的组合物中的多核苷酸触发因子的方法的一个非限制性实例牵涉使用全基因(或全长参考序列)覆瓦阵列法对有效多核苷酸序列(或序列片段)的基因定位。将选自SEQ ID NO:1-725和SEQ ID NO:726-830及SEQ ID NO:1087-1094的序列沿着所选靶序列的整个长度分成为200-300个连续核苷酸的“覆瓦序列”或片段。覆瓦序列可被设计成所选序列的连续片段,在所选序列的相邻片段中没有重叠或有约18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸重叠。合成与各200-300个核苷酸的覆瓦序列(在有义、反义或有义和反义方向上)相对应的多核苷酸触发因子用于功效筛选。

[0306] 通过任何便利方式测试多核苷酸触发因子在使叶甲属种类靶基因沉默方面的功效。适合的测试的实例为食物生物测定,如实施例5和6中描述的食物生物测定。另一种适合的测试牵涉直接向叶甲属个体或向待保护以免受叶甲属种类侵扰的植物表面局部施用多核苷酸触发因子。用多核苷酸触发因子处理的一个期望结果是预防或控制叶甲属种类侵扰,例如,通过在叶甲属昆虫中诱导生理或行为变化,如但不限于生长受阻、死亡率增加、生殖能力降低、摄食行为或运动减少或停止或变态期发育减少或停止。用多核苷酸触发因子处理的另一个期望结果是提供对叶甲属种类侵扰表现出提高的抗性的茄科植物,例如对受马铃薯叶甲(科罗拉多马铃薯甲虫,CPB)或其它叶甲属种类的侵扰表现出提高的抗性的马铃薯、番茄、茄子或胡椒植物。可成组筛选多核苷酸触发因子。例如,将多组5种单独多核苷酸触发因子合并到单种多核苷酸组合物中并向植物局部施用。然后通过测试单独组分多核苷酸触发因子的功效,再次筛选显示出更佳功效的那些组。

[0307] 若需要,可重复覆瓦过程。可为发现提供了所需活性的多核苷酸触发因子本身覆瓦。沿着亲本多核苷酸触发因子的长度将亲本多核苷酸触发因子分成更小的重叠或非重叠片段。例如,沿着亲本多核苷酸触发因子的整个长度将亲本多核苷酸触发因子分成长度为50-60个核苷酸的片段。合成与各50-60个核苷酸的覆瓦序列(在有义、反义或有义和反义方向上)相对应的多核苷酸触发因子用于功效筛选。可进行更多轮覆瓦分析,其中测试短至18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸的触发因子。

[0308] 使用任意大小的有效多核苷酸触发因子制备用于局部施用的组合物或用于产生转基因植物的重组DNA构建体。

[0309] 实施例5

[0310] 该实施例说明了用于评价多核苷酸触发因子的叶甲属控制功效的非限制性测定。更具体地,该实施例说明了包含与叶甲属靶基因(例如,选自靶基因序列组,或具有选自:

SEQ ID NO:1-725和SEQ ID NO:726-830及SEQ ID NO:1087-1094或其互补物的DNA序列的靶基因)的至少21个连续核苷酸互补的核苷酸序列的双链RNA触发因子和用于评价这些dsRNA触发因子的叶甲属控制功效的生物测定。

[0311] 为叶甲属靶基因设计长度介于约50个至约500个碱基对(更具体地,介于约100个至约450个碱基对)的触发因子(参见实施例2和3)。为表1所列的靶基因制成具有SEQ ID NO:831-1085中提供的反义链序列的平端双链RNA(dsRNA)。

[0312] 使用以下方法测定用于抑制叶甲属靶基因的dsRNA触发因子(表1)以测定由于接触或摄取多核苷酸触发因子引起的马铃薯叶甲幼虫的死亡率或生长受阻。使用由13.2克/升琼脂(Serva 11393)、140.3克/升Bio-Serve预混料(F9380B)、5毫升/升KOH(18.3%w/w)和1.25毫升/升福尔马林(formalin)(37%)组成的人工食物进行对科罗拉多马铃薯甲虫(CPB)(马铃薯叶甲)的生物测定。按200微升等分试样将食物分配至96孔板中并且在样品施用之前短暂干燥。每孔施用20微升试样,无菌水用作未处理对照(UTC)。在添加昆虫幼虫之前使板。用纤细画笔为每孔添加一只新生CPB幼虫。板用Mylar密封并使用昆虫针通风。每次处理试验32只幼虫。生物测定板在27摄氏度、60%相对湿度下于完全黑暗中培育10-12天。对板的幼虫生长受阻和死亡率进行评分。使用JMP[®]4统计软件(SAS Institute,1995)分析数据并且用杜奈特检验(Dunnet's test)进行全因子ANOVA以检查与未处理对照相比的处理效果($P < 0.05$)。进行Tukey-Kramer事后检验以比较所有处理对($P < 0.05$)。表1中提供了结果。

[0313]

表 1

SEQ ID NO.*	靶基因	靶基因的 SEQ ID NO.	CPB 食物生物测定结果**	dsRNA 浓度 (ppm)	外显子数量
831	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 1	825	(+)	0.1	1
832	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 1	825	(-)	0.1	1
833	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 1	825	(-)	0.1	1
834	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 1	825	(-)	0.1	1
835	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 1	825	(-)	0.1	2
836	肌动蛋白	821	(-)	0.1	1
837	肌动蛋白	821	(-)	0.1	1
838	肌动蛋白	821	(-)	0.1	1
839	肌动蛋白	821	(-)	0.1	1
840	肌动蛋白	821	(-)	0.1	1
841	衣被蛋白 β 亚基	822	(-)	0.1	1
842	衣被蛋白 β 亚基	822	(+)	0.1	1
843	衣被蛋白 β 亚基	822	NT	0.1	1
844	衣被蛋白 β 亚基	822	NT	0.1	1
845	衣被蛋白 β 亚基	822	(-)	0.1	1
846	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 2	805	(-)	0.1	1
847	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 2	805	(-)	0.1	1
848	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 2	805	(-)	0.1	1
849	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 2	805	(+)	0.1	1
850	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 2	805	(-)	0.1	2?
851	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 12	806	(-)	0.1	1
852	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 12	806	(-)	0.1	1
853	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 12	806	NT	0.1	2?
854	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 12	806	NT	0.1	1
855	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 12	806	NT	0.1	1

[0314]

856	可能的 26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 3	807	(-)	0.1	1
857	可能的 26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 3	807	(-)	0.1	1
858	可能的 26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 3	807	NT	0.1	1
859	可能的 26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 3	807	NT	0.1	1
860	可能的 26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 3	807	NT	0.1	1
861	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 7	808	(-)	0.1	1
862	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 7	808	(-)	0.1	1
863	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 7	808	NT	0.1	1
864	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 7	808	NT	0.1	1
865	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 7	808	NT	0.1	1
866	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 2	809	(-)	0.1	1
867	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 2	809	(-)	0.1	2?
868	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 2	809	(-)	0.1	2
869	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 2	809	(-)	0.1	1
870	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 2	809	(-)	0.1	1
871	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 4	810	(-)	0.1	1
872	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 4	810	NT	0.1	2
873	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 4	810	NT	0.1	1
874	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 4	810	NT	0.1	1
875	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 4	810	NT	0.1	1
876	26S 蛋白酶调节亚基 8	811	NT	0.1	1
877	26S 蛋白酶调节亚基 8	811	NT	0.1	1
878	26S 蛋白酶调节亚基 8	811	NT	0.1	2?
879	26S 蛋白酶调节亚基 8	811	(-)	0.1	1
880	26S 蛋白酶调节亚基 8	811	(-)	0.1	1
881	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 13	812	NT	0.1	2
882	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 13	812	NT	0.1	1
883	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 13	812	(-)	0.1	1
884	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 13	812	(-)	0.1	1
885	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 13	812	(-)	0.1	1

[0315]

886	假定非典型蛋白		813	NT	0.1	1
887	假定非典型蛋白		813	NT	0.1	1
888	假定非典型蛋白		813	(-)	0.1	1
889	ADP 核糖基化因子 GTP 酶活化蛋白, 假定		814	NT	0.1	1
890	ADP 核糖基化因子 GTP 酶活化蛋白, 假定		814	NT	0.1	1
891	ADP 核糖基化因子 GTP 酶活化蛋白, 假定		814	(-)	0.1	1
892	ADP 核糖基化因子 GTP 酶活化蛋白, 假定		814	(-)	0.1	1
893	高尔基特异布雷菲德菌素 A(Golgi-specific brefeldin A)抗性鸟嘌呤核苷酸交换因子, 假定		815	NT	0.1	1
894	高尔基特异布雷菲德菌素 A 抗性鸟嘌呤核苷酸交换因子, 假定		815	NT	0.1	1
895	高尔基特异布雷菲德菌素 A 抗性鸟嘌呤核苷酸交换因子, 假定		815	NT	0.1	1
896	高尔基特异布雷菲德菌素 A 抗性鸟嘌呤核苷酸交换因子, 假定		815	NT	0.1	1
897	高尔基特异布雷菲德菌素 A 抗性鸟嘌呤核苷酸交换因子, 假定		815	NT	0.1	2?
898	Sec24 蛋白, 假定		816	(+)	0.1	2
899	Sec24 蛋白, 假定		816	(-)	0.1	2?
900	Sec24 蛋白, 假定		816	(-)	0.1	2?
901	Sec24 蛋白, 假定		816	(-)	0.1	2?
902	Sec24 蛋白, 假定		816	(-)	0.1	1
903	蛋白质转运蛋白 Sec24B		817	(-)	0.1	1
904	蛋白质转运蛋白 Sec24B		817	(-)	0.1	1
905	蛋白质转运蛋白 Sec24B		817	(-)	0.1	1
906	蛋白质转运蛋白 Sec24B		817	(-)	0.1	1
907	蛋白质转运蛋白 Sec24B		817	(-)	0.1	1
908	蛋白质转运蛋白 sec31A		818	(-)	0.1	1
909	蛋白质转运蛋白 sec31A		818	(-)	0.1	1
910	蛋白质转运蛋白 sec31A		818	(+)	0.1	1
911	蛋白质转运蛋白 sec31A		818	(-)	0.1	2?
912	蛋白质转运蛋白 sec31A		818	(-)	0.1	1
913	GTP 结合蛋白 SAR1B		819	(-)	0.1	1
914	GTP 结合蛋白 SAR1B		819	(-)	0.1	1

[0316]

915	GTP 结合蛋白 SARIB	819	NT	0.1	2
916	GTP 结合蛋白 SARIB	819	NT	0.1	1
917	GTP 结合蛋白 SARIB	819	NT	0.1	1
918	蛋白质转运蛋白 sec13	820	(-)	0.1	2
919	蛋白质转运蛋白 sec13	820	(-)	0.1	1
920	蛋白质转运蛋白 sec13	820	(-)	0.1	1
921	蛋白质转运蛋白 sec13	820	(-)	0.1	1
922	核糖体蛋白 L13A	741	NT	1.0	2
923	核糖体蛋白 L13A	741	NT	1.0	2
924	60S 核糖体蛋白 L5	728	NT	1.0	2
925	60S 核糖体蛋白 L5	728	(+)	1.0	2?
926	核糖体蛋白 S7	776	NT	1.0	1
927	核糖体蛋白 S7	776	(-)	1.0	1
928	核糖体蛋白 L9	735	(+)	1.0	2
929	核糖体蛋白 L9	735	NT	1.0	1
930	核糖体蛋白 L3	726	NT	1.0	2
931	核糖体蛋白 L3	726	(+)	1.0	2
932	60S 核糖体蛋白 L32	755	(+)	1.0	3
933	核糖体蛋白 L8	734	NT	1.0	2
934	核糖体蛋白 L8	734	NT	1.0	2
935	核糖体蛋白 S15	785	NT	1.0	2
936	核糖体蛋白 S15	785	NT	1.0	2
937	核糖体蛋白 L7A	732	(+)	1.0	3
938	核糖体蛋白 L7A	732	(+)	1.0	3
939	40S 核糖体蛋白 S14	784	NT	1.0	2
940	40S 核糖体蛋白 S14	784	(+)	1.0	2
941	40S 核糖体蛋白 S24	796	(+)	1.0	2?
942	60S 核糖体蛋白 L10A	737	(+)	1.0	1
943	核糖体蛋白 L13	740	(+)	1.0	1
944	核糖体蛋白 L13	740	(+)	1.0	1

[0317]

945	核糖体蛋白 S13	783	(+)	1.0	3
946	核糖体蛋白 S13	783	NT	1.0	2
947	核糖体蛋白 L4e	727	(+)	1.0	3
948	核糖体蛋白 L4e	727	(+)	1.0	2
949	核糖体蛋白 S30	803	(+)	1.0	2
950	核糖体蛋白 S30	803	(+)	1.0	2
951	核糖体蛋白 L26	749	(+)	1.0	2?
952	核糖体蛋白 L26	749	(+)	1.0	2?
953	核糖体蛋白 L31	754	NT	1.0	3
954	60S 核糖体蛋白 L10	736	NT	1.0	2
955	60S 核糖体蛋白 L10	736	(+)	1.0	2
956	核糖体蛋白 S4	772	(+)	1.0	3
957	核糖体蛋白 S4	772	(+)	1.0	2
958	核糖体蛋白 L11c	738	(+)	1.0	2
959	核糖体蛋白 S6	774	(-)	1.0	1
960	核糖体蛋白 S11	782	(+)	1.0	3
961	核糖体蛋白 S11	782	(+)	1.0	3
962	核糖体蛋白 S11	781	NT	1.0	3
963	核糖体蛋白 S11	781	NT	1.0	3
964	核糖体蛋白 L12e	739	(+)	1.0	2
965	核糖体蛋白 L12e	739	NT	1.0	2
966	核糖体蛋白 S5	773	(+)	1.0	2
967	核糖体蛋白 S5	773	(+)	1.0	3
968	核糖体蛋白 S18	790	(+)	1.0	2
969	核糖体蛋白 S18	790	(+)	1.0	2
970	核糖体蛋白 L23A	747	(+)	1.0	2
971	核糖体蛋白 L23A	747	(+)	1.0	2
972	核糖体蛋白 L35A	759	NT	1.0	1
973	核糖体蛋白 L35A	759	(+)	1.0	2
974	核糖体蛋白 L21	746	NT	1.0	2?

[0318]

975	核糖体蛋白 L21	746	NT	1.0	2?
976	核糖体蛋白 L21	745	(+)	1.0	1
977	核糖体蛋白 L21	745	(-)	1.0	2?
978	核糖体蛋白 S8	777	(+)	1.0	2
979	核糖体蛋白 S8	777	(+)	1.0	3
980	核糖体蛋白 S16	788	NT	1.0	1
981	核糖体蛋白 S16	799	NT	1.0	2
982	核糖体蛋白 L18Ac	744	(+)	1.0	2
983	核糖体蛋白 S6	775	(+)	1.0	1
984	核糖体蛋白 S3	768	NT	1.0	2
985	核糖体蛋白 S3	768	(+)	1.0	2
986	核糖体蛋白 S17	789	NT	1.0	2
987	核糖体蛋白 S15A	786	(+)	1.0	2
988	核糖体蛋白 L7	730	(+)	1.0	2?
989	核糖体蛋白 L7	730	(+)	1.0	2
990	核糖体蛋白 S4	771	NT	1.0	2
991	核糖体蛋白 S4	771	(+)	1.0	2
992	40S 核糖体蛋白 S3A	769	(+)	1.0	1
993	40S 核糖体蛋白 S3A	769	NT	1.0	1
994	核糖体蛋白 L36	760	(+)	1.0	1
995	核糖体蛋白 L37	762	(+)	1.0	2
996	核糖体蛋白 L37	763	(+)	1.0	2
997	核糖体蛋白 S19	792	(+)	1.0	1
998	核糖体蛋白 S19	792	NT	1.0	1
999	核糖体蛋白 S19	792	(+)	1.0	1
1000	核糖体蛋白 S20	794	NT	1.0	1
1001	核糖体蛋白 L15	743	NT	1.0	2
1002	核糖体蛋白 L35A	758	NT	1.0	1
1003	核糖体蛋白 L35A	758	NT	1.0	1
1004	40S 核糖体蛋白 S21	795	NT	1.0	3

[0319]

1005	核糖体蛋白 S29	802	NT	1.0	1
1006	核糖体蛋白 S8	778	(+)	1.0	1
1007	40S 核糖体蛋白 S3A	770	(+)	1.0	1
1008	核糖体蛋白 L24	748	(+)	1.0	2
1009	核糖体蛋白 S16	787	(+)	1.0	2
1010	核糖体蛋白 L7A	733	(+)	1.0	1
1011	40S 核糖体蛋白 S9	780	NT	1.0	2
1012	40S 核糖体蛋白 SA	804	NT	1.0	1
1013	40S 核糖体蛋白 SA	804	(+)	1.0	1
1014	核糖体蛋白 L37Ae	764	(-)	1.0	2?
1015	60S 核糖体蛋白 L23	797	NT	1.0	1
1016	核糖体蛋白 L7	731	NT	1.0	2
1017	核糖体蛋白 L36	761	NT	1.0	1
1018	40S 核糖体蛋白 S9	779	(+)	1.0	2?
1019	核糖体蛋白 S26	798	(+)	1.0	3
1020	核糖体蛋白 L34A	756	(+)	1.0	2
1021	核糖体蛋白 L27Ae	751	NT	1.0	1
1022	核糖体蛋白 L27Ae	751	(+)	1.0	1
1023	40S 核糖体蛋白 S28	801	(-)	1.0	2?
1024	核糖体蛋白 L29	753	(-)	1.0	3
1025	核糖体蛋白 L28	752	(+)	1.0	4
1026	核糖体蛋白 L28	752	NT	1.0	4
1027	核糖体生物发生蛋白 RLP24	765	NT	1.0	2
1028	核糖体生物发生蛋白 RLP24	765	(-)	1.0	1
1029	核糖体蛋白 L27	750	(+)	1.0	2
1030	核糖体蛋白 L27	750	(+)	1.0	2
1031	39S 核糖体蛋白 L13	766	(-)	1.0	3
1032	39S 核糖体蛋白 L13	766	(-)	1.0	3
1033	核糖体蛋白 S2	767	(+)	1.0	1
1034	40S 核糖体蛋白 S28	800	(-)	1.0	2?

[0320]

1035	核糖体蛋白 L14		742	(+)	1.0	2
1036	核糖体蛋白 L6		729	(+)	1.0	2
1037	衣被蛋白 β 亚基		822	(+)	1.0	2
1038	衣被蛋白 γ 亚基		828	(+)	1.0	2
1039	肌球蛋白 VIIa		824	(+)	1.0	2
1040	肌球蛋白 VIIa		823	(+)	1.0	1
1041	肌动蛋白		821	(+)	1.0	1
1042	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 1		826	(+)	1.0	2
1043	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 1		825	(+)	1.0	2
1044	曲颈		830	NT	1.0	1
1045	曲颈		829	(+)	1.0	2
1046	预测假定蛋白		827	(+)	1.0	2
1047	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 2		805	(+)	1.0	2
1048	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基, 假定		806	(-)	1.0	2
1049	可能的 26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 3		807	(+)	1.0	1
1050	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 7		808	(+)	1.0	2
1051	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 2		809	NT	1.0	2
1052	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 4		810	(-)	1.0	3
1053	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 8		811	(+)	1.0	3
1054	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 13		812	(+)	1.0	3
1055	假定非典型蛋白		813	(-)	1.0	2
1056	ADP 核糖基化因子 GTP 酶活化蛋白, 假定		814	(-)	1.0	2
1057	高尔基特异布雷菲德菌素 A 抗性鸟嘌呤核苷酸交换因子, 假定		815	(-)	1.0	2?
1058	Sec24 蛋白, 假定		816	(+)	1.0	2
1059	蛋白质转运蛋白 Sec24B		817	(-)	1.0	1
1060	蛋白质转运蛋白 sec31A		818	(+)	1.0	2
1061	GTP 结合蛋白 SAR1B		819	(+)	1.0	2
1062	蛋白质转运蛋白 sec13		820	(-)	1.0	2?
1063	Sec24B 蛋白		817	(-)	1.0	1
1064	衣被蛋白 β 亚基		822	(+)	1.0	2

[0321]

1065	衣被蛋白 γ 亚基	828	(+)	1.0	2
1066	肌球蛋白 VIIa	824	(+)	1.0	2
1067	肌球蛋白 VIIa	823	(+)	1.0	2
1068	肌动蛋白	821	(+)	1.0	1
1069	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 1	825	NT	1.0	2
1070	曲颈	829	(+)	1.0	2
1071	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 2	805	(-)	1.0	2
1072	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 12	806	(-)	1.0	2
1073	可能的 26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 3	807	(+)	1.0	1
1074	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 7	808	(+)	1.0	2
1075	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 2	809	(+)	1.0	2
1076	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 4	810	(-)	1.0	2
1077	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 8	811	(+)	1.0	3
1078	26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 13	812	(+)	1.0	3
1079	ADP 核糖基化因子 GTP 酶活化蛋白, 假定	814	(-)	1.0	2
1080	高尔基特异带雷菲德菌素 A 抗性鸟嘌呤核苷酸交换因子, 假定	815	(+)	1.0	1
1081	Sec24 蛋白, 假定	816	(+)	1.0	1
1082	蛋白质转运蛋白 Sec24B	817	(+)	1.0	1
1083	蛋白质转运蛋白 sec31A	818	(-)	1.0	1
1084	GTP 结合蛋白 SAR1B	819	(+)	1.0	1
1085	蛋白质转运蛋白 sec13	820	(+)	1.0	1

* dsRNA 触发因子的反义链的序列

** (+) 与用水处理的对照相比, 显著的生长受阻或死亡率; (-) 与用水处理的对照相比, 无显著的生长受阻或死亡率; NT=(1) 未测试触发因子, 或(2)发生以下两种情况: 在该测试中样品未提供显著的生长受阻/死亡率并且阳性对照未提供显著的生长受阻/死亡率。用于这项测定的阳性对照是靶向 β 衣被蛋白并且具有 SEQ ID NO:1086, 先在美国专利第 7,943,819 号中作为 SEQ ID NO:880 公开的有义链序列的 dsRNA 触发因子。

[0322]

[0323]

容许可用基因组序列数据时, 确定由指定触发因子序列所跨越的外显子的数量并

且在表1中提供：“1”表示触发因子序列似乎含在单一连续基因组座位中；“2?”表示触发因子全长未与基因组对齐，至少40个碱基对缺失，这可能表示可用基因组序列数据的不完整性。

[0324] 从与叶甲属靶基因一样的单独测序和组装项目鉴定编码马铃薯叶甲(科罗拉多马铃薯甲虫,CPB)泡外复合体的亚基的附加cDNA序列。这些叶甲属泡外靶基因,SEQ ID NO:1087-1094,在设计包含与泡外靶基因互补的至少21个连续核苷酸并且用于控制叶甲属种类侵扰的多核苷酸触发因子中,及在产生表达此类多核苷酸触发因子以抗叶甲属种类侵扰的转基因植物中 useful。

[0325] 如实施例4中所述,为每个叶甲属泡外靶基因(SEQ ID NO:1087-1094)设计长度介于约50个至约500个碱基对(更具体地,介于约100个至约450个碱基对)的触发因子。使用以上对表1中的多核苷酸所描述的相同方法测试这些触发因子。

[0326] 在一个非限制性实例中,被设计为靶向马铃薯叶甲Exo70基因(SEQ ID NO:1093)的多核苷酸触发因子,作为具有SEQ ID NO:1095的反义链序列的平端双链RNA而产生。使用上述方法,在所测试的两个浓度下,这种触发因子引起显著的生长受阻和显著的死亡率。在表2中提供了结果。

[0327] 表2

SEQ ID NO.*	触发因子长度 (bp)	靶基因	靶基因的 SEQ ID NO.	CPB 食物生物测定结果 **	dsRNA 浓度 (ppm)
1095	277	Exo70	1093	(+)	0.1
1095	277	Exo70	1093	(+)	0.033

[0329] *dsRNA触发因子的反义链的序列

[0330] **(+与用水处理的对照相比,显著的生长受阻或死亡率;(-)与用水处理的对照相比,无显著的生长受阻或死亡率;NT=(1)未测试触发因子,或(2)发生以下两种情况:在该测试中样品未提供显著的生长受阻/死亡率并且阳性对照未提供显著的生长受阻/死亡率。用于这项测定的阳性对照是靶向β衣被蛋白并且具有SEQ ID NO:1086,先前在美国专利第7,943,819号中作为SEQ ID NO:880公开的有义链序列的dsRNA触发因子。

[0331] 实施例6

[0332] 该实施例说明了本发明的多核苷酸、用于控制叶甲属种类的杀虫组合物和用于评价此类多核苷酸的叶甲属种类控制功效的代表性测定的非限制性实施方案。

[0333] 使用以下叶盘法测试用于抑制叶甲属靶基因的5种dsRNA触发因子(具有SEQ ID NO:989、1049、1050、1078和1084的反义链序列;参见表1)以测定由于接触或摄取多核苷酸触发因子引起的马铃薯叶甲幼虫的死亡率或生长受阻。

[0334] 对于用成虫的叶盘生物测定而言,收集新羽化的科罗拉多马铃薯甲虫(CPB,马铃薯叶甲)成虫并用马铃薯叶喂养长达7天,然后在开始生物测定之前禁食6-8小时。每次处理使用15只成虫(触发因子/剂量)。向直径15-毫米的马铃薯(大西洋品种)叶盘施用10微升在0.1%Silwet L77溶液中(于超纯水(Invitrogen)中)含有250、83.3、27.8或9.3纳克的dsRNA触发因子;用制剂0.1%Silwet L77溶液或用设计为使绿色荧光蛋白(GFP)沉默的阴性对照触发因子处理对照叶盘。将经过处理的叶盘单独置于含有2毫升/孔的固化2%琼脂/蒸馏水基质的6孔集群板的孔中。将单只CPB成虫置于每个孔中并且培育过夜以使其吃掉叶

盘;在叶盘未被完全吃掉的情况下,昆虫可能因处理而死亡或受损伤并且从所述测定中排除。第二天,将来自于指定触发因子/剂量处理的CPB成虫全体转移到由有盖、充气16盎司半透明塑料容器制成的喂养场所,在容器底部衬有滤纸并且装有马铃薯(大西洋品种)叶,为了新鲜而将茎插入充满水的管中。在环境室内的喂养场所中培育昆虫(27摄氏度;60%相对湿度;16小时光照/8小时黑暗),根据需要补充马铃薯叶。每天监测昆虫活力。记录昆虫为活动的(有活力)、垂死(置于背卧位10秒后未恢复足立位)或死亡。在表3中提供了活力结果。

[0335] 表3

处理	CPB 靶基因 SEQ ID NO.	处理后的天数								
		5	6	7	8	9	10	12	14	16
制剂-1	n/a	100	100	100	100	100	100	100	100	100
制剂-2	n/a	93	93	93	93	93	93	86	86	86
SEQ ID NO. 1115, GFP-1	n/a	100	100	100	100	100	100	80	80	60
SEQ ID NO. 1115, GFP-2	n/a	93	93	87	87	80	80	80	80	80
SEQ ID NO. 989*, 250ng	730	87	87	80	33	0	0	0	0	0
SEQ ID NO. 989*, 83ng	730	100	100	79	43	29	7	0	0	0
SEQ ID NO. 989*, 28ng	730	100	100	80	47	27	0	0	0	0
SEQ ID NO. 989*, 9ng	730	93	93	73	60	33	0	0	0	0
SEQ ID NO. 1049*, 250ng	807	40	13	0	0	0	0	0	0	0
SEQ ID NO. 1049*, 83ng	807	80	7	7	7	0	0	0	0	0
SEQ ID NO. 1049*, 28 ng	807	80	13	13	13	13	7	13	7	7
SEQ ID NO. 1049*, 9ng	807	87	73	60	60	60	60	53	53	53
SEQ ID NO. 1050*, 250ng	808	60	13	0	0	0	0	0	0	0
SEQ ID NO. 1050*, 83ng	808	60	20	0	0	0	0	0	0	0
SEQ ID NO. 1050*, 28ng	808	86	29	29	14	14	14	14	14	14
SEQ ID NO. 1050*, 9ng	808	80	60	60	53	53	53	47	40	40
SEQ ID NO. 1078*, 250ng	812	67	27	20	0	0	0	0	0	0
SEQ ID NO. 1078*, 83ng	812	60	13	7	7	7	7	7	7	7
SEQ ID NO. 1078*, 28ng	812	73	33	20	13	13	13	13	13	13
SEQ ID NO. 1078*, 9ng	812	100	80	80	67	60	60	53	47	47
SEQ ID NO. 1084*, 250ng	819	33	0	0	0	0	0	0	0	0

[0336]

处理	CPB 靶基因 SEQ ID NO.	处理后的天数								
		5	6	7	8	9	10	12	14	16
[0337] SEQ ID NO. 1084*, 83ng	819	73	33	7	0	0	0	0	0	0
SEQ ID NO. 1084*, 28ng	819	73	40	33	33	33	33	20	20	20
SEQ ID NO. 1084*, 9ng	819	80	60	53	53	53	53	47	47	40

[0338] *除非另外指出,否则为dsRNA触发因子的反义链的序列。

[0339] “制剂-1”和“制剂-2”为无效对照(0.1%于水中的Silwet)的副本。“GFP-1”和“GFP-2”是使用靶向绿色荧光蛋白(GFP)并且具有SEQ ID NO:1115的有义链序列的377bp dsRNA触发因子的阴性对照的副本。“n/a”=不适用。

[0340] 对于用幼虫的叶盘生物测定而言,使用在24小时的生物测定期间孵化的新生科罗拉多马铃薯甲虫(CPB,马铃薯叶甲)幼虫。每次处理使用16只幼虫(触发因子/剂量)。向直径7-毫米的马铃薯(大西洋品种)叶盘施用2微升在0.1%Silwet L77溶液中(于超纯水(Invitrogen)中含有250、83.3、27.8或9.3纳克的dsRNA触发因子;用制剂0.1%Silwet L77溶液或用设计为使绿色荧光蛋白(GFP)沉默的阴性对照触发因子处理对照叶盘。将经过处理的叶盘单独置于含有0.5毫升/孔的固化2%琼脂/蒸馏水基质的128孔集群板的孔中。将单只CPB新生虫置于每个孔中并且培育过夜以使其吃掉叶盘;在叶盘未被完全吃掉的情况下,昆虫可能因处理而死亡或受损伤并且从所述测定中排除。第二天,将来自于指定触发因子/剂量处理的CPB幼虫全体转移到由有盖、充气16盎司半透明塑料容器制成的喂养场所,在容器底部衬有滤纸并且装有马铃薯(大西洋品种)叶,为了新鲜而将茎插入充满水的管中。在环境室内的喂养场所中培育昆虫(27摄氏度;60%相对湿度;16小时光照/8小时黑暗),根据需要补充马铃薯叶。每天监测幼虫活力。记录幼虫为活着或死亡。在表4中提供了活力结果。

[0341] 表4

[0342]

处理	CPB 靶基因 SEQ ID NO.	处理后的天数									
		5	6	7	8	9	10	12	14	16	
制剂-1	n/a	100	100	100	100	100	100	92	54	15	
制剂-2	n/a	87	87	87	87	73	73	73	27	20	
SEQ ID NO. 1115, GFP-1	n/a	69	69	69	69	69	69	69	50	38	
SEQ ID NO. 1115, GFP-2	n/a	100	100	94	94	75	75	56	19	19	
SEQ ID NO. 989*, 250 ng	730	44	38	31	13	13	0	0	0	0	
SEQ ID NO. 989*, 83 ng	730	19	19	13	0	0	0	0	0	0	
SEQ ID NO. 989* 28ng	730	69	50	38	13	13	6	6	6	6	
SEQ ID NO. 989*, 9ng	730	38	13	13	13	6	6	6	6	6	
SEQ ID NO. 1049*, 250ng	807	20	7	7	7	7	0	0	0	0	
SEQ ID NO. 1049*, 83ng	807	38	13	13	13	13	13	13	13	13	
SEQ ID NO. 1049*, 28ng	807	38	13	13	6	6	6	6	6	6	
SEQ ID NO. 1049*, 9ng	807	57	21	21	21	21	21	21	21	14	
SEQ ID NO. 1050*, 250ng	808	44	31	31	25	19	19	19	0	0	
SEQ ID NO. 1050*, 83ng	808	38	19	19	6	0	0	0	0	0	
SEQ ID NO. 1050*, 28ng	808	13	13	13	13	13	13	0	0	0	
SEQ ID NO. 1050*, 9ng	808	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
SEQ ID NO. 1078*, 250ng	812	19	13	0	0	0	0	0	0	0	
SEQ ID NO. 1078*, 83ng	812	29	14	14	7	7	0	0	0	0	
SEQ ID NO. 1078*, 28ng	812	50	31	19	13	13	6	6	0	0	
SEQ ID NO. 1078*, 9ng	812	60	47	40	27	27	27	27	27	13	
SEQ ID NO. 1084*, 250ng	819	79	43	43	43	29	21	21	14	14	
SEQ ID NO. 1084*, 83 ng	819	56	38	19	19	19	13	13	13	13	
SEQ ID NO. 1084*, 28ng	819	50	38	25	19	19	19	19	19	19	
SEQ ID NO. 1084*, 9ng	819	75	50	44	44	38	38	38	31	31	

[0343] *除非另外指出,否则为dsRNA触发因子的反义链的序列。

[0344] “制剂-1”和“制剂-2”为无效对照(0.1%于水中的Silwet)的副本。“GFP-1”和“GFP-2”是使用靶向绿色荧光蛋白(GFP)并且具有SEQ ID NO:1115的有义链序列的377bp dsRNA触发因子的阴性对照的副本。“n/a”=不适用。

[0345] 实施例7

[0346] 该实施例说明了用于抑制叶甲属种类靶基因的多核苷酸触发因子的非限制性实施方案。更具体地,该实施例说明了由有义和单独的反义链组成的平端dsRNA触发因子的实施方案,以及呈发夹形式的dsRNA触发因子(含有有义区和反义区的单RNA转录物)的实施方案。

[0347] 表5提供了具有与“亲本触发因子”(参见表1)相关的序列的平端dsRNA触发因子,其中已经确定亲本触发因子对马铃薯叶甲具有杀虫活性(参见表1、3和4)并且衍生触发因子是与亲本触发因子的子区域相对应的平端dsRNA。

[0348] 表5

触发因子 SEQ ID NO:*	靶基因名称	靶基因 SEQ ID NO:	亲本触发因 子 SEQ ID NO:	食物活性与 CPB(0.1 ppm)	食物活性与 CPB(0.025ppm)
1096	GTP 结合蛋白 SAR1B	819	1084	(-)	(-)
1097	GTP 结合蛋白 SAR1B	819	1084	(-)	(-)
1098	GTP 结合蛋白 SAR1B	819	1084	(+)	(-)
1099	GTP 结合蛋白 SAR1B	819	1084	(+)	(-)
1100	可能的 26S 蛋 白酶体非 ATP 酶调节亚基 3	807	1049	(-)	(-)
1101	26S 蛋白酶体 非 ATP 酶调节 亚基 7	808	1050	(-)	(-)
1102	26S 蛋白酶体 非 ATP 酶调节 亚基 13	812	1078	(-)	(-)
1103	核糖体蛋白 L7	730	989	(-)	(-)
1104	核糖体蛋白 L7	730	989	(+)	(-)

[0349] *dsRNA触发因子的反义链的序列

[0351] 表6提供了呈发夹形式的dsRNA触发因子(含有杂交形成dsRNA的有义区和反义区的单RNA转录物),序列源自“亲本触发因子”或与之相关(参见表1),其中已经确定亲本触发因子对马铃薯叶甲具有杀虫活性(参见表1、3和4)。发夹触发因子当在具有适当启动子或其它元件的表达构建体中提供以允许其(例如)在细菌细胞或植物细胞中表达时,适于体外表达或体内表达。表6中公开的非限制性实施方案各自含有T7启动子(位于每个发夹序列中的核苷酸位置1-17)和位于有义区和反义区之间的“环”或间隔区;环含有非特异性(与靶基因的任何部分都不互补或相同的)核苷酸。技术人员将立刻理解,发夹的有义区和反义区与用于在指定细胞类型中表达的不同适合启动子组合,并且与不同的间隔区或环序列组合使用(或者一个也没有,其中在有义区和反义区接合处的核苷酸在发夹中形成必需“弯曲”或最小的环)。技术人员还将认识到,易于设计类似重组DNA构建体以编码与表1-5中提供的平端dsRNA触发因子相对应或靶向靶基因序列组中提供的靶基因的发夹dsRNA触发因子。

[0352] 表6

发夹触发因子 SEQ ID NO:*	发夹中触发因子反义区的核苷酸位置	发夹中的触发因子反义区, SEQ ID NO:	发夹中环或间隔区的核苷酸位置	发夹中触发因子有义区的核苷酸位置	平端dsRNA触发因子 SEQ ID NO:	CPB 靶基因 SEQ ID NO:
[0353] 1105	21-417	1110	418-566	567-963	989**	730
1106	21-300	1111	301-450	451-730	1086	
1107	21-453	1112	454-603	604-1036	1084**	819
1108	21-458	1113	459-608	609-1046	1050**	808
1109	21-448	1114	449-598	599-1026	1038**	828

[0354] *编码发夹dsRNA触发因子的DNA构建体的序列

[0355] **dsRNA触发因子的反义链的序列

[0356] SEQ ID NO:1086与靶向β衣被蛋白的平端dsRNA的有义链序列相对应,先前在美国专利第7,943,819号中作为SEQ ID NO:880公开。

[0357] 预计如本文所述的某些重组RNA(例如,表1-6中描述的dsRNA触发因子或其发夹等效物,或这些触发因子的活性片段)与一种或多种非多核苷酸杀虫剂的组合在叶甲属种类侵扰的预防或控制方面,与用单独的RNA或单独的非多核苷酸杀虫剂获得的效果相比,将导致协同提高。常规昆虫生物测定如此处所述的采用人工食物的生物测定,用于定义使用多核苷酸触发因子和一种或多种非多核苷酸杀虫剂(例如,马铃薯糖蛋白、植物凝集素、植物脱皮甾醇、苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白、致病杆菌杀虫蛋白、发光杆菌杀虫蛋白、侧孢芽孢杆菌杀虫蛋白和球形芽孢杆菌杀虫蛋白)的组合,对于幼虫死亡率或生长抑制的剂量反应。技术人员可以在常规生物测定中测试多核苷酸和非多核苷酸杀虫剂的组合以鉴定用于保护植物免受叶甲属种类侵扰具有协同作用并且理想的生物活性剂的组合。

[0358] 实施例8RNAi介导的对马铃薯叶甲的控制的田间功效

[0359] 进行田间试验以测试在田间条件下局部施用的dsRNA触发因子对控制马铃薯植株受马铃薯叶甲(科罗拉多马铃薯甲虫,CPB)侵扰的功效。使用局部(叶面喷洒)施用测试3种dsRNA触发因子:具有SEQ ID NO:989的反义链序列的平端dsRNA,其靶向核糖体蛋白L7(由SEQ ID NO:730编码);具有SEQ ID NO:1049的反义链序列的平端dsRNA,其靶向可能的26S蛋白酶体非ATP酶调节亚基3(由SEQ ID NO:807编码);及由SEQ ID NO:1105的DNA构建体编码的发夹dsRNA,其靶向核糖体蛋白L7(由SEQ ID NO:730编码)。SEQ ID NO:1105编码具有与SEQ ID NO:989相对应的反义链的发夹dsRNA(参见实施例7)。为实验设计呈完全随机区组设计排列的11次处理,重复4次。试验区由春季分20英尺两行种植,行中央间隔6英尺的马铃薯植株(“优良”品种)组成;试验区根据标准经济栽培实践维持。叶面喷洒处理进行两次:第一次处理在种植36天后而第二次处理在种植43天后。所有叶面处理均用装备有间隔20英寸的110003VS喷嘴的4-喷嘴喷杆施用,一次喷洒2行,并且以40磅/平方英尺由二氧化碳驱动的双背包式喷雾器驱动,每英亩递送38加仑。对于每个区10根随机选择的茎在3个时间点记录科罗拉多马铃薯甲虫的所有生命阶段:第一次叶面喷洒处理3天后(种植39天后),第一次叶面喷洒处理7天后(种植43天后)和在第二次叶面喷洒处理3天后(种植46天后)。在第一次叶面喷洒处理9天后(种植45天后)测量主要由小幼虫引起的落叶。两种商业合成(小分子)杀虫剂用作阳性对照:Coragen®(氯虫苯甲酰胺(chlorantraniliprole),DuPont)和Radiant®(乙基多杀菌素(spinetoram),Dow AgroSciences)。结果呈现于表7中;有统计学

差异的值用不同字母(a、b、c、d、e)表示。共用一个字母的那些处理,例如共用字母“a”的未处理的对照和在第一次喷洒3天后的5克/英亩SEQ ID NO:989处理无统计学差异;而不共用一个字母的那些处理,例如未处理的对照和在第一次喷洒3天后的Coragen®处理有统计学差异。dsRNA触发因子的作用随时间推移而增强并且显示出剂量依赖性反应;在第二次叶面喷洒3天后,除最低剂量的具有SEQ ID NO:1049的反义链序列的dsRNA触发因子外,所有dsRNA触发因子处理均导致大幼虫减少,与合成杀虫剂阳性对照(Coragen®和辐射处理)无统计学差异而与未处理的对照有统计学差异。落叶对dsRNA处理也显示出剂量依赖性反应;几种dsRNA处理与未处理的对照有统计学差异并且在试验最高剂量下的所有dsRNA触发因子均提供了与合成杀虫剂阳性对照(Coragen®和辐射处理)所提供的无统计学差异的落叶保护。幼虫数量减少及落叶或植物损伤减少表明经dsRNA处理的马铃薯植株对马铃薯叶甲的抗性提高;预计这些对马铃薯叶甲的抗性提高的植株会展现出提高的产量(可收获的块茎增加)。

[0360] 表7

		科罗拉多马铃薯甲虫的平均数量/10根茎						
		小幼虫			大幼虫			
处理	速率(克/英亩)	第一次喷洒3天后	第一次喷洒7天后	第二次喷洒3天后	第一次喷洒3天后	第一次喷洒7天后	第二次喷洒3天后	落叶%
未处理的对照	n.a.	115.8 a	201.3 a	72.0 ab	0	45.3 ab	108.0 a	72.5 a
SEQ ID	5	63.5 ab	146.5	98.0 ab	3	8.5 bcd	8.3 b	9.8 de

处理	速率(克/英亩)	科罗拉多马铃薯甲虫的平均数量/10根茎						落叶%
		小幼虫			大幼虫			
		第一次喷洒3天后	第一次喷洒7天后	第二次喷洒3天后	第一次喷洒3天后	第一次喷洒7天后	第二次喷洒3天后	
未处理的对照	n.a.	115.8 a	201.3 a	72.0 ab	0	45.3 ab	108.0 a	72.5 a
NO:989*			ab					
SEQ ID NO:989*	1	93.3 ab	159.5 a	144.5 a	1.3	33.0 abcd	21.8 b	28.8 cd
SEQ ID NO:989*	0.2	87.8 ab	116.0 abc	118.0 a	0	25.3 abcd	33.8 b	45.0 abc
SEQ ID NO:1049*	5	66.5 ab	135.5 abc	126.0 a	0	2.0 cd	12.8 b	15.0 cde
SEQ ID NO:1049*	1	91.0 ab	175.0 a	102.5 ab	0	41.3 abc	33.8 b	32.5 bcd
SEQ ID NO:1049*	0.2	93.5 ab	113.8 abc	99.3 ab	0.8	59.0 a	80.0 a	68.8 ab
SEQ ID NO:1105*	5	61.0 ab	91.3 abc	117.8 a	0	9.0 bcd	14.0 b	12.5 cde
SEQ ID NO:1105*	1	72.3 ab	104.8 abc	87.3 ab	0	17.8 bcd	8.8 b	18.8 cd
Coragen®	5**	9.8 b	6.0 c	0.3 b	0	0.0 d	0.0 b	0.0 e
辐射	8**	1.3 b	16.8 bc	0.0 b	0	0.5 d	0.0 b	0.0 e
来自于方差分析的P值		0.0053	0.0004	0.0009	ns	0.0001	<0.0001	<0.0001

[0363] n.a., 不适用

[0364] ns, 不显著

[0365] *应用于每1600毫升水含有3毫升商业喷雾佐剂TACTIC™(Loveland Products, Loveland, CO 80538)的制剂中的dsRNA触发因子

[0366] **每英亩的液量盎司

[0367] 本文公开且要求保护的所有材料和方法均可以上公开所指示那样制备和使用, 无需过度实验。虽然已经依据实施方案和说明性实例描述了本发明的材料和方法, 但是对于本领域技术人员显而易见的是, 在不背离本发明的原理、精神和范围的前提下, 可对本文所述的材料和方法加以变化。对于本领域技术人员显而易见的所有此类相似替代和修改均被认为是由所附权利要求所定义的本发明的精神、范围和概念之内。