

1. 一种沉默元件,其包含至少一个双链RNA区域,所述双链RNA区域的至少一条链包含与以下互补的多核苷酸:

(a) 包含SEQ ID NO:1-49中任一者的核苷酸序列;或其变体和片段,及其互补序列;

(b) 与核苷酸SEQ ID NO:1-49中任一者具有至少90%序列同一性的核苷酸序列;或其变体和片段,及其互补序列;或

(c) 包含SEQ ID NO:1-49中任一者的至少19个连续核苷酸的核苷酸序列;或其变体和片段,及其互补序列;

其中所述沉默元件对昆虫植物有害生物具有杀昆虫活性。

2. 如权利要求1所述的沉默元件,其中所述昆虫植物有害生物是鞘翅目(Coleoptera)植物有害生物。

3. 如权利要求2所述的沉默元件,其中所述鞘翅目植物有害生物是叶甲属(Diabrotica)植物有害生物。

4. 如权利要求3所述的沉默元件,其中所述叶甲属植物有害生物包括玉米根萤叶甲(D. virgifera virgifera)、墨西哥玉米根虫(D. virgifera zea)、南美叶甲(D. speciosa)、巴氏根叶甲(D. barberi)、墨西哥玉米根虫(D. vtrgifera zea)、或黄瓜十一星叶甲(D. undecimpunctata)。

5. 如权利要求1所述的沉默元件,其中所述昆虫植物有害生物是鳞翅目(Lepidopteran)植物有害生物。

6. 如权利要求5所述的沉默元件,其中鳞翅目植物有害生物为斜纹夜蛾(Spodoptera litura)、玉米螟(Ostrinia nubilalis)、谷实夜蛾(Helicoverpa zea)、或草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的沉默元件,其中所述沉默元件包含发夹环。

8. 如权利要求1或7所述的沉默元件,其中所述沉默元件包含第一区段、第二区段和第三区段,其中

(a) 所述第一区段包含至少约19个核苷酸,这些核苷酸与SEQ ID NO:1-49中任一者所示的序列具有至少90%序列互补性;或其变体和片段,及互补序列;或者所述第一区段由与SEQ ID NO:1-49中任一者所示的序列具有至少90%序列互补性的至少19个核苷酸组成;

(b) 所述第二区段包含足够长的环,以允许所述沉默元件被转录为发夹RNA;并且,

(c) 所述第三区段包含至少约19个核苷酸,这些核苷酸与所述第一区段具有至少85%互补性。

9. 如权利要求8所述的沉默元件,其中所述第三区段与所述第一区段具有至少90%互补性。

10. 如权利要求8所述的沉默元件,其中所述第三区段与所述第一区段具有至少95%互补性。

11. 如权利要求8所述的沉默元件,其中所述第三区段与所述第一区段具有至少98%互补性。

12. 如权利要求8所述的沉默元件,其中所述第一区段与鞘翅目昆虫物种互补;并且其中所述第三区段与不同的鞘翅目昆虫物种互补。

13. 如权利要求8所述的沉默元件,其中所述第一区段与半翅目(Hemiptera)昆虫物种

互补;并且其中所述第三区段与不同的半翅目昆虫物种互补。

14. 如权利要求8所述的沉默元件,其中所述第一区段与鳞翅目昆虫物种互补;并且其中所述第三区段与不同的鳞翅目昆虫物种互补。

15. 一种DNA构建体,其包含编码如权利要求1-14中任一项所述的沉默元件的多核苷酸。

16. 一种表达构建体,其包含如权利要求15所述的DNA构建体。

17. 如权利要求16所述的表达盒,其中所述多核苷酸可操作地连接至异源启动子。

18. 如权利要求16所述的表达盒,其中所述多核苷酸的侧翼是在所述多核苷酸的一个末端处的第一可操作地连接的趋同启动子和在所述多核苷酸的对向末端处的第二可操作地连接的趋同启动子,其中所述第一趋同启动子和所述第二趋同启动子能够驱动所述沉默元件的表达。

19. 一种宿主细胞,其包含如权利要求1-14中任一项所述的沉默元件、如权利要求15所述的DNA构建体、或如权利要求16-18中任一项所述的表达构建体。

20. 如权利要求19所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是细菌细胞。

21. 如权利要求20所述的宿主细胞,其中所述细菌细胞是灭活的细菌细胞。

22. 如权利要求19-21中任一项所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞包含如权利要求16所述的表达构建体。

23. 如权利要求22所述的宿主细胞,其中所述表达构建体包含与如权利要求15所述的DNA构建体可操作地连接的转录启动子。

24. 如权利要求23所述的宿主细胞,其中可通过将所述宿主细胞暴露于外源性分子来诱导所述转录启动子。

25. 一种组合物,其包含如权利要求1-14中任一项所述的核糖核酸构建体、如权利要求15所述的DNA构建体、如权利要求16-18中任一项所述的表达构建体、或如权利要求19-24中任一项所述的宿主细胞。

26. 如权利要求25所述的组合物,其进一步包含农业上可接受的载体。

27. 如权利要求25所述的组合物,其进一步包含除草剂化合物、杀昆虫剂、杀真菌剂、杀线虫剂、农业上可接受的载体、和/或细菌,或其组合。

28. 如权利要求25或27所述的组合物,其中所述组合物呈液体形式、固体形式或凝胶形式。

29. 如权利要求25所述的组合物,其中所述组合物是固体形式。

30. 如权利要求29所述的组合物,其中所述固体形式是丸剂、粉末、聚集体或模制品。

31. 一种植物细胞,其基因组中稳定地并入了编码沉默元件的异源多核苷酸,其中所述多核苷酸包含:

(a) 包含SEQ ID NO:1-49中任一者的核苷酸序列;或其变体和片段,及其互补序列;

(b) 与核苷酸SEQ ID NO:1-49中任一者具有至少90%序列同一性的核苷酸序列;或其变体和片段,及其互补序列;或

(c) 包含SEQ ID NO:1-49中任一者的至少19个连续核苷酸的核苷酸序列;或其变体和片段,及其互补序列;

其中所述沉默元件对植物有害生物具有杀昆虫活性。

32. 如权利要求31所述的植物细胞,其中所述昆虫植物有害生物是鞘翅目植物有害生物。

33. 如权利要求32所述的植物细胞,其中所述鞘翅目植物有害生物是叶甲属植物有害生物。

34. 如权利要求33所述的植物细胞,其中所述叶甲属植物有害生物包括玉米根萤叶甲、墨西哥玉米根虫、南美叶甲、巴氏根叶甲、墨西哥玉米根虫、或黄瓜十一星叶甲。

35. 如权利要求31所述的植物细胞,其中所述鞘翅目植物有害生物是条跳甲属(*Phyllotreta*)植物有害生物。

36. 如权利要求35所述的植物细胞,其中条跳甲属植物有害生物是黄曲条跳甲(*Phyllotreta striolata*)。

37. 如权利要求31所述的植物细胞,其中所述鞘翅目植物有害生物是瘦跗叶甲属(*Leptinotarsa*)植物有害生物。

38. 如权利要求37所述的植物细胞,其中瘦跗叶甲属植物有害生物是马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)。

39. 如权利要求31所述的植物细胞,其中所述昆虫植物有害生物是半翅目植物有害生物。

40. 如权利要求31所述的植物细胞,其中所述昆虫植物有害生物是鳞翅目植物有害生物。

41. 如权利要求40所述的植物细胞,其中鳞翅目植物有害生物是草地贪夜蛾、玉米螟、或谷实夜蛾。

42. 如权利要求31所述的植物细胞,其中所述植物细胞包含如权利要求16所述的表达盒。

43. 如权利要求31所述的植物细胞,其中所述沉默元件表达双链RNA。

44. 如权利要求31所述的植物细胞,其中所述沉默元件表达发夹RNA。

45. 如权利要求31所述的植物细胞,其中所述沉默元件可操作地连接至异源启动子。

46. 如权利要求31所述的植物细胞,其中所述植物细胞来自单子叶植物。

47. 如权利要求46所述的植物细胞,其中所述单子叶植物是玉米、大麦、粟、小麦或稻。

48. 如权利要求31所述的植物细胞,其中所述植物细胞来自双子叶植物。

49. 如权利要求48所述的植物细胞,其中所述双子叶植物是羽衣甘蓝、花椰菜、西兰花、芥菜植物、卷心菜、豌豆、三叶草、苜蓿、蚕豆、番茄、木薯、大豆、卡诺拉油菜(*canola*)、苜蓿、向日葵、红花、烟草、拟南芥属植物(*Arabidopsis*)、或棉花。

50. 一种植物或植物部分,其包含如权利要求31所述的植物细胞。

51. 一种转基因种子,其来自如权利要求50所述的植物。

52. 一种用于防治昆虫植物有害生物的方法,其包括向昆虫植物有害生物饲喂包含沉默元件的组合物,其中所述沉默元件防治所述植物有害生物,其中所述沉默元件包含与以下互补的序列:

(a) 包含SEQ ID NO:1-49中任一者的核苷酸序列;或其变体和片段,及其互补序列;

(b) 与核苷酸SEQ ID NO:1-49中任一者具有至少90%序列同一性的核苷酸序列;或其变体和片段,及其互补序列;或

(c) 包含SEQ ID NO:1-49中任一者的至少19个连续核苷酸的核苷酸序列;或其变体和片段,及其互补序列;或

其中所述沉默元件对所述植物有害生物具有杀昆虫活性。

53. 如权利要求52所述的方法,其中所述组合物包含其基因组中稳定地并入了编码所述沉默元件的多核苷酸的植物或植物部分。

54. 如权利要求52所述的方法,其中所述沉默元件包含双链RNA。

55. 如权利要求52所述的方法,其中所述沉默元件包含发夹RNA。

56. 如权利要求52所述的方法,其中编码沉默元件的所述多核苷酸可操作地连接至异源启动子。

57. 如权利要求52所述的方法,其中沉默元件由多核苷酸编码,其中所述多核苷酸的侧翼是在所述多核苷酸的一个末端处的第一可操作地连接的趋同启动子和在所述多核苷酸的对向末端处的第二可操作地连接的趋同启动子,其中所述第一趋同启动子和所述第二趋同启动子能够驱动所述沉默元件的表达。

58. 如权利要求52所述的方法,其中所述沉默元件包含第一区段、第二区段和第三区段,其中

(a) 所述第一区段包含至少约19个核苷酸,这些核苷酸与SEQ ID NO:1-49中任一者所示的序列具有至少90%序列互补性;或其变体和片段,及互补序列;

(b) 所述第二区段包含足够长的环,以允许所述沉默元件被转录为发夹RNA;并且,

(c) 所述第三区段包含至少约19个核苷酸,这些核苷酸与所述第一区段具有至少85%互补性。

59. 如权利要求58所述的方法,其中所述第三区段与所述第一区段具有至少90%互补性。

60. 如权利要求58所述的方法,其中所述第三区段与所述第一区段具有至少95%互补性。

61. 如权利要求58所述的方法,其中所述第三区段与所述第一区段具有至少98%互补性。

62. 如权利要求58所述的方法,其中所述第一区段与鞘翅目昆虫物种互补;并且其中所述第三区段与不同的鞘翅目昆虫物种互补。

63. 如权利要求58所述的方法,其中所述第一区段与半翅目昆虫物种互补;并且其中所述第三区段与不同的半翅目昆虫物种互补。

64. 如权利要求58所述的方法,其中所述第一区段与鳞翅目昆虫物种互补;并且其中所述第三区段与不同的鳞翅目昆虫物种互补。

65. 如权利要求52所述的方法,其中所述植物是单子叶植物。

66. 如权利要求65所述的方法,其中所述单子叶植物是玉米、大麦、粟、小麦或稻。

67. 如权利要求52所述的方法,其中所述植物是双子叶植物。

68. 如权利要求67所述的方法,其中所述双子叶植物是羽衣甘蓝、花椰菜、西兰花、芥菜植物、卷心菜、豌豆、三叶草、苜蓿、蚕豆、番茄、木薯、大豆、卡诺拉油菜、苜蓿、向日葵、红花、烟草、拟南芥属植物、或棉花。

69. 一种试剂盒,其包含如权利要求1-14中任一项所述的沉默元件、如权利要求15所述

的DNA构建体、或如权利要求16所述的表达构建体,以及所述沉默元件、所述DNA构建体、或使用所述表达构建体作为对抗植物有害生物的杀昆虫剂的说明书。

70.如权利要求69所述的试剂盒,其包含两种或更多种如权利要求1-14中任一项所述的沉默元件。

71.如权利要求69或70所述的试剂盒,其中所述说明书提供了一种或多种沉默元件的顺序施用,以降低所述昆虫有害生物生物体对所述一种或多种沉默元件产生抗性的发生率。

72.如权利要求69或70所述的试剂盒,其中所述说明书提供了一种或多种沉默元件的同时施用,以降低所述昆虫有害生物生物体对所述一种或多种沉默元件产生抗性的发生率。

73.如权利要求69所述的试剂盒,其中所述昆虫植物有害生物是鞘翅目植物有害生物。

74.如权利要求73所述的试剂盒,其中所述鞘翅目植物有害生物是叶甲属植物有害生物。

75.如权利要求74所述的试剂盒,其中所述叶甲属昆虫有害生物生物体包括玉米根萤叶甲、墨西哥玉米根虫、南美叶甲、巴氏根叶甲、墨西哥玉米根虫、或黄瓜十一星叶甲。

76.如权利要求73所述的试剂盒,其中所述鞘翅目植物有害生物是条跳甲属植物有害生物。

77.如权利要求76所述的试剂盒,其中条跳甲属植物有害生物是黄曲条跳甲。

78.如权利要求73所述的试剂盒,其中所述鞘翅目植物有害生物是瘦跗叶甲属植物有害生物。

79.如权利要求78所述的试剂盒,其中瘦跗叶甲属植物有害生物是马铃薯甲虫。

80.如权利要求69所述的试剂盒,其中所述昆虫植物有害生物为半翅目植物有害生物。

81.如权利要求80所述的试剂盒,其中所述半翅目植物有害生物为无网蚜属(Acyrtosiphon)、小粉虱属(Bemisia)、褐飞虱属(Nilaparvata)或茶翅蜡属(Halyomorpha)植物有害生物。

82.如权利要求69所述的试剂盒,其中所述昆虫植物有害生物为鳞翅目植物有害生物。

83.如权利要求82所述的试剂盒,其中鳞翅目植物有害生物为斜纹夜蛾、草地贪夜蛾、玉米螟、或谷实夜蛾。

用以防治昆虫有害生物的组合物和方法

[0001] 以电子方式提交的序列表的引用

[0002] 与本说明书一起以计算机可读形式提交了序列表,其文件名为“7139USPSP_SequenceList.txt”,创建于2016年6月15日,并且大小为85千字节。该序列表是本说明书的一部分并且以其全文通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明总体上涉及用以防治有害生物分子生物学方法和基因沉默方法。

背景技术

[0004] 昆虫植物有害生物是农业中的严重问题。昆虫植物有害生物破坏了数百万英亩的主要作物,如玉米、大豆、豌豆和棉花。每年,仅在美国,昆虫植物有害生物就造成了超过1000亿美元的作物损失。在与昆虫有害生物进行季节性斗争中,农场主们必须施用数十亿加仑的合成杀有害生物剂来对付这些有害生物。过去采用的其他方法通过微生物或在转基因植物中表达来源于微生物的基因来提供杀昆虫活性。例如,已知芽孢杆菌属(*Bacillus*)微生物的某些物种对于广泛范围的昆虫有害生物具有杀有害生物活性,这些昆虫有害生物包括鳞翅目(Lepidoptera)、双翅目(Diptera)、鞘翅目(Coleoptera)、半翅目(Hemiptera)等。事实上,微生物杀有害生物剂,特别是从芽孢杆菌菌株获得的那些微生物杀有害生物剂,在农业上作为有害生物化学防治的替代方案起到重要作用。农业科学家通过对作物植物进行遗传工程改造以产生来自芽孢杆菌的杀昆虫蛋白,开发出了抗昆虫性增强的作物。例如,经遗传工程改造而产生Cry毒素的玉米和棉花植物(参见例如Aronson (2002) *Cell Mol. Life Sci.* [细胞与分子生命科学], 59 (3) :417-425; Schnepf等人(1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* [微生物学与分子生物学综述] 62 (3) :775-806)目前在农业中广泛应用,并给农场主提供了传统昆虫防治方法的替代方案。然而,在一些情况下,这些Bt杀昆虫蛋白可能仅保护植物免受相对较窄范围的有害生物的危害。不断演变的昆虫抗性也是一个问题(Gassmann等人, (2014) *PNAS* [美国国家科学院院刊] 111 (14) :5141-6)。因此,新颖的昆虫防治组合物仍然是所希望的。

发明内容

[0005] 提供了采用一种或多种沉默元件的方法和组合物,在被昆虫植物有害生物(例如鞘翅目、半翅目或鳞翅目植物有害生物,包括叶甲属、瘦跗叶甲属、条跳甲属、无网蚜属、小粉虱属、茶翅蝽属、玉米螟属、草盲蝽属、铃夜蛾属、稻绿蝽属或灰翅夜蛾属植物有害生物)摄取时,所述沉默元件能够降低靶标序列在所述有害生物中的表达。在某些实施例中,靶标序列表达的降低能防治一种或多种有害生物,并且因此这些方法和组合物能够限制对植物的损害。本文描述了如SEQ ID NO.:1-49所示的各种靶标多核苷酸,或其变体或片段,或其互补序列,以上各项调节靶标有害生物RNA中参与隔壁连接(septate junction) (更具体地是平滑隔壁连接(SSJ))形成的一个或多个序列的表达。还提供了沉默元件,所述沉默元件

在被有害生物摄取时,降低这些靶标多核苷酸中的一种或多种的表达水平。进一步提供了编码沉默元件的构建体和包含编码沉默元件的构建体的宿主细胞。还提供了包含编码这些沉默元件的构建体或者其活性变体或片段的植物、植物部分、植物细胞、细菌和其他宿主细胞。还提供了用于局部施用到昆虫有害生物或可能存在昆虫有害生物的基质上的可喷雾沉默剂的制剂。

[0006] 在另一个实施例中,提供了用于防治如下昆虫植物有害生物的方法:例如鞘翅目、半翅目或鳞翅目植物有害生物,包括叶甲属、瘦跗叶甲属、条跳甲属、无网蚜属、小粉虱属、茶翅蝽属、玉米螟属、草盲蝽属、铃夜蛾属、稻绿蝽属或灰翅夜蛾属植物有害生物。所述方法包括向昆虫植物有害生物饲喂包含沉默元件的组合物,其中所述沉默元件在被有害生物摄取时,降低所述有害生物中靶标序列的水平,并且因此防治所述有害生物。进一步提供了保护植物免受昆虫植物有害生物侵害的方法。此类方法包括将所披露的沉默元件引入植物或植物部分中。当表达沉默元件的植物被有害生物摄取时,所述靶标序列的水平降低,使有害生物得以防治。

附图说明

[0007] 图1.玉米根虫(CRW)SSJ3多肽序列Dv-ssj3(SEQ ID NO:50)、Dv-ssj3b(SEQ ID NO:51)、Db-ssj3(SEQ ID NO:52)、和Du-ssj3(SEQ ID NO:53),和黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)多肽序列Tsp2A-PA(SEQ ID NO:48)与Tsp2A-PB(SEQ ID NO:49)的序列比对。使用具有默认参数的CLUSTAL W(Zuckerkan dl E.和Pauling L.,1965),获得该比对。*(星号)表示CRW SSJ3氨基酸序列之间共有的同一的氨基酸残基,: (冒号)表示强类似性质的两个氨基酸残基之间的保守性,并且.(句点)表示弱类似性质的两个氨基酸残基之间的保守性。

[0008] 图2.SSJ3直向同源物的进化关系。使用邻接法(Saitou N.和Nei M.,1987)推断进化史。示出了具有分支长度之和=3.67397181的最佳系统树。系统树按比例绘制,分支长度与用于推断系统树的进化距离的分支长度单位相同。使用泊松校正方法(Zuckerkan dl E.和Pauling L.,1965)计算进化距离,并且以每个位点的氨基酸取代数为单位。分析涉及24个氨基酸序列。所有包含缺口和缺失数据的位置都被淘汰。最终数据集共有151个位置。进化分析在MEGA7中进行(Kumar S.,Stecher G.,和Tamura K.,2015)。

[0009] 图3.Dv-SSJ3的表达构建体。

具体实施方式

[0010] 如本文所用,单数形式“一个/种(a/an)”以及“该”包括复数个指示物,除非上下文中另外明确指明。因此,例如,提及“细胞”包括多个这样的细胞,并且提及“蛋白质”包括本领域技术人员已知的一种或多种蛋白质及其等同物等。本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义,除非另有明确说明。

[0011] I.概述

[0012] 提供了采用一种或多种沉默元件的方法和组合物,在被昆虫植物有害生物(例如鞘翅目、半翅目或鳞翅目植物有害生物,包括叶甲属、瘦跗叶甲属、条跳甲属、无网蚜属、小粉虱属、茶翅蝽属、玉米螟属、草盲蝽属、铃夜蛾属、稻绿蝽属或灰翅夜蛾属植物有害生物)

摄取时,所述沉默元件能够降低靶标序列在所述有害生物中的表达。本文披露了如SEQ ID NO.:1-49中所示的靶标多核苷酸、或其变体和片段、及其互补序列。提供了包含这些靶标多核苷酸的序列、互补序列、活性片段或变体的沉默元件,该沉默元件在被有害生物摄取或与有害生物接触时降低该靶标序列中的一者或多者的表达,并且从而防治有害生物。在一些实施例中,提供了包含编码沉默元件的多核苷酸的转基因植物,当所述转基因植物被有害生物摄取或与有害生物接触时降低所述靶标序列中的一者或多者的表达,并且从而防治有害生物。

[0013] 在一个实施例中,提供了采用包含至少一个双链RNA区域的沉默元件的组合物和方法,所述双链RNA区域的至少一条链包含与以下互补的多核苷酸:(a)包含在靶标有害生物中表达的RNA转录物序列的核苷酸序列,其中沉默元件对昆虫植物有害生物具有杀昆虫活性;或其变体和片段,以及所述核苷酸序列的互补序列;(b)包含与所述核苷酸序列具有至少90%序列同一性的核苷酸序列;或其变体和片段,及其互补序列;或者(c)包含所述核苷酸序列的至少19个连续核苷酸的核苷酸序列;或其变体和片段,及其互补序列;其中所述多核苷酸编码沉默元件,其中所述沉默元件对昆虫植物有害生物具有杀昆虫活性。

[0014] 在另外的实施例中,提供了采用包含至少一个双链RNA区域的沉默元件的组合物和方法,所述双链RNA区域的至少一条链包含与以下互补的多核苷酸:(a)包含在昆虫植物有害生物中表达的RNA转录物序列的核苷酸序列,其中沉默元件对昆虫植物有害生物具有杀昆虫活性;或其变体和片段,以及所述核苷酸序列的互补序列;(b)包含与所述核苷酸序列具有至少90%序列同一性的核苷酸序列;或其变体和片段,及其互补序列;或者(c)包含所述核苷酸序列的至少19个连续核苷酸的核苷酸序列;或其变体和片段,及其互补序列;其中所述沉默元件对昆虫植物有害生物具有杀昆虫活性。

[0015] 在另一个实施例中,提供了采用包含至少一个双链RNA区域的沉默元件的组合物和方法,所述双链RNA区域的至少一条链包含与以下互补的多核苷酸:(a)包含SEQ ID NO:1-49中任一项的核苷酸序列或其变体和片段,及其互补序列;(b)与核苷酸SEQ ID NO:1-49中任一项具有至少90%序列同一性的核苷酸序列;或其变体和片段,及其互补序列;或者(c)包含SEQ ID NO:1-49中任一项的至少19个连续核苷酸的核苷酸序列;或其变体和片段,及其互补序列;其中所述沉默元件对昆虫植物有害生物具有杀昆虫活性。

[0016] 在另一个实施例中,提供了采用一种或多种沉默元件的组合物和方法,所述沉默元件靶向编码平滑间壁连接(SSJ)蛋白的多核苷酸。在另外的实施例中,所述一种或多种沉默元件靶向编码SSJ蛋白的多核苷酸,其中编码SSJ蛋白的多核苷酸包含SEQ ID NO:1-49中的任一项。在一个实施例中,SSJ蛋白包含SEQ ID NO.:48-53。在又一个实施例中,所述一种或多种沉默元件靶向编码SSJ的多核苷酸,其中编码SSJ蛋白包含SEQ ID NO:1-49中的任一项和美国专利申请公开2014/0275208和US 2015/0257389的RyanR和/或HP2靶标序列(SEQ ID NO:561-583、693、和728)。

[0017] 在另一个实施例中,提供了采用编码一种或多种沉默元件的DNA构建体的组合物和方法,所述沉默元件在被有害生物摄取时降低一种或多种靶标多核苷酸的表达水平,并从而防治植物有害生物。在另一个实施例中,还提供了包含编码这些沉默元件的DNA构建体或者其活性变体或片段的植物、植物部分、植物细胞、细菌和其他宿主细胞。

[0018] 如本文所使用的,“对昆虫植物有害生物进行防治”或“防治昆虫植物有害生物”意

指使昆虫植物有害生物造成的损害受到限制的、对有害生物的任何影响。防治昆虫植物有害生物包括但不限于杀死该有害生物、抑制该有害生物的发育、改变该有害生物的可育性或生长,以此种方式使该有害生物对植物的损害减小,或以某种方式减少所产生后代的数量、产生适应力较弱的有害生物(包括后代)、产生易受捕食者攻击的有害生物、产生更易受其他杀昆虫蛋白影响的有害生物、或阻止这些有害生物啃食植物。

[0019] 降低有害生物中的靶标多核苷酸或由其编码的多肽的表达水平使得入侵有害生物被抑制、防治和/或杀死。在一个实施例中,减少有害生物的靶标序列的表达水平将使有害生物损害减少了至少约2%至至少约6%、至少约5%至约50%、至少约10%至约60%、至少约30%至约70%、至少约40%至约80%、或至少约50%至约90%或更高。因此,本文披露的方法可以用于防治有害生物,有害生物包括但不限于鞘翅目昆虫植物有害生物或叶甲属植物有害生物。

[0020] 测量对昆虫植物有害生物的防治的某些测定法通常是本领域已知的,正如用以记录结节损伤评分的方法也是本领域已知的一样。参见,例如,Oleson等人(2005) J.Econ.Entomol.[经济昆虫学杂志]98:1-8。其他测定方法在下面的实例中提供。

[0021] 本文披露的是用于保护植物免受昆虫植物有害生物侵害或诱导植物中的对昆虫植物有害生物(例如鞘翅目植物有害生物或叶甲属植物有害生物或其他昆虫植物有害生物)抗性的组合物和方法。可以靶向的昆虫植物有害生物包括选自如下各目的昆虫:鞘翅目、双翅目、膜翅目、鳞翅目、食毛目、同翅目、半翅目、直翅目、缨翅目、革翅目、等翅目、虱目、蚤目、毛翅目等,特别是鳞翅目和鞘翅目。

[0022] 本领域技术人员将认识到,并非所有组合物对所有有害生物都同样有效。披露的组合物(包括本文披露的沉默元件)显示出抗昆虫植物有害生物活性,该昆虫植物有害生物可以包括经济上重要的农艺、森林、温室、苗圃观赏植物、食物和纤维、公共和动物健康、家庭和商业结构、家用和储存产品有害生物。

[0023] 如本文所使用的,“鞘翅目植物有害生物”用于指鞘翅目的任何成员。可以通过本文披露的方法和组合物进行靶向的其他昆虫植物有害生物包括但不限于墨西哥豆瓢虫(*Epilachna varivestis*)、西方玉米根虫(玉米根萤叶甲(*Diabrotica virgifera virgifera*))、南方玉米根虫(黄瓜十一星叶甲(*Diabrotica undecimpunctata*))、北方玉米根虫(巴氏根叶甲(*Diabrotica Barberi*))、和科罗拉多马铃薯甲虫(马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*))。

[0024] 如本文所使用的,术语“叶甲属植物有害生物”是指叶甲属的任何成员。因此,这些组合物和方法也可用于保护植物免受任何叶甲属植物有害生物的伤害,该叶甲属植物有害生物包括,例如,柠条叶甲(*Diabrotica adelpha*);梅卡叶甲(*Diabrotica amecameca*);黄瓜条叶甲(*Diabrotica balteata*);北方玉米根虫(巴氏根叶甲);双环叶甲(*Diabrotica biannularis*);冠叶甲(*Diabrotica cristata*);十星叶甲(*Diabrotica decempunctata*);异色叶甲(*Diabrotica dissimilis*);纽带叶甲(*Diabrotica lemniscata*);小拟叶甲(*Diabrotica limitata*) (包括,例如,十五星小拟叶甲(*Diabrotica limitata quindecimpunctata*));长角叶甲(*Diabrotica longicornis*);钱币状叶甲(*Diabrotica nummularis*);中空叶甲(*Diabrotica porracea*);棘角叶甲(*Diabrotica scutellata*);六斑叶甲(*Diabrotica sexmaculata*);南美叶甲(*Diabrotica speciosa*) (包括,例加,

Diabrotica speciosa speciosa);胫叶甲(*Diabrotica tibialis*);黄瓜十一星叶甲(*Diabrotica undecimpunctata*) (包括,例如南方玉米根虫(黄瓜十一星叶甲),*Diabrotica undecimpunctata duodecimnotata*);黄瓜十一星叶甲食根亚种(*Diabrotica undecimpunctata howardi*) (斑点黄瓜甲虫(spotted cucumber beetle));西方斑点黄瓜甲虫(*Diabrotica undecimpunctata undecimpunctata*,western spotted cucumber beetle);玉米根虫(*Diabrotica virgifera*) (包括,例如,玉米根萤叶甲(*Diabrotica virgifera virgifera*) (西方玉米根虫(western corn rootworm)) 和墨西哥玉米根虫(*Diabrotica virgifera zae*,Mexican corn rootworm));绿叶甲(*Diabrotica viridula*);芜菁叶甲(*Diabrotica wartensis*);叶甲属物种JYG335;叶甲属物种JYG336;叶甲属物种JYG341;叶甲属物种JYG356;叶甲属物种JYG362;如叶甲属物种JYG365。

[0025] 在某些实施例中,叶甲属植物有害生物包含玉米根萤叶甲(*D. virgifera virgifera*)、巴氏根叶甲(*D. barberi*)、墨西哥玉米根虫(*D. virgifera zae*)、南美叶甲(*D. speciosa*)或黄瓜十一星叶甲(*D. undecimpunctata*)。

[0026] 鳞翅目幼虫包括但不限于:夜蛾科(*Noctuidae*)中的粘虫、地老虎、尺蠖,草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda* JE Smith) (秋粘虫(fall armyworm));甜菜夜蛾(*S. exigua* Hübner,beet armyworm);斜纹夜蛾(*S. litura* Fabricius,tobacco cutworm,cluster caterpillar);蓓带夜蛾(*Mamestra configurata* Walker) (披肩粘虫(bertha armyworm));甘蓝夜蛾(*M. brassicae* Linnaeus,cabbage moth);小地老虎(*Agrotis ipsilon* Hufnagel,black cutworm);地老虎(*A. orthogonia* Morrison) (西方地老虎(western cutworm));*A. subterranea* Fabricius(颗粒状地老虎(granulate cutworm));棉叶波纹夜蛾(*Alabama argillacea* Hübner) (棉叶虫(cotton leaf worm));粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni* Hübner,cabbage looper);大豆尺夜蛾(*Pseudoplusia includens* Walker) (大豆夜蛾(soybean looper));黎豆夜蛾(*Anticarsia gemmatilis* Hübner,velvetbean caterpillar);粗长须夜蛾(*Hypena scabra* Fabricius) (苜蓿绿夜蛾(green cloverworm));烟芽夜蛾(*Heliothis virescens* Fabricius) (烟草夜蛾(tobacco budworm));一星粘虫(*Pseudaletia unipuncta* Haworth) (粘虫(armyworm));*Athetis mindara* Barnes&Mcdunnough(粗皮地老虎(rough skinned cutworm));暗缘地老虎(*Euxoa messoria* Harris) (暗缘切根虫(darksided cutworm));棉斑实蛾(*Earias insulana* Boisduval) (多刺螟蛉(spiny bollworm));翠纹钻夜蛾(*E. vittella* Fabricius) (斑点螟蛉(spotted bollworm));棉铃虫(*Helicoverpa armigera* Hüibner) (美洲螟蛉(American bollworm));玉米穗虫(玉米穗蛾(corn earworm)或棉螟蛉(cotton bollworm));斑马纹夜蛾(*Melanchnra picta* Harris) (斑马毛虫(zebra caterpillar));柑橘夜蛾(*Egira (Xylomyges) curialis* Grote) (柑橘地老虎(citrus cutworm));来自螟蛾科玉米螟(*Ostrinia nubilalis* Hübner,欧洲玉米螟(European corn borer))的螟虫、鞘蛾、结网虫、锥形虫(coneworms)、和雕叶虫(skeletonizers);脐橙螟蛾(*Amyelois transitella* Walker) (脐橙螟(navah orangeworm));地中海粉螟(*Anagasta kuehniella* Zeller) (地中海粉斑螟(Mediterranean flour moth));干果斑螟(*Cadra cautella* Walker) (粉斑螟(almond moth));二化螟(*Chilo suppressalis* Walker) (水稻螟虫(rice stem borer));斑禾草螟(*C. partellus*), (高粱螟(sorghum borer));米螟(*Corcyra cephalonica*

Stainton) (米蛾 (rice moth)); 玉米根草螟 (*Crambus caliginosellus* Clemens) (玉米根结网虫 (corn root webworm)); 早熟禾草螟 (*Crambus teterrellus* Zincken) (早熟禾结网虫 (bluegrass webworm)); 稻纵卷叶螟 (*Cnaphalocrocis medinalis* Guenée, rice leaf roller); 葡萄野螟 (*Desmia funeralis* Hübner) (葡萄甘薯麦蛾 (grape leaf folder)); 绢野螟 (*Diaphania hyalinata* Linnaeus) (瓜虫 (melon worm)); 黄瓜绢野螟 (*D. lliidis* Stoll) (泡菜虫 (pickleworm)); 巨座玉米螟 (*Diatraea grandiosella* Dyar) (西南玉米秆草螟 (southwestern corn borer)); 蔗螟 (*D. saccharalis* Fabricius) (甘蔗螟虫 (surgarcane borer)); 墨西哥稻螟 (*Eoreuma loftini* Dyar, Mexican rice borer); 烟草粉斑螟 (*Ephestia elutella* Hübner) (烟草飞蛾 (tobacco (cacao) moth)); 大蜡螟 (*Galleria mellonella* Linnaeus) (大蜡蛾 (greater wax moth)); 水稻切叶野螟 (*Herpetogramma licarsisalis* Walker) (草地螟 (sod webworm)); 向日葵同斑螟 (*Homoeosoma electellum* Hulst) (向日葵螟 (sunflower moth)); 南美玉米苗斑螟 (*Elasmopalpus lignosellus* Zeller) (小玉米茎蛀虫 (lesser cornstalk borer)); 小蜡螟 (*Achroia grisella* Fabricius) (小蜡蛾 (lesser wax moth)); 草地螟 (*Loxostege sticticalis* Linnaeus, beet webworm); 茶树螟 (*Orthaga thyrisalis* Walker) (茶树结网蛾 (tea tree web moth)); 豆荚野螟 (*Maruca testulalis* Geyer) (豆荚蛀螟 (bean pod borer)); 印度谷螟 (*Plodia interpunctella* Hübner, Indian meal moth); 三化螟 (*Scirpophaga incertulas* Walker, yellow stem borer); 温室螟 (*Udea rubigalis* Guenée) (芹菜卷叶螟 (celery leaf tier)); 和卷蛾科 (*Tortricidae*) 中的卷叶虫、蚜虫、种实虫以及果实虫, 西部黑头长翅卷蛾 (*Acleris gloverana* Walsingham) (西部黑头蚜虫 (Western blackheaded budworm)); 东部黑头长翅卷蛾 (*A. variana* Fernald) (东部黑头蚜虫 (Eastern blackheaded budworm)); 果树黄卷蛾 (*Archips argyrospila* Walker) (果树卷叶蛾 (fruit tree leafroller)); 罗萨娜黄卷蛾 (*A. rosana* Linnaeus) (欧洲卷叶蛾 (European leaf roller)); 和其他黄卷蛾属物种, 苹小卷叶蛾 (*Adoxophyes orana* Fischer von **Rösslerstamm**) (苹果小卷蛾 (summer fruit tortrix moth)); 条纹向日葵螟 (*Cochylis hospes* Walsingham) (带状向日葵斑蛾 (banded sunflower moth)); 榛小卷蛾 (*Cydia latiferreana* Walsingham) (filbertworm); 苹果蠹蛾 (*C. pomonella* Linnaeus) (苹果蚕蛾 (codling moth)); 杂色卷叶蛾 (*Platynota flavedana* Clemens) (色稻纵卷叶螟 (variegated leafroller)); 荷兰石竹小卷蛾 (*P. stultana* Walsingham) (杂食卷叶蛾 (omnivorous leafroller)); 鲜食葡萄小卷蛾 (*Lobesia botrana* Denis & Schiffermüller) (欧洲葡萄蛾 (European grape vine moth)); 苹白小卷蛾 (*Spilonota ocellana* Denis & Schiffermüller) (苹果芽小卷叶蛾 (eyespotted bud moth)); 萄果实虫主虫 (*Endopiza viteana* Clemens) (葡萄小卷叶蛾 (grape berry moth)); 女贞细卷蛾 (*Eupoecilia ambiguella* Hübner) (葡萄果蠹蛾 (vine moth)); 巴西苹果卷叶虫 (*Bonagota salubricola* Meyrick) (巴西苹果小卷叶蛾 (Brazilian apple leafroller)); 东方果实蛾 (*Grapholita molesta* Busck) (梨小食心虫 (oriental fruit moth)); 向日葵芽蛾 (*Suleima helianthana* Riley, sunflower bud moth); 带卷蛾属物种 (*Argyrotaenia* spp.); 卷叶蛾属物种 (*Choristoneura* spp.)。

[0027] 在鳞翅目中选择的其他农艺学有害生物包括但不限于秋星尺蠖 (*Alsophila*

pometaria Harris, fall cankerworm); 桃蚜蛾 (*Anarsia lineatella* Zeller) (桃条麦蛾 (peach twig borer)); 栎橙纹犀额蛾 (*Anisota senatoria* J.E. Smith) (橙色斑纹橡木虫 (orange striped oakworm)); 柞蚕 (*Antheraea pernyi* Guérin-Méneville) (中国橡树柞蛾 (Chinese Oak Tussock Moth)); 家蚕 (*Bombyx mori* Linnaeus) (桑蚕 (Silkworm)); 棉潜蛾 (*Bucculatrix thurberiella* Busck) (棉叶潜蛾 (cotton leaf perforator)); 纹黄豆粉蝶 (*Colias eurytheme* Boisduval) (苜蓿粉蝶 (alfalfa caterpillar)); 核桃舟蛾 (*Datana integerrima* Grote & Robinson) (胡桃毛虫 (walnut caterpillar)); 西伯利亚松毛虫 (*Dendrolimus sibiricus* Tschetwerikov) (西伯利亚丝蛾 (Siberian silk moth)), *Ennomos subsignaria* Hübner (榆树尺蠖 (elm spanworm)); 菩提尺蠖 (*Erannis tiliaria* Harris) (椴尺蠖 (linden looper)); 黄毒蛾 (*Euproctis chrysorrhoea* Linnaeus) (棕尾毒蛾 (browntail moth)); 黑拟蛉蛾 (*Harrisina americana* Guérin-Méneville) (野棉花夜蛾 (grapeleaf skeletonizer)); 行列半白大蚕蛾 (*Hemileuca oliviae* Cockrell) (山脉毛虫 (range caterpillar)); 美国白蛾 (*Hyphantria cunea* Drury, fall webworm); 番茄茎麦蛾 (*Keiferia lycopersicella* Walsingham) (番茄蛴虫 (tomato pinworm)); 铁杉尺蠖 (*Lambdina fiscellaria fiscellaria* Hulst) (东部铁杉尺蠖 (Eastern hemlock looper)); 西部铁杉尺蠖 (*L. fiscellaria lugubrosa* Hulst) ((西方铁杉尺蠖 (Western hemlock looper)); 毒蛾 (*Leucoma salicis* Linnaeus) (柳毒蛾 (satin moth)); 舞毒蛾 (*Lymantria dispar* Linnaeus, gypsy moth); 番茄天蛾 (*Manduca quinquemaculata* Haworth) (五点天蛾 (five spotted hawk moth), 番茄天蛾 (tomato hornworm)); 烟草天蛾 (*M. sexta* Haworth) (番茄天蛾 (tomato hornworm), 烟草天蛾 (tobacco hornworm)); 冬尺蠖蛾 (*Operophtera brumata* Linnaeus, winter moth); 春尺蠖 (*Paleacrita vernata* Peck, spring cankerworm); 美洲大芷凤蝶 (*Papilio cresphontes* Cramer) (大黄带凤蝶 (giant swallowtail), 柑桔凤蝶 (orange dog)); 加州木角斗蛾 (*Phryganidia californica* Packard) (加州槲蛾 (California oakworm)); 柑桔潜蛾 (*Phyllocnistis citrella* Stainton) (柑桔潜叶蛾 (citrus leafminer)); 斑幕潜叶蛾 (*Phyllonorycter blancardella* Fabricius) (斑点幕型潜叶虫 (spotted tentiform leafminer)); 欧洲粉蝶 (*Pieris brassicae* Linnaeus) (大白粉蝶 (large white butterfly)); 菜青虫 (*P. rapae* Linnaeus) (小菜粉蝶 (small white butterfly)); 暗脉菜粉蝶 (*P. napi* Linnaeus) (绿色纹理粉蝶 (green veined white butterfly)); 洋蓟葱羽蛾 (*Platyptilia carduidactyla* Riley) (洋蓟羽蛾 (artichoke plume moth)); 小菜蛾 (*Plutella xylostella* Linnaeus, diamondback moth); 红铃麦蛾 (*Pectinophora gossypiella* Saunders) (棉红铃虫 (pink bollworm)); 多形云粉蝶 (*Pontia protodice* Boisduval and Leconte) (南方菜青虫 (Southern cabbageworm)); 杂食尺蠖 (*Sabulodes aegrotata* Guenée, omnivorous looper); 红抚天社蛾 (*Schizura concinna* J.E. Smith) (红疣天社蛾 (red humped caterpillar)); 麦蛾 (*Sitotroga cerealella* Olivier, Angoumois grain moth); 松异带蛾 (*Thaumetopoea pityocampa* Schiffermüller) (松树列队毛虫 (pine processionary caterpillar)); 幕谷蛾 (*Tineola bisselliella* Hummel) (织带衣蛾 (webbing clothesmoth)); 番茄斑潜蝇 (*Tuta absoluta* Meyrick) (番茄潜叶虫 (tomato leafminer)); 苹果巢蛾 (*Yponomeuta padella* Linnaeus) (巢蛾 (ermine moth)); 实夜蛾

(*Heliothis subflexa* Guenée);天幕毛虫属(*Malacosoma*)物种和古毒蛾属(*Orgyia*)物种。

[0028] 引人关注的是鞘翅目的幼虫和成虫,包括来自长角象虫科、豆象科和象甲科的象鼻虫,包括但不限于:墨西哥棉铃象(*Anthonomus grandis* Boheman)(棉铃象甲(*boll weevil*));稻水象甲(*Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel, rice water weevil);谷象鼻虫(*Sitophilus granarius* Linnaeus)(谷象(*granary weevil*));稻象虫(*S.oryzae* Linnaeus, rice weevil);三叶草叶象(*Hypera punctata* Fabricius)(车轴草叶象虫(*clover leaf weevil*));密点细枝象(*Cronrocopturus adpersus* LeConte)(向日葵茎象鼻虫(*sunflower stem weevil*));黄褐小爪象(*Smicronyx fulvus* LeConte)(红色葵花籽象鼻虫(*red sunflower seed weevil*));灰色小爪象(*S.sordidus* LeConte)(灰葵花籽象甲(*gray sunflower seed weevil*));玉米隐啄象(*Sphenophorus maidis* Chittenden)(玉米象虫(*maize billbug*));叶甲科(*Chrysomelidae*)的跳甲、黄瓜叶甲、根虫、叶甲、马铃薯叶甲以及潜叶虫,包括但不限于:马铃薯叶甲(*Leptinotarsa decemlineata* Say)(科罗拉多马铃薯甲虫);玉米根萤叶甲(*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte)(西方玉米根虫(*western corn rootworm*));巴氏根叶甲(*D.barberi* Smith and Lawrence, 北方玉米根虫);斑点黄瓜甲虫(*D.undecimpunctata howardi* Barber)(南方玉米根虫(*southern corn rootworm*));玉米跳甲(*Chaetocnema pulicaria* Melsheimer, corn flea beetle);十字花科条跳甲(*Phyllotreta cruciferae* Goeze或Crueifer flea beetle);黄曲条跳甲(*Phyllotreta striolata*或stripped flea beetle);肖叶甲褐斑(*Colaspis brunnea* Fabricius)(葡萄肖叶甲(*grape colaspis*));橙足负泥虫(*Oulema melanopus* Linnaeus)(谷物叶甲(*cereal leafbeetle*));向日葵叶甲(*Zygogramma exclamationis* Fabricius, sunflower beetle);来自瓢虫科(*Coccinellidae*)的甲虫(包括但不限于:墨西哥豆瓢虫(*Epilachna varivestis* Mulsant或Mexican bean beetle);金龟子和来自金龟子科(*Scarabaeidae*)的其他甲虫,包括但不限于:日本丽金龟(*Popillia japonica* Newman)(日本甲虫);北方圆头犀金龟(*Cyclocephala borealis* Arrow)(北方独角仙(*northern masked chafer*),白蛴螬(*white grub*));南方圆头犀金龟(*C.immaculata* Olivier)(南方独角仙(*southern masked chafer*),白蛴螬(*white grub*));欧洲切根鳃金龟(*Rhizotrogus majalis* Razoumowsky)(欧洲金龟子(*European chafer*));具毛鳃角金龟(*Phyllophaga crinita* Burmeister)(蛴螬(*white grub*));胡萝卜甲虫(*Ligyrus gibbosus* De Geer, carrot beetle);来自皮蠹科的红缘皮蠹(*carpet beetle*);来自叩甲科(*Elateridae*)、伪金针虫属物种(*Eleodes* spp.)、梳爪叩头虫属物种(*Melanotus* spp.)的金针虫;宽胸金针虫属物种(*Conoderus* spp.);叩甲属物种(*Limonius* spp.);缺隆叩甲属(*Agriotes* spp.);特尼塞拉属(*Ctenicera* spp.);埃俄罗斯属(*Aeolus* spp.);来自小蠹科(*Scolytidae*)的树皮甲虫和来自拟步甲科(*Tenebrionidae*)的甲虫。

[0029] 目的是双翅目的成虫和未成熟的虫,包括潜叶虫玉米斑潜蝇(*Agromyza parvicornis* Loew)(玉米斑潜蝇(*corn blotch leafminer*));摇蚊科(包括但不限于:高粱瘿蚊(*Contarinia sorghicola* Coquillett)(高粱瘿蚊(*sorghum midge*));黑森瘿蚊(*Mayetiola destructor* Say)(黑森蝇(*Hessian fly*));麦红吸浆虫(*Sitodiplosis mosellana* Géhin)(小麦吸浆虫(*wheat midge*));葵花籽蚊(*Neolasioptera murtfeldtiana* Felt), (向日葵籽瘿蚊(*sunflower seed midge*)));果蝇(实蝇科

(Tephritidae)、瑞典麦秆蝇(*Oscinella frit* Linnaeus)(果蝇(*frit flies*));蛆虫(包括但不限于:灰地种蝇(*Delia platura* Meigen)(种蝇(*seedcorn maggot*));麦地种蝇(*D.coarctata* Fallen)(麦种蝇(*wheat bulb fly*))和其他地种蝇属(*Delia* spp.),美洲麦秆蝇(*Meromyza americana* Fitch)(美洲麦秆蝇(*wheat stem maggot*));家蝇(*Musca domestica* Linnaeus,house flies);夏厕蝇(*Fannia canicularis* Linnaeus)、小舍蝇(*F.femorialis* Stein)(小家蝇(*lesser houseflies*));厩螫蝇(*Stomoxys calcitrans* Linnaeus)(螫蝇(*stable flies*));秋家蝇(*face flies*)、角蝇(*horn flies*)、丽蝇(*blow flies*)、金蝇属物种(*Chrysomya* spp.);伏蝇属物种(*Phormia* spp.)和其他蝇状的蝇类有害生物,虻属物种(*Tabanus* spp.);肤蝇(*bot flies*)胃蝇属物种(*Gastrophilus* spp.);狂蝇属物种(*Oestrus* spp.);纹皮蝇(*cattle grubs*)皮蝇属物种(*Hypoderma* spp.);鹿虻(*deer flies*)斑虻属物种(*Chrysops* spp.);绵羊虱蝇(*Melophagus ovinus* Linnaeus)(羊婢蝇(*keds*))和其他短角亚目(*Brachycera*),蚊子伊蚊属物种(*Aedes* spp.);疟蚊属物种(*Anopheles* spp.);家蚊属物种(*Culex* spp.);黑蝇(*black flies*)原蚋属物种(*Prosimulium* spp.);蚋属(*Simulium* spp.);蠓、沙蝇、眼菌蚊和长角亚目。

[0030] 作为目的昆虫包括了半翅目和同翅目的成体和若虫,例如但不限于:来自球蚜科(*Adelgidae*)的球蚜、来自盲蝽科(*Miridae*)的盲蝽、来自蝉科(*Cicadidae*)的蝉、叶蝉、小绿叶蝉属物种(*Empoasca* spp.);来自叶蝉科的,来自菱蜡蝉科(*Cixiidae*)、青翅飞虱科(*Flatidae*)、蜡蝉总科(*Fulgoroidea*)、瓢蜡蝉科(*Issidae*)和(*Delphacidae*)的飞虱,来自角蝉科(*Membracidae*)的角蝉,来自木虱科(*Psyllidae*)的木虱,来自粉虱科(*Aleyrodidae*)的粉虱,来自蚜科(*Aphididae*)的蚜虫,来自根瘤蚜科(*Phylloxera*)的葡萄根瘤蚜,来自粉蚧科(*Pseudococcidae*)的粉蚧,来自链介壳虫科(*Asterolecanidae*)、蚧科(*Coccidae*)、粉蚧科(*Dactylopiidae*)、盾蚧科(*Diaspididae*)、绒蚧科(*Eriococcidae*)、旌介壳虫科(*Ortheziidae*)、刺葵介壳虫科(*Phoenicococcidae*)和绵蚧科(*Margarodidae*)的介壳虫,来自网蝽科的网蝽,来自蝽科(*Pentatomidae*)的椿象,长蝽(*cinch bug*),土长蝽属物种;和来自长蝽科(*Lygaeidae*)的其他籽长蝽、来自沫蝉科(*Cercopidae*)的沫蝉、来自缘蝽科(*Coreidae*)的南瓜缘蝽和来自红蝽科(*Pyrrhocotidae*)的秋恙蝽和棉蝽。

[0031] 来自同翅目的农艺重要成员进一步包括但不限于:豌豆蚜(*Acyrtosiphon pisum* Harris)(豌豆蚜虫(*pea aphid*));黑豆蚜(*Aphis craccivora* Koch)(豇豆蚜(*cowpea aphid*));甜菜蚜(*A.fabae* Scopoli)(黑豆蚜(*black bean aphid*));棉蚜(*A.gossypii* Glover)(棉蚜虫(*cotton aphid*,*melon aphid*));槐蚜(*A.maidiradicis* Forbes)(玉米根蚜(*corn root aphid*));苹果蚜(*A.pomi* De Geer,*apple aphid*);绣线菊蚜(*A.spiraeicola* Parch,*spirea aphid*);茄沟无网蚜(*Aulacorthum solani* Kaltenbach)(毛地黄蚜虫(*foxglove aphid*));草莓钉蚜(*Chaetosiphon fragaefolii* Cockerell)(草莓蚜(*strawberry aphid*));麦双尾蚜(*Diuraphis noxia* Kurdjumov/Mordvilko)(俄罗斯小麦蚜虫(*Russian wheat aphid*));车前圆尾蚜(*Dysaphis plantaginea* Paaserini)(红苹果蚜(*rosy apple aphid*));苹果绵蚜(*Eriosoma lanigerum* Hausmann,*woolly apple aphid*);甘蓝蚜(*Brevicoryne brassicae* Linnaeus)(菜蚜(*cabbage aphid*));大尾蚜(*Hyalopterus pruni* Geoffroy)(桃大尾蚜(*mealy plum aphid*));萝卜蚜(*Lipaphis erysimi* Kaltenbach,*turnip aphid*);麦无网蚜(*Metopolophium dirrhodum* Walker)(谷

物蚜虫(cereal aphid));马铃薯蚜(Macrosiphum euphorbiae Thomas,potato aphid);桃蚜(Myzus persicae Sulzer)(桃-马铃薯蚜虫,绿桃蚜虫);莴苣蚜(Nasonovia ribisnigri Mosley,lettuce aphid);瘿绵蚜属物种(Pemphigus spp.)(根蚜(root aphid)和倍蚜(gall aphids));玉米蚜(Rhopalosiphum maidis Fitch,corn leafaphid);稻麦蚜(R.padi Linnaeus)(禾谷缢管蚜(bird cherry-oataphid));麦二叉蚜(Schizaphis graminum Rondani,greenbug);牛鞭草蚜(Sipha flava Forbes)(甘蔗黄蚜(yellow sugarcane aphid));麦长管蚜(Sitobion avenae Fabricius,English grain aphid);苜蓿斑蚜(Therioaphis maculata Buckton,spotted alfalfa aphid);茶二叉蚜(Toxoptera aurantii Boyer de Fonscolombe)(黑色柑橘蚜(black citrus aphid)和褐色橘蚜(T.citricida Kirkaldy)(桔二叉蚜(brown citrus aphid));球蚜属物种(Adelges spp.)(球蚜(adelgids));长山核桃根瘤蚜(Phylloxera devastatrix Pergande)(山胡桃根瘤蚜(pecan phylloxera));烟粉虱(Bemisia tabaci Gennadius)(烟草粉虱(tobacco whitefly),甘薯粉虱(sweetpotato whitefly));银叶粉虱(B.argentifolii Bellows&Perring,silverleaf whitefly);柑桔粉虱(Dialeurodes citri Ashmead,citrus whitefly);结翅白粉虱(Trialeurodes abutiloneus)(带状翅白粉虱(bandedwinged whitefly)和温室粉虱(T.vaporariorum Westwood)(温室粉虱(greenhouse whitefly));马铃薯小绿叶蝉(Empoasca fabae Harris)(马铃薯叶蝉(potato leafhopper));灰飞虱(Laodelphax striatellus Fallen)(小褐飞虱(smaller brown planthopper));二点叶蝉(Macrolestes quadrilineatus Forbes)(紫菀叶蝉(aster leafhopper));黑尾叶蝉(Nephotettix cincticeps Uhler)(青大叶蝉(green leafhopper));二条斑黑尾叶蝉(N.nigropictus Stål)(稻叶蝉(rice leafhopper));稻褐飞虱(Nilaparvata lugens Stål)(褐飞虱(brown planthopper));玉米蜡蝉(Peregrinus maidis Ashmead)(玉米飞虱(com planthopper));白背飞虱(Sogatella furcifera Horvath,white-backed planthopper);稻条背飞虱(Sogatodes orizicola Muir)(稻飞虱(rice delphacid));苹果白叶蝉(Typhlocyba pomaria McAtee)(苹白小叶蝉(white apple leafhopper));葡萄斑叶蝉属物种(Erythroneoura spp.)(葡萄叶蝉(grape leafhopper));十七年蝉(Magicicada septendecimLinnaeus)(晚秀蝉(periodical cicada));吹绵蚧(Icerya purchasasi Maskell,cottony cushion seale);梨圆蚧(Quadraspidiotus perniciosus Comstock, San Jose seale);臀纹粉蚧(Planococcus citri Risso)(桔粉蚧(citrus mealybug));粉蚧属物种(Pseudococcus spp.)(其他粉蚧系群);梨木虱(Cacopsylla pyricola Foerster,pear psylla);柿木虱(Trioza diospyri Ashmead,persimmon psylla)。

[0032] 来自半翅目的目的农艺重要物种包括但不限于:拟绿蝽(Acrosternum hilare Say)(稻绿蝽(green stink bug));南瓜缘蝽(Anasa tristis De Geer)(南瓜虫(squash bug));美洲谷长蝽(Blissus leucopterus leucopterus Say)(麦长蝽(chinch bug));方翅网蝽(Corythuca gossypii Fabricius)(棉网蝽(cotton lace bug));番茄蝽(Cyrtopeltis modesta Distant)(番茄虫(tomato bug));棉蝽(Dysdercus suturellus Herrich-Schäffer)(棉红蝽(cotton stainer));褐臭蝽(Euschistus servus Say,brown stink bug);一斑臭蝽(E.variolarius Palisot de Beauvois)(单斑椿象(one-spotted stink bug));长蝽属(Graptostethus)物种(果实蝽系群(complex of seed bugs));叶足

松树长蝽 (*Leptoglossus corculus* Say, leaf-footed pine seed bug); 美洲牧草盲蝽 (*Lygus lineolaris* Palisot de Beauvois) (牧草盲蝽 (tarnished plant bug)); 豆荚盲蝽 (*L. Hesperus* Knight) (西方牧草盲蝽 (Western tarnished plant bug)); 牧草盲蝽 (*L. pratensis* Linnaeus) (寻常草地虫 (common meadow bug)); 长毛草盲蝽 (*L. rugulipennis* Poppius) (欧洲牧草盲蝽 (European tarnished plant bug)); 长绿盲蝽 (*Lygocoris pabulinus* Linnaeus) (苹绿盲蝽 (common green capsid)); 南方绿椿象 (*Nezara viridula* Linnaeus) (南方喜绿蝽 (southern green stink bug)); 美洲稻蝽 (*Oebalus pugnax* Fabricius) (稻褐蝽 (rice stink bug)); 马利筋长蝽 (*Oncopeltus fasciatus* Dallas) (大马利筋长蝽 (large milkweed bug)); 棉跳盲蝽 (*Pseudatomoscelis seriatus* Reuter, cotton fleahopper)。

[0033] 此外, 实施例可以对半翅目有效, 如草莓蝽 (*Calocoris norvegicus* Gmelin) (草莓长蝽 (strawberry bug)); 荒野奥盲蝽 (*Orthops campestris* Linnaeus); 苹果盲蝽 (*Plesiocoris rugicollis* Fallen) (苹盲蝽 (apple capsid)); 番茄蝽 (*Cyrtopeltis modesta* Distant) (番茄虫 (tomato bug)); 黑斑烟盲蝽 (*Cyrtopeltis notatus* Distant) (吸蝇 (suckfly)); 白斑盲蝽 (*Spanagonicus albofasciatus* Reuter) (水印跳盲蝽 (whitemarked fleahopper)); 皂荚蝽 (*Diaphnocoris chlorionis* Say) (皂角蝽 (honeylocust plant bug)); 洋葱蝽 (*Labopidicola allii* Knight) (葱盲蝽 (onion plant bug)); 棉跳盲蝽 (*Pseudatomoscelis seriatus* Reuter, cotton fleahopper); 苜蓿褐盲蝽 (*Adelphocoris rapidus* Say) (快速植食蝽 (rapid plant bug)); 四线盲蝽 (*Poecilocapsus lineatus* Fabricius) (四线叶虫 (four-lined plant bug)); 小长蝽 (*Nysius ericae* Schilling) (谷长蝽 (false chinch bug)); 假麦长蝽 (*Nysius raphanus* Howard) (谷长蝽 (false chinch bug)); 南方绿椿象 (*Nezara viridula* Linnaeus) (南方喜绿蝽 (southern green stink bug)); 扁盾蝽属物种 (*Eurygaster* spp.); 缘蝽科 (*Coreidae*) 物种; 红蝽科物种 (*Pyrrhocoridae*); 谷蛾科物种 (*Tinidae*); 负子蝽科物种 (*Blostomatidae*); 猎蝽属物种 (*Reduviidae* spp.) 和臭虫属物种 (*Cimicidae* spp.)。

[0034] 还包括蜱螨目 (螨) 的成虫和幼虫, 如小麦瘤瘿螨 (*Aceria tosichella* Keifer) (小麦卷叶螨 (wheat curl mite)); 麦岩螨 (*Petrobia latens* Müller) (棕色小麦螨 (brown wheat mite)); 叶螨科中的蜘蛛螨 (spider mite) 和红螨 (red mite), 苹果全爪螨 (*Panonychus ulmi* Koch) (欧洲红螨 (European red mite)); 二斑叶螨 (*Tetranychus urticae* Koch) (二点叶螨 (two spotted spider mite)); 迈叶螨 (*T. medanieli* McGregor, McDaniel mite); 朱砂虫螨 (*T. cinnabarinus* Boisduval) (胭脂红蜘蛛螨 (carmine spider mite)); 土耳其斯坦叶螨 (*T. turkestanii* Ugarov & Nikolski) (草莓蜘蛛螨 (strawberry spider mite)); 细须螨科中的平螨, 短须螨 (*Brevipalpus lewisi* McGregor) (柑橘平螨 (citrus flat mite)); 瘿螨科 (*Eriophyidae*) 中的锈螨和芽瘿螨以及其他食叶螨和对人类和动物健康重要的螨, 即表皮螨科 (*Epidermoptidae*) 的尘螨、蠕形螨科 (*Demodicidae*) 的毛囊螨、食甜螨科 (*Glycyphagidae*) 的谷螨, 硬蜱科 (*Ixodidae*) 的蜱。肩突硬蜱 (*Ixodes scapularis* Say) (鹿蜱 (deer tick)); 全环硬蜱 (*I. holocyclus* Neumann) (澳大利亚麻痹蜱 (Australian paralysis tick)); 变异革蜱 (*Dermacentor variabilis* Say) (美洲犬蜱 (American dog tick)); 美洲钝眼蜱 (*Amblyomma americanum* Linnaeus) (孤星蜱 (lone

star tick) 和痒螨科、蒲螨科和疥螨科中的疥螨和痒螨。

[0035] 缨尾目 (Thysanura) 的昆虫有害生物是目的有害生物, 例如衣鱼 (*Lepisma saccharina* Linnaeus) (蠹虫 (silverfish)); 家衣鱼 (*Thermobia domestica* Packard, firebrat)。

[0036] 目的昆虫有害生物包括椿象和其他相关昆虫的总科, 包括但不限于属于以下各科的物种: 蝽科 (稻绿蝽、茶翅蝽 (*Halyomorpha halys*)、*Piezodorus guildini*、褐臭蝽、拟绿蝽、英雄美洲蝽 (*Euschistus heros*)、美洲蝽 (*Euschistus tristigma*)、拟绿蝽、褐蝽 (*Dichelops melacanthus*)、和蓓蝽 (*Bagrada hilaris* 或 *Bagrada Bug*)), 龟蝽科 (*Plataspidae*) (筛豆龟蝽 (*Megacopta cribraria*) - 豆平腹蝽 (Bean plataspid)) 和土蝽科 (*Scaptocoris castanea* - Root stink bug), 以及鳞翅目物种, 包括但不限于: 小菜蛾, 例如, 玉米穗虫; 大豆尺蠖, 例如, 大豆尺夜蛾 (*Pseudoplusia includens* Walker), 以及绒毛豆毛虫, 例如, 大豆夜蛾 (*Anticarsia gemmatalis* Hübner)。

[0037] II. 靶标序列

[0038] 如本文所使用的, “靶标序列” 或 “靶标多核苷酸” 包括有害生物中的希望降低其表达水平的任何序列。在某些实施例中, 降低所述靶标序列在有害生物中的表达水平防治该有害生物。例如, 该靶标序列可以是生长和发育所必需的。靶标序列的非限制性实例包括 SEQ ID NO.: 1-49 中所示的多核苷酸, 或其变体和片段、及其互补序列。如本文别处所示例的, 降低这些靶标序列中的一者或多者在鞘翅目植物有害生物或叶甲属植物有害生物中的表达水平防治有害生物。在一个实施例中, 靶标序列编码间壁连接或平滑间壁连接 (SSJ) 蛋白。

[0039] III. 沉默元件

[0040] “沉默元件” 意指当被昆虫植物有害生物接触或摄取时能够降低或消除靶标多核苷酸或其编码的多肽的水平或表达的多核苷酸。因此, 应当理解的是, 本文所用的 “沉默元件” 包含如下多核苷酸: 例如 RNA 构建体、双链 RNA (dsRNA)、发夹 RNA、siRNA、miRNA、amiRNA、以及正义和/或反义 RNA。在一个实施例中, 所用的沉默元件可通过影响靶标 RNA 转录物的水平, 或者可替代地, 通过影响翻译并由此影响所编码的多肽的水平来降低或消除靶标序列的表达水平。本文别处披露了测定功能性沉默元件的方法, 该沉默元件能够降低或消除目的序列的水平。披露的方法中所采用的单个多核苷酸可包含针对相同或不同靶标多核苷酸的一个或多个沉默元件。该沉默元件可在体内 (即, 在宿主细胞诸如植物或微生物中) 或体外生成。

[0041] 在某些实施例中, 沉默元件可以包含如下嵌合构建分子, 该嵌合构建分子包含两个或更多个本披露的序列或其部分。例如, 该嵌合构建体可为如本文所披露的发夹或 dsRNA。嵌合体可包含两个或更多个所披露的序列或其部分。在一个实施例中, 设想出嵌合体具有本文所示的两个互补序列或其部分, 这两个互补序列之间具有一定程度的错配, 使得这两个序列彼此并非完全互补。在单一沉默元件中提供至少两个不同序列可以允许使用一个沉默元件和/或例如一个表达盒靶向多个基因。靶向多个基因可以允许减缓或降低有害生物抗性的可能性。此外, 在一个表达的分子中提供多重靶向能力可减轻经转化的植物或植物产物的表达负担, 或提供能够用一次施用靶向多个宿主的局部处理。

[0042] 在某些实施例中, 虽然沉默元件防治有害生物, 但优选地沉默元件对正常植物或

植物部分无作用。

[0043] 如下文进一步详细讨论的,沉默元件可以包括但不限于,有义抑制元件、反义抑制元件、双链RNA、siRNA、amiRNA、miRNA或发夹抑制元件。在实施例中,沉默元件可以包含如下嵌合体,其中在沉默元件中发现两个或更多个本披露的序列、或者活性片段或变体、或者其互补序列。在各种实施例中,本披露的序列、或者活性片段或变体、或者其互补序列可以作为多于一个拷贝存在于DNA构建体、沉默元件、DNA分子或RNA分子中。在发夹或dsRNA分子中,有义或反义序列在分子中的位置(例如,其中序列首先进行转录或位于该RNA分子的具体末端上)对所公开的序列来说并不是限制性的,并且dsRNA不受本文公开内容中这种序列的具体位置的限制。可用于降低这些靶标序列表达的沉默元件的非限制性实例,包括该有义或反义序列的片段或变体,或者可替代地,由该有义或反义序列和SEQ ID NO.:1-49中所示序列、或者其变体和片段、及其互补序列组成。该沉默元件可以进一步包含有利地影响转录和/或所得转录物的稳定性的另外的序列。例如,该沉默元件可以在3'端包含至少一个胸腺嘧啶残基。这有助于稳定。因此,该沉默元件在3'端可具有至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个胸腺嘧啶残基。如下文进一步详细讨论的,增强子抑制元件也可以与本文所披露的沉默元件结合使用。

[0044] “减少”或“降低”多核苷酸或由其编码的多肽的表达水平旨在表示,该靶标序列的多核苷酸或多肽水平在统计学上低于适当的对照有害生物中相同靶标序列的多核苷酸水平或多肽水平,该对照有害生物没有暴露于(即没有摄取或接触)沉默元件。在具体实施例中,本文披露的方法和/或组合物降低昆虫植物有害生物中靶标序列的多核苷酸水平和/或多肽水平,得到多核苷酸水平和/或多肽水平是适当的对照有害生物中相同靶标序列的多核苷酸水平或由其编码的多肽的水平的小于95%、小于90%、小于80%、小于70%、小于60%、小于50%、小于40%、小于30%、小于20%、小于10%或小于5%。在一些实施例中,沉默元件与靶标多核苷酸具有大量的序列同一性,通常大于约65%序列同一性,大于约85%序列同一性,约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。此外,沉默元件可以与靶标多核苷酸的一部分互补。通常,可以使用SEQ ID NO.:1-49中任一项所示的序列、或者其变体和片段、及其互补序列的至少15、16、17、18、19、20、22、25、50、100、200、300、400、450个或更多个连续核苷酸的靶标序列。本文别处讨论了测定RNA转录物水平、经编码的多肽水平、或者该多核苷酸或多肽活性的方法。

[0045] i. 有义抑制元件

[0046] 如本文所使用的,“有义抑制元件”包括如下多核苷酸,该多核苷酸被设计用于表达对应于“有义”方向的靶标信使RNA的至少一部分的RNA分子。包含有义抑制元件的RNA分子的表达能降低或消除靶标多核苷酸或由其编码的多肽的水平。包含有义抑制元件的多核苷酸可以对应于靶标多核苷酸序列的全部或一部分、靶标多核苷酸的5'和/或3'非翻译区的全部或一部分、靶标多核苷酸的编码序列的全部或一部分、或靶标多核苷酸的编码序列和非翻译区二者的全部或一部分。

[0047] 通常,有义抑制元件与靶标多核苷酸具有大量的序列同一性,通常大于约65%序列同一性,大于约85%序列同一性,约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。参见美国专利号5,283,184和5,034,323。有义抑制元件可以是任何长度的,只要其允许抑制靶标序列即可。该有义抑制元件可以是例如,SEQ ID NO.:1-49中任

一项所示的靶标多核苷酸、或其变体和片段、以及其补体的15、16、17、18、19、20、22、25、30、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、600、700、900、1000、1100、1200、1300个核苷酸或更长。在其他实施例中,该有义抑制元件可以是例如,SEQ ID NO.:1-49中任一项所示的靶标多核苷酸、或其变体和片段、以及其互补序列的约15-25、19-35、19-50、25-100、100-150、150-200、200-250、250-300、300-350、350-400、450-500、500-550、550-600、600-650、650-700、700-750、750-800、800-850、850-900、900-950、950-1000、1000-1050、1050-1100、1100-1200、1200-1300、1300-1400、1400-1500、1500-1600、1600-1700、1700-1800个核苷酸或更长。

[0048] ii. 反义抑制元件

[0049] 如本文所使用的,“反义抑制元件”包括被设计用于表达与靶标信使RNA的全部或部分互补的RNA分子的多核苷酸。反义RNA抑制元件的表达降低或消除靶标多核苷酸的水平。用于反义抑制中的多核苷酸可以对应于编码靶标多核苷酸的序列的互补序列的全部或部分、靶标多核苷酸的5'和/或3'非翻译区的互补序列的全部或部分、靶标多核苷酸的编码序列的互补序列的全部或部分、或靶标多核苷酸的编码序列和非翻译区两者的互补序列的全部或部分。此外,该反义抑制元件可以与靶标多核苷酸完全互补(即,与靶标序列的互补序列100%同一)或部分互补(即,与靶标序列的互补序列低于100%同一)。在某些实施例中,该反义抑制元件包含与靶标多核苷酸具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列互补性。反义抑制可用于抑制同一植物中多种蛋白质的表达。参见例如美国专利号5,942,657。此外,该反义抑制元件可以与靶标多核苷酸的一部分互补。通常,可以使用SEQ ID NO.:1-49中任一项所示的序列、或者其变体和片段、及其互补序列的至少15、16、17、18、19、20、22、25、50、100、200、300、400、450个或更多个核苷酸的序列。用于使用反义抑制来抑制植物中内源基因表达的方法描述于以下文献中:例如,Liu等人(2002) *Plant Physiol.* [植物生理学] 129:1732-1743和美国专利号5,942,657。

[0050] iii. 双链RNA抑制元件

[0051] “双链RNA沉默元件”或“dsRNA”包含至少一种能够在被昆虫植物有害生物摄取之前或之后形成dsRNA的转录物。因此,“dsRNA沉默元件”包括dsRNA、能够形成dsRNA的转录物或多核糖核苷酸或超过一种能够形成dsRNA的转录物或多核糖核苷酸。“双链RNA”或“dsRNA”是指由单个自互补的RNA分子形成的多核糖核苷酸结构或由至少两个不同的RNA链的表达形成的多核糖核苷酸结构。所披露的方法和组合物中使用的一种或多种dsRNA分子介导靶标序列表达的降低,例如通过以序列特异性方式介导RNA干扰“RNAi”或基因沉默。在各种实施例中,dsRNA能够降低或消除昆虫植物有害生物中靶标多核苷酸或由其编码的多肽的水平或表达。

[0052] dsRNA可以通过影响靶标RNA转录物的水平、通过影响翻译并从而影响经编码的多肽的水平、或通过影响转录前水平上的表达(即,经由染色质结构的调节、甲基化模式等来改变基因表达)来降低或消除靶标序列的表达水平。例如,参见Verdel等人(2004) *Science* [科学] 303:672-676;Pal-Bhadra等人(2004) *Science* [科学] 303:669-672;Allshire(2002) *Science* [科学] 297:1818-1819;Volpe等人(2002) *Science* [科学] 297:1833-1837;Jenuwein(2002) *Science* [科学] 297:2215-2218;以及Hall等人(2002) *Science* [科学] 297:2232-2237。本文别处披露了测定功能性dsRNA的方法,该dsRNA能够降低或消除目的序列的水平。

因此,如本文所使用的,术语“dsRNA”意在包括用于描述能够介导RNA干扰或基因沉默的核酸分子的其他术语,包括例如短干扰RNA (siRNA)、双链RNA (dsRNA)、微RNA (miRNA)、发夹RNA、短发夹RNA (shRNA)、转录后基因沉默RNA (ptgsRNA)等。

[0053] 在某些实施例中,dsRNA的双链体或双链区域的至少一条链与靶标多核苷酸共享足够的序列同一性或序列互补性,以允许dsRNA降低靶标序列的表达水平。在一些实施例中,dsRNA与靶标多核苷酸具有大量的序列同一性,通常大于约65%序列同一性,大于约85%序列同一性,约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。此外,dsRNA元件可以与靶标多核苷酸的一部分互补。通常,可以使用SEQID NO.:1-49中任一项所示的序列、或者其变体和片段、及其互补序列的至少15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、50、100、200、300、400、450个或更多个核苷酸的序列。如本文所使用的,与靶标多核苷酸互补的链是“反义链”,并且与靶标多核苷酸同源的链是“有义链”。

[0054] 在另一个实施例中,dsRNA包含发夹RNA。发夹RNA包含能够折回到自身上以形成双链结构的RNA分子。多种结构都可以用作发夹元件。在某些实施例中,该dsRNA抑制元件包含如下发夹元件,该发夹元件依次包含第一区段、第二区段和第三区段,其中该第一和第三区段共享足够的互补性,以允许经转录的RNA形成双链茎环结构。

[0055] 该发夹的“第二区段”包含“环”或“环区”。这些术语在本文中作为同义词使用,并且广义地被解释为包含任何如下核苷酸序列,该核苷酸序列赋予足够灵活性以允许多核苷酸的互补区域(即,形成发夹茎的区段1和3)之间发生自配对。例如,在一些实施例中,该环区可以基本上是单链的并且作为发夹茎环的自互补区域之间的间隔区。在一些实施例中,该环区可以包含随机或无义核苷酸序列,并且因此不与靶标多核苷酸共享序列同一性。在其他实施例中,该环区包含与靶标多核苷酸共享同一性的有义或反义RNA序列或者其片段。参见,例如,国际专利公开号WO 02/00904。在某些实施例中,该环序列可以包括内含子序列、源自内含子序列的序列、与内含子序列同源的序列、或经修饰的内含子序列。该内含子序列可以是与衍生出区段1和3相同或不同物种中发现的序列。在某些实施例中,可以将环区优化为尽可能短,同时仍然提供足够的分子内灵活性以允许形成碱基配对的茎区。因此,该环序列通常小于1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、50、25、20、19、18、17、16、15、10个核苷酸或更少。

[0056] 发夹RNA分子的“第一”和“第三”区段包含发夹结构的碱基配对的茎。第一和第三区段是彼此的反向重复序列,并且共享足够的互补性以允许形成碱基配对的茎区。在某些实施例中,第一和第三区段彼此完全互补。可替代地,第一和第三区段可以彼此部分互补,只要它们能够彼此杂交形成碱基配对的茎区就可以。第一和第三区段之间的互补性的量可以计算为整个区段的百分比。因此,发夹RNA的第一和第三区段通常共享至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、高至且包括100%的互补性。

[0057] 第一和第三区段至少约为1000、500、475、450、425、400、375、350、325、300、250、225、200、175、150、125、100、75、60、50、40、30、25、22、21、20、19、18、17、16、15或10个核苷酸的长度。在某些实施例中,该第一和/或第三区段的长度为约10-100个核苷酸、约10至约75个核苷酸、约10至约50个核苷酸、约10至约40个核苷酸、约10至约35个核苷酸、约10至约30个核苷酸、约10至约25个核苷酸、约10至约19个核苷酸、约10至约20个核苷酸、约19至约50

个核苷酸、约50个核苷酸至约100个核苷酸、约100个核苷酸至约150个核苷酸、约100个核苷酸至约300个核苷酸、约150个核苷酸至约200个核苷酸、约200个核苷酸至约250个核苷酸、约250个核苷酸至约300个核苷酸、约300个核苷酸至约350个核苷酸、约350个核苷酸至约400个核苷酸、约400个核苷酸至约500个核苷酸、约600nt、约700nt、约800nt、约900nt、约1000nt、约1100nt、约1200nt、1300nt、1400nt、1500nt、1600nt、1700nt、1800nt、1900nt、2000nt或更长。在其他实施例中，第一和/或第三区段的长度包含至少10-19个核苷酸、10-20个核苷酸；19-35个核苷酸、20-35个核苷酸；30-45个核苷酸；40-50个核苷酸；50-100个核苷酸；100-300个核苷酸；约500-700个核苷酸；约700-900个核苷酸；约900-1100个核苷酸；约1300-1500个核苷酸；约1500-1700个核苷酸；约1700-1900个核苷酸；约1900-2100个核苷酸；约2100-2300个核苷酸；或约2300-2500个核苷酸。参见，例如国际公开号W0 02/00904。

[0058] 本披露的发夹分子或双链RNA分子可以具有在该RNA分子的相同部分中发现的多于一个本披露的序列或活性片段或变体或者其互补序列。例如，在嵌合发夹结构中，发夹分子的第一区段包含两个多核苷酸部分，每个具有不同的本披露的序列。例如，从发夹的一个末端开始读，第一区段由来自两个单独基因(A之后是B)的序列构成。该第一区段后面是第二区段，即发夹的环部分。该环区段之后是第三区段，其中发现第一区段中的序列的互补链(B*之后是A*)形成了发夹结构的茎环，该茎包含茎远端的SeqA-A*以及邻近环区的SeqB-B*。

[0059] 在某些实施例中，该第一和第三区段包含与该第一区段具有至少85%互补性的至少20个核苷酸。在其他实施例中，形成发夹的茎-环结构的第一和第三区段包含具有不成对的核苷酸残基的3'或5'悬垂区域。

[0060] 在某些实施例中，第一、第二和/或第三区段中使用的序列包含设计为与目的靶标多核苷酸具有足够的序列同一性并且从而具有降低靶标多核苷酸的表达水平的能力的结构域。因此抑制性RNA转录物的特异性通常由沉默元件的这些结构域赋予。因此，在一些实施例中，沉默元件的第一、第二和/或第三区段包含具有至少10、至少15、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少30、至少40、至少50、至少100、至少200、至少300、至少500、至少1000或1000个以上的核苷酸的结构域，这些核苷酸与靶标多核苷酸共享足够的序列同一性，以允许在合适的细胞中表达时降低靶标多核苷酸的表达水平。在其他实施例中，该结构域介于约15至50个核苷酸之间、约19-35个核苷酸之间、约20-35个核苷酸之间、约25-50个核苷酸之间、约19至75个核苷酸之间、约20至75个核苷酸之间、约40-90个核苷酸之间、约15-100个核苷酸之间、10-100个核苷酸之间、约10至约75个核苷酸之间、约10至约50个核苷酸之间、约10至约40个核苷酸之间、约10至约35个核苷酸之间、约10至约30个核苷酸之间、约10至约25个核苷酸之间、约10至约20个核苷酸之间、约10至约19个核苷酸之间、约50个核苷酸至约100个核苷酸之间、约100个核苷酸至约150个核苷酸之间、约150个核苷酸至约200个核苷酸之间、约200个核苷酸至约250个核苷酸之间、约250个核苷酸至约300个核苷酸之间、约300个核苷酸至约350个核苷酸之间、约350个核苷酸至约400个核苷酸之间、约400个核苷酸至约500个核苷酸之间或更长。在其他实施例中，第一和/或第三区段的长度包含至少10-20个核苷酸、至少10-19个核苷酸、20-35个核苷酸、30-45个核苷酸、40-50个核苷酸、50-100个核苷酸、或约100-300个核苷酸。

[0061] 在某些实施例中，第一、第二和/或第三区段的结构域与靶标多核苷酸具有100%

序列同一性。在其他实施例中,与靶标多核苷酸具有同源性的第一、第二和/或第三区段的结构域与该靶标多核苷酸的区域具有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。与靶标多核苷酸互补的第一、第二和/或第三区段的结构域的序列同一性只需足以降低目的靶标多核苷酸的表达即可。参见,例如Chuang和Meyerowitz (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国科学院院刊] 97: 4985-4990; Stoutjesdijk等人 (2002) Plant Physiol. [植物生理学] 129: 1723-1731; Waterhouse和Helliwell (2003) Nat. Rev. Genet. [遗传学自然评论] 4: 29-38; Pandolfini等人 BMC Biotechnology [BMC生物技术学] 3: 7, 以及美国专利公开号20030175965。用于测定hpRNA构建体沉默基因体内表达的效率的瞬时测定法已在以下文献中进行描述: Panstruga等人 (2003) Mol. Biol. Rep. [分子生物学导报] 30: 135-140。

[0062] 第一、第二和/或第三区段与靶标多核苷酸之间共享的互补性的量或第一区段与第三区段(即,发夹结构的茎)之间共有的互补性的量可以根据其基因表达需要被防治的生物体而有所不同。一些生物体或细胞类型可能需要精确配对或100%同一性,而其他生物体或细胞类型可以容忍一些错配。在一些细胞中,例如,靶向序列中的单一核苷酸错配消除了抑制基因表达的能力。在这些细胞中,所披露的抑制盒可以用于靶向突变基因的抑制,例如其转录物包含点突变的癌基因,并因此可使用本发明的方法和组合物特异性地靶向这些癌基因而不改变其余野生型等位基因的表达。在其他生物体中,可以容忍整体序列变异性,只要该序列的某个22nt区域表现出靶标多核苷酸与抑制盒之间的100%同源性即可。

[0063] 可以使用靶标多核苷酸的任何区域来设计共享足够序列同一性的沉默元件的结构域,以允许发夹转录物的表达来降低靶标多核苷酸的水平。例如,可以将结构域设计为与一种或多种靶标多核苷酸的5'非翻译区、一种或多种靶标多核苷酸的3'非翻译区、一种或多种靶标多核苷酸的外显子区、一种或多种靶标多核苷酸的内含子区以及其任何组合共享序列同一性。在某些实施例中,该沉默元件的结构域与来自靶标序列的约核苷酸1-50、25-75、75-125、50-100、125-175、175-225、100-150、150-200、200-250、225-275、275-325、250-300、325-375、375-425、300-350、350-400、425-475、400-450、475-525、450-500、525-575、575-625、550-600、625-675、675-725、600-650、625-675、675-725、650-700、725-825、825-875、750-800、875-925、925-975、850-900、925-975、975-1025、950-1000、1000-1050、1025-1075、1075-1125、1050-1100、1125-1175、1100-1200、1175-1225、1225-1275、1200-1300、1325-1375、1375-1425、1300-1400、1425-1475、1475-1525、1400-1500、1525-1575、1575-1625、1625-1675、1675-1725、1725-1775、1775-1825、1825-1875、1875-1925、1925-1975、1975-2025、2025-2075、2075-2125、2125-2175、2175-2225、1500-1600、1600-1700、1700-1800、1800-1900、1900-2000的至少约15、16、17、18、19、20、22、25或30个连续核苷酸共享足够的同一性、同源性、或与其互补。在某些情况下,为了优化发夹中使用的siRNA序列,可以使用合成的寡脱氧核糖核苷酸/核糖核酸酶H法确定靶标mRNA上易经受RNA沉默的构象中的位点。参见,例如,Vickers等人 (2003) J. Biol. Chem [生物化学杂志] 278: 7108-7118和Yang等人 (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国科学院院刊] 99: 9442-9447。这些研究表明,核糖核酸酶-H敏感位点与促进有效的siRNA导向的mRNA降解的位点之间具有显著的相关性。

[0064] 还可对发夹沉默元件进行设计,使得有义序列或反义序列不对应于靶标多核苷酸。在这个实施例中,该反义和有义序列侧翼于如下环序列,该环序列包含对应于靶标多核

苷酸的全部或部分的核苷酸序列。因此,是环区决定了RNA干扰的特异性。参见,例如WO 02/00904。

[0065] 另外,可以通过使用发夹抑制元件实现转录基因沉默(TGS),其中该发夹的反向重复序列与待沉默的靶标多核苷酸的启动子区域共享序列同一性。参见,例如,Aufsatz等人(2002)PNAS[美国科学院院报]99(增刊4):16499-16506和Metre等人(2000)EMBO J[欧洲分子生物学杂志]19(19):5194-5201。

[0066] 在其他实施例中,该沉默元件可包含小RNA(sRNA)。sRNA可以包含微RNA(miRNA)和短干扰RNA(siRNA)两者(Meister和Tuschl(2004)Nature[自然]431:343-349和Bonetta等人(2004)Nature Methods[自然方法]1:79-86)。miRNA是长度为约19至约24个核糖核苷酸的调控剂,其能高效抑制靶标多核苷酸的表达。参见例如Javier等人(2003)Nature[自然]425:257-263。对于miRNA干扰,可以将该沉默元件设计用来表达形成发夹结构或部分碱基配对的结构的dsRNA分子,该发夹结构或部分碱基配对的结构包含与目的靶标多核苷酸互补的19、20、21、22、23、24或25个核苷酸序列。该miRNA可以经合成产生,或被转录为更长的RNA,该更长的RNA随后裂解,以产生活性miRNA。具体地讲,miRNA可以包含有义方向上与靶标多核苷酸具有同源性的序列的19个核苷酸,以及与有义序列互补的相应反义序列的19个核苷酸。miRNA可以是包含miRNA序列的“人工miRNA”或“amiRNA”,其以合成的方式被设计用来使靶标序列沉默。

[0067] 当表达miRNA时,最终的(成熟的)miRNA以双链体存在于前体骨架结构中,这两条链被称为miRNA(最终与靶标碱基配对的链)和miRNA*(星号序列)。已经证明miRNA能以转基因的方式被表达并且目的靶基因可以被有效地沉默(Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis[在拟南芥中通过人工微RNA进行高度特异性基因沉默]Schwab R,Ossowski S,Riester M,Warthmann N,Weigel D.Plant Cell.[植物细胞]2006年5月;18(5):1121-33.2006年3月10日电子公布;以及Expression of artificial microRNAs in transgenic Arabidopsis thaliana confers virus resistance[人工微RNA在转基因拟南芥中的表达赋予病毒抗性]Niu QW,Lin SS,Reyes J,Chen KC,Wu HW,Yeh SD,Chua NH.Nat Biotechnol.[自然生物技术]2006年11月;24(11):1420-8.2006年10月22日电子公布勘误表在:Nat Biotechnol.[自然生物技术]2007年2月;25(2):254中)。

[0068] 用于miRNA干扰的沉默元件包含miRNA一级序列。该miRNA一级序列包含如下DNA序列,该DNA序列具有被环间隔开的miRNA和星号序列,以及侧翼于该区域的对于加工重要的另外的序列。当表达为RNA时,该一级miRNA的这种结构使得允许形成如下发夹RNA结构,该发夹RNA结构可被加工成成熟的miRNA。在一些实施例中,miRNA骨架包含基因组或cDNA miRNA前体序列,其中所述序列包含在其中插入有异源(人工)成熟miRNA和星号序列的天然一级结构。

[0069] 如本文所使用的,“星号序列”是miRNA前体骨架内的与miRNA互补,并与miRNA形成双链体进而形成发夹RNA的茎结构的序列。在一些实施例中,该星号序列可以与miRNA序列具有小于100%的互补性。可替代地,该星号序列可以与miRNA序列具有至少99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%或更低的序列互补性,只要该星号序列与miRNA序列具有足以形成双链结构的互补性即可。在另外的实施例中,该星号序列包含与miRNA序列具有

1、2、3、4、5或更多个错配的序列并且仍然具有足够的互补性以与miRNA序列形成双链结构，从而生成miRNA并抑制靶标序列。

[0070] miRNA前体骨架可来自任何植物。在一些实施例中，miRNA前体骨架来自单子叶植物。在其他实施例中，miRNA前体骨架来自双子叶植物。在另外的实施例中，骨架来自玉米或大豆。之前已对微RNA前体骨架进行了描述。例如，US 20090155910 A1 (WO 2009/079532) 披露了下列大豆miRNA前体骨架：156c、159、166b、168c、396b和398b，并且US 20090155909 A1 (WO 2009/079548) 披露了下列玉米miRNA前体骨架：159c、164h、168a、169r和396h。

[0071] 因此，可以改变一级miRNA以允许异源miRNA和星号序列有效插入到miRNA前体骨架内。在此类情况下，使用PCR技术将miRNA前体骨架的miRNA区段和星号区段替换为设计用来靶向任何目的序列的异源miRNA和异源星号序列，并克隆到表达构建体中。已经认识到，可以改变人工miRNA和星号序列插入骨架中的位置。用于将miRNA和星号序列插入miRNA前体骨架中的详细方法描述于例如美国专利申请20090155909 A1和US 20090155910 A1中。

[0072] 当设计miRNA序列和星号序列时，可作出各种设计选择。参见，例如，Schwab R等人(2005) *Dev Cell* [发育细胞] 8:517-27。在非限制性实施例中，本文所披露的miRNA序列可具有5'端的“U”、第19个核苷酸位置处的“C”或“G”、以及第10个核苷酸位置处的“A”或“U”。在其他实施例中，miRNA的这种设计使得miRNA具有如用ZipFold算法计算得到的高自由 $\Delta -G$ (Markham, N.R. 和 Zuker, M. (2005) *Nucleic Acids Res.* [核酸研究] 33:W577-W581)。任选地，在miRNA的5'部分内可添加一个碱基对改变，以使该序列与靶标序列相差一个核苷酸。

[0073] 本文披露的方法和组合物使用DNA构建体，所述DNA构建体在转录时“形成”沉默元件(例如dsRNA分子)。所述方法和组合物还可以包含含有编码沉默元件的DNA构建体的宿主细胞。在另一个实施例中，所述方法和组合物还可以包含含有编码沉默元件的DNA构建体的转基因植物。因此，正在被表达的异源多核苷酸不需要自己形成dsRNA，而可以与植物细胞中或摄食后的有害生物肠中的其他序列相互作用，以允许形成dsRNA。例如，可以通过将包含miRNA或siRNA靶标序列的嵌合构建体表达达到与待沉默的一个或多个基因的全部或部分相对应的序列中，来生成能够选择性沉默靶标多核苷酸的嵌合多核苷酸。在这个实施例中，当miRNA或siRNA的靶标与细胞中存在的miRNA相互作用时，“形成”dsRNA。然后所得的dsRNA可以降低待沉默的一个或多个基因的表达水平。参见例如美国申请公开2007-0130653，题目为“Methods and Compositions for Gene Silencing [用于基因沉默的方法和组合物]”。可以将该构建体设计为具有内源性miRNA的靶标，或者可替代地，可以在该构建体中使用的异源的和/或合成的miRNA的靶标。如果使用异源的和/或合成的miRNA，可以将其引入与嵌合多核苷酸相同的核苷酸构建体上或单独的构建体上的细胞中。如本文别处所述的，可以用任何方法来引入包含该异源miRNA的构建体。

[0074] IV. 变体和片段

[0075] “片段”意在是多核苷酸的一部分或者氨基酸序列和因此由其编码的蛋白质的一部分。多核苷酸的片段可以编码保留天然蛋白的生物活性的蛋白质片段。可替代地，可用作沉默元件的多核苷酸片段不必编码保留生物活性的片段蛋白质。因此，核苷酸序列的片段的范围为至少约10个核苷酸、约15个核苷酸、约16个核苷酸、约17个核苷酸、约18个核苷酸、约19个核苷酸、约20个核苷酸、约21个核苷酸、约22个核苷酸、约50个核苷酸、约75个核苷酸、约100个核苷酸、200个核苷酸、300个核苷酸、400个核苷酸、500个核苷酸、600个核苷酸、

700个核苷酸并且高至且包括比所采用的全长多核苷酸少一个核苷酸。可替代地,核苷酸序列的片段的范围可以为SEQ ID NO.:1-49中任一项、或者其变体和片段、及其互补序列的1-50、25-75、75-125、50-100、125-175、175-225、100-150、100-300、150-200、200-250、225-275、275-325、250-300、325-375、375-425、300-350、350-400、425-475、400-450、475-525、450-500、525-575、575-625、550-600、625-675、675-725、600-650、625-675、675-725、650-700、725-825、825-875、750-800、875-925、925-975、850-900、925-975、975-1025、950-1000、1000-1050、1025-1075、1075-1125、1050-1100、1125-1175、1100-1200、1175-1225、1225-1275、1200-1300、1325-1375、1375-1425、1300-1400、1425-1475、1475-1525、1400-1500、1525-1575、1575-1625、1625-1675、1675-1725、1725-1775、1775-1825、1825-1875、1875-1925、1925-1975、1975-2025、2025-2075、2075-2125、2125-2175、2175-2225、1500-1600、1600-1700、1700-1800、1800-1900、1900-2000。测定希望的沉默元件的活性的方法在本文其他地方进行了描述。

[0076] “变体”意指基本上相似的序列。对于多核苷酸,变体包含在天然多核苷酸中的一个或多个内部位点处的一个或多个核苷酸的缺失和/或添加,和/或在天然多核苷酸中的一个或多个位点处的一个或多个核苷酸的取代。可用作沉默元件的多核苷酸的变体将保留降低靶标多核苷酸表达的能力,并且在一些实施例中,因此能防治目的昆虫植物有害生物。如本文所用,“天然”多核苷酸或多肽分别包含天然存在的核苷酸序列或氨基酸序列。对于多核苷酸,保守变体包括如下那些序列,由于遗传密码的简并性而编码所披露的多肽之一的氨基酸序列。变体多核苷酸还包括通过合成衍生的多核苷酸,诸如那些例如通过使用定点诱变产生但继续保留所需活性的多核苷酸。通常,如通过本文别处所描述的序列比对程序和参数确定的,具体披露的多核苷酸(即,沉默元件)的变体将与该具体多核苷酸具有至少约40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。

[0077] 具体披露的多核苷酸(即参考多核苷酸)的变体还可通过比较由变体多核苷酸所编码的多肽与由该参考多核苷酸所编码的多肽之间的序列同一性百分数来进行评价。可以使用本文别处描述的序列比对程序和参数计算任何两个多肽之间的百分比序列同一性。当通过比较由它们编码的两个多肽共有的序列同一性百分数来评估所使用的给定的所披露的多核苷酸对时,两个编码的多肽之间的序列同一性百分数为至少约40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。

[0078] 相对于参考序列(受试者),“百分比(%)序列同一性”被确定为在比对序列并引入空位(如果需要)以实现最大百分比序列同一性后,并且不考虑作为序列同一性的一部分的任何氨基酸保守取代,候选序列(查询)中与参考序列中的相应氨基酸残基或核苷酸同一的氨基酸残基或核苷酸的百分比。用于确定序列同一性百分比目的的比对可以以本领域技术范围内的各种方式实现,例如,使用公共可用的计算机软件,例如BLAST, BLAST-2。本领域的技术人员可以确定用于比对的适当参数,包括在进行比较的序列的全长度上实现最大比对所需的任何算法。两个序列之间的同一性百分比是序列共有的同一位置的数目的函数(例如,查询序列的同一性百分比=查询序列和主题序列之间的同一位置的数目/查询序列的位置总数×100)。

[0079] 进一步提供了用于从SEQ ID NO.:1-49中所示的靶标多核苷酸、或者其变体和片段、及其互补序列中识别沉默元件的方法。这样的方法包括获得SEQ ID NO.:1-49中任一项、或者其变体和片段、及其互补序列的候选片段,该候选片段具有足够的长度以至于能充当沉默元件,并且从而降低靶标多核苷酸的表达和/或防治希望的有害生物;在合适的表达盒中表达所述候选多核苷酸片段以产生候选沉默元件,并确定所述候选多核苷酸片段具有沉默元件的活性,并且从而降低靶标多核苷酸的表达和/或防治期望的有害生物。鉴于本文提供的教导,基于抑制所期望的通路来识别此类候选片段的方法是已知的。例如,可以采用各种生物信息学程序来识别可以被用来产生沉默元件的靶标多核苷酸的区域。参见,例如,Elbahir等人(2001) *Genes and Development* [基因与发育] 15:188-200, Schwartz等人(2003) *Cell* [细胞] 115:199-208, Khvorova等人(2003) *Cell* [细胞] 115:209-216。还参见,在Whitehead网站(jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/)的siRNA,其计算正义和反义siRNA的结合能。还参见网址genscript.com/ssl-bin/app/rnai?op=known;来自英杰公司(Invitrogen)的Block-iT™ RNAi设计器(Block-iT™ RNAi designer)和金斯瑞公司(GenScript)的siRNA构建体生成器(siRNA Construct Builder)。在各个方面,应当理解,术语“.....SEQ ID NO.:1-49,或者其变体或片段,或者其互补序列.....”意指本披露的序列包含SEQ ID NO.:1-49,和/或SEQ ID NO.:1-49的片段,和/或SEQ ID NO.:1-49的变体,和/或SEQ ID NO.:1-49、SEQ ID NO.:1-49的变体、和/或SEQ ID NO.:1-49的片段的互补序列,单独地(或)或包含一些或所有列出的序列。

[0080] V. DNA构建体

[0081] 术语“多核苷酸”的使用并不旨在局限于包含DNA的多核苷酸。本领域普通技术人员将认识到,多核苷酸可以包含核糖核苷酸和核糖核苷酸与脱氧核糖核苷酸的组合。这种脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸既包括天然存在的分子也包括合成的类似物。所披露的多核苷酸还涵盖所有形式的序列,包括但不限于单链形式、双链形式、发夹结构、茎-环结构等。

[0082] 编码沉默元件或在某些实施例中的、在披露的方法和组合物中使用的多核苷酸可以在表达盒中提供以便在目的植物或生物体中表达。已经认识到,可以使用多个沉默元件,包括多个相同沉默元件、多个靶向靶标序列不同区域的沉默元件、或多个来自不同靶标序列的沉默元件。在这个实施例中,已经认识到每个沉默元件可以由单个或单独的盒、DNA构建体或载体编码。如所讨论的,设想了提供该沉默元件的任何方式。可使用包含编码一个或多个沉默元件的DNA的单个的盒来转化植物或植物细胞,或者可使用编码沉默元件的分离的盒来转化植物或者植物细胞或宿主细胞。同样地,经一种组分转化的植物可以随后用第二组分进行转化。还可以通过有性杂交将编码沉默元件的一个或多个DNA构建体聚在一起。也就是说,包含一种组分的第一植物与包含第二种组分的第二植物杂交。杂交所产生的子代植物将包含这两种组分。

[0083] 该表达盒可以包括可操作地连接至本发明的多核苷酸的5'和3'调控序列。“可操作地连接”旨在表示两个或更多个元件之间的功能性连接。例如,本发明的多核苷酸与调节序列(即,启动子)之间的有效连接是可使本文披露的多核苷酸得以表达的功能性连接。可操作地连接的元件可以是连续的或非连续的。当用于指两个蛋白质编码区域的连接时,可操作地连接意在是这些编码区域处于相同的阅读框中。该盒可以另外地含有至少一个待共转化到生物体中的另外的多核苷酸。可替代地,可以在多个表达盒上提供另外的一种或多

种多肽。提供的表达盒可以具有多个限制性位点和/或重组位点,用于将多核苷酸插入到调控区的转录调控之下。该表达盒可另外包含选择性标记基因。

[0084] 该表达盒在5'-3'转录方向可以包括转录和翻译起始区(即启动子)、编码本发明的方法和组合物中使用的沉默元件的多核苷酸、以及在植物中起作用的转录和翻译终止区(即,终止区)。在其他实施例中,从抑制盒表达双链RNA。这样的盒可以包含驱动可操作地连接的沉默元件的转录的两个趋同启动子。“趋同启动子”是指在编码该沉默元件的、可操作地连接的多核苷酸任一末端上取向,使得每个启动子以相反方向驱动该沉默元件的转录,产生两个转录物的启动子。在此类实施例中,趋同启动子允许正义和反义链的转录,并且从而允许dsRNA的形成。这种盒还可以包含驱动编码该沉默元件的一个或多个可操作地连接的多核苷酸的转录的两个趋异启动子。“趋异启动子”是指彼此以相反方向取向,驱动编码该沉默元件的一个或多个多核苷酸以相反的方向转录的启动子。在此类实施例中,趋异启动子允许正义和反义链的转录并允许dsRNA的形成。在此类实施例中,趋异启动子还允许至少两个单独发夹RNA的转录。在另一个实施例中,构建体中存在一个盒,该盒包含受到两个单独启动子控制的、处于相同取向的、编码该沉默元件的两个或更多个多核苷酸。在另一个实施例中,构建体中存在处于相同取向的两个或更多个单独的盒,每个盒包含受到启动子控制的、编码该沉默元件的至少一个多核苷酸。

[0085] 本文披露的调控区(即,启动子、转录调控区和翻译终止区)和/或多核苷酸对于宿主细胞而言或彼此之间可以是天然的/同功的。可替代地,本文披露的调控区和/或多核苷酸对于宿主细胞或彼此之间可以是异源的。如本文所用,关于序列的“异源性”是指该序列源于外来物种,或者,如果源于相同物种的话,则是通过蓄意人为干预从其在组合物和/或基因组基因座中的天然形式进行实质性修饰得到的序列。例如,可操作地连接至异源多核苷酸的启动子来自与其衍生该多核苷酸的物种不同的物种,或者,如果来自相同/类似的物种,那么一方或双方基本上由它们的原来形式和/或基因组基因座修饰得到,或者该启动子不是被可操作地连接的多核苷酸的天然启动子。如本文使用的,嵌合基因包含与转录起始区可操作地连接的编码序列,该转录起始区对于该编码序列是异源的。

[0086] 终止区可以对于转录起始区而言是天然的,可以对于编码沉默元件的可操作地连接的多核苷酸而言是天然的,可以对于植物宿主而言是天然的,或者可以衍生自对于启动子、编码该沉默元件的多核苷酸、植物宿主或其任何组合而言别的来源(即外来的或异源的)。方便的终止区可获自根癌农杆菌(*A. tumefaciens*)的Ti质粒,诸如章鱼碱合酶和胭脂碱合酶终止区。还参见Guerineau等人(1991) *Mol. Gen. Genet.* [分子遗传学和普通遗传学] 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* [细胞] 64:671-674; Sanfacon等人(1991) *Genes Dev.* [基因与发育] 5:141-149; Mogen等人(1990) *Plant Cell* [植物细胞] 2:1261-1272; Munroe等人(1990) *Gene* [基因] 91:151-158; Ballas等人(1989) *Nucleic Acids Res.* [核酸研究] 17:7891-7903; 以及Joshi等人(1987) *Nucleic Acids Res.* [核酸研究] 15:9627-9639。

[0087] 已知有另外的序列修饰能增强细胞宿主中的基因表达。这些包括消除以下序列:编码假聚腺苷酸化信号、外显子-内含子剪接位点信号、转座子样重复的序列、及可能不利于基因表达的其他经充分表征的序列。可将序列的G-C含量调整至通过参照宿主细胞中表达的已知基因而计算出的给定细胞宿主的平均水平。当可能时,修饰序列以避免出现可预见的发夹二级mRNA结构。

[0088] 在制备表达盒时,可以操作各种DNA片段,以提供处于适当取向以及合适时,处于适当阅读框中的DNA序列。为此,可采用衔接子(adapter)或接头以连接DNA片段,或可以涉及其他操作以提供方便的限制位点、移除多余的DNA、移除限制位点等。出于这个目的,可以涉及体外诱变、引物修复、限制性酶切(restriction)、退火、再取代(例如转换和颠换)。

[0089] 多种启动子可用于本发明的实践中。可基于所需结果,选择启动子。核酸可以与组成型启动子、组织偏好性启动子、诱导型启动子或其他启动子组合用于在宿主生物体中的表达。

[0090] 此类组成型启动子包括,例如Rsyn7启动子的核心启动子和其他在W0 99/43838和美国专利号6,072,050中披露的组成型启动子;核心CaMV 35S启动子(Odell等人,(1985) Nature[自然]313:810-812);稻肌动蛋白(McElroy等人,(1990) Plant Cell[植物细胞]2:163-171);泛素(Christensen等人(1989) Plant Mol. Biol. [植物分子生物学]12:619-632和Christensen等人(1992) Plant Mol. Biol. [植物分子生物学]18:675-689;pEMU (Last等人(1991) Theor. Appl. Genet. [理论与应用遗传学]81:581-588);MAS (Velten等人(1984) EMBO J. [欧洲分子生物学学会杂志]3:2723-2730);ALS启动子(美国专利号5,659,026)等。其他组成型启动子包括例如美国专利号5,608,149;5,608,144;5,604,121;5,569,597;5,466,785;5,399,680;5,268,463;5,608,142;和6,177,611。

[0091] 根据期望的结果,从诱导型启动子表达基因可能是有益的。还可以采用诱导型启动子,例如病原体诱导型启动子。这些启动子包括来自病程相关蛋白(PR蛋白)的那些启动子,其在被病原体感染后被诱导;例如,PR蛋白、SAR蛋白、 β -1,3-葡聚糖酶、几丁质酶等。参见,例如Redolfi等人(1983) Neth. J. Plant Pathol. [荷兰植物病理学杂志]89:245-254;Uknes等人(1992) Plant Cell [植物细胞]4:645-656;以及Van Loon(1985) Plant Mol. Virol. [植物分子病毒学]4:111-116。还参见W0 99/43819。

[0092] 此外,由于病原体通过伤口或昆虫损伤找到进入植物的入口,伤口诱导型启动子可以用于本发明的构建中。这种伤口诱导型启动子包括马铃薯蛋白酶抑制剂(pin II)基因(Ryan(1990) Ann. Rev. Phytopath. [植物病理学年鉴]28:425-449;Duan等人(1996) Nature Biotechnology [自然生物技术]14:494-498);wun1和wun2,美国专利号5,428,148;win1和win2(Stanford等人(1989) Mol. Gen. Genet. [分子和普通遗传学]215:200-208);系统素(McGurl等人(1992) Science [科学]225:1570-1573);WIP1(Rohmeier等人(1993) Plant Mol. Biol. [植物分子生物学]22:783-792;Eckelkamp等人(1993) FEBS Letters [欧洲生化学会联盟通讯]323:73-76);MPI基因(Corderok等人(1994) Plant J. [植物杂志]6(2):141-150);等等。

[0093] 此外,可以在实施例的方法和核苷酸构建体中使用病原体诱导型启动子。这种病原体诱导型启动子包括来自病程相关蛋白(PR蛋白)的那些,其在病原体感染后被诱导;例如,PR蛋白、SAR蛋白、 β -1,3-葡聚糖酶、几丁质酶等。参见,例如Redolfi等人(1983) Neth. J. Plant Pathol. [荷兰植物病理学杂志]89:245-254;Uknes等人(1992) Plant Cell [植物细胞]4:645-656;以及Van Loon(1985) Plant Mol. Virol. [植物分子病毒学]4:111-116。还参见W0 99/43819。

[0094] 引人关注的是在病原体侵染部位处或附近局部表达的启动子。参见,例如,Marineau等人(1987) Plant Mol. Biol. [植物分子生物学]9:335-342;Matton等人(1989)

Molecular Plant-Microbe Interactions [分子植物-微生物相互作用] 2:325-331; Somsisch等人(1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国科学院院刊] 83:2427-2430; Somsisch等人(1988) Mol. Gen. Genet. [分子遗传和基因组学] 2:93-98和Yang(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国科学院院刊] 93:14972-14977。还参见, Chen等人(1996) Plant J. [植物杂志] 10:955-966; Zhang等人(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国科学院院刊] 91:2507-2511; Warner等人(1993) Plant J. [植物杂志] 3:191-201; Siebertz等人(1989) Plant Cell [植物细胞] 1:961-968; 美国专利号5,750,386(线虫诱导型)。特别引人关注的是玉米PRms基因的诱导型启动子,其表达是由串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)病原体诱导的(参见例如Cordero等人(1992) Physiol. Mol. Plant Path. [生理学与分子植物病理学] 41:189-200)。

[0095] 可以使用化学调节型启动子以通过应用外源化学调节剂来调节植物中的基因表达。取决于目标,在应用化学品诱导基因表达的情况下启动子可以是化学诱导型启动子,或者在应用化学品阻抑基因表达的情况下启动子可以是化学阻抑型启动子。化学诱导型启动子是本领域已知的,并且包括但不限于由苯磺酰胺除草剂安全剂激活的玉米In2-2启动子、由用作萌前除草剂的疏水亲电子化合物激活的玉米GST启动子、以及由水杨酸激活的烟草PR-1a启动子。其他目的化学调节的启动子包括类固醇应答性启动子(参见,例如,糖皮质激素诱导型启动子(Schena等人(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国科学院院刊] 88:10421-10425和McNellis等人(1998) Plant J [植物杂志] 14(2):247-257)以及四环素诱导型和四环素阻抑型启动子(参见例如Gatz等人(1991) Mol Gen Genet [分子遗传和基因组学] 227:229-237以及美国专利号5,814,618和5,789,156)。

[0096] 组织偏好性启动子可以用于靶向特定植物组织内的增强的表达。组织偏好性启动子包括Yamamoto等人(1997) Plant J. [植物杂志] 12(2):255-265; Kawamata等人(1997) Plant Cell Physiol. [植物细胞生理学] 38(7):792-803; Hansen等人(1997) Mol. Gen. Genet. [分子遗传学和普通遗传学] 254(3):337-343; Russell等人(1997) Transgenic Res. [转基因研究] 6(2):157-168; Rinehart等人(1996) Plant Physiol. [植物生理学] 112(3):1331-1341; Van Camp等人(1996) Plant Physiol. [植物生理学] 112(2):525-535; Canevascini等人(1996) Plant Physiol. [植物生理学] 112(2):513-524; Yamamoto等人(1994) Plant Cell Physiol. [植物细胞生理学] 35(5):773-778; Lam(1994) Results Probl. Cell Differ. [细胞分化的结果和问题] 20:181-196; Orozco等人(1993) Plant Mol Biol. [植物分子生物学] 23(6):1129-1138; Matsuoka等人(1993) Proc Natl. Acad. Sci. USA [美国科学院院刊] 90(20):9586-9590; 和Guevara-Garcia等人(1993) Plant J. [植物杂志] 4(3):495-505。必要的话,此类启动子可经修饰用于弱表达。

[0097] 叶偏好性启动子是本领域已知的。参见,例如, Yamamoto等人(1997) Plant J. [植物杂志] 12(2):255-265; Kwon等人(1994) Plant Physiol. [植物生理学] 105:357-67; Yamamoto等人(1994) Plant Cell Physiol. [植物细胞生理学] 35(5):773-778; Gotor等人(1993) Plant J. [植物学] 3:509-18; Orozco等人(1993) Plant Mol. Biol. [植物分子生物学] 23(6):1129-1138; 以及Matsuoka等人(1993) Proc Natl. Acad. Sci. USA [美国科学院院刊] 90(20):9586-9590。

[0098] 根偏好性启动子是已知的,并且可以选自来自文献的许多可获得的启动子,或从

各种相容物种中重新分离。参见,例如,Hire等人(1992) *Plant Mol. Biol.* [植物分子生物学] 20 (2) :207-218 (大豆根特异性谷氨酰胺合成酶基因);Keller和Baumgartner (1991) *Plant Cell* [植物细胞] 3 (10) :1051-1061 (法国菜豆的GRP 1.8基因中的根特异性控制元件);Sanger等人(1990) *Plant Mol. Biol.* [植物分子生物学] 14 (3) :433-443 (根癌农杆菌的甘露碱合酶(MAS)的根特异性启动子);以及Miao等人(1991) *Plant Cell* [植物细胞] 3 (1) :11-22 (编码细胞溶质谷氨酰胺合成酶(GS)的全长cDNA克隆,其在大豆根和根结节中表达)。还参见,Bogusz等人(1990) *Plant Cell* [植物细胞] 2 (7) :633-641,其中描述了来自固氮的非豆科植物榆科山黄麻(*Parasponia andersonii*)以及相关的非固氮的非豆科植物山黄麻(*Trema tomentosa*)的血红蛋白基因分离的两个根特异性启动子。这些基因的启动子与 β -葡糖醛酸糖苷酶报告基因连接,并且被引入非豆科作物烟草(*Nicotiana tabacum*)和豆科作物百脉根(*Lotus corniculatus*)两者中,并且在两种情况下都保留了根特异性启动子活性。Leach和Aoyagi (1991)描述了他们对发根土壤杆菌的高表达的rolC和rolD根诱导性基因的启动子的分析(参见*Plant Science* [植物科学] (Limerick) 79 (1) :69-76)。他们得出结论,增强子和组织偏好性DNA决定簇在这些启动子中是解离的。Teeri等人(1989)使用与lacZ的基因融合以显示编码章鱼碱合酶的土壤杆菌属T-DNA基因尤其是在根尖的表皮中有活性,并且TR2'基因在完整植物中具有根特异性并且被叶组织中的创伤刺激,这是杀昆虫的或杀幼虫的基因一起使用的特别希望的特征组合(参见,EMBO J. [欧洲分子生物学学会杂志] 8 (2) :343-350)。与nptII (新霉素磷酸转移酶II)融合的TR1'基因显示类似的特征。另外的根偏好性启动子包括VfENOD-GRP3基因启动子(Kuster等人(1995) *Plant Mol. Biol.* [植物分子生物学] 29 (4) :759-772);和rolB启动子(Capana等人(1994) *Plant Mol. Biol.* [植物分子生物学] 25 (4) :681-691。还参见美国专利号5,837,876;5,750,386;5,633,363;5,459,252;5,401,836;5,110,732;和5,023,179。

[0099] “种子偏好性”启动子包括“种子特异性”启动子(在种子发育期间有活性的那些启动子如种子贮藏蛋白的启动子)以及“种子发芽性”启动子(在种子发芽期间有活性的那些启动子)。参见Thompson等人,(1989) *BioEssays* [生物学分析] 10:108。这样的种子偏好性启动子包括但不限于Cim1 (细胞分裂素诱导的信息);cZ19B1 (玉米19kDa玉米醇溶蛋白);和milps (肌醇-1-磷酸盐合酶)(参见美国专利号6,225,529,通过引用并入本文)。 γ -玉米蛋白和Glob-1是胚乳特异性启动子。对于双子叶植物,种子特异性启动子包括但不限于:菜豆 β -菜豆素、油菜籽蛋白、 β -伴大豆球蛋白、大豆凝集素、十字花科蛋白等。对于单子叶植物,种子特异性启动子包括但不限于玉米15kDa玉米蛋白、22kDa玉米蛋白、27kDa玉米蛋白、g-玉米蛋白、waxy蛋白、收缩素(shrunken) 1、收缩素2、球蛋白1等。还参见WO 00/12733,其中公开了来自end1和end2基因的种子偏好性启动子。在特定组织中具有“偏好性”表达的启动子在该组织中比在至少一种其他植物组织中以更高程度表达。一些组织偏好性启动子几乎专门在特定组织中表达。

[0100] 在实施例中,植物表达性启动子是维管特异性启动子,例如韧皮部特异性启动子。如本文所使用的,“维管特异性”启动子是至少在维管细胞中表达的启动子或优先在维管细胞中表达的启动子。维管特异性启动子的表达不必仅在维管细胞中,其他细胞类型或组织中的表达也是可能的。如本文所使用的,“韧皮部特异性启动子”是至少在韧皮部细胞中表达的植物可表达性启动子,或优先在韧皮部细胞中表达的启动子。

[0101] 韧皮部特异性启动子的表达不必仅在韧皮部细胞中,在其他细胞类型或组织(例如木质部组织)中的表达也是可能的。在本发明的一个实施例中,韧皮部特异性启动子是至少在韧皮部细胞中表达的植物可表达性启动子,其中与韧皮部细胞中的表达相比,非韧皮部细胞中的表达更有限(或不存在)。根据本发明,合适的维管特异性或韧皮部特异性启动子的实例包括但不限于选自由以下各项组成的组的启动子:SCSV3、SCSV4、SCSV5和SCSV7启动子(Schunmann等人(2003)Plant Functional Biology[植物生物学功能]30:453-60);发根土壤杆菌的rolC基因启动子(Kiyokawa等人(1994)Plant Physiology[植物生理学]104:801-02;Pandolfini等人(2003)BioMedCentral (BMC)Biotechnology[生物医学中心(BMC)生物技术]3:7,(www.biomedcentral.com/1472-6750/3/7);Graham等人(1997)Plant Mol.Biol.[植物分子生物学]33:729-35;Guivarc'h等人(1996);Almon等人(1997)Plant Physiol.[植物生理学]115:1599-607;the rolA gene promoter of Agrobacterium rhizogenes[发根土壤杆菌的rolA基因启动子](Dehio等人(1993)Plant Mol.Biol.[植物分子生物学]23:1199-210);根癌农杆菌T-DNA基因5的启动子(Korber等人(1991)EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]10:3983-91);稻蔗糖合酶RSs1基因启动子(Shi等人(1994)J.Exp.Bot.[实验植物学杂志]45:623-31);CoYMV或鸭跖草黄斑驳杆状病毒(Commelina yellow mottle badnavirus)启动子(Medberry等人(1992)Plant Cell[植物细胞]4:185-92;Zhou等人(1998)Chin.J.Biotechnol.[中国生物技术杂志]14:9-16);CFDV或椰子叶面腐败病毒启动子(Rohde等人(1994)Plant Mol.Biol.[植物分子生物学]27:623-28;Hehn和Rhode(1998)J.Gen.Virol.[普通病毒学杂志]79:1495-99);RTBV或水稻东格鲁杆状病毒(rice tungro bacilliform virus)启动子(Yin和Beachy(1995)Plant J.[植物杂志]7:969-80;Yin等人(1997)Plant J.[植物杂志]12:1179-80);豌豆谷氨酰胺合酶GS3A基因(Edwards等人(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国科学院院刊]87:3459-63;Brears等人(1991)Plant J.[植物杂志]1:235-44);马铃薯转化酶基因的iny CD111和inv CD141启动子(Hedley等人(2000)J.Exp.Botany[实验植物学杂志]51:817-21);从拟南芥中分离的启动子显示在烟草中具有韧皮部特异性表达(Keribundit等人(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国科学院院刊]88:5212-16);VAHOX1启动子区(Tornero等人(1996)Plant J.[植物杂志]9:639-48);豌豆细胞壁转化酶基因启动子(Zhang等人(1996)Plant Physiol.[植物生理学]112:1111-17);与美国公开专利申请20030106097的几丁质酶相关的内源性棉花蛋白的启动子,这是来自胡萝卜的酸性转化酶基因启动子(Ramloch-Lorenz等人(1993)The Plant J.[植物学杂志]4:545-54);硫酸盐转运蛋白基因Sultr1的启动子;3(Yoshimoto等人(2003)Plant Physiol.[植物生理学]131:1511-17);蔗糖合酶基因的启动子(Nolte和Koch(1993)PlantPhysiol.[植物生理学]101:899-905);以及烟草蔗糖转运蛋白基因的启动子(Kuhn等人(1997)Science[科学]275-1298-1300)。

[0102] 可能的启动子还包括洋李贰水解酶(PH DL1.4PRO)的黑樱桃启动子(美国专利号6,797,859),来自黄瓜和稻的硫氧还蛋白H启动子(Fukuda A等人(2005)Plant Cell Physiol.[植物细胞生理学]46(11):1779-86),稻(RSs1)(Shi,T.Wang等人(1994)J.Exp.Bot.[实验植物学杂志]45(274):623-631)和玉米蔗糖合酶-1启动子(Yang.,N-S.等人(1990)PNAS[美国科学院院报]87:4144-4148),来自南瓜的PP2启动子(Guo,H.等人(2004)Transgenic Research[转基因研究]13:559-566),At SUC2启动子(Truernit,E.等

人(1995) *Planta* [植物] 196 (3) :564-70), *At SAM-1* (S-腺苷甲硫氨酸合成酶) (Mijnsbrugge KV. 等人(1996) *Plant Cell. Physiol.* [植物细胞生物学] 37 (8) :1108-1115), 以及水稻东格鲁杆状病毒 (RTBV) 启动子 (Bhattacharyya-Pakrasi 等人(1993) *Plant J.* [植物杂志] 4 (1) :71-79)。

[0103] 当希望低水平表达时,可使用弱启动子。通常,如在此使用的术语“弱启动子”是指以低水平驱动编码序列的表达的启动子。低水平表达是指约1/1000转录物至约1/100,000转录物至约1/500,000转录物的水平。可替代地,应当认识到,术语“弱启动子”还涵盖仅在少数细胞中驱动表达但不在其他细胞中表达,从而具有低水平总表达的启动子。当启动子以不可接受的高水平驱动表达时,可以对启动子序列的部分进行缺失或修饰,以降低表达水平。

[0104] 此类弱组成型启动子包括,例如:*Rsyn7*启动子的核心启动子 (WO 99/43838和美国专利号6,072,050)、核心35S *CaMV*启动子等。其他组成型启动子包括,例如以下美国专利号中所公开的那些;5,608,149;5,608,144;5,604,121;5,569,597;5,466,785;5,399,680;5,268,463;5,608,142;和6,177,611。

[0105] 该表达盒还可以包含选择性标记基因,用于筛选转化的细胞。利用选择性标记基因来筛选转化的细胞或组织。标记基因包括编码抗生素抗性的基因,例如编码新霉素磷酸转移酶II (NEO) 和潮霉素磷酸转移酶 (HPT) 的基因,以及赋予除草剂化合物抗性的基因,例如草胺磷、溴草腈、咪唑啉酮和2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D)。另外的选择性标记包括表型标记,例如 β -半乳糖苷酶和荧光蛋白,例如绿色荧光蛋白 (GFP) (Su 等人(2004) *Biotechnol Bioeng* [生物技术与生物工程] 85:610-9和Fetter 等人(2004) *Plant Cell* [植物细胞] 16:215-28)、青色荧光蛋白 (CYP) (Bolte 等人(2004) *J. Cell Science* [细胞科学杂志] 117:943-54和Kato 等人(2002) *Plant Physiol* [植物生理学] 129:913-42) 和黄色荧光蛋白 (来自 *Evrogen* 的 *PhiYFP*TM, 参见 Bolte 等人(2004) *J. Cell Science* [细胞科学杂志] 117:943-54)。对于另外的选择性标记,通常参见, Yarranton (1992) *Curr. Opin. Biotech.* [当前对生物技术的意见] 3:506-511; Christopherson 等人(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国科学院院刊] 89:6314-6318; Yao 等人(1992) *Cell* [细胞] 71:63-72; Reznikoff (1992) *Mol. Microbiol.* [分子微生物学] 6:2419-2422; Barkley 等人(1980) 于 *The Operon* [操纵子], 第177-220页中; Hu 等人(1987) *Cell* [细胞] 48:555-566; Brown 等人(1987) *Cell* [细胞] 49:603-612; Figge 等人(1988) *Cell* [细胞] 52:713-722; Deuschle 等人(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国科学院院刊] 86:5400-5404; Fuerst 等人(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国科学院院刊] 86:2549-2553; Deuschle 等人(1990) *Science* [科学] 248:480-483; Gossen (1993) *Ph.D. Thesis, University of Heidelberg* [博士论文, 海德堡大学]; Reines 等人(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国科学院院刊] 90:1917-1921; Labow 等人(1990) *Mol. Cell. Biol.* [分子与细胞生物学] 10:3343-3356; Zambretti 等人(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国科学院院刊] 89:3952-3956; Baim 等人(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国科学院院刊] 88:5072-5076; Wyborski 等人(1991) *Nucleic Acids Res.* [核酸研究] 19:4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) *Topics Mol. Struc. Biol.* [热点分子结构生物学] 10:143-162; Degenkolb 等人(1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* [抗微生物剂化学疗法] 35:1591-1595; Kleinschmidt 等人

(1988) *Biochemistry* [生物化学] 27:1094-1104; Bonin (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg [博士论文, 海德堡大学]; Gossen 等人 (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国科学院院刊] 89:5547-5551; Oliva 等人 (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* [抗微生物剂化学疗法] 36:913-919; Hlavka 等人 (1985) *Handbook of Experimental Pharmacology* [实验药理学手册], 第78卷 (施普林格出版社, 柏林) 和 Gill 等人 (1988) *Nature* [自然] 334:721-724。以上选择性标记基因的列表并不意味着是限制性的。任何选择性标记基因都可以与本文所述的组合物和方法一起使用。

[0106] VI. 包含沉默元件的组合物

[0107] 包含沉默元件的多核苷酸中的一种或多种可以作为植物、植物部分、种子、昆虫植物有害生物或耕作区的外用组合物, 诸如喷雾剂或粉剂提供。在另一个实例中, 用DNA构建体或表达盒转化植物, 用于至少一个沉默元件的表达。在任一组合物中, 在被有害生物摄取时, 沉默元件可降低靶标有害生物序列的水平并从而防治该有害生物 (即, 鞘翅目植物有害生物, 包括叶甲属植物有害生物, 例如玉米根萤叶甲、巴氏根叶甲、墨西哥玉米根虫、南美叶甲或黄瓜十一星叶甲)。已经认识到, 该组合物可以包含如下细胞 (诸如植物细胞或细菌细胞), 在该细胞中, 编码沉默元件的多核苷酸稳定地被并入到基因组中并可操作地连接到在细胞中有活性的启动子上。还涵盖包含细胞混合物 (表达至少一个沉默元件的一些细胞) 的组合物。在其他实施例中, 包含沉默元件的组合物不包含于细胞中。在此类实施例中, 可将该组合物施用到昆虫植物有害生物所栖息的区域。在一个实施例中, 将该组合物外用地施用于植物 (即, 通过喷洒田间或种植区域) 来保护植物免受有害生物侵害。以这种方式施用核苷酸的方法是本领域技术人员已知的。

[0108] 还可以将本文披露的组合物配制成诱饵。在此实施例中, 这些组合物包含增加该组合物对有害生物的吸引力的食品或引诱剂。

[0109] 包含沉默元件的组合物可在农业上合适的和/或环境上可接受的载体中进行配制。此类载体可以为待处理的动物、植物或环境可耐受的任何材料。此外, 此类载体必须使得该组合物在防治昆虫植物有害生物时仍然有效。此类载体的实例包括水、盐水、林格氏溶液、右旋糖或其他糖溶液、汉克氏溶液和其他生理上平衡的水性盐溶液、磷酸盐缓冲液、碳酸氢盐缓冲液以及Tris缓冲液。另外, 该组合物可以包括延长组合物半衰期的化合物。各种杀昆虫制剂也可见于例如美国公开2008/0275115、2008/0242174、2008/0027143、2005/0042245和2004/0127520中。

[0110] 已经认识到, 可使用包含编码沉默元件的序列的多核苷酸来转化生物体, 以便宿主生物体产生这些组分, 并随后将该宿主生物体施用到一种或多种靶标有害生物的环境中。此类宿主生物体包括杆状病毒、细菌等等。以这种方式, 可通过合适的载体将编码沉默元件的多核苷酸的组合引入微生物宿主中, 并将所述宿主施用到环境中或者施用到植物或动物上。

[0111] 在将核酸插入细胞的背景下, 术语“引入”是指“转染”或“转化”或“转导”, 并且包括将核酸并入真核或原核细胞中, 在该真核或原核细胞中核酸可以稳定地被并入细胞的基因组 (例如, 染色体、质粒、质体或线粒体DNA) 中, 转化为自主复制子, 或被瞬时表达 (例如转染的mRNA)。

[0112] 可选择如下微生物宿主, 已知该微生物宿主可占领一种或多种目的作物的“植物

圈”(叶面、叶围、根围和/或根面)。选择这些微生物以便能够在具体环境中成功地与野生型微生物竞争,为编码沉默元件的序列供给稳定的维持和表达,并且理想的是,增加对这些组分的保护使其不受环境降解和失活的影响。

[0113] 此类微生物包括细菌、藻类和真菌。特别引人关注的是微生物,例如细菌,例如假单胞菌属(*Pseudomonas*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、克雷伯氏杆菌属(*Klebsiella*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、红假单胞菌属(*Rhodopseudomonas*)、甲基菌属(*Methylius*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、醋酸杆菌属(*Acetobacter*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、节细菌属(*Arthrobacter*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)和产碱杆菌属(*Alcaligenes*);真菌,尤其是酵母,如酵母菌属(*Saccharomyces*)、隐球菌属(*Cryptococcus*)、克鲁维酵母菌属(*Kluyveromyces*)、掷孢酵母属(*Sporobolomyces*)、红酵母(*Rhodotorula*)和短梗霉属(*Aureobasidium*)。特别引人关注的是例如以下的植物圈细菌物种:丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)、农杆菌、球形红假单胞菌(*Rhodopseudomonas spheroides*)、野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)、苜蓿根瘤菌(*Rhizobium melioli*)、富营养产碱菌(*Alcaligenes entrophus*)、木质棍状杆菌(*Clavibacter xyli*)和维涅兰德固氮菌(*Azotobacter vinlandii*);以及例如以下的植物圈酵母物种:深红酵母(*Rhodotorula rubra*)、粘红酵母(*R.glutinis*)、海滨红酵母(*R.marina*)、橙黄红酵母(*R.aurantiaca*)、浅白色隐球酵母(*Cryptococcus albidus*)、流散隐球酵母(*C.diffluens*)、罗伦隐球酵母(*C.laurentii*)、罗斯酵母(*Saccharomyces rosei*)、普地酵母(*S.pretoriensis*)、酿酒酵母(*Scerevisiae*)、粉红掷孢酵母(*Sporobolomyces rosues*)、香气掷孢酵母(*S.odorus*)、佛地克鲁维酵母(*Kluyveromyces veronae*)和出芽短梗霉(*Aureobasidium pollulans*)。特别引人关注的是有颜色的微生物。

[0114] 有多种方式可用来将包含沉默元件的多核苷酸引入处于如下条件下的微生物宿主中,该条件容许这种核苷酸编码序列的稳定维持和表达。例如,可以构建出如下表达盒,该表达盒包括所感兴趣的为了该核苷酸构建体的表达与转录和翻译调节信号可操作地连接的核苷酸构建体,以及与宿主生物体(在此将发生合并)中的序列同源的核苷酸序列和/或在该宿主(在此将发生合并或稳定维持)中具有功能的复制系统。

[0115] 转录和翻译调节信号包括但不限于启动子、转录起始位点、操纵子、活化子、增强子、其他调节元件、核糖体结合位点、起始密码子、终止信号等。参见,例如美国专利号5,039,523和4,853,331;EP 0480762A2; Sambrook等人(2000); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd edition; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY) [分子克隆:实验室手册(第3版;冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约州)]; Davis等人(1980) *Advanced Bacterial Genetics* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) [高级细菌遗传学(冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约州)]; 以及其中引用的参考文献。

[0116] 合适的宿主细胞包括原核生物和低等真核生物,例如真菌。说明性的原核生物(革兰氏阴性和革兰氏阳性)包括肠杆菌科,如埃希氏杆菌属、欧文氏菌属、志贺氏杆菌、沙门氏

菌和变形杆菌；芽孢杆菌科；根瘤科，如根瘤菌；螺菌科，如发光杆菌属、单胞发酵菌属、沙雷菌属、气单孢菌属、弧菌属、脱硫弧菌属、螺旋菌属；乳酸细菌科；假单胞菌科，如假单胞菌属和醋菌属；固氮菌科和硝化杆菌科。真核生物中的真菌，如藻菌和子囊菌纲(包括酵母，如酵母菌属和裂殖酵母属；以及担子菌纲酵母，如红酵母、短梗霉、掷孢酵母等)。

[0117] 在选择宿主细胞方面特别引人关注的特征可以包括易于将编码序列引入该宿主中、表达系统的可用性、表达效率、宿主中的稳定性以及辅助遗传能力的存在。用作杀有害生物剂微胶囊的目的特征包括保护性性质，如细胞壁厚、色素沉着、以及细胞内包装或包涵体的形成；叶亲和力；无哺乳动物毒性；吸引有害生物摄取；等等。其他考虑因素包括易于配制和处理、经济性、储存稳定性等。

[0118] 特别引人关注的宿主生物体包括酵母，例如红酵母属物种(*Rhodotorula* spp.)、短梗霉属物种(*Aureobasidium* spp.)、酵母属物种(*Saccharomyces* spp.)和掷孢酵母属物种(*Sporobolomyces* spp.)，叶面生物体，例如假单胞菌属物种(*Pseudomonas* spp.)、欧文氏菌属物种(*Erwinia* spp.)和黄杆菌属物种(*Flavobacterium* spp.)，以及其他此类生物体，包括铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、荧光假单胞菌、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等。

[0119] 本发明所包含的编码沉默元件的序列可以被引入到植物上繁殖的微生物(体表寄生菌)中，以将这些组分传递给潜在的靶标有害生物。体表寄生菌，例如可以是革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌。

[0120] 可以将沉默元件在细菌宿主中发酵，并且将所得到的细菌以与苏云金芽孢杆菌菌株用作杀昆虫喷雾剂相同的方式进行加工并用作微生物喷雾剂。任何合适的微生物都可以用于此目的。举例来说，假单胞菌已被用来将苏云金芽孢杆菌内毒素表达为包封的蛋白质，并且将所得细胞进行加工并将其作为杀昆虫剂进行喷雾(Gaertner等人(1993)，于Advanced Engineered Pesticides[高级工程杀有害生物剂]，编辑L.Kim(马塞尔·德克尔公司(Marcel Decker, Inc.)))。

[0121] 可替代地，通过将异源基因引入细胞宿主中来产生本文披露的组合物的组分。异源序列的表达直接或间接地导致沉默元件在细胞内产生。然后可以根据常规技术配制这些组合物，以施用于靶标有害生物所寄宿的环境(例如，土壤、水和植物的叶子)中。参见例如EPA0192319，以及其中引用的参考文献。

[0122] 可以用可接受的载体将经转化的微生物配制成单独的或组合的组合物，该组合物为例如悬浮液、溶液、乳剂、扑粉、可分散颗粒、可湿性粉末、以及乳油、气雾剂、浸渍颗粒、辅剂、可涂覆型糊剂，以及还有如聚合物物质中的包封物。

[0123] 上文公开的组合物可以通过添加表面活性剂、惰性载体、防腐剂、湿润剂、摄食刺激剂、引诱剂、包封剂、粘合剂、乳化剂、染料、UV保护剂、缓冲剂、流动剂或肥料、微量营养素供体或其他影响植物生长的制剂来获得。包括但不限于除草剂、杀昆虫剂、杀真菌剂、杀细菌剂、杀线虫剂、杀软体动物剂、杀螨剂、植物生长调节剂、收获助剂(harvest aid)和肥料的一种或多种农用化学品可以与制剂或其他组分的本领域通常使用的载体、表面活性剂或佐剂组合，以促进特定靶标有害生物的产品处理和应用。合适的载体和佐剂可以是固体或液体并且对应于制剂技术中通常使用的物质，例如，天然或再生矿物质、溶剂、分散剂、润湿

剂、增粘剂、粘合剂或肥料。这些活性成分(即至少一种沉默元件)通常以组合物的形式被施用,并且可以施用于待处理的作物区域、植物或种子上。例如,可以在准备贮藏于粮仓或筒仓等中或者在贮藏于粮仓或筒仓等中的过程中将这些组合物施用于谷物上。可以将这些组合物与其他化合物同时或相继施用。施用含有至少一种沉默元件的活性成分或组合物的方法包括但不限于叶面施用、种子包衣和土壤施用。施用次数和施用速度取决于相应有害生物侵染的强度。

[0124] 合适的表面活性剂包括但不限于阴离子化合物,例如羧酸盐,如金属的羧酸盐;长链脂肪酸的羧酸盐;N-酰基肌氨酸盐;磷酸与脂肪醇乙氧基化物的单酯或二酯或这些酯的盐;脂肪醇硫酸盐,如十二烷基硫酸钠、十八烷基硫酸钠或十六烷基硫酸钠;乙氧基化脂肪醇硫酸盐;乙氧基化烷基酚硫酸盐;木质素磺酸盐;石油磺酸盐;烷基芳基磺酸盐,例如烷基苯磺酸盐或低级烷基木素磺化盐,如丁基木素磺化盐;磺化萘-甲醛缩合物的盐;磺化苯酚-甲醛缩合物的盐;更复杂的磺酸盐,例如酰胺磺酸盐,如油酸和N-甲基牛磺酸的磺化缩合产物;或二烷基磺基琥珀酸盐,例如,磺酸钠或二辛基琥珀酸盐。非离子剂包括脂肪酸酯、脂肪醇、脂肪酸酰胺或者经脂肪烷基或烯基取代的酚与环氧乙烷的缩合产物,多元醇醚的脂肪酯(例如脱水山梨糖醇脂肪酸酯),这种酯类与环氧乙烷的缩合产物(例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯),环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物,炔二醇(例如2,4,7,9-四乙基-5-癸炔-4,7-二醇,或者乙氧基化的炔二醇)。阳离子表面活性剂的实例包括例如脂肪族单胺、二胺或多胺诸如乙酸盐、环烷酸盐或者油酸盐;或含氧胺,如聚氧乙烯烷基胺的氧化胺;通过羧酸与二胺或多胺的缩合制备的酰胺连接的胺;或季铵盐。

[0125] 惰性材料的实例包括但不限于,无机矿物(如高岭土、页硅酸盐、碳酸盐、硫酸盐、磷酸盐)或植物材料(如软木、粉末玉米芯、花生壳、稻壳和核桃壳)。

[0126] 包含沉默元件的这些组合物可以处于用于直接施用的合适形式或作为主要组合物的浓缩物,该浓缩物在施用前需要用适量的水或其他稀释剂进行稀释。

[0127] 这些组合物(包括经转化的微生物)可以通过例如以如下方式施用于昆虫有害生物(例如鞘翅目植物有害生物或叶甲属植物有害生物)的环境中:喷雾、雾化、撒粉、散射、涂覆或浇注、引入到土壤或土壤上、引入到灌溉水中、在有害生物已开始出现时或者在有害生物出现前进行种子处理或普通施用或撒粉作为保护措施。例如,可以将该一种或多种组合物和/或一种或多种经转化的微生物与谷物混合以在储存期间保护谷物。总体而言重要的是在植物生长的早期阶段获得对有害生物的良好防治,因为这是植物可能受到最严重损害的时候。如果认为必要,这些组合物可方便地含有另一种杀昆虫剂。在本发明的实施例中,在种植时将该一种或多种组合物直接施用于土壤,施用的形式为载体与芽孢杆菌菌株的或者本发明经转化微生物的死细胞的组合物的颗粒形式。另一个实施例是包含惰性载体中的农业化学品(例如除草剂、杀昆虫剂、肥料)与芽孢杆菌菌株的或本发明经转化微生物的死细胞的组合物的颗粒形式。

[0128] VII. 植物、植物部分及将序列引入植物中的方法

[0129] 在一个实施例中,本发明的方法涉及将多核苷酸引入植物中。“引入”旨在表示以使得该序列进入该植物细胞的内部的方式,将该多核苷酸呈送给该植物。本发明的方法不取决于用于将序列引入植物中的具体方法,只要多核苷酸或多肽进入该植物的至少一个细胞的内部即可。将多核苷酸引入植物的方法是本领域已知的,该方法包括但不限于稳定转

化法、瞬时转化法和病毒介导法。

[0130] “稳定转化”旨在表示经引入植物中的核苷酸构建体合并到该植物的基因组中,并且能够被其子代遗传。“瞬时转化”旨在表示将多核苷酸引入该植物中并且不整合到该植物的基因组中,或者将多肽引入植物中。

[0131] 转化方案连同用于将多肽或多核苷酸序列引入植物中的方案可以取决于被靶向转化的植物或植物细胞的类型(即,单子叶植物或双子叶植物)而变化。用于将多肽和多核苷酸引入植物细胞的适合的方法包括显微注射(Crossway等人(1986) *Biotechniques* [生物技术]4:320-334)、电穿孔(Riggs等人(1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国科学院院刊]83:5602-5606)、土壤杆菌介导的转化(美国专利号5,563,055和美国专利号5,981,840)、直接基因转移(Paszkowski等人(1984) *EMBO J.* [欧洲分子生物学学会杂志]3:2717-2722)、和弹道粒子加速法(参见例如美国专利号4,945,050;美国专利号5,879,918;美国专利号5,886,244;和5,932,782;Tomes等人(1995)在 *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods* [植物细胞、组织和器官培养:基础方法]中,Gamborg和Phillips编辑(施普林格出版公司(Springer-Verlag),柏林);McCabe等人(1988) *Biotechnology* [生物技术]6:923-926);和Lec1转化法(WO 00/28058)。也参见Weissinger等人(1988) *Ann. Rev. Genet.* [遗传学年鉴]22:421-477;Sanford等人(1987) *Particulate Science and Technology* [微粒科学与技术]5:27-37(洋葱);Christou等人(1988) *Plant Physiol.* [植物生理学]87:671-674(大豆);McCabe等人(1988) *Bio/Technology* [生物学/技术]6:923-926(大豆);Finer和McMullen(1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* [体外细胞与发育生物学]27P:175-182(大豆);Singh等人(1998) *Theor. Appl. Genet.* [理论与应用遗传学]96:319-324(大豆);Datta等人(1990) *Biotechnology* [生物技术]8:736-740(稻);Klein等人(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国科学院院刊]85:4305-4309(玉米);Klein等人(1988) *Biotechnology* [生物技术]6:559-563(玉米);美国专利号5,240,855、5,322,783、和5,324,646;Klein等人(1988) *Plant Physiol.* [植物生理学]91:440-444(玉米);Fromm等人(1990) *Biotechnology* [生物技术]8:833-839(玉米);Hooykaas-Van Slogteren等人(1984) *Nature* [自然](伦敦)311:763-764;美国专利号5,736,369(谷类);Bytebier等人(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国科学院院刊]84:5345-5349(百合科);De Wet等人(1985)在 *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues* [卵巢组织的实验操作]中,Chapman等人编辑(纽约朗文出版社(Longman, New York))第197-209页(花粉);Kaeppler等人(1990) *Plant Cell Reports* [植物细胞报告]9:415-418和Kaeppler等人(1992) *Theor. Appl. Genet.* [理论与应用遗传学]84:560-566(须介导的转化);D'Halluin等人(1992) *Plant Cell* [植物细胞]4:1495-1505(电穿孔);Li等人(1993) *Plant Cell Reports* [植物细胞报告]12:250-255以及Christou和Ford(1995) *Annals of Botany* [植物学年鉴]75:407-413(稻);Osjoda等人(1996) *Nature Biotechnology* [自然生物技术]14:745-750(经由根癌农杆菌获得的玉米)。

[0132] 在某些实施例中,可以使用各种瞬时转化法向植物提供本文披露的沉默元件。这种瞬时转化法包括但不限于将蛋白质或者其变体或片段直接引入植物中或将转录物引入植物中。此类方法包括例如显微注射或粒子轰击。参见例如Crossway等人(1986) *Mol Gen. Genet.* [分子遗传学和基因组学]202:179-185;Nomura等人(1986) *Plant Sci.* [植物科

学]44:53-58;Hepler等人(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.[美国国家科学院院刊]91:2176-2180和Hush等人(1994)The Journal of Cell Science[细胞科学杂志]107:775-784。可替代地,可以使用本领域已知的技术将多核苷酸瞬时转化到植物中。此类技术包括病毒载体系统,和以阻止DNA后续释放的方式使多核苷酸沉淀。这种方法包括使用包被有聚乙烯亚胺(PEI;西格玛(Sigma) #P3143)的粒子。

[0133] 在其他实施例中,可以通过使植物与病毒或病毒核酸接触将本文披露的多核苷酸引入植物中。通常,此类方法涉及将本发明的核苷酸构建体并入病毒DNA或RNA分子内。此外,已经认识到,启动子还可以涵盖用于通过病毒RNA聚合酶转录的启动子。涉及病毒DNA或RNA分子、用于将多核苷酸引入植物中并于其中表达所编码的蛋白质的方法是本领域已知的。参见例如,美国专利号5,889,191、5,889,190、5,866,785、5,589,367、5,316,931和Porta等人(1996)Molecular Biotechnology[分子生物技术]5:209-221。

[0134] 用于在植物基因组的特定位置靶向插入多核苷酸的方法是本领域已知的。在一个实施例中,利用位点特异性重组系统实现多核苷酸在所希望的基因组位置处的插入。参见例如WO 99/25821、WO 99/25854、WO 99/25840、WO 99/25855和WO 99/25853。简言之,本文披露的多核苷酸可以包含在侧翼为两个非引起重组的重组位点的转移盒中。将转移盒引入使如下靶位点稳定地并入其基因组中的植物中,该靶位点的侧翼为与该转移盒的这些位点相对应的两个非引起重组的重组位点。提供适当的重组酶,并将该转移盒整合到靶位点。由此,目的多核苷酸被整合在植物基因组中的特定染色体位置处。

[0135] 可依据常规方式将已转化的细胞培育成植株。参见例如,McCormick等人(1986)Plant Cell Reports[植物细胞报告]5:81-84。然后可以培育这些植株,并用相同的经转化的株系或者不同的株系进行授粉,并鉴定出具有所希望的表型特征的组成型表达的所得后代。可以培育两代或更多代植株,确保所希望的表型特征的表达得到稳定保持和遗传,并且然后收获种子以确保已实现所希望的表型特征的表达。以这种方式,本文所述的组合物和方法提供了如下经转化的种子(也称为“转基因种子”),该种子将本文披露的多核苷酸(例如表达盒)稳定地并入其基因组中。

[0136] 如本文所用,术语植物包括植物细胞、植物原生质体、可再生植物的植物细胞组织培养物、植物愈伤组织、植物块和在植物或植物部分(例如胚、花粉、胚珠、种子、叶、花、枝、果、核、穗、穗轴、壳、茎、根、根尖、花药等)中的完整植物细胞。谷物意指由商业种植者出于栽培或繁殖物种之外的目的所生产的成熟种子。这些再生植物的后代、变体和突变体也包括在本发明的范围内,条件是这些部分包含经引入的多核苷酸。

[0137] 本文描述的组合物和方法可用于转化任何植物物种,包括但不限于单子叶植物和双子叶植物。目的植物物种的实例包括但不限于玉米(玉蜀黍),芸苔属物种(例如,甘蓝型油菜、芜菁、芥菜)(特别是可用作种子油来源的那些芸苔属物种),苜蓿(紫花苜蓿(*Medicago sativa*)),稻(*rice, Oryza sativa*),黑麦(*rye, Secale cereale*),高粱(甜高粱(*Sorghum bicolor*),高粱(*Sorghum vulgare*)),粟(例如,珍珠粟(御谷(*Pennisetum glaucum*))),黍(粟米(*Panicum miliaceum*)),粟(谷子(*Setaria italica*)),穆子(龙爪稷(*Eleusine coracana*))),向日葵(*sunflower, Helianthus annuus*),红花(*safflower, Carthamus tinctorius*),小麦(*wheat, Triticum aestivum*),大豆(*soybean, Glycine max*),烟草(*tobacco, Nicotiana tabacum*),马铃薯(*potato, Solanum tuberosum*),花生

(peanut, *Arachis hypogaea*), 棉花(海岛棉(*Gossypium barbadense*)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)), 甘薯(番薯(*Ipomoea batatas*)), 木薯(*cassava*, *Manihot esculenta*), 咖啡(咖啡属物种(*Coffea* spp.)), 椰子(*coconut*, *Cocos nucifera*), 菠萝(*pineapple*, *Ananas comosus*), 柑橘树(柑橘属物种(*Citrus* spp.)), 可可(*cocoa*, *Theobroma cacao*), 茶树(*tea*, *Camellia sinensis*), 香蕉(芭蕉属物种(*Musa* spp.)), 鳄梨(*avocado*, *Persea americana*), 无花果(*fig*或(*Ficus casica*)), 番石榴(*guava*, *Psidium guajava*), 芒果(*mango*, *Mangifera indica*), 橄榄(*olive*, *Olea europaea*), 木瓜(番木瓜(*Carica papaya*)), 腰果(*cashew*, *Anacardium occidentale*), 澳洲坚果(*macadamia*, *Macadamia integrifolia*), 巴旦杏(*almond*, *Prunus amygdalus*), 甜菜(*sugar beets*, *Beta vulgaris*), 甘蔗(甘蔗属物种(*Saccharum* spp.)), 燕麦, 大麦, 蔬菜, 观赏植物和针叶树。

[0138] 蔬菜包括番茄(*tomatoes*, *Lycopersicon esculentum*)、莴苣(例如, 莴苣(*Lactuca sativa*))、青豆(菜豆(*Phaseolus vulgaris*))、利马豆(*lima bean*, *Phaseolus limensis*)、豌豆(香豌豆属(*Lathyrus* spp.))和黄瓜属的成员诸如黄瓜(*cucumber*, *C. sativus*)、香瓜(*cantaloupe*, *C. cantalupensis*)和甜瓜(*musk melon*, *C. melo*)。观赏植物包括杜鹃(杜鹃花属(*Rhododendron* spp.))、绣球花(*hydrangea*, *Macrophylla hydrangea*)、木槿(*hibiscus*, *Hibiscus rosasanensis*)、玫瑰(蔷薇属(*Rosa* spp.))、郁金香(郁金香属(*Tulipa* spp.))、水仙(水仙属(*Narcissus* spp.))、矮牵牛(*petunias*, *Petunia hybrida*)、康乃馨(*carnation*, *Dianthus caryophyllus*)、一品红(*poinsettia*, *Euphorbia pulcherrima*)和菊花。

[0139] 可以用于实践本文所述组合物和方法的针叶树包括(例如)松树诸如火炬松(*loblolly pine*, *Pinus taeda*)、湿地松(*slash pine*, *Pinus elliotii*)、西黄松(*ponderosa pine*, *Pinus ponderosa*)、黑松(*lodgepole pine*, *Pinus contorta*)和辐射松(*Monterey pine*, *Pinus radiata*); 花旗松(*Douglas-fir*, *Pseudotsuga menziesii*); 西方铁杉(*Western hemlock*, *Tsuga canadensis*); 北美云杉(白云杉(*Picea glauca*)); 红杉(北美红杉(*Sequoia sempervirens*)); 枞树(*true firs*) 诸如银杉(胶冷杉(*Abies amabilis*))和胶枞(香脂冷杉(*Abies balsamea*)); 以及雪松, 诸如西方红雪松(北美乔柏(*Thuja plicata*))和阿拉斯加黄-雪松(黄扁柏(*Chamaecyparis nootkatensis*))。在某些实施例中, 本文所述组合物和方法可以与植物一起使用, 例如作物植物(如玉米、苜蓿、向日葵、芸苔、大豆、棉花、红花、花生、高粱、小麦、粟、烟草等)。在其他实施例中, 玉米和大豆植物以及甘蔗植物是最佳的, 并且在仍然其他的实施例中, 玉米植物是最佳的。

[0140] 其他目的植物包括提供目的种子的谷物类植物、油料种子植物和豆科植物。目的种子包括谷物种子, 例如玉米、小麦、大麦、稻、高粱、黑麦等。油料种子植物包括棉花、大豆、红花、向日葵、芸苔属、玉蜀黍、苜蓿、棕榈、椰子等。豆科植物包括豆类和豌豆。豆类包括瓜尔豆、槐豆、胡芦巴、大豆、四季豆、豇豆、绿豆、利马豆、蚕豆、小扁豆、鹰嘴豆等。

[0141] VIII. 转基因植物中性状的堆叠

[0142] 如本文所披露的, 转基因植物可以包含大量的如SEQ ID NO.: 1-49中所示的一个或多个靶标多核苷酸、或其变体或片段、或其互补序列, 以及一种或多种另外的多核苷酸, 该多核苷酸导致多个多肽序列的产生或抑制。包含多核苷酸序列堆叠的转基因植物可以通过传统育种方法或通过遗传工程方法中的一种或两种获得。这些方法包括但不限于, 育种

各自包含目的多核苷酸的单个品系、如本文所披露的用随后的基因转化包含如下表达构建体的转基因植物,该表达构建体包含如SEQ ID NO.:1-49中所示的各种靶标多核苷酸,或者编码涉及这种靶标序列变体或其片段、或其互补序列的沉默元件,和将基因共转化入单个植物细胞中。如本文所使用的,术语“堆叠”包括使多个性状存在于相同植物中(即,两个性状都并入核基因组中、一个性状并入核基因组中并且另一个性状并入质体的基因组中、或者两种性状都并入质体的基因组中)。在一个非限制性实例中,“堆叠性状”包括如下分子堆叠物,在该分子堆叠物中,这些序列在物理上彼此相邻。如本文使用的性状是指源自特定序列或序列组群的表型。可以使用包含多个多核苷酸或分别携带于多个载体上的多核苷酸的单一转化载体进行多核苷酸的共转化。如果通过遗传转化植物来堆叠序列,则目的多核苷酸序列可以在任意时间并以任意顺序组合。可以用共转化方案将这些性状与转化盒的任何组合所提供的目的多核苷酸一起引入。例如,若引入两个序列,则这两个序列可包含在分开的转化盒(反式)或包含在同一个转化盒(顺式)中。这些序列的表达可以通过相同的启动子或通过不同的启动子驱动。应当进一步认识到,可以使用位点特异重组系统,在希望的基因组位置堆叠多核苷酸序列。参见,例如WO 1999/25821、WO 1999/25854、WO 1999/25840、WO 1999/25855和WO 1999/25853。

[0143] 在一些实施例中,如本文所披露的,单独的或与一种或多种另外的昆虫抗性性状相堆叠的如SEQ ID NO.:1-49中所示的各种靶标多核苷酸、涉及这类靶标序列的沉默元件、以及其变体或片段、或其互补序列,可以与一种或多种另外的输入性状(例如,除草剂抗性、真菌抗性、病毒抗性、胁迫耐受性、抗病性、雄性不育性、茎秆强度等)或产出性状(例如,增加的产量、经修饰的淀粉、改进的油特性、平衡的氨基酸、高赖氨酸或甲硫氨酸、增加的消化性、改善的纤维品质、抗旱性等)相堆叠。因此,多核苷酸实施例可用于提供具有灵活地且成本有效地控制任何数量的农艺有害生物的能力的经改善的作物品质的完整农艺学方案。

[0144] 可用于堆叠的转基因包括但不限于下文所述的那些转基因。

[0145] i. 赋予昆虫抗性或抗病性的转基因

[0146] (A) 植物抗病性基因。通常通过植物中抗病性基因(R)的产物与病原体中相应的无毒性(Avr)基因的产物之间的特异性相互作用来激活植物防御。可以用经克隆的抗性基因来转化植物变种,以工程化对特定病原体菌株具有抗性的植物。参见,例如Jones等人(1994) *Science* [科学] 266:789 (cloning of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* [克隆番茄Cf-9基因以抵抗番茄叶霉病菌]); Martin等人(1993) *Science* [科学] 262:1432 (tomato Pto gene for resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* encodes a protein kinase [用于抵抗丁香假单胞菌番茄致病变种的番茄Pto基因编码蛋白激酶]); Mindrinos等人, (1994) *Cell* [细胞] 78:1089 (*Arabidopsis* RSP2 gene for resistance to *Pseudomonas syringae* [拟南芥RSP2基因用于对抗丁香假单胞菌]), McDowell和Woffenden, (2003) *Trends Biotechnol.* [生物科技趋势] 21 (4): 178-83以及Toyoda等人, (2002) *Transgenic Res.* [转基因研究] 11 (6): 567-82。与野生型植物相比,对疾病具有抗性的植物对病原体更具抗性。

[0147] (B) 编码苏云金芽孢杆菌蛋白质的基因,其衍生物或其上建模的合成多肽。参见,例如,Geiser等人, (1986) *Gene* [基因] 48:109,其公开了Bt δ -内毒素基因的克隆和核苷酸序列。此外,编码 δ -内毒素基因的DNA分子可购自美国典型培养物保藏中心(American Type

Culture Collection) (美国马里兰州罗克韦尔市 (Rockville, Md.)), 例如ATCC® 登录号 40098、67136、31995和31998下。经遗传工程化的苏云金芽孢杆菌转基因的其他非限制性实例在以下专利和专利申请中给出, 并且特此通过引用并入本文中: 美国专利号5, 188, 960; 5, 689, 052; 5, 880, 275; 5, 986, 177; 6, 023, 013; 6, 060, 594; 6, 063, 597; 6, 077, 824; 6, 620, 988; 6, 642, 030; 6, 713, 259; 6, 893, 826; 7, 105, 332; 7, 179, 965; 7, 208, 474; 7, 227, 056; 7, 288, 643; 7, 323, 556; 7, 329, 736; 7, 449, 552; 7, 468, 278; 7, 510, 878; 7, 521, 235; 7, 544, 862; 7, 605, 304; 7, 696, 412; 7, 629, 504; 7, 705, 216; 7, 772, 465; 7, 790, 846; 7, 858, 849和WO 1991/14778; WO 1999/31248; WO 2001/12731; WO 1999/24581和WO 1997/40162。

[0148] 也可以堆叠编码杀有害生物蛋白的基因, 该基因包括但不限于: 来自假单胞菌属的杀昆虫蛋白, 例如PSEEN3174 (Monalysin, (2011) PLoS Pathogens [PLoS病原体], 7:1-13), 来自假单胞菌蛋白菌株CHAO和Pf-5 (之前为荧光假单胞菌 (*fluorescens*)) (Pechy-Tarr, (2008) Environmental Microbiology [环境微生物学] 10:2368-2386; 基因库登录号 EU400157); 来自台湾假单胞菌 (*Pseudomonas taiwanensis*) (Liu等人, (2010) J. Agric. Food Chem. [农业食品化学学报] 58:12343-12349) 和来自假产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) (Zhang等人, (2009) Annals of Microbiology [微生物学年报] 59:45-50和Li等人, (2007) Plant Cell Tiss. Organ Cult. [植物细胞组织和器官培养] 89:159-168); 来自发光杆菌属和致病杆菌属的杀昆虫蛋白 (Hinchliffe等人, (2010) The Open Toxinology Journal [开放性毒理学杂志] 3:101-118和Morgan等人, (2001) Applied and Envir. Micro. [应用与环境微生物学] 67:2062-2069), 美国专利号6, 048, 838 和美国专利号6, 379, 946; 美国专利公开US 20140007292的PIP-1多肽; 美国专利公开US 20140033361的AfIP-1A和/或AfIP-1B多肽; 美国专利公开号US 20140274885和US 20160040184的PHI-4多肽; PCT公开号WO 2015/023846的PIP-47多肽、PCT公开号WO 2015/038734的PIP-72多肽; PCT公开号WO 2015/120270的PtIP-50多肽和PtIP-65多肽; PCT公开号WO 2015/120276的PtIP-83多肽; PCT序列号PCT/US 15/55502的PtIP-96多肽; 以及 δ -内毒素, 包括但不限于Cry1、Cry2、Cry3、Cry4、Cry5、Cry6、Cry7、Cry8、Cry9、Cry10、Cry11、Cry12、Cry13、Cry14、Cry15、Cry16、Cry17、Cry18、Cry19、Cry20、Cry21、Cry22、Cry23、Cry24、Cry25、Cry26、Cry27、Cry28、Cry29、Cry30、Cry31、Cry32、Cry33、Cry34、Cry35、Cry36、Cry37、Cry38、Cry39、Cry40、Cry41、Cry42、Cry43、Cry44、Cry45、Cry46、Cry47、Cry49、Cry51和Cry55类的 δ -内毒素基因和苏云金芽孢杆菌溶细胞Cyt1和Cyt2基因。苏云金芽孢杆菌杀昆虫蛋白的这些类别的成员包括但不限于Cry1Aa1 (登录号AAA22353); Cry1Aa2 (登录号AAA22552); Cry1Aa3 (登录号BAA00257); Cry1Aa4 (登录号CAA31886); Cry1Aa5 (登录号BAA04468); Cry1Aa6 (登录号AAA86265); Cry1Aa7 (登录号AAD46139); Cry1Aa8 (登录号I26149); Cry1Aa9 (登录号BAA77213); Cry1Aa10 (登录号AAD55382); Cry1Aa11 (登录号CAA70856); Cry1Aa12 (登录号AAP80146); Cry1Aa13 (登录号AAM44305); Cry1Aa14 (登录号AAP40639); Cry1Aa15 (登录号AAY66993); Cry1Aa16 (登录号HQ439776); Cry1Aa17 (登录号HQ439788); Cry1Aa18 (登录号HQ439790); Cry1Aa19 (登录号HQ685121); Cry1Aa20 (登录号JF340156); Cry1Aa21 (登录号JN651496); Cry1Aa22 (登录号KC158223); Cry1Ab1 (登录号AAA22330); Cry1Ab2 (登录号AAA22613); Cry1Ab3 (登录号AAA22561); Cry1Ab4 (登录号BAA00071); Cry1Ab5 (登录号CAA28405); Cry1Ab6 (登录号AAA22420); Cry1Ab7 (登录号

CAA31620);Cry1Ab8(登录号AAA22551);Cry1Ab9(登录号CAA38701);Cry1Ab10(登录号A29125);Cry1Ab11(登录号I12419);Cry1Ab12(登录号AAC64003);Cry1Ab13(登录号AAN76494);Cry1Ab14(登录号AAG16877);Cry1Ab15(登录号AA013302);Cry1Ab16(登录号AAK55546);Cry1Ab17(登录号AAT46415);Cry1Ab18(登录号AAQ88259);Cry1Ab19(登录号AAW31761);Cry1Ab20(登录号ABB72460);Cry1Ab21(登录号ABS18384);Cry1Ab22(登录号ABW87320);Cry1Ab23(登录号HQ439777);Cry1Ab24(登录号HQ439778);Cry1Ab25(登录号HQ685122);Cry1Ab26(登录号HQ847729);Cry1Ab27(登录号JN135249);Cry1Ab28(登录号JN135250);Cry1Ab29(登录号JN135251);Cry1Ab30(登录号JN135252);Cry1Ab31(登录号JN135253);Cry1Ab32(登录号JN135254);Cry1Ab33(登录号AAS93798);Cry1Ab34(登录号KC156668);Cry1Ab样(登录号AAK14336);Cry1Ab样(登录号AAK14337);Cry1Ab样(登录号AAK14338);Cry1Ab样(登录号ABG88858);Cry1Ac1(登录号AAA22331);Cry1Ac2(登录号AAA22338);Cry1Ac3(登录号CAA38098);Cry1Ac4(登录号AAA73077);Cry1Ac5(登录号AAA22339);Cry1Ac6(登录号AAA86266);Cry1Ac7(登录号AAB46989);Cry1Ac8(登录号AAC44841);Cry1Ac9(登录号AAB49768);Cry1Ac10(登录号CAA05505);Cry1Ac11(登录号CAA10270);Cry1Ac12(登录号I12418);Cry1Ac13(登录号AAD38701);Cry1Ac14(登录号AAQ06607);Cry1Ac15(登录号AAN07788);Cry1Ac16(登录号AAU87037);Cry1Ac17(登录号AAX18704);Cry1Ac18(登录号AAY88347);Cry1Ac19(登录号ABD37053);Cry1Ac20(登录号ABB89046);Cry1Ac21(登录号AAY66992);Cry1Ac22(登录号ABZ01836);Cry1Ac23(登录号CAQ30431);Cry1Ac24(登录号ABL01535);Cry1Ac25(登录号FJ513324);Cry1Ac26(登录号FJ617446);Cry1Ac27(登录号FJ617447);Cry1Ac28(登录号ACM90319);Cry1Ac29(登录号DQ438941);Cry1Ac30(登录号GQ227507);Cry1Ac31(登录号GU446674);Cry1Ac32(登录号HM061081);Cry1Ac33(登录号GQ866913);Cry1Ac34(登录号HQ230364);Cry1Ac35(登录号JF340157);Cry1Ac36(登录号JN387137);Cry1Ac37(登录号JQ317685);Cry1Ad1(登录号AAA22340);Cry1Ad2(登录号CAA01880);Cry1Ae1(登录号AAA22410);Cry1Af1(登录号AAB82749);Cry1Ag1(登录号AAD46137);Cry1Ah1(登录号AAQ14326);Cry1Ah2(登录号ABB76664);Cry1Ah3(登录号HQ439779);Cry1Ai1(登录号AA039719);Cry1Ai2(登录号HQ439780);Cry1A样(登录号AAK14339);Cry1Ba1(登录号CAA29898);Cry1Ba2(登录号CAA65003);Cry1Ba3(登录号AAK63251);Cry1Ba4(登录号AAK51084);Cry1Ba5(登录号AB020894);Cry1Ba6(登录号ABL60921);Cry1Ba7(登录号HQ439781);Cry1Bb1(登录号AAA22344);Cry1Bb2(登录号HQ439782);Cry1Bc1(登录号CAA86568);Cry1Bd1(登录号AAD10292);Cry1Bd2(登录号AAM93496);Cry1Be1(登录号AAC32850);Cry1Be2(登录号AAQ52387);Cry1Be3(登录号ACV96720);Cry1Be4(登录号HM070026);Cry1Bf1(登录号CAC50778);Cry1Bf2(登录号AAQ52380);Cry1Bg1(登录号AA039720);Cry1Bh1(登录号HQ589331);Cry1Bi1(登录号KC156700);Cry1Ca1(登录号CAA30396);Cry1Ca2(登录号CAA31951);Cry1Ca3(登录号AAA22343);Cry1Ca4(登录号CAA01886);Cry1Ca5(登录号CAA65457);Cry1Ca6[1](登录号AAF37224);Cry1Ca7(登录号AAG50438);Cry1Ca8(登录号AAM00264);Cry1Ca9(登录号AAL79362);Cry1Ca10(登录号AAN16462);Cry1Ca11(登录号AAX53094);Cry1Ca12(登录号HM070027);Cry1Ca13(登录号HQ412621);Cry1Ca14(登录号JN651493);Cry1Cb1(登录号M97880);Cry1Cb2(登录号AAG35409);Cry1Cb3(登录号

ACD50894);Cry1Cb样(登录号AAX63901);Cry1Da1(登录号CAA38099);Cry1Da2(登录号I76415);Cry1Da3(登录号HQ439784);Cry1Db1(登录号CAA80234);Cry1Db2(登录号AAK48937);Cry1Dc1(登录号ABK35074);Cry1Ea1(登录号CAA37933);Cry1Ea2(登录号CAA39609);Cry1Ea3(登录号AAA22345);Cry1Ea4(登录号AAD04732);Cry1Ea5(登录号A15535);Cry1Ea6(登录号AAL50330);Cry1Ea7(登录号AAW72936);Cry1Ea8(登录号ABX11258);Cry1Ea9(登录号HQ439785);Cry1Ea10(登录号ADR00398);Cry1Ea11(登录号JQ652456);Cry1Eb1(登录号AAA22346);Cry1Fa1(登录号AAA22348);Cry1Fa2(登录号AAA22347);Cry1Fa3(登录号HM070028);Cry1Fa4(登录号HM439638);Cry1Fb1(登录号CAA80235);Cry1Fb2(登录号BAA25298);Cry1Fb3(登录号AAF21767);Cry1Fb4(登录号AAC10641);Cry1Fb5(登录号AA013295);Cry1Fb6(登录号ACD50892);Cry1Fb7(登录号ACD50893);Cry1Ga1(登录号CAA80233);Cry1Ga2(登录号CAA70506);Cry1Gb1(登录号AAD10291);Cry1Gb2(登录号AA013756);Cry1Gc1(登录号AAQ52381);Cry1Ha1(登录号CAA80236);Cry1Hb1(登录号AAA79694);Cry1Hb2(登录号HQ439786);Cry1H样(登录号AAF01213);Cry1Ia1(登录号CAA44633);Cry1Ia2(登录号AAA22354);Cry1Ia3(登录号AAC36999);Cry1Ia4(登录号AAB00958);Cry1Ia5(登录号CAA70124);Cry1Ia6(登录号AAC26910);Cry1Ia7(登录号AAM73516);Cry1Ia8(登录号AAK66742);Cry1Ia9(登录号AAQ08616);Cry1Ia10(登录号AAP86782);Cry1Ia11(登录号CAC85964);Cry1Ia12(登录号AAV53390);Cry1Ia13(登录号ABF83202);Cry1Ia14(登录号ACG63871);Cry1Ia15(登录号FJ617445);Cry1Ia16(登录号FJ617448);Cry1Ia17(登录号GU989199);Cry1Ia18(登录号ADK23801);Cry1Ia19(登录号HQ439787);Cry1Ia20(登录号JQ228426);Cry1Ia21(登录号JQ228424);Cry1Ia22(登录号JQ228427);Cry1Ia23(登录号JQ228428);Cry1Ia24(登录号JQ228429);Cry1Ia25(登录号JQ228430);Cry1Ia26(登录号JQ228431);Cry1Ia27(登录号JQ228432);Cry1Ia28(登录号JQ228433);Cry1Ia29(登录号JQ228434);Cry1Ia30(登录号JQ317686);Cry1Ia31(登录号JX944038);Cry1Ia32(登录号JX944039);Cry1Ia33(登录号JX944040);Cry1Ib1(登录号AAA82114);Cry1Ib2(登录号ABW88019);Cry1Ib3(登录号ACD75515);Cry1Ib4(登录号HM051227);Cry1Ib5(登录号HM070028);Cry1Ib6(登录号ADK38579);Cry1Ib7(登录号JN571740);Cry1Ib8(登录号JN675714);Cry1Ib9(登录号JN675715);Cry1Ib10(登录号JN675716);Cry1Ib11(登录号JQ228423);Cry1Ic1(登录号AAC62933);Cry1Ic2(登录号AAE71691);Cry1Id1(登录号AAD44366);Cry1Id2(登录号JQ228422);Cry1Ie1(登录号AAG43526);Cry1Ie2(登录号HM439636);Cry1Ie3(登录号KC156647);Cry1Ie4(登录号KC156681);Cry1If1(登录号AAQ52382);Cry1Ig1(登录号KC156701);Cry1I样(登录号AAC31094);Cry1I样(登录号ABG88859);Cry1Ja1(登录号AAA22341);Cry1Ja2(登录号HM070030);Cry1Ja3(登录号JQ228425);Cry1Jb1(登录号AAA98959);Cry1Jc1(登录号AAC31092);Cry1Jc2(登录号AAQ52372);Cry1Jd1(登录号CAC50779);Cry1Ka1(登录号AAB00376);Cry1Ka2(登录号HQ439783);Cry1La1(登录号AAS60191);Cry1La2(登录号HM070031);Cry1Ma1(登录号FJ884067);Cry1Ma2(登录号KC156659);Cry1Na1(登录号KC156648);Cry1Nb1(登录号KC156678);Cry1样(登录号AAC31091);Cry2Aa1(登录号AAA22335);Cry2Aa2(登录号AAA83516);Cry2Aa3(登录号D86064);Cry2Aa4(登录号AAC04867);Cry2Aa5(登录号CAA10671);Cry2Aa6(登录号

CAA10672);Cry2Aa7(登录号CAA10670);Cry2Aa8(登录号AA013734);Cry2Aa9(登录号AA013750);Cry2Aa10(登录号AAQ04263);Cry2Aa11(登录号AAQ52384);Cry2Aa12(登录号ABI83671);Cry2Aa13(登录号ABL01536);Cry2Aa14(登录号ACF04939);Cry2Aa15(登录号JN426947);Cry2Ab1(登录号AAA22342);Cry2Ab2(登录号CAA39075);Cry2Ab3(登录号AAG36762);Cry2Ab4(登录号AA013296);Cry2Ab5(登录号AAQ04609);Cry2Ab6(登录号AAP59457);Cry2Ab7(登录号AAZ66347);Cry2Ab8(登录号ABC95996);Cry2Ab9(登录号ABC74968);Cry2Ab10(登录号EF157306);Cry2Ab11(登录号CAM84575);Cry2Ab12(登录号ABM21764);Cry2Ab13(登录号ACG76120);Cry2Ab14(登录号ACG76121);Cry2Ab15(登录号HM037126);Cry2Ab16(登录号GQ866914);Cry2Ab17(登录号HQ439789);Cry2Ab18(登录号JN135255);Cry2Ab19(登录号JN135256);Cry2Ab20(登录号JN135257);Cry2Ab21(登录号JN135258);Cry2Ab22(登录号JN135259);Cry2Ab23(登录号JN135260);Cry2Ab24(登录号JN135261);Cry2Ab25(登录号JN415485);Cry2Ab26(登录号JN426946);Cry2Ab27(登录号JN415764);Cry2Ab28(登录号JN651494);Cry2Ac1(登录号CAA40536);Cry2Ac2(登录号AAG35410);Cry2Ac3(登录号AAQ52385);Cry2Ac4(登录号ABC95997);Cry2Ac5(登录号ABC74969);Cry2Ac6(登录号ABC74793);Cry2Ac7(登录号CAL18690);Cry2Ac8(登录号CAM09325);Cry2Ac9(登录号CAM09326);Cry2Ac10(登录号ABN15104);Cry2Ac11(登录号CAM83895);Cry2Ac12(登录号CAM83896);Cry2Ad1(登录号AAF09583);Cry2Ad2(登录号ABC86927);Cry2Ad3(登录号CAK29504);Cry2Ad4(登录号CAM32331);Cry2Ad5(登录号CA078739);Cry2Ae1(登录号AAQ52362);Cry2Af1(登录号AB030519);Cry2Af2(登录号GQ866915);Cry2Ag1(登录号ACH91610);Cry2Ah1(登录号EU939453);Cry2Ah2(登录号ACL80665);Cry2Ah3(登录号GU073380);Cry2Ah4(登录号KC156702);Cry2Ai1(登录号FJ788388);Cry2Aj(登录号);Cry2Ak1(登录号KC156660);Cry2Ba1(登录号KC156658);Cry3Aa1(登录号AAA22336);Cry3Aa2(登录号AAA22541);Cry3Aa3(登录号CAA68482);Cry3Aa4(登录号AAA22542);Cry3Aa5(登录号AAA50255);Cry3Aa6(登录号AAC43266);Cry3Aa7(登录号CAB41411);Cry3Aa8(登录号AAS79487);Cry3Aa9(登录号AAW05659);Cry3Aa10(登录号AAU29411);Cry3Aa11(登录号AAW82872);Cry3Aa12(登录号ABY49136);Cry3Ba1(登录号CAA34983);Cry3Ba2(登录号CAA00645);Cry3Ba3(登录号JQ397327);Cry3Bb1(登录号AAA22334);Cry3Bb2(登录号AAA74198);Cry3Bb3(登录号I15475);Cry3Ca1(登录号CAA42469);Cry4Aa1(登录号CAA68485);Cry4Aa2(登录号BAA00179);Cry4Aa3(登录号CAD30148);Cry4Aa4(登录号AFB18317);Cry4A样(登录号AAY96321);Cry4Ba1(登录号CAA30312);Cry4Ba2(登录号CAA30114);Cry4Ba3(登录号AAA22337);Cry4Ba4(登录号BAA00178);Cry4Ba5(登录号CAD30095);Cry4Ba样(登录号ABC47686);Cry4Ca1(登录号EU646202);Cry4Cb1(登录号FJ403208);Cry4Cb2(登录号FJ597622);Cry4Cc1(登录号FJ403207);Cry5Aa1(登录号AAA67694);Cry5Ab1(登录号AAA67693);Cry5Ac1(登录号I34543);Cry5Ad1(登录号ABQ82087);Cry5Ba1(登录号AAA68598);Cry5Ba2(登录号ABW88931);Cry5Ba3(登录号AFJ04417);Cry5Ca1(登录号HM461869);Cry5Ca2(登录号ZP_04123426);Cry5Da1(登录号HM461870);Cry5Da2(登录号ZP_04123980);Cry5Ea1(登录号HM485580);Cry5Ea2(登录号ZP_04124038);Cry6Aa1(登录号AAA22357);Cry6Aa2(登录号AAM46849);Cry6Aa3(登录号ABH03377);Cry6Ba1(登录号AAA22358);Cry7Aa1(登录号

AAA22351);Cry7Ab1(登录号AAA21120);Cry7Ab2(登录号AAA21121);Cry7Ab3(登录号ABX24522);Cry7Ab4(登录号EU380678);Cry7Ab5(登录号ABX79555);Cry7Ab6(登录号ACI44005);Cry7Ab7(登录号ADB89216);Cry7Ab8(登录号GU145299);Cry7Ab9(登录号ADD92572);Cry7Ba1(登录号ABB70817);Cry7Bb1(登录号KC156653);Cry7Ca1(登录号ABR67863);Cry7Cb1(登录号KC156698);Cry7Da1(登录号ACQ99547);Cry7Da2(登录号HM572236);Cry7Da3(登录号KC156679);Cry7Ea1(登录号HM035086);Cry7Ea2(登录号HM132124);Cry7Ea3(登录号EEM19403);Cry7Fa1(登录号HM035088);Cry7Fa2(登录号EEM19090);Cry7Fb1(登录号HM572235);Cry7Fb2(登录号KC156682);Cry7Ga1(登录号HM572237);Cry7Ga2(登录号KC156669);Cry7Gb1(登录号KC156650);Cry7Gc1(登录号KC156654);Cry7Gd1(登录号KC156697);Cry7Ha1(登录号KC156651);Cry7Ia1(登录号KC156665);Cry7Ja1(登录号KC156671);Cry7Ka1(登录号KC156680);Cry7Kb1(登录号BAM99306);Cry7La1(登录号BAM99307);Cry8Aa1(登录号AAA21117);Cry8Ab1(登录号EU044830);Cry8Ac1(登录号KC156662);Cry8Ad1(登录号KC156684);Cry8Ba1(登录号AAA21118);Cry8Bb1(登录号CAD57542);Cry8Bc1(登录号CAD57543);Cry8Ca1(登录号AAA21119);Cry8Ca2(登录号AAR98783);Cry8Ca3(登录号EU625349);Cry8Ca4(登录号ADB54826);Cry8Da1(登录号BAC07226);Cry8Da2(登录号BD133574);Cry8Da3(登录号BD133575);Cry8Db1(登录号BAF93483);Cry8Ea1(登录号AAQ73470);Cry8Ea2(登录号EU047597);Cry8Ea3(登录号KC855216);Cry8Fa1(登录号AAT48690);Cry8Fa2(登录号HQ174208);Cry8Fa3(登录号AFH78109);Cry8Ga1(登录号AAT46073);Cry8Ga2(登录号ABC42043);Cry8Ga3(登录号FJ198072);Cry8Ha1(登录号AAW81032);Cry8Ia1(登录号EU381044);Cry8Ia2(登录号GU073381);Cry8Ia3(登录号HM044664);Cry8Ia4(登录号KC156674);Cry8Ib1(登录号GU325772);Cry8Ib2(登录号KC156677);Cry8Ja1(登录号EU625348);Cry8Ka1(登录号FJ422558);Cry8Ka2(登录号ACN87262);Cry8Kb1(登录号HM123758);Cry8Kb2(登录号KC156675);Cry8La1(登录号GU325771);Cry8Ma1(登录号HM044665);Cry8Ma2(登录号EEM86551);Cry8Ma3(登录号HM210574);Cry8Na1(登录号HM640939);Cry8Pa1(登录号HQ388415);Cry8Qa1(登录号HQ441166);Cry8Qa2(登录号KC152468);Cry8Ra1(登录号AFP87548);Cry8Sa1(登录号JQ740599);Cry8Ta1(登录号KC156673);Cry8样(登录号FJ770571);Cry8样(登录号ABS53003);Cry9Aa1(登录号CAA41122);Cry9Aa2(登录号CAA41425);Cry9Aa3(登录号GQ249293);Cry9Aa4(登录号GQ249294);Cry9Aa5(登录号JX174110);Cry9Aa样(登录号AAQ52376);Cry9Ba1(登录号CAA52927);Cry9Ba2(登录号GU299522);Cry9Bb1(登录号AAV28716);Cry9Ca1(登录号CAA85764);Cry9Ca2(登录号AAQ52375);Cry9Da1(登录号BAA19948);Cry9Da2(登录号AAB97923);Cry9Da3(登录号GQ249293);Cry9Da4(登录号GQ249297);Cry9Db1(登录号AAX78439);Cry9Dc1(登录号KC156683);Cry9Ea1(登录号BAA34908);Cry9Ea2(登录号AA012908);Cry9Ea3(登录号ABM21765);Cry9Ea4(登录号ACE88267);Cry9Ea5(登录号ACF04743);Cry9Ea6(登录号ACG63872);Cry9Ea7(登录号FJ380927);Cry9Ea8(登录号GQ249292);Cry9Ea9(登录号JN651495);Cry9Eb1(登录号CAC50780);Cry9Eb2(登录号GQ249298);Cry9Eb3(登录号KC156646);Cry9Ec1(登录号AAC63366);Cry9Ed1(登录号AAX78440);Cry9Ee1(登录号GQ249296);Cry9Ee2(登录号KC156664);Cry9Fa1(登录号

KC156692);Cry9Ga1(登录号KC156699);Cry9样(登录号AAC63366);Cry10Aa1(登录号AAA22614);Cry10Aa2(登录号E00614);Cry10Aa3(登录号CAD30098);Cry10Aa4(登录号AFB18318);Cry10A样(登录号DQ167578);Cry11Aa1(登录号AAA22352);Cry11Aa2(登录号AAA22611);Cry11Aa3(登录号CAD30081);Cry11Aa4(登录号AFB18319);Cry11Aa样(登录号DQ166531);Cry11Ba1(登录号CAA60504);Cry11Bb1(登录号AAC97162);Cry11Bb2(登录号HM068615);Cry12Aa1(登录号AAA22355);Cry13Aa1(登录号AAA22356);Cry14Aa1(登录号AAA21516);Cry14Ab1(登录号KC156652);Cry15Aa1(登录号AAA22333);Cry16Aa1(登录号CAA63860);Cry17Aa1(登录号CAA67841);Cry18Aa1(登录号CAA67506);Cry18Ba1(登录号AAF89667);Cry18Ca1(登录号AAF89668);Cry19Aa1(登录号CAA68875);Cry19Ba1(登录号BAA32397);Cry19Ca1(登录号AFM37572);Cry20Aa1(登录号AAB93476);Cry20Ba1(登录号ACS93601);Cry20Ba2(登录号KC156694);Cry20样(登录号GQ144333);Cry21Aa1(登录号I32932);Cry21Aa2(登录号I66477);Cry21Ba1(登录号BAC06484);Cry21Ca1(登录号JF521577);Cry21Ca2(登录号KC156687);Cry21Da1(登录号JF521578);Cry22Aa1(登录号I34547);Cry22Aa2(登录号CAD43579);Cry22Aa3(登录号ACD93211);Cry22Ab1(登录号AAK50456);Cry22Ab2(登录号CAD43577);Cry22Ba1(登录号CAD43578);Cry22Bb1(登录号KC156672);Cry23Aa1(登录号AAF76375);Cry24Aa1(登录号AAC61891);Cry24Ba1(登录号BAD32657);Cry24Ca1(登录号CAJ43600);Cry25Aa1(登录号AAC61892);Cry26Aa1(登录号AAD25075);Cry27Aa1(登录号BAA82796);Cry28Aa1(登录号AAD24189);Cry28Aa2(登录号AAG00235);Cry29Aa1(登录号CAC80985);Cry30Aa1(登录号CAC80986);Cry30Ba1(登录号BAD00052);Cry30Ca1(登录号BAD67157);Cry30Ca2(登录号ACU24781);Cry30Da1(登录号EF095955);Cry30Db1(登录号BAE80088);Cry30Ea1(登录号ACC95445);Cry30Ea2(登录号FJ499389);Cry30Fa1(登录号ACI22625);Cry30Ga1(登录号ACG60020);Cry30Ga2(登录号HQ638217);Cry31Aa1(登录号BAB11757);Cry31Aa2(登录号AAL87458);Cry31Aa3(登录号BAE79808);Cry31Aa4(登录号BAF32571);Cry31Aa5(登录号BAF32572);Cry31Aa6(登录号BAI44026);Cry31Ab1(登录号BAE79809);Cry31Ab2(登录号BAF32570);Cry31Ac1(登录号BAF34368);Cry31Ac2(登录号AB731600);Cry31Ad1(登录号BAI44022);Cry32Aa1(登录号AAG36711);Cry32Aa2(登录号GU063849);Cry32Ab1(登录号GU063850);Cry32Ba1(登录号BAB78601);Cry32Ca1(登录号BAB78602);Cry32Cb1(登录号KC156708);Cry32Da1(登录号BAB78603);Cry32Ea1(登录号GU324274);Cry32Ea2(登录号KC156686);Cry32Eb1(登录号KC156663);Cry32Fa1(登录号KC156656);Cry32Ga1(登录号KC156657);Cry32Ha1(登录号KC156661);Cry32Hb1(登录号KC156666);Cry32Ia1(登录号KC156667);Cry32Ja1(登录号KC156685);Cry32Ka1(登录号KC156688);Cry32La1(登录号KC156689);Cry32Ma1(登录号KC156690);Cry32Mb1(登录号KC156704);Cry32Na1(登录号KC156691);Cry32Oa1(登录号KC156703);Cry32Pa1(登录号KC156705);Cry32Qa1(登录号KC156706);Cry32Ra1(登录号KC156707);Cry32Sa1(登录号KC156709);Cry32Ta1(登录号KC156710);Cry32Ua1(登录号KC156655);Cry33Aa1(登录号AAL26871);Cry34Aa1(登录号AAG50341);Cry34Aa2(登录号AAK64560);Cry34Aa3(登录号AAT29032);Cry34Aa4(登录号AAT29030);Cry34Ab1(登录号AAG41671);Cry34Ac1(登录号AAG50118);Cry34Ac2(登录号AAK64562);Cry34Ac3(登录号AAT29029);Cry34Ba1(登录号AAK64565);Cry34Ba2(登录号AAT29033);Cry34Ba3(登录号

AAT29031);Cry35Aa1(登录号AAG50342);Cry35Aa2(登录号AAK64561);Cry35Aa3(登录号AAT29028);Cry35Aa4(登录号AAT29025);Cry35Ab1(登录号AAG41672);Cry35Ab2(登录号AAK64563);Cry35Ab3(登录号AY536891);Cry35Ac1(登录号AAG50117);Cry35Ba1(登录号AAK64566);Cry35Ba2(登录号AAT29027);Cry35Ba3(登录号AAT29026);Cry36Aa1(登录号AAK64558);Cry37Aa1(登录号AAF76376);Cry38Aa1(登录号AAK64559);Cry39Aa1(登录号BAB72016);Cry40Aa1(登录号BAB72018);Cry40Ba1(登录号BAC77648);Cry40Ca1(登录号EU381045);Cry40Da1(登录号ACF15199);Cry41Aa1(登录号BAD35157);Cry41Ab1(登录号BAD35163);Cry41Ba1(登录号HM461871);Cry41Ba2(登录号ZP_04099652);Cry42Aa1(登录号BAD35166);Cry43Aa1(登录号BAD15301);Cry43Aa2(登录号BAD95474);Cry43Ba1(登录号BAD15303);Cry43Ca1(登录号KC156676);Cry43Cb1(登录号KC156695);Cry43Cc1(登录号KC156696);Cry43样(登录号BAD15305);Cry44Aa(登录号BAD08532);Cry45Aa(登录号BAD22577);Cry46Aa(登录号BAC79010);Cry46Aa2(登录号BAG68906);Cry46Ab(登录号BAD35170);Cry47Aa(登录号AAY24695);Cry48Aa(登录号CAJ18351);Cry48Aa2(登录号CAJ86545);Cry48Aa3(登录号CAJ86546);Cry48Ab(登录号CAJ86548);Cry48Ab2(登录号CAJ86549);Cry49Aa(登录号CAH56541);Cry49Aa2(登录号CAJ86541);Cry49Aa3(登录号CAJ86543);Cry49Aa4(登录号CAJ86544);Cry49Ab1(登录号CAJ86542);Cry50Aa1(登录号BAE86999);Cry50Ba1(登录号GU446675);Cry50Ba2(登录号GU446676);Cry51Aa1(登录号ABI14444);Cry51Aa2(登录号GU570697);Cry52Aa1(登录号EF613489);Cry52Ba1(登录号FJ361760);Cry53Aa1(登录号EF633476);Cry53Ab1(登录号FJ361759);Cry54Aa1(登录号ACA52194);Cry54Aa2(登录号GQ140349);Cry54Ba1(登录号GU446677);Cry55Aa1(登录号ABW88932);Cry54Ab1(登录号JQ916908);Cry55Aa2(登录号AAE33526);Cry56Aa1(登录号ACU57499);Cry56Aa2(登录号GQ483512);Cry56Aa3(登录号JX025567);Cry57Aa1(登录号ANC87261);Cry58Aa1(登录号ANC87260);Cry59Ba1(登录号JN790647);Cry59Aa1(登录号ACR43758);Cry60Aa1(登录号ACU24782);Cry60Aa2(登录号EA057254);Cry60Aa3(登录号EEM99278);Cry60Ba1(登录号GU810818);Cry60Ba2(登录号EA057253);Cry60Ba3(登录号EEM99279);Cry61Aa1(登录号HM035087);Cry61Aa2(登录号HM132125);Cry61Aa3(登录号EEM19308);Cry62Aa1(登录号HM054509);Cry63Aa1(登录号BAI44028);Cry64Aa1(登录号BAJ05397);Cry65Aa1(登录号HM461868);Cry65Aa2(登录号ZP_04123838);Cry66Aa1(登录号HM485581);Cry66Aa2(登录号ZP_04099945);Cry67Aa1(登录号HM485582);Cry67Aa2(登录号ZP_04148882);Cry68Aa1(登录号HQ113114);Cry69Aa1(登录号HQ401006);Cry69Aa2(登录号JQ821388);Cry69Ab1(登录号JN209957);Cry70Aa1(登录号JN646781);Cry70Ba1(登录号AD051070);Cry70Bb1(登录号EEL67276);Cry71Aa1(登录号JX025568);Cry72Aa1(登录号JX025569)。

[0149] δ -内毒素的实例还包括但不限于:美国专利号5,880,275和7,858,849的Cry1A蛋白;美国专利号8,304,604和8.304,605的DIG-3或DIG-11毒素(cry蛋白(如Cry1A)的 α 螺旋1和/或 α 螺旋2变体的N末端缺失),美国专利申请序列号10/525,318的Cry1B;美国专利号6,033,874的Cry1C;美国专利号5,188,960、6,218,188的Cry1F;美国专利号7,070,982、6,962,705和6,713,063的Cry1A/F嵌合体);美国专利号7,064,249的Cry2蛋白如Cry2Ab蛋白;Cry3A蛋白,包括但不限于通过融合至少两种不同Cry蛋白的可变区和保守区的独特组合产

生的工程化杂合杀昆虫蛋白 (eHIP) (美国专利申请公开号2010/0017914);Cry4蛋白;Cry5蛋白;Cry6蛋白;美国专利号7,329,736、7,449,552、7,803,943、7,476,781、7,105,332、7,378,499和7,462,760的Cry8蛋白;Cry9蛋白,如Cry9A、Cry9B、Cry9C、Cry9D、Cry9E、和Cry9F家族的成员;Cry15蛋白,描述于以下文献中:Naimov等人(2008) *Applied and Environmental Microbiology* [应用与环境微生物学]74:7145-7151;美国专利号6,127,180、6,624,145和6,340,593的Cry22、Cry34Ab1蛋白;美国专利号6,248,535、6,326,351、6,399,330、6,949,626、7,385,107和7,504,229的CryET33和CryET34蛋白;美国专利公开号2006/0191034、2012/0278954,和PCT公开号W0 2012/139004的CryET33和CryET34同源物;美国专利号6,083,499、6,548,291和6,340,593的Cry35Ab1蛋白;Cry46蛋白、Cry 51蛋白、Cry二元毒素;TIC901或相关毒素;US 2008/0295207的TIC807;PCT US 2006/033867的ET29、ET37、TIC809、TIC810、TIC812、TIC127、TIC128;美国专利公开号2016/0108428的TIC1100、TIC 860、TIC867、TIC868、TIC869和TIC836。美国专利号8,236,757的AXMI-027、AXMI-036和AXMI-038;US 7,923,602的AXMI-031、AXMI-039、AXMI-040、AXMI-049;WO 2006/083891的AXMI-018、AXMI-020和AXMI-021;WO 2005/038032的AXMI-010;WO 2005/021585的AXMI-003;US 2004/0250311的AXMI-008;US 2004/0216186的AXMI-006;US 2004/0210965的AXMI-007;US 2004/0210964的AXMI-009;US 2004/0197917的AXMI-014;US 2004/0197916的AXMI-004;WO 2006/119457的AXMI-028和AXMI-029;WO 2004/074462的AXMI-007、AXMI-008、AXMI-0080rf2、AXMI-009、AXMI-014和AXMI-004;美国专利号8,084,416的AXMI-150;US 20110023184的AXMI-205;US 2011/0263488的AXMI-011、AXMI-012、AXMI-013、AXMI-015、AXMI-019、AXMI-044、AXMI-037、AXMI-043、AXMI-033、AXMI-034、AXMI-022、AXMI-023、AXMI-041、AXMI-063、和AXMI-064;US 2010/0197592的AXMI-R1和相关蛋白;WO 2011/103248的AXMI221z、AXMI222z、AXMI223z、AXMI224z和AXMI225z;WO11/103247的AXMI218、AXMI219、AXMI220、AXMI226、AXMI227、AXMI228、AXMI229、AXMI230、和AXMI231;美国专利号8,334,431的AXMI-115、AXMI-113、AXMI-005、AXMI-163和AXMI-184;US 2010/0298211的AXMI-001、AXMI-002、AXMI-030、AXMI-035、和AXMI-045;US 20090144852的AXMI-066和AXMI-076;美国专利号8,318,900的AXMI128、AXMI130、AXMI131、AXMI133、AXMI140、AXMI141、AXMI142、AXMI143、AXMI144、AXMI146、AXMI148、AXMI149、AXMI152、AXMI153、AXMI154、AXMI155、AXMI156、AXMI157、AXMI158、AXMI162、AXMI165、AXMI166、AXMI167、AXMI168、AXMI169、AXMI170、AXMI171、AXMI172、AXMI173、AXMI174、AXMI175、AXMI176、AXMI177、AXMI178、AXMI179、AXMI180、AXMI181、AXMI182、AXMI185、AXMI186、AXMI187、AXMI188、AXMI189;US 2010/0005543的AXMI079、AXMI080、AXMI081、AXMI082、AXMI091、AXMI092、AXMI096、AXMI097、AXMI098、AXMI099、AXMI100、AXMI101、AXMI102、AXMI103、AXMI104、AXMI107、AXMI108、AXMI109、AXMI110、AXMI111、AXMI112、AXMI114、AXMI116、AXMI117、AXMI118、AXMI119、AXMI120、AXMI121、AXMI122、AXMI123、AXMI124、AXMI1257、AXMI1268、AXMI127、AXMI129、AXMI164、AXMI151、AXMI161、AXMI183、AXMI132、AXMI138、AXMI137;和美国专利号8,319,019的具有修饰的蛋白水解位点的Cry蛋白如Cry1A和Cry3A;美国专利申请公开号2011/0064710的来自苏云金芽孢杆菌菌株VBTS 2528的Cry1Ac、Cry2Aa和Cry1Ca毒素蛋白,和PCT公开号W0 2016/061197的IP1B。其他Cry蛋白是本领域技术人员熟知的(参见Crickmore等人,“*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature [苏

云金芽孢杆菌毒素命名法]”(2011),网址为lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/,可以使用“www”前缀在万维网上访问)。Cry蛋白的杀昆虫活性是本领域技术人员所熟知的(回顾参见van Franckenhuyzen, (2009) J. Invert. Path. [无脊椎动物病理学杂志]101:1-16)。使用Cry蛋白作为转基因植物性状是本领域技术人员所熟知的,并且Cry转基因植物(包括但不限于Cry1Ac、Cry1Ac+Cry2Ab、Cry1Ab、Cry1A.105、Cry1F、Cry1Fa2、Cry1F+Cry1Ac、Cry2Ab、Cry3A、mCry3A、Cry3Bb1、Cry34Ab1、Cry35Ab1、Vip3A、mCry3A、Cry9c和CBI-Bt)已获得监管部门的批准(参见, Sanahuja, (2011) Plant Biotech Journal [植物生物技术杂志]9:283-300和CERA (2010) 转基因作物数据库环境风险评估中心(CERA) (GM Crop Database Center for Environmental Risk Assessment), ILSI研究基金会, 华盛顿特区, 网址为cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database, 可以使用“www”前缀在万维网上访问)。本领域技术人员熟知的多种杀有害生物蛋白也可以在植物中表达:如Vip3Ab&Cry1Fa (US 2012/0317682)、Cry1BE&Cry1F (US 2012/0311746)、Cry1CA&Cry1AB (US 2012/0311745)、Cry1F&CryCa (US 2012/0317681)、Cry1DA&Cry1BE (US 2012/0331590)、Crv1DA&Crv1Fa (US 2012/0331589)、Cry1AB&Cry1BE (US 2012/0324606)以及Cry1Fa&Cry2Aa、Cry1I或Cry1E (US 2012/0324605);Cry34Ab/35Ab以及Cry6Aa (US 20130167269);Cry34Ab/VCry35Ab和Cry3Aa (US 20130167268);Cry3A和Cry1Ab或Vip3Aa (US 20130116170);以及Cry1F、Cry34Ab1和Cry35Ab1 (PCT/US 2010/060818)。杀有害生物蛋白还包括杀昆虫脂肪酶,这些杀昆虫脂肪酶包括美国专利号7,491,869的脂质酰基水解酶,和胆固醇氧化酶,如来自链霉菌属(Purcell等人, (1993) Biochem Biophys Res Commun [生物化学与生物物理学研究通讯]15:1406-1413)。杀有害生物蛋白还包括美国专利号5,877,012、6,107,279、6,137,033、7,244,820、7,615,686和8,237,020中的VIP(营养性杀昆虫蛋白)毒素等。其他VIP蛋白质是本领域技术人员熟知的(参见, lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/vip.html, 其可以使用“www”前缀在万维网上访问)。杀有害生物蛋白还包括可从如下生物体获得的毒素复合物(TC)蛋白质:致病杆菌、发光杆菌和类芽孢杆菌(参见美国专利号7,491,698和8,084,418)。一些TC蛋白具有“独立”杀昆虫活性并且其他TC蛋白增强由相同给定生物体产生的独立毒素(stand-alone toxin)的活性。可以通过源自不同属的来源生物体的一种或多种TC蛋白“增效剂”来增强“独立”TC蛋白(例如来自发光杆菌属、致病杆菌属或类芽孢杆菌属)的毒性。有三种主要类型的TC蛋白。如本文所提及的,A类蛋白(“蛋白A”)是独立毒素。B类蛋白(“蛋白B”)和C类蛋白(“蛋白C”)增强了A类蛋白的毒性。A类蛋白的实例是TcbA、TcdA、XptA1和XptA2。B类蛋白的实例是TcaC、TcdB、XptB1Xb和XptC1Wi。C类蛋白的实例是TccC、XptC1Xb和XptB1Wi。杀有害生物蛋白还包括蜘蛛、蛇和蝎毒蛋白。蜘蛛毒肽的实例包括但不限于莱科毒素-1肽及其突变体(美国专利号8,334,366)。

[0150] (C) 编码昆虫特异性激素或信息素(如蜕化类固醇和保幼激素)的多核苷酸,其变体,基于其的模拟物,或者其拮抗剂或激动剂。参见,例如Hammock等人, (1990) Nature [自然]344:458,该文献公开了经克隆的保幼激素酯酶的杆状病毒表达是保幼激素的灭活剂。

[0151] (D) 编码昆虫特异性肽的多核苷酸,其在表达时破坏受影响有害生物的生理机能。例如,参见以下公开内容:Regan, (1994) J. Biol. Chem. [生物化学杂志]269:9 (expression cloning yields DNA coding for insect diuretic hormone receptor [表达克隆产生编

码昆虫利尿激素受体的DNA)];Pratt,等人,(1989)Biochem.Biophys.Res.Comm.[生物化学与生物物理学研究通讯]163:1243(an allostatin is identified in *Diploptera punctata*[在紫斑折翅类中鉴定一种同分异构他汀]);Chattopadhyay,等人,(2004)Critical Reviews in Microbiology[微生物学重要评论]30(1):33-54;Zjawiony,(2004)J Nat Prod[天然产物杂志]67(2):300-310;Carlini和Grossi-de-Sa,(2002)Toxicon[毒素]40(11):1515-1539;Ussuf,等人,(2001)Curr Sci.[当代科学]80(7):847-853以及Vasconcelos和Oliveira,(2004)Toxicon[毒素]44(4):385-403。还参见,美国专利号5,266,317,作者Tomalski等人,他们披露了编码昆虫特异性毒素的基因。

[0152] (E) 编码如下酶的多核苷酸,该多核苷酸负责单萜、倍半萜烯、类固醇、异羟肟酸、苯丙素衍生物或具有杀昆虫活性的其他非蛋白质分子的超累积。

[0153] (F) 编码参与生物活性分子的修饰(包括翻译后修饰)的酶的多核苷酸;例如糖醇解酶、蛋白水解酶、脂肪分解酶、核酸酶、环化酶、转氨酶、酯酶、水解酶、磷酸酶、激酶、磷酸化酶、聚合酶、弹性蛋白酶、几丁质酶和葡聚糖酶,无论是天然还是合成的。参见,Scott等人的PCT申请W0 1993/02197,该文献公开了愈创葡聚糖酶(callase)基因的核苷酸序列。含有几丁质酶编码序列的DNA分子可以例如从ATCC登录号39637和67152下获得。还参见,Kramer等人,(1993)Insect Biochem.Molec.Biol.[昆虫生物化学与分子生物学],23:691,其教导了编码烟草钩虫几丁质酶的cDNA的核苷酸序列,和Kawalleck等人,(1993)Plant Molec.Biol.[植物分子生物学]21:673,其提供了欧芹ubi4-2多泛素基因的核苷酸序列,和美国专利号6,563,020、7,145,060和7,087,810。

[0154] (G) 编码刺激信号转导的分子的多核苷酸。例如,参见Botella等人,(1994)Plant Molec.Biol.[分子细胞生物学]24:757,该文献公开了绿豆钙调素cDNA克隆的核苷酸序列,以及Griess等人,(1994)Plant Physiol.[植物生理学]104:1467,他们提供了玉米钙调素cDNA克隆的核苷酸序列。

[0155] (H) 编码疏水力矩肽(hydrophobic moment peptide)的多核苷酸。参见,PCT申请W0 1995/16776和美国专利号5,580,852(公开了抑制真菌植物病原体的螯素(Tachyplesin)的肽衍生物)以及PCT申请W0 1995/18855和美国专利号5,607,914(教导了赋予抗病性的合成抗微生物肽)。

[0156] (I) 编码膜通透酶、通道形成剂(channel former)或通道阻断剂的多核苷酸。例如,参见Jaynes等人,(1993)Plant Sci.[植物科学]89:43,该文献公开了天蚕素-β裂解肽类似物的异源表达,以提供对烟草假单胞菌具有抗性的转基因烟草植物。

[0157] (J) 编码病毒侵入性蛋白质或由其衍生的复合毒素的基因。例如,病毒外壳蛋白在转化的植物细胞中的积累赋予针对由外源蛋白基因来源的病毒以及由相关病毒导致的病毒侵染和/或疾病发展的抗性。参见,Beachy等人,(1990)Ann.Rev.Phytopathol.[植物病理学年评]28:451。外壳蛋白介导的抗性已赋予至转化植物抵抗:苜蓿花叶病毒、黄瓜花叶病毒、烟草线条病毒、马铃薯X病毒、马铃薯Y病毒、烟草蚀纹病毒、烟草脆裂病毒和烟草花叶病毒。同上。

[0158] (K) 编码昆虫特异性抗体或由其衍生的免疫毒素的基因。因此,靶向昆虫肠道中关键代谢功能的抗体将使受影响的酶失活,杀灭昆虫。参看Taylor等人,摘要#497,SEVENTH INT'L SYMPOSIUM ON MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS[关于分子植物-微生物相

相互作用的第七届国际研讨会] (苏格兰爱丁堡, 1994) (通过生产单链抗体片段进行转基因烟草中的酶失活)。

[0159] (L) 编码病毒特异性抗体的基因。参见, 例如Tavladoraki等人, (1993) Nature [自然] 366:469, 其提出表达重组抗体基因的转基因植物不受病毒侵袭。

[0160] (M) 编码由病原体或寄生虫在自然中产生的发育阻滞蛋白的多核苷酸。因此, 真菌内 α -1,4-D-多聚半乳糖醛酸酶通过溶解植物细胞壁均 α -1,4-D-半乳糖醛酸酶来促进真菌定植和植物营养释放。参见Lamb等人, (1992) Bio/Technology [生物技术] 10:1436。以下文献描述了编码豆内聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白的基因的克隆和表征:Toubart等人, (1992) Plant J. [植物杂志] 2:367。

[0161] (N) 编码由植物在自然中产生的发育抑制蛋白的多核苷酸。例如, 已在以下文献中表明表达大麦核糖体失活基因的转基因植物具有增加的对真菌疾病的抗性:Logemann等人, (1992) Bio/Technology [生物技术] 10:305。

[0162] (O) 参与系统获得抗性 (SAR) 应答的基因和/或发病相关基因。Briggs, (1995) Current Biology [当代生物学] 5 (2), Pieterse和Van Loon, (2004) Curr. Opin. Plant Bio. [植物生物学新观点] 7 (4):456-64, 以及Somssich, (2003) Cell [细胞] 113 (7):815-6。

[0163] (P) 抗真菌基因 (Cornelissen和Melchers, (1993) Pl. Physiol. [植物生理学] 101:709-712, 和Parijs等人, (1991) Planta [植物] 183:258-264, 以及Bushnell等人, (1998) Can. J. of Plant Path. [加拿大植物病理学杂志] 20 (2):137-149)。还参见, 美国专利申请序列号09/950,933;11/619,645;11/657,710;11/748,994;11/774,121以及美国专利号6,891,085和7,306,946。用于感知几丁质片段的LysM受体样激酶作为对真菌病原体的植物防御应答中的第一步 (US 2012/0110696)。

[0164] (Q) 解毒基因, 如伏马菌素、白僵菌素、念珠菌素和玉米赤霉烯酮及其结构相关的衍生物的基因。例如, 参见美国专利号5,716,820;5,792,931;5,798,255;5,846,812;6,083,736;6,538,177;6,388,171和6,812,380。

[0165] (R) 编码脲抑素和半胱氨酸蛋白酶抑制剂的多核苷酸。参见美国专利号7,205,453。

[0166] (S) 防御素基因。参见WO 2003/000863和美国专利号6,911,577;6,855,865;6,777,592和7,238,781中找到。

[0167] (T) 赋予对线虫抗性的基因。参见, 例如PCT申请WO 1996/30517;PCT申请WO 1993/19181、WO 2003/033651, 以及Urwin等人, (1998) Planta [植物] 204:472-479, Williamson, (1999) Curr Opin Plant Bio. [植物生物学新观点] 2 (4):327-31;美国专利号6,284,948和7,301,069, 和miR164基因 (WO 2012/058266)。

[0168] (U) 赋予对疫霉根腐病抗性的基因, 如Rps 1、Rps 1-a、Rps 1-b、Rps 1-c、Rps 1-d、Rps 1-e、Rps 1-k、Rps 2、Rps 3-a、Rps3-b、Rps 3-c、Rps 4、Rps 5、Rps 6、Rps 7和其他Rps基因。参见, 例如Shoemaker等人, Phytophthora Root Rot Resistance Gene Mapping in Soybean [大豆中疫霉根腐病抗性基因图谱], 植物基因组第四次会议, 加利福尼亚州圣迭戈 (San Diego, Calif.) (1995)。

[0169] (V) 赋予对褐茎腐病抗性的基因, 如美国专利号5,689,035所述, 并为此通过引入并入本文。

[0170] (W) 赋予对炭疽菌抗性的基因,如美国专利申请公开US 2009/0035765中所述,并为此通过引用并入本文。这包括可以用作单一基因座转化的Rcg基因座。

[0171] (X) 一些实施例涉及通过干扰核糖核酸(RNA)分子来下调昆虫有害生物物种中靶基因的表达。PCT公开WO 2007/074405描述了抑制无脊椎动物有害生物(包括科罗拉多马铃薯甲虫)中靶基因表达的方法。PCT公开WO2005/110068描述了抑制无脊椎动物有害生物(特别是包括西方玉米根虫)中靶基因表达的方法,该方法作为防治昆虫侵染的手段。此外,PCT公开WO2009/091864描述了用于抑制来自昆虫有害生物物种(包括来自草盲蝽属的有害生物)的靶基因的组合和方法。

[0172] 核酸分子包括用于靶向液泡ATP酶H亚基的沉默元件,该沉默元件可用于防治如美国专利申请公开号2012/0198586中所述的鞘翅目有害生物群体和侵袭。PCT公开WO 2012/055982描述了抑制或下调如下靶基因的表达的核糖核酸(RNA或双链RNA),所述靶基因编码:昆虫核糖体蛋白,例如核糖体蛋白L19、核糖体蛋白L40或核糖体蛋白S27A;昆虫蛋白酶体亚基,如Rpn6蛋白、Pros 25、Rpn2蛋白、蛋白酶体 β 1亚基蛋白或Pros β 2蛋白;COPI囊泡的昆虫 β -外被体,COPI囊泡的 γ -外被体,COPI囊泡的 β' -外被体蛋白或 ζ -外被体;昆虫四跨膜蛋白(Tetraspanin)2A蛋白(推定的跨膜结构域蛋白);属于肌动蛋白家族的昆虫蛋白,例如肌动蛋白5C;昆虫泛素-5E蛋白;昆虫Sec23蛋白,其是参与细胞内蛋白质转运的GTP酶活化剂;涉及运动活性的作为非常规肌球蛋白的昆虫皱蛋白(crinkled protein);涉及核替代性mRNA剪接的调节的昆虫曲颈蛋白(crooked neck protein);昆虫囊泡H⁺-ATP酶G亚基蛋白和昆虫Tbp-1如Tat结合蛋白。PCT公开WO 2007/035650描述了抑制或下调编码Snf7的靶基因表达的核糖核酸(RNA或双链RNA)。美国专利申请公开2011/0054007描述了靶向RPS10的多核苷酸沉默元件。美国专利申请公开2014/0275208和US 2015/0257389描述了靶向RyanR和PAT3的多核苷酸沉默元件。PCT公开WO 2016/060911、WO 2016/060912、WO 2016/060913、和WO 2016/060914描述了靶向赋予对鞘翅目和半翅目有害生物的抗性的COPI外被体亚单位核酸分子的多核苷酸沉默元件。美国专利申请公开2012/029750、US 20120297501和2012/0322660描述了干扰核糖核酸(RNA或双链RNA),所述干扰核糖核酸在被昆虫有害生物物种摄取时起作用以下调所述昆虫有害生物中靶基因的表达,其中所述RNA包含至少一个沉默元件,其中所述沉默元件是包含经退火的互补链的双链RNA区域,所述双链RNA区域的一条链包含或由如下核苷酸序列组成,所述核苷酸序列至少部分地与靶基因中的靶标核苷酸序列互补。美国专利申请公开2012/0164205描述了用于干扰双链核糖核酸(用于抑制无脊椎动物有害生物)的潜在靶标,包括:Chd3同源序列、 β -微管蛋白同源序列、40kDa V-ATP酶同源序列、EF1 α 同源序列、26S蛋白质体亚基p28同源序列、保幼激素环氧化物酶水解酶同源序列、溶胀依赖氯通道蛋白同源序列、葡萄糖-6-磷酸1-脱氢酶蛋白同源序列、Act42A蛋白同源序列、ADP-核糖因子1同源序列、转录因子IIB蛋白同源序列、几丁质酶同源序列、泛素缀合酶同源序列、甘油醛-3-磷酸脱氢酶同源序列、泛素B同源序列、保幼激素酯酶同源物、和 α 微管蛋白同源序列。

[0173] ii. 赋予除草剂抗性的转基因。

[0174] (A) 编码对如下除草剂的抗性的多核苷酸,该除草剂抑制生长点或分生组织,如咪唑啉酮或磺酰脲。这个类别的示例性基因编码突变体ALS和AHAS酶,例如分别如以下文献中所述:Lee等人,(1988)EMBO J. [欧洲分子生物学学会杂志]7:1241和Miki等人,(1990)

Theor. Appl. Genet. [理论与应用遗传学]80:449。还参见美国专利号5,605,011;5,013,659;5,141,870;5,767,361;5,731,180;5,304,732;4,761,373;5,331,107;5,928,937和5,378,824;美国专利申请序号11/683,737和国际公开WO 1996/33270。

[0175] (B) 编码对草甘膦(分别由突变体5-烯醇丙酮酰-3-磷酸合酶(EPSP)和aroA基因赋予的抗性)和其他膦酰基化合物如草铵膦(草丁膦乙酰转移酶(PAT)和吸水链霉菌草丁膦乙酰转移酶(bar)基因)和吡啶氧基或苯氧基丙酸和环己酮(ACC酶抑制剂编码基因)有抗性的蛋白质的多核苷酸。参见,例如Shah等人的美国专利号4,940,835,其披露了EPSPS形式的能赋予草甘膦抗性的核苷酸序列。Barry等人的美国专利号5,627,061也描述了编码EPSPS酶的基因。还参见美国专利号6,566,587;6,338,961;6,248,876 B1;6,040,497;5,804,425;5,633,435;5,145,783;4,971,908;5,312,910;5,188,642;5,094,945;4,940,835;5,866,775;6,225,114 B1;6,130,366;5,310,667;4,535,060;4,769,061;5,633,448;5,510,471;Re. 36,449;RE 37,287E和5,491,288以及国际公开EP 1173580;WO 2001/66704;EP 1173581和EP 1173582中。

[0176] 还给予植物草甘膦抗性,使该植物表达编码草甘膦氧化还原酶的基因,这在美国专利号5,776,760和5,463,175中进行了更全面地描述。另外,可通过过量表达编码草甘膦N-乙酰转移酶的基因,来赋予植物草甘膦抗性。参见,例如美国专利号7,462,481;7,405,074以及美国专利申请公开号2008/0234130。编码突变aroA基因的DNA分子可以在ATCC登录号39256下获得,并且该突变基因的核苷酸序列披露于授予Comai的美国专利号4,769,061中。欧洲申请号0 333033(Kumada等人)和美国专利号4,975,374(Goodman等人)披露了赋予除草剂(如L-草丁膦)抗性的谷氨酰胺合成酶基因的核苷酸序列。Leemans等人的EP申请号0242246和0242236中提供了草丁膦乙酰基转移酶基因的核苷酸序列;De Greef等人,(1989)Bio/Technology[生物/技术]7:61,描述了表达编码草丁膦乙酰转移酶活性的嵌合bar基因的转基因植物的产生。还参见美国专利号5,969,213;5,489,520;5,550,318;5,874,265;5,919,675;5,561,236;5,648,477;5,646,024;6,177,616B1和5,879,903。赋予苯氧基丙酸和环己酮(例如稀禾啶和吡氟氯禾灵)抗性的示例性基因是Acc1-S1、Acc1-S2和Acc1-S3基因,其描述于以下文献中:Marshall等人,(1992)Theor. Appl. Genet. [理论与应用遗传学]83:435。

[0177] (C) 编码对抑制光合作用的除草剂具有抗性的蛋白质的多核苷酸,例如三嗪(psbA和gs+基因)和苄腈(腈水解酶基因)。Przibilla等人(1991)Plant Cell[植物细胞]3:169,描述了用编码突变体psbA基因的质粒对衣藻进行转化。针对腈水解酶基因的核苷酸序列披露在Stalker的美国专利号4,810,648中,并且含有这些基因的DNA分子可以在ATCC登录号53435,67441和53435,67442下获得。编码谷胱甘肽S-转移酶的DNA的克隆和表达描述于以下文献中:Hayes等人,(1992)Biochem. J. [生物化学杂志]285:173。

[0178] (D) 编码已经被引入到各种植物中对乙酰羟酸合酶具有抗性的蛋白的多核苷酸,已经发现该蛋白使表达该酶的植物对多种类型的除草剂具有抗性(参见,例如,Hattori等人,(1995)Mol Gen Genet. 246:419[分子和普通遗传学])。赋予除草剂抗性的其他基因包括:编码大鼠细胞色素P4507A1和酵母NADPH-细胞色素P450氧化还原酶的嵌合蛋白的基因(Shiota等人,(1994)Plant Physiol[植物生理学]106:17),针对谷胱甘肽还原酶和超氧化物歧化酶的基因(Aono等人,(1995)Plant Cell Physiol[植物细胞生理学]36:1687)和各

种磷酸转移酶的基因 (Datta等人, (1992) Plant Mol Biol [植物分子生理学] 20:619)。

[0179] (E) 编码对靶向原卟啉原氧化酶 (protox) 的除草剂的抗性的多核苷酸, 该原卟啉原氧化酶是生产叶绿素所必需的。原卟啉原氧化酶 (protox) 作为针对各种除草剂化合物的靶标。这些除草剂还抑制存在的所有不同种类的植物的生长, 导致其整体毁灭。含有对这些除草剂具有抗性的经改变的原卟啉原氧化酶 (protox) 活性的植物的发育描述于以下文献中: 美国专利号 6,288,306 B1; 6,282,837 B1 和 5,767,373, 以及国际公开 W0 2001/12825。

[0180] (F) aad-1 基因 (最初来自鞘脂单胞菌 (*Sphingobium herbicidovorans*)) 编码芳氧基链烷酸酯双加氧酶 (AAD-1) 蛋白。该性状赋予对 2,4-二氯苯氧基乙酸和芳氧基苯氧基丙酸酯 (通常称为 “fop” 除草剂, 例如 啶磺禾灵) 除草剂的耐受性。用于植物中除草剂耐受性的 aad-1 基因本身首先在 W0 2005/107437 中公开 (还参见 US 2009/0093366)。来自食酸丛毛单胞菌的 aad-12 基因, 其编码芳氧基链烷酸酯双加氧酶 (AAD-12) 蛋白, 该蛋白通过用芳氧基链烷酸酯部分 (包括苯氧基生长素 (例如 2,4-D, MCPA) 以及吡啶氧基生长素 (例如 氯氟吡氧乙酸, 三氯吡氧乙酸)) 使几种除草剂失活来赋予对 2,4-二氯苯氧基乙酸和吡啶氧基乙酸酯除草剂的耐受性。

[0181] (G) 编码美国专利申请公开 2003/0135879 中披露的用于赋予麦草畏耐受性的除草剂抗性麦草畏单加氧酶的多核苷酸。

[0182] (H) 美国专利号 4,810,648 中所披露的用于给予溴苯腈耐受性的编码溴苯腈水分解酶 (Bxn) 的多核苷酸分子。

[0183] (I) 用于达草灭耐受性的编码八氢番茄红素 (crtl) 的多核苷酸分子描述于以下文献中: Misawa 等人, (1993) Plant J. [植物杂志] 4:833-840 和 Misawa 等人, (1994) Plant J. [植物杂志] 6:481-489。

[0184] iii. 赋予或贡献于改变的谷物特征的转基因

[0185] (A) 经改变的脂肪酸, 例如通过 (1) 硬脂酰-ACP 的下调以增加植物的硬脂酸含量。参见 Knultzon 等人, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国科学院院刊] 89:2624 和 W0 1999/64579 (Genes to Alter Lipid Profiles in Corn [改变玉米脂质谱的基因]); (2) 通过 FAD-2 基因修饰提高油酸和/或通过 FAD-3 基因修饰降低亚麻酸 (参见美国专利号 6,063,947; 6,323,392; 6,372,965 以及 W0 1993/11245); (3) 改变共轭亚麻酸或亚油酸含量, 例如在 W0 2001/12800 中; (4) 改变 LEC1、AGP、Dek1、Superall、mil ps、各种 Ipa 基因 (如 Ipa1、Ipa3、hpt 或 hgg)。例如, 参见 W0 2002/42424, W0 1998/22604, W0 2003/011015, W0 2002/057439, W0 2003/011015, 美国专利号 6,423,886、6,197,561、6,825,397, 和美国专利申请公开号 US 2003/0079247、US 2003/0204870, 以及 Rivera-Madrid 等人, (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. [国家科学院院刊] 92:5620-5624; (5) 编码用于制备长链多不饱和脂肪酸的 δ -8 去饱和酶的基因 (美国专利号 8,058,571 和 8,338,152), 用于降低饱和脂肪的 δ -9 去饱和酶 (美国专利号 8,063,269), 用于改善 ω -3 脂肪酸谱的报春花 δ 6-去饱和酶; (6) 与脂质和糖代谢调节相关的分离的核酸和蛋白质, 特别是用于生产转基因植物和调节种子储存化合物 (包括脂质、脂肪酸、淀粉或种子储存蛋白) 的水平的方法中以及用于调节植物种子大小、种子数、种子重量、根长和叶子大小的方法中的脂质代谢蛋白 (LMP) (EP 2404499); (7) 改变植物中糖诱导型 2 (HSI2) 蛋白的高水平表达以增加或减少植物中 HSI2 的表达。增加 HSI2 的表达增加油含量, 然而降低 HSI2 的表达降低脱落酸敏感性和/或增加抗旱性 (美国专

利申请公开号2012/0066794); (8) 细胞色素b5 (Cb5) 单独或与FAD2一起表达调节植物种子中的油含量,特别是增加 ω -3脂肪酸的水平,并改进 ω -6与 ω -3脂肪酸的比例(美国专利申请公开号2011/0191904);以及(9) 编码用于调节糖代谢的皱纹1样多肽的核酸分子(美国专利号8,217,223)。

[0186] (B) 经改变的磷含量,例如,通过(1) 引入植酸酶编码基因将增强植酸盐的分解,向经转化的植物中添加更多的游离磷酸盐。例如,参见Van Hartingsveldt等人,(1993) Gene [基因]127:87,该文献公开了黑曲霉植酸酶基因的核苷酸序列;和(2) 调节降低植酸盐含量的基因。例如,可以在玉米中通过以下方法来完成:克隆然后重新引入与一个或多个等位基因相关联的DNA,例如在以低水平的植酸为特征的玉米突变体中经识别的LPA等位基因,例如W0 2005/113778中;和/或改变肌醇激酶活性,如W0 2002/059324、美国专利申请公开号2003/0009011、W0 2003/027243、美国专利申请公开号2003/0079247、W0 1999/05298、美国专利号6,197,561、美国专利号6,291,224、美国专利号6,391,348、W0 2002/059324、美国专利申请公开号2003/0079247、W0 1998/45448、W0 1999/55882、W0 2001/04147中。

[0187] (C) 经改变的受到影响的碳水化合物,例如通过改变如下基因:影响淀粉分支模式的酶的基因,或改变硫氧还蛋白(例如NTR和/或TRX)(参见美国专利号6,531,648,为此目的将其通过引用并入本文)和/或 γ 玉米蛋白敲除或突变体(例如cs27或TUSC27或者en27)(参见美国专利号6,858,778和美国专利申请公开号2005/0160488、美国专利申请公开号2005/0204418,其通过引用并入本文)的基因。参见,Shiroza等人,(1988) J. Bacteriol. [细菌学杂志]170:810(链球菌突变果糖基转移酶基因的核苷酸序列),Steinmetz等人,(1985) Mol. Gen. Genet. [分子遗传学和基因组学]200:220(枯草芽孢杆菌果聚糖蔗糖酶基因的核苷酸序列),Pen等人,(1992) Bio/Technology [生物/技术],10:292(生产表达地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶的转基因植物),Elliot等人,(1993) Plant Molec. Biol. [植物分子生物学]21:515(番茄转化酶基因的核苷酸序列),Sogaard等人,(1993) J. Biol. Chem. [生物化学杂志]268:22480(大麦 α -淀粉酶基因的定点诱变)和Fisher等人,(1993) Plant Physiol. [植物生理学]102:1045(玉米胚乳淀粉分支酶II),W0 1999/10498(通过修饰UDP-D-木糖4-差向异构酶、脆性1和2、Ref1、HCHL、C4H改进的可消化性和/或淀粉提取),美国专利号6,232,529(通过改变淀粉水平(AGP)生产高油种子的方法)。在此提及的脂肪酸修饰基因也可用于通过淀粉和油途径的相互关系影响淀粉含量和/或组成。

[0188] (D) 经改变的抗氧化剂含量或组成,如改变生育酚或生育三烯酚。例如,参见美国专利号6,787,683、美国专利申请公开号2004/0034886和W02000/68393(涉及抗氧化剂水平操作),以及W0 2003/082899(通过改变尿黑酸香叶基香叶基转移酶(hggt))。

[0189] (E) 经改变的必需种子氨基酸。例如,参见美国专利号6,127,600(增加种子中必需氨基酸积累的方法)、美国专利号6,080,913(增加种子中必需氨基酸积累的二元方法)、美国专利号5,990,389(高赖氨酸)、W0 1999/40209(种子中氨基酸组成的改变)、W0 1999/29882(用于改变蛋白质的氨基酸含量的方法)、美国专利号5,850,016(种子中氨基酸组成的改变)、W0 1998/20133(具有升高水平的必需氨基酸的蛋白质)、美国专利号5,885,802(高甲硫氨酸)、美国专利号5,885,801(高苏氨酸)、美国专利号6,664,445(植物氨基酸生物合成酶)、美国专利号6,459,019(赖氨酸和苏氨酸增加)、美国专利号6,441,274(植物色氨酸合酶B亚基)、美国专利号6,346,403(甲硫氨酸代谢酶)、美国专利号5,939,599(高硫)、美

国专利号5,912,414(甲硫氨酸增加)、WO 1998/56935(植物氨基酸生物合成酶)、WO 1998/45458(具有较高百分比的必需氨基酸的工程化种子蛋白)、WO 1998/42831(赖氨酸增加)、美国专利号5,633,436(增加含硫氨基酸含量)、美国专利号5,559,223(具有限定结构的、含可编程水平的必需氨基酸的合成储存蛋白,用于改善植物的营养价值)、WO 1996/01905(苏氨酸增加)、WO 1995/15392(赖氨酸增加)、美国专利申请公开号2003/0163838、美国专利申请公开号2003/0150014、美国专利申请公开号2004/0068767、美国专利号6,803,498、WO 2001/79516。

[0190] iv. 控制雄性不育的基因

[0191] 有几种赋予遗传雄性不育的方法,例如基因组内分离位置处的赋予雄性不育的多个突变基因,如Brar等人在美国专利号4,654,465和4,727,219中所披露的;以及染色体易位,如Patterson在美国专利号3,861,709和3,710,511中所述。除了这些方法之外,Albertsen等人在美国专利号5,432,068中描述了细胞核雄性不育的系统,该系统包括:鉴定对雄性能育性至关重要的基因;沉默这种对雄性能育性至关重要的天然基因;从基本的雄性能育性基因中除去天然启动子并用诱导型启动子替换;将该遗传工程化基因插回入植物;并因此产生雄性不育的植物,因为诱导型启动子不是“开”的,导致雄性能育性基因不被转录。通过诱导或将启动子打“开”来恢复能育性,该启动子反过来又允许赋予雄性能育性的基因被转录。非限制性实例包括:(A)在绒毡层特异性启动子的控制下并使用化学N-Ac-PPT来引入脱乙酰酶基因(WO 2001/29237);(B)引入各种雄蕊特异性启动子(WO 1992/13956、WO 1992/13957);和(C)引入bamase和barstar基因(Paul等人,(1992) Plant Mol. Biol. [植物分子生物学] 19:611-622)。关于细胞核雄性和雌性不育系统和基因的另外的实例,也可参见美国专利号5,859,341;6,297,426;5,478,369;5,824,524;5,850,014和6,265,640。

[0192] v. 创建用于位点特异性DNA整合的位点的基因。

[0193] 这包括引入可以在FLP/FRT系统中使用的FRT位点和/或可以在Cre/Loxp系统中使用的Lox位点。例如,参见Lyznik等人(2003) Plant Cell Rep [植物细胞报告] 21:925-932和WO 1999/25821。可以使用的其他系统包括噬菌体Mu的Gln重组酶(Maeser等人,(1991) Vicki Chandler, The Maize Handbook eh.118 [玉米手册,第118章] (施普林格出版公司(Springer-Verlag) 1994)、大肠杆菌的Pin重组酶(Enomoto等人,1983)和pSRi质粒的R/RS系统(Araki等人,1992)。

[0194] vi. 影响非生物胁迫抗性的基因

[0195] 包括但不限于开花,穗和种子发育,提高氮利用效率,改变氮反应性,抗旱性或耐旱性,抗寒性或耐寒性和抗盐性或耐盐性以及胁迫下产量的增加。非限制性实例包括:(A)例如,参见:WO 2000/73475,其中通过改变苹果酸来改变水分的使用效率;美国专利号5,892,009、5,965,705、5,929,305、5,891,859、6,417,428、6,664,446、6,706,866、6,717,034、6,801,104、WO 2000/060089、WO 2001/026459、WO 2001/035725、WO 2001/034726、WO 2001/035727、WO 2001/036444、WO 2001/036597、WO 2001/036598、WO 2002/015675、WO 2002/017430、WO 2002/077185、WO 2002/079403、WO 2003/013227、WO 2003/013228、WO 2003/014327、WO 2004/031349、WO 2004/076638、WO 199809521; (B) WO 199938977描述了基因,这些基因包括有效减轻冷冻、高盐和干旱对植物的负面影响以及赋予植物表型其他

积极作用的CBF基因和转录因子；(C) 美国专利申请公开号2004/0148654和WO 2001/36596，其中脱落酸在植物中被改变，导致改进的植物表型，例如增加的产量和/或增加的对非生物胁迫的耐受性；(D) WO 2000/006341、WO 2004/090143、美国专利号7,531,723和6,992,237，其中修饰细胞分裂素表达，产生具有增加的胁迫耐受性（例如耐旱性和/或增加的产量）的植物。还参见，WO 2002/02776、WO 2003/052063、JP 2002/281975、美国专利号6,084,153、WO 2001/64898、美国专利号6,177,275和美国专利号6,107,547（提高氮利用率和改变氮反应性）；(E) 对于乙烯改变，参见美国专利申请公开号2004/0128719、美国专利申请公开号2003/0166197和WO 2000/32761；(F) 对于非生物胁迫的植物转录因子或转录调节子，参见，例如，美国专利申请公开号2004/0098764或美国专利申请公开号2004/0078852；(G) 增加囊泡焦磷酸酶（如AVP1）表达的基因（美国专利号8,058,515），用于提高产量；编码HSFA4或HSFA5（A4或A5类热休克因子）多肽（寡肽转运蛋白（OPT4样）多肽）的核酸；间隔期2样（PLA2样）多肽或Wuschel相关同源框1样（WOX1样）多肽（美国专利申请公开号US 2011/0283420）；(H) 下调编码聚（ADP-核糖）聚合酶（PARP）蛋白的多核苷酸来调节程序性细胞死亡（美国专利号8,058,510），用于增加活力；(I) 编码用于赋予抗旱性的DTP21多肽的多核苷酸（美国专利申请公开号US 2011/0277181）；(J) 编码用于调节发育，调节对胁迫的应答和调节胁迫耐受性的ACC合酶3（ACS3）蛋白的核苷酸序列（美国专利申请公开号US 2010/0287669）；(K) 编码赋予耐旱性表型（DTP）的蛋白质的多核苷酸，以赋予抗旱性（WO 2012/058528）；(L) 用于赋予耐旱性和耐盐性的生育酚环化酶（TC）基因（美国专利申请公开号2012/0272352）；(M) CAAX氨基末端家族蛋白质，用于胁迫耐受性（美国专利号8,338,661）；(N) SAL1编码基因的突变具有增加的胁迫耐受性，包括耐旱性增加（美国专利申请公开号2010/0257633）；(O) 编码选自下组的多肽的核酸序列的表达，该组由以下组成：GRF多肽、RAA1样多肽、SYR多肽、ARKL多肽、和YTP多肽，这些多肽增加产量相关性状（美国专利申请公开号2011/0061133）；以及(P) 调节植物中编码III类海藻糖磷酸酯酶（TPP）多肽的核酸的表达，用于增强植物中产量相关性状，特别是增加种子产量（美国专利申请公开号2010/0024067）。

[0196] 影响植物生长和农艺性状（如产量、开花、植物生长和/或植物结构）的其他基因和转录因子可被引入或种质渗入到植物中，参见例如WO 1997/49811（LHY）、WO 1998/56918（ESD4）、WO 1997/10339和美国专利号6,573,430（TFL）、美国专利号6,713,663（FT）、WO 1996/14414（CON）、WO 1996/38560、WO 2001/21822（VRN1）、WO 2000/44918（VRN2）、WO 1999/49064（GI）、WO 2000/46358（FR1）、WO 1997/29123、美国专利号6,794,560、美国专利号6,307,126（GAI）、WO 1999/09174（D8和Rht）以及WO 2004/076638和WO 2004/031349（转录因子）。

[0197] vii. 赋予增加的产量的基因

[0198] 赋予增加的产量的基因的非限制性实例是：(A) 由1-氨基环丙烷-1-羧酸酯脱氨酶样多肽（ACCDP）编码核酸转化的转基因作物植物，其中，与该植物的野生型品种相比，在该作物植物中的核酸序列的表达使该植物具有增加的根生长、和/或增加的产量、和/或增加的对环境胁迫的耐受性（美国专利号8,097,769）；(B) 已显示，使用种子偏好性启动子的玉米锌指蛋白基因（Zm-ZFP1）的过表达能促进植物生长、增加每株植物的籽粒数和总籽粒重量（美国专利申请公开号2012/0079623）；(C) 已显示，玉米侧生器官界限（LOB）结构域蛋白（Zm-LOBDP1）的组成型过表达能增加每株植物的籽粒数和总籽粒重量（美国专利申请公开

号2012/0079622) ; (D) 通过调节植物中编码VIM1 (甲基化1中的变体) 样多肽或VTC2样 (GDP-L-半乳糖磷酸化酶) 多肽或DUF1685多肽或ARF6样 (生长素应答因子) 多肽 (WO 2012/038893) 的核酸的表达来增强植物中产量相关性状; (E) 调节植物中编码Ste20样多肽或其同源物的核酸的表达, 得到相对于对照植物具有增加的产量的植物 (EP 2431472) ; 以及 (F) 编码核苷二磷酸酶激酶 (NDK) 多肽及其同源物的基因, 用于修饰该植物根系结构 (美国专利申请公开号2009/0064373) 。

[0199] IX. 使用方法

[0200] 本文中披露的方法包括用于防治如下昆虫植物有害生物的方法: 例如鞘翅目、半翅目或鳞翅目植物有害生物, 包括叶甲属、瘦跗叶甲属、条跳甲属、无网蚜属、小粉虱属、茶翅蝽属、稻绿蝽属或灰翅夜蛾属植物有害生物。在一个实施例中, 该方法包括向昆虫植物有害生物饲喂或施用包含本文披露的沉默元件的组合物, 其中在被昆虫植物有害生物 (即, 并不限于, 鞘翅目植物有害生物, 包括叶甲属植物有害生物, 例如玉米根萤叶甲、巴氏根叶甲、墨西哥玉米根虫、南美叶甲或黄瓜十一星叶甲) 摄取或接触时, 所述沉默元件降低该有害生物的靶标多核苷酸的水平, 并且因此防治该有害生物。可以以各种方式向该有害生物饲喂沉默元件。可以将该沉默元件饲喂给雄性、雌性或两种性别的有害生物。例如, 在一个实施例中, 将编码沉默元件, 即靶向如SEQ ID NO.: 1-49中所示一个或多个多核苷酸的沉默元件的多核苷酸引入植物中。由于植物有害生物以表达这些序列的植物或其部分为食, 所以在幼虫、成虫、或者在任何或所有的发育阶段, 将所述沉默元件递送到该有害生物中。在一个实施例中, 本文所述的方法和组合物进一步包含含有本文披露的沉默元件的转基因植物, 其中所述沉默元件在幼虫、成虫、或者在任何或所有的发育阶段均具有杀昆虫活性。当以这种方式将沉默元件递送到植物中时, 已经认识到, 该沉默元件可以被组成型表达, 或可替代的, 其能以阶段特异性方式、通过使用各种本文别处所讨论的诱导型或组织偏好性、或发育调节的启动子来产生。在某些实施例中, 该沉默元件在根、秆或茎、叶 (包括花梗、木质部和韧皮部)、果实或生殖组织、须、花、及其中的所有部分、或其任何组合中表达。

[0201] 在另一种方法中, 将包含本文所披露的至少一种沉默元件的组合物施用于植物。在这样的实施例中, 可以将沉默元件配制在农艺学上合适的和/或环境可接受的载体 (优选适于在田间喷散) 中。在一些实施例中, 可以将靶向不同昆虫阶段、途径和性别的沉默元件以获得不育活性和杀昆虫活性。在一个实施例中, 本文披露的沉默元件可以通过桶混与杀昆虫化学物质混合。此外, 载体还可以包括增加该组合物半衰期的化合物。在某些实施例中, 包含该沉默元件的组合物以这样的方式配制, 使得其在环境中持续一段足以允许其被递送至植物有害生物中的时间。在此类实施例中, 可将该组合物施用到昆虫植物有害生物所栖息的区域。在一个实施例中, 将该组合物外部施用于植物 (即, 通过喷洒田地) 以保护植物免受有害生物的伤害。

[0202] 在某些实施例中, 所披露的多核苷酸或构建体可以与感兴趣的多核苷酸序列的任何组合堆叠, 以产生具有所需性状的植物。如本文使用的性状是指源自特定序列或序列群体的表型。例如, 本文所述的多核苷酸可以与编码具有杀有害生物和/或杀昆虫活性的多肽的任何其他多核苷酸堆叠, 例如其他苏云金芽孢杆菌毒性蛋白 (描述于美国专利号5,366,892; 5,747,450; 5,737,514; 5,723,756; 5,593,881; 和Geiser等人 (1986) Gene [基因] 48: 109中)、凝集素 (Van Damme等人 (1994) Plant Mol. Biol. [植物分子生物学] 24:825)、果胶

(pentin) (描述于美国专利号5,981,722中)等。产生的组合也可以包括目的多核苷酸中的任一种的多个拷贝。本文描述的多核苷酸还可以与任何其他基因或基因的组合堆叠以产生具有各种希望的性状组合的植物,这些性状组合包括但不限于对于动物饲料希望的性状例如高油基因(例如,美国专利号6,232,529);平衡的氨基酸(例如羟丁硫素(hordothionin)(美国专利号5,990,389;5,885,801;5,885,802;和5,703,409);大麦高赖氨酸(Williamson等人(1987)Eur.J.Biochem.[欧洲生物化学杂志]165:99-106和WO 98/20122)和高甲硫氨酸蛋白质(Pedersen等人(1986)J.Biol.Chem.[生物化学杂志]261:6279;Kirihara等人(1988)Gene[基因]71:359;以及Musumura等人(1989)Plant Mol.Biol.[植物分子生物学]12:123));增加的消化率(例如,改良的储存蛋白(2001年11月7日提交的美国申请序列号10/053,410);和硫氧还蛋白(2001年12月3日提交的美国申请序列号10/005,429))。

[0203] 披露的多核苷酸也可以与以下性状堆叠;疾病或除草剂抗性所期望的性状(例如,伏马菌素解毒基因(美国专利号5,792,931);无毒性和病害抗性基因(Jones等人(1994)Science[科学]266:789;Martin等人(1993)Science[科学]262:1432;Mindrinos等人(1994)Cell[细胞]78:1089);导致除草剂抗性的乙酰乳酸合酶(ALS)突变体,例如S4和/或Hra突变;谷氨酰胺合酶抑制剂例如草丁膦或巴斯塔(basta)(例如bar基因);和草甘膦抗性(EPSPS基因));以及加工或加工产品希望的性状,例如高油(例如,美国专利号6,232,529);改性油(例如,脂肪酸去饱和酶基因(美国专利号5,952,544;WO 94/11516));改性淀粉(例如,ADPG焦磷酸化酶(AGPase)、淀粉合成酶(SS)、淀粉分支酶(SBE)和淀粉脱支酶(SDBE));以及聚合物或助发育物(bioplastic)(例如美国专利号5.602,321; β -酮硫解酶、聚羟基丁酸酯合成酶和乙酰乙酰基辅酶A还原酶(Schubert等人(1988)J.Bacteriol.[细菌学杂志]170:5837-5847)促进聚羟基链烷酸酯(PHA)表达),其公开内容通过引用并入本文。还可以将多核苷酸与提供农艺性状(例如,雄性不育(例如,参见美国专利号5.583,210)、茎秆强度、抗旱性(例如美国专利号7,786,353)、开花时间)或转化技术性状(如细胞周期调节或基因靶向(例如,WO 99/61619、WO 00/17364和WO 99/25821))的多核苷酸组合。

[0204] 这些堆叠的组合可以通过如下任何方法产生,该方法包括但不限于,通过任何常规的或TopCross方法学进行杂交育种或遗传转化。如果通过对植物进行遗传转化来堆叠这些序列(即分子堆叠物),则可以在任何时间和以任何顺序组合这些目的多核苷酸序列。例如,可以使用包含一种或多种所需性状的转基因植物作为靶标,以通过随后的转化来引入另外的性状。可以用共转化方案将这些性状与转化盒的任何组合所提供的目的多核苷酸一起引入。例如,若引入两个序列,则这两个序列可包含在分开的转化盒(反式)或包含在同一个转化盒(顺式)中。这些序列的表达可以通过相同的启动子或通过不同的启动子驱动。在某些情况下,可能所希望的是引入将抑制目的聚核苷酸的表达的转化盒。这可以与其他抑制盒或过度表达盒的任何组合进行组合以在该植物中产生所需性状组合。应当进一步认识到,可以使用位点特异重组系统,在希望的基因组位置堆叠多核苷酸序列。参见例如WO 99/25821、WO 99/25854、WO 99/25840、WO 99/25855和WO 99/25853。

[0205] X. 昆虫抗性管理方法

[0206] 本文中披露的方法包括用于防治如下昆虫植物有害生物(例如昆虫抗性管理)的方法:例如鞘翅目、半翅目或鳞翅目植物有害生物,包括叶甲属、瘦跗叶甲属、条跳甲属、无网蚜属、小粉虱属、茶翅蜡属、稻绿蜡属或灰翅夜蛾属植物有害生物。昆虫抗性管理(IRM)是

用来描述旨在减少昆虫有害生物变得对杀有害生物剂具有抗性的潜力的实践的术语。Bt (或其他杀有害生物蛋白, 化学的或生物学的) IRM的维护是非常重要的, 因为昆虫抗性对未来使用Bt植物掺入保护剂和Bt技术整体而言构成威胁。特定的IRM策略(例如高剂量/结构化庇护所策略) 延迟对玉米、棉花和马铃薯中产生的特异性Bt蛋白的昆虫抗性。然而, 为了确保非抗性昆虫发育并可与在受保护作物中产生的任何抗性有害生物交配, 这样的策略导致作物的一部分容易受到一种或多种有害生物的伤害。因此, 从农民/生产者的角度来看, 非常希望拥有尽可能小的庇护所, 但仍然能够管理昆虫抗性, 从而获得最大的产量, 同时仍然保持所用的有害生物防治方法(无论是Bt、化学、一些其他方法、或其组合) 的功效。

[0207] 通常使用的IRM策略是种植庇护所(总面积的一部分使用非Bt/杀有害生物性状种子), 因为通常认为这将通过保持昆虫易感性来延迟昆虫对杀有害生物性状的抗性的发展。用于延迟抗性的庇护所策略的理论基础取决于如下假设: 昆虫抗性的频率和隐性与有害生物易感性成反比; 只有当有害生物对毒素非常敏感时, 抗性才是罕见且隐性的, 并且反之, 当有害生物不是非常敏感时, 抗性会更加频繁且隐性也更少。此外, 该策略假定对Bt的抗性是隐性的并且由具有两个等位基因的单一基因座赋予, 所述两个等位基因产生三种基因型: 易感纯合体(SS)、杂合体(RS)和抗性纯合体(RR)。还假定初始抗性等位基因频率较低, 并且抗性成虫和易感成虫之间会有大量的随机交配。在理想的情况下, 只有罕见的RR个体将幸免于作物产生的杀有害生物毒素。SS个体和RS个体均易受到杀有害生物毒素的影响。结构化庇护所是种植者的田地或一组田地的非Bt/杀有害生物性状部分, 其提供可能与幸免于所述杀有害生物性状作物(可能是Bt性状作物)的罕见抗性(RR)昆虫随机交配的易感(SS)昆虫的产生, 以产生将被所述Bt/杀有害生物性状作物杀死的易感RS杂合子。整合的庇护所是种植者的田地或一组田地的随机种植的非Bt/杀有害生物性状部分的某些部分, 其提供可能与幸免于所述杀有害生物性状作物的罕见抗性(RR)昆虫随机交配的易感(SS)昆虫的产生, 以产生将被所述杀有害生物性状作物杀死的易感RS杂合子每个庇护所策略将从昆虫群体中移除抗性(R)等位基因并延迟抗性的演变。

[0208] 减少对庇护所的需求的另一个策略是对具有针对靶标昆虫有害生物的不同作用模式的性状进行聚合。例如, 具有堆叠在一个转基因植物中的不同作用模式的Bt毒素对庇护所的需求降低。堆叠组合中不同的作用模式也保持了每种性状的持久性, 因为抗性发展到每种性状的速度较慢。

[0209] 目前, 庇护所的规模、布置和管理通常被认为是减轻昆虫对玉米、棉花、大豆和其他作物中产生的Bt/杀有害生物性状的抗性的庇护所策略成功的关键。由于庇护所种植区的产量下降, 一些农民选择避开庇护所需求, 而其他农民则不遵循规模和/或布置要求。这些问题导致没有庇护所或庇护所效果不佳, 而且抗性有害生物发展的风险也相应增加。

[0210] 因此, 仍然需要用于管理一片有害生物抗性作物植物中的有害生物抗性的方法。提供用于保护植物, 特别是玉米或其他作物植物免受有害生物的摄食损伤的改良方法是有用的。如果这种方法会降低对传统化学杀有害生物剂所需的施用率, 并且还将限制作物种植和栽培所需的单独田间作业的数量, 这将是特别有用的。另外, 具有部署转基因庇护所的方法将是有益的, 该方法消除了上述关于依从性的、淡化或消除许多抗性治理策略的功效的问题。

[0211] 一个实施例涉及减少抗性有害生物发展的方法, 该方法包括向植物提供植物保护

组合物(Bt毒素、转基因杀昆虫蛋白、其他杀昆虫蛋白、化学杀昆虫剂、杀昆虫生物学昆虫病原体等),以及使该植物有害生物与沉默元件(即,靶向如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸的沉默元件)接触,其中所述沉默元件(即,靶向如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸的沉默元件)使靶标有害生物中的序列中的一个或多个的表达减少并防治所述有害生物。

[0212] 另外的实施例涉及增加植物有害生物组合物的持久性的方法,该方法包括向植物提供植物保护组合物(Bt毒素、转基因杀昆虫蛋白、其他杀昆虫蛋白、化学杀昆虫剂、杀昆虫生物学昆虫病原体等),以及使该植物有害生物与沉默元件(即,如SEQ ID NO.:1-49中所示一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸的沉默元件)接触,使靶标有害生物中的序列中的一个或多个的表达减少并防治所述有害生物。在另一个实施例中,作为条、块种植或与所述性状种子整合的庇护所包含进一步包含沉默元件(例如,靶向如SEQ ID NO.:1-49中所示一个或多个多核苷酸的沉默元件)的植物。

[0213] 在另外的实施例中,可以通过施加到非庇护所植物的沉默元件的存在(作为与非庇护所植物中的任何杀昆虫性状不同的作用模式)而减少或消除所需的庇护所。在另一个实施例中,所述庇护所或非庇护所可以包括作为喷雾剂、诱饵、引诱物,或者作为不同的转基因植物的沉默元件,即,如SEQ ID NO.:1-49中所示一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸的沉默元件。

[0214] 在另外的实施例中,向昆虫有害生物饲喂如下饲料,该饲料包含如SEQ ID NO.:1-49中所示一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸的沉默元件,并且所述昆虫在饲喂后第1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天被释放到植物上。在另外的实施例中,所述有害生物是昆虫有害生物,并且在幼虫或成虫阶段对所述昆虫有害生物进行饲喂。

[0215] 目前的IRM策略需要高剂量的Bt毒素以便使昆虫抗性发展最小化。由于植物毒性,可能难以达到所需的高剂量。借助不同的昆虫防治手段进行有害生物综合治理(IPM)可用于延迟暴露于次最优剂量的蛋白毒素(例如Bt毒素)的昆虫抗性。可以将RNAi和沉默元件作为IPM策略的一部分进行部署。

[0216] 如本文所使用的,术语“杀有害生物的”用于指针对有害生物(例如鞘翅目植物有害生物)的毒性作用,并且包括外部供应的杀有害生物剂和/或由作物植物产生的试剂中的任一者或两者的活性。如本文所使用的,术语“不同的杀有害生物作用模式”包括一种或多种抗性性状的杀有害生物效果,其中无论是通过转化或传统育种方法,例如将由所述作物植物产生的杀有害生物毒素与玉米根虫的肠膜中不同的结合位点(即不同的毒素受体和/或同一毒素受体上的不同位点)结合,或通过RNA干扰,将所述抗性性状引入所述作物植物中。

[0217] XI. 施用方法

[0218] 在一个实施例中,可以将如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸序列的沉默元件、以及包含所述序列的组合物直接施用于种子。例如,在本文披露

的组合和方法中使用的如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸序列的沉默元件可以在没有附加组分和不进行稀释的情况下施用。

[0219] 在一个实施例中,喷雾剂、诱饵、引诱物、引诱剂和种子处理可以包含如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸序列的沉默元件、以及包含所述序列的组合物。

[0220] 在另一个实施例中,将如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸序列的沉默元件、以及包含所述序列的组合物以合适的制剂形式施用于种子。用于处理种子的合适的制剂和方法是本领域技术人员已知的并且例如描述于以下文献中:US 4,272,417 A、US 4,245,432 A、US 4,808,430 A、US 5,876,739 A、US 2003/0176428 A1、WO 2002/080675 A1、WO 2002/028186 A2。

[0221] 可以将如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸序列的沉默元件、以及包含所述序列的组合物转化为常规的拌种制剂(例如溶液、乳剂、悬浮剂、粉剂、泡沫剂、浆剂或其他种子包衣材料)和ULV制剂。以已知的方式,通过将如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸序列的沉默元件、以及包含所述序列的组合物与常规添加剂(例如,常规填充剂以及溶剂或稀释剂、着色剂、润湿剂、分散剂、乳化剂、消泡剂、防腐剂、二次增稠剂、粘合剂、赤霉素和水)混合来制备这些制剂。

[0222] 在另一个实施例中,可能存在于拌种制剂中的合适的着色剂包括常用于此类目的的所有着色剂。可以使用在水中溶解性很低的颜料和可溶于水的染料二者。可以提及的实例包括名称为罗丹明B(Rhodamine B)、C.I.颜料红112(C.I.Pigment Red 112)、和C.I.溶剂红1(C.I.Solvent Red 1)的已知着色剂。

[0223] 在另一个实施例中,可存在于所述拌种制剂中的合适的润湿剂包括促进润湿且常用于活性农用化学物质的制剂中的所有物质。优选地,有可能使用烷基萘磺酸盐,如二异丙基萘磺酸盐或二异丁基萘磺酸盐。

[0224] 在仍另一个实施例中,可存在于所述拌种制剂中的合适的分散剂和/或乳化剂包括常用于活性农用化学物质的制剂中的所有非离子、阴离子和阳离子分散剂。在一个实施例中,可以使用非离子或阴离子分散剂或者非离子或阴离子分散剂的混合物。在一个实施例中,非离子分散剂包括但不限于环氧乙烷-环氧丙烷嵌段聚合物、烷基酚聚乙二醇醚和三苯乙烯苯酚聚乙二醇醚,以及它们的磷酸化或硫酸化衍生物。

[0225] 在仍另一个实施例中,可以存在于根据本发明使用的拌种制剂中的消泡剂包括常用于农用化学活性化合物的制剂中的所有泡沫抑制性化合物,但不限于硅酮消泡剂、硬脂酸镁、硅酮乳剂、长链醇、脂肪酸及其盐,以及有机氟化合物及其混合物。

[0226] 在仍另一个实施例中,可存在于拌种制剂中的二次增稠剂包括可用于农业化学组合物中的此类目的的所有化合物,包括但不限于纤维素衍生物、丙烯酸衍生物、多糖类(例如黄原胶或硅酸铝镁(Veegum))、改性粘土、层状硅酸盐(如绿坡缕石和膨润土)、以及精细

分散的硅酸。

[0227] 可存在于待根据本发明使用的拌种制剂中的合适的粘合剂包括可用于拌种的所有常规粘合剂。聚乙烯吡咯烷酮、聚乙酸乙烯酯、聚乙烯醇和Tylose可以作为优选的被提及。

[0228] 在另一个实施例中,如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸或其互补序列、或者包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸序列的沉默元件、以及包含所述序列的组合物在第一次施用步骤中施用于土壤、在第二次施用中施用于种子、并且在第三次施用中施用于植物的叶面区域。

[0229] 如本文所使用的,将如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸序列的沉默元件、以及包含所述序列的组合物施用于种子、植物、或植物部分包括将所述种子、植物、或植物部分直接和/或间接与所述如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸序列的沉默元件、以及包含所述序列的组合物接触。在一个实施例中,如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸序列的沉默元件、以及包含所述序列的组合物可以作为喷雾剂、冲洗剂(rinse)或粉剂,或其任何组合来直接施用。

[0230] 在另一个方面,如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸序列的沉默元件、以及包含所述序列的组合物可以作为粉剂直接施用于植物或植物部分。如本文所使用的,粉剂是由大量非常细的颗粒组成的干燥或接近干燥的散装固体,其在振动或倾斜时可自由流动。本文公开的干燥或接近干燥的粉末组合物优选地含有低百分比的水,例如在各个方面,小于按重量计的5%、小于2.5%、或小于1%。

[0231] 在另外的实施例中,可以通过本领域技术人员已知的转化技术将如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸序列的沉默元件引入细菌、酵母或真菌中,并将所述经转化的细菌、酵母或真菌施用于植物、该植物正在生长的土壤、水培介质、种子或按照如上文所述的前述施用方法中的任一种进行任意施用。

[0232] 在一个实施例中,可通过封装技术来配制如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸序列的沉默元件、以及包含所述序列的组合物,以提高稳定性。在一个实施例中,所述封装技术可以包含随时间推移定时释放的珠状聚合物。在一个实施例中,可以将所述封装的如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸序列的沉默元件、以及包含所述序列的组合物以沿犁沟单独施用珠的方式施用于种子。在另一个实施例中,可以将所述封装的如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸序列的沉默元件、以及包含所述序列的组合物与种子同时共同施用。

[0233] 可用于包封实施例的缓释微粒的包衣剂可以是用于用其上待负载的物质对该微粒形式进行包衣的物质。一般可以使用能够形成所述负载物质难以透过的包衣的任何包衣剂,而没有任何特别的限制。例如,可以使用饱和度更高的脂肪酸、蜡、热塑性树脂、热固性树脂等。

[0234] 有用的饱和度更高的脂肪酸的实例包括硬脂酸、硬脂酸锌、硬脂酸酰胺和亚乙基双硬脂酸酰胺;蜡的实例包括合成蜡,如聚乙烯蜡、碳蜡、赫斯特(Hoechst)蜡和脂肪酸酯;天然蜡,如巴西棕榈蜡、蜂蜡和日本蜡;以及石油蜡,如固体石蜡和凡士林。热塑性树脂的实例包括聚烯烃,例如聚乙烯、聚丙烯、聚丁烯和聚苯乙烯;乙烯基聚合物,例如聚乙酸乙烯酯、聚氯乙烯、聚偏二氯乙烯、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、聚丙烯酸酯和聚甲基丙烯酸酯;二烯聚合物,例如丁二烯聚合物、异戊二烯聚合物、氯丁二烯聚合物、丁二烯-苯乙烯共聚物、乙烯-丙烯-二烯共聚物、苯乙烯-异戊二烯共聚物、MMA-丁二烯共聚物和丙烯腈-丁二烯共聚物;聚烯烃共聚物,例如乙烯-丙烯共聚物、丁烯-乙烯共聚物、丁烯-丙烯共聚物、乙烯-乙酸乙烯酯共聚物、乙烯-丙烯酸共聚物、苯乙烯-丙烯酸共聚物、乙烯-甲基丙烯酸共聚物、乙烯-甲基丙烯酸酯共聚物、乙烯-一氧化碳共聚物、乙烯-乙酸乙烯酯-一氧化碳共聚物、乙烯-乙酸乙烯酯-氯乙烯共聚物和乙烯-乙酸乙烯酯-丙烯酸共聚物;以及氯乙烯共聚物,例如氯乙烯-乙酸乙烯酯共聚物和偏二氯乙烯-氯乙烯共聚物。热固性树脂的实例包括聚氨酯树脂、环氧树脂、醇酸树脂、不饱和聚酯树脂、酚醛树脂、脲-三聚氰胺树脂、尿素树脂和硅酮树脂。在以上所述中,优选的是热塑性丙烯酸酯树脂、丁二烯苯乙烯共聚物树脂、热固性聚氨酯树脂和环氧树脂,并且在所述优选的树脂中,特别优选的是热固性聚氨酯树脂。这些包衣剂可以单独使用或者两种或更多种组合使用。

[0235] 在一个实施例中,可以将如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸序列的沉默元件、以及包含所述序列的组合物配制成进一步包含昆虫病原体。在一个实施例中,本公开的方法和组合物涉及如下组合物,该组合物包含如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸序列的沉默元件、以及包含所述序列的组合物和一种或多种生物防治剂。如本文所使用的,术语“生物防治剂”(“BCA”)包括一种或多种细菌、真菌或酵母,原生动物,病毒,昆虫病原线虫和植物提取物,或由微生物产生的产物(包括蛋白质或次级代谢产物),以及具有以下特征中的一种或两种的接种剂(innoculant):(1)抑制或减少病原体、有害生物或昆虫(包括但不限于致病性真菌、细菌和线虫)以及节肢动物有害生物(如昆虫、蛛纲动物、蜈蚣、双足动物)的植物侵染和/或生长,或者抑制植物病原体、有害生物或昆虫的组的植物侵染和/或生长;(2)改进植物性能;(3)改进植物产量;(4)改进植物活力;和(5)改进植物健康。

[0236] XII. 使用Cas/CRISPR进行基因编辑

[0237] 在一个实施例中,可以使用基因组编辑技术将如SEQ ID NO.:1-49中所示的一个或多个多核苷酸或其互补序列、包含如SEQ ID NO.:1-49中所示序列或其互补序列的表达构建体、或者靶向所述多核苷酸的沉默元件、以及包含所述序列的组合物引入到植物的基因组中,或者可以使用基因组编辑技术对先前导入的编码植物基因组中本文披露的沉默元件的多核苷酸进行编辑。例如,可以通过使用双链断裂技术(如TALEN、大范围核酸酶、锌指

核酸酶、CRISPR-Cas等)将公开的多核苷酸引入植物基因组中期望的位置中。例如,为了位点特异性插入的目的,可以使用CRISPR-Cas系统将所公开的多核苷酸引入基因组中期望的位置中。植物基因组中期望的位置可以是任何对于插入来说期望的靶标位点,例如适于育种的基因组区域,或者可以是位于具有现有的目的性状的基因组窗口中的靶标位点。现有的目的性状可能是内生性状或先前引入的性状。

[0238] 在另一个方面,在所披露的编码沉默元件的多核苷酸先前已经被引入到基因组中的情况下,可以使用基因组编辑技术来改变或修饰引入的多核苷酸序列。可以引入披露的编码沉默元件的多核苷酸组合物中的位点特异性修饰包括使用用于引入位点特异性修饰的任何方法产生的修饰,该方法包括但不限于通过使用基因修复寡核苷酸(例如美国公开2013/0019349),或通过使用双链断裂技术,如TALEN、大范围核酸酶、锌指核酸酶、CRISPR-Cas等。此类技术可用于通过在引入的多核苷酸内的核苷酸的插入、缺失或取代来修饰先前引入的多核苷酸。可替代地,可以使用双链断裂技术向引入的多核苷酸中添加另外的核苷酸序列。可以添加的另外的序列包括另外的表达元件(例如增强子序列和启动子序列)。在另一个实施例中,可以使用基因组编辑技术在植物基因组内定位紧邻本文披露的多核苷酸组合物的另外的杀昆虫活性蛋白,以产生杀昆虫活性蛋白的分子堆叠物。“改变的靶标位点”、“改变的靶标序列”、“修饰的靶标位点”和“修饰的靶标序列”在本文中可互换地使用,并且意指如本文公开的靶标序列,当与非改变的靶标序列相比时,该靶标序列包含至少一种改变。此类“改变”包括,例如:(i)至少一个核苷酸的替代、(ii)至少一个核苷酸的缺失、(iii)至少一个核苷酸的插入、或(iv) (i)-(iii)的任何组合。

[0239] 本说明书中提到的所有出版物和专利申请都指示了本发明所属领域的技术人员的水平。将所有出版物和专利申请通过引用并入本文,其程度就像明确且单独指出通过引用将每个单独出版物或专利申请并入本文一样。

[0240] 虽然出于清楚理解的目的,已经通过说明和实例的方式对前述实施例进行了详细描述,但是可以在所附权利要求的范围内实施某些改变和修改。

[0241] 通过说明的方式但不是通过限制的方式提供了以下实例。

[0242] 实验

[0243] 实例1:核酸序列。

[0244] 本文披露的核酸序列包含以下核酸序列。某些序列是示例性的,并且使用如下所示的实例2、3和6中所述的测定方法显示出其对玉米根虫具有杀昆虫活性。此类序列或其互补序列可以用于本文上下文所述的方法中。本文所述的DNA构建体、载体、转基因细胞、植物、种子或产物可以包含一种或多种以下核酸序列,或者一种或多种本披露的序列中的一部分。靶标多核苷酸、或者其变体和片段、及其互补序列的非限制性实例列于下表1中,包括例如SEQ ID NO.:1-49、及其变体和片段、及其互补序列。

[0245] 表1. 通过同源序列搜索鉴定的SSJ3直向同源物的列表

[0246]

俗名	学名	基因 ID	Seq No.	转录物大小 (bp)	Seq No.	orf 大小 (bp)
西方玉米根虫	玉米根萤叶甲	Dv-ssj3	1	1170	2	771
西方玉米根虫	玉米根萤叶甲	Dv-ssj3 b	3	4816	4	747
北方玉米根虫	北方玉米根虫	Db-ssj3	5	1487	6	747

[0247]

	(巴氏根叶甲)					
南方玉米根虫	黄瓜十一星叶甲	Du-ssj3	7	3691	8	747
十字花科跳甲	十字花科条跳甲	Pc-ssj3	9	1243	10	747
黄条叶蚤	黄曲条跳甲	Ps-ssj3	11	1250	12	747
赤拟谷盗 (Red Flour Beetle)	赤拟谷盗 (<i>Tribolium castaneum</i>)	Tc-ssj3	13	519	14	519
科罗拉多马铃薯甲虫	马铃薯甲虫	Ld-ssj3	15	1624	16	747
墨西哥豆瓢虫 (Mexican Bean Beetle)	墨西哥豆瓢虫 (<i>Epilachna varivestis</i>)	Ev-ssj3	17	1085	18	735
十二斑瓢虫	十二斑褐菌瓢虫 (<i>Vibidia duodecimguttata</i>)	Vd-ssj3	19	1004	20	735
天蛾幼虫	烟草天蛾 (<i>Manduca sexta</i>)	Ms-ssj3	21	1388	22	732
秋粘虫	草地贪夜蛾	Sf-ssj3	23	1267	24	747
棉红铃虫 (Pink Bollworm)	红铃麦蛾 (<i>Pectinophora gossypiella</i>)	Pg-ssj3	25	1227	26	750
棉铃虫	谷实夜蛾	Hs-ssj3	27	1027	28	747
欧洲玉米螟 (European Corn Borer)	欧洲玉米螟 (<i>Ostrinia nubilalis</i>)	On-ssj3	29	953	30	747
豌豆蚜	豌豆长管蚜 (<i>Acyrtosiphon pisum</i>)	Ap-ssj3	31	977	32	633
西方盲蝽	豆荚盲蝽 (<i>Lygus hesperus</i>)	Lh-ssj3	33	1804	34	729
隐伏花蝽	狡小花蝽	Oi-ssj3	35	1498	36	702

[0248]

	<i>(Orius insidiosus)</i>					
葛藤虫	筛豆龟蝽 <i>(Megacopta cribraria)</i>	Mc-ssj3	37	1758	38	693
南方绿色椿象	稻绿蝽	Nv-ssj3	39	2006	40	693
褐色大理石纹椿象	茶翅蝽	Hh-ssj3	41	1711	42	693
褐色椿象	褐臭蝽	Es-ssj3	43	1188	44	693
果蝇	黑腹果蝇	Tsp2A-PA		N/A*	46	735
果蝇	黑腹果蝇	Tsp2A-PB		N/A*	47	735

[0249] *N/A指示是不可获得的。

[0250] 实例2:体外转录 (IVT) 和dsRNA昆虫生物测定。

[0251] 在基于玉米根虫饮食的测定中使用不同的靶标选择策略用于识别具有杀昆虫活性的RNAi活性靶标。采用标准方法从3日龄西方玉米根虫幼虫的中肠或新生虫产生cDNA文库。使用靶标特异性引物在PCR中扩增含有表达序列标签 (EST) 的所选择的cDNA克隆,以产生DNA模板。靶标特异性引物还含有T7RNA聚合酶位点(在每个引物5'端的T7序列)。之前的随机cDNA筛选鉴定了若干SSJ cDNA作为RNAi活性靶标(参见美国专利申请公开2014/0275208和US2015/0257389)。为了识别具有RNAi活性的玉米根虫的其他基因,使用来自以下各项的3日龄幼虫来完成转录组实验;西方玉米根虫(“WCRW”;玉米根萤叶甲)、北方玉米根虫(“NCRW”;北方玉米根虫(巴氏根叶甲))、南方玉米根虫(“SCRW”;黄瓜十一星叶甲)。鉴定了同源转录物,并列于表1中 (SEQ ID NO.5至44)。

[0252] 通过PCR产生WCRW基因的一个或多个区域,然后通过体外转录 (IVT) 产生长双链RNA (DvSSJ3FRAG1, SEQ ID NO:45)。将IVT反应产物在凝胶中进行定量,并并入如下所述的用于第一轮IVT筛选 (FIS) 的人工昆虫饮食中。简言之,将dsRNA以96孔微量滴定板形式并入标准WCRW人工饮食中,终浓度为300ppm。将5 μ l的IVT反应 (300ng/ μ l) 添加到96孔微量滴定板的给定孔中。将25 μ l的熔融的低熔点西方玉米根虫饮食添加到样品中并在定轨摇床上摇动以混合该样品和饮食。一旦饮食凝固,针对每个RNA样品使用8个孔。将预先准备好的1日龄WCRW(在转移至试验材料中之前将新生昆虫置于中性饮食中持续24小时)以3-5只昆虫/孔的比率添加到96孔微量滴定板中。为了防止饮食变干,首先将板放在具有轻微潮湿的布的塑料袋内,并将这些袋放置在设定在28°C和70%RH的培养箱中。7天后对该测定法的死亡率和发育迟缓影响进行评分,并且基于据对每一类影响的数值赋值确定平均值 (3=死亡,2=严重发育迟缓,1=发育迟缓,0=无影响)。这个和所有饮食测定表中报告的数字反映了所有观察结果的平均分。3分表示所有观察结果全部死亡。例如,得分2.5表明一半的孔显示死亡,而另一半的孔评分为严重发育迟缓。代表性的初步测定 (FIS) 结果在下表2中提供。

[0253] 表2:西方玉米根虫初步 (FIS) 测定结果。

[0254]

SEQ ID NO.	靶标片段名称	得分
45	DV-SSJ3-FRAG1	2.75

[0255] 实例3. 针对改进的杀昆虫活性的靶标片段搜索。

[0256] 设计有效dsRNA的靶子区域来评估饮食和植物体内dsRNA表达方面的杀昆虫活性。如初次筛选所述,将dsRNA掺入饮食中。对于每个样品,评估10个剂量(100、31.6、10、3.16、1、0.316、0.10、0.032、0.010和0.0032ng μl^{-1}),对每剂量或水对照总共32次观察。采用四个板,每个板上对每个浓度有8个孔。将两只一日龄幼虫转移到每个孔中。将板在27°C和65% RH孵育。暴露后8天,对幼虫进行生长抑制(严重发育迟缓的幼虫,大小减少>60%)和死亡率评分。使用SAS中的PROC Probit分析来分析数据以确定50%致死浓度(LC₅₀)。使用死亡和严重发育迟缓的幼虫的总数来分析50%抑制浓度(IC₅₀),如表3所示。

[0257] 表3:靶标片段西方玉米根虫测定结果。

[0258]

	<u>SEQ ID NO:</u>	<u>LC50/IC50</u>	<u>8天-评分</u>	<u>95%CL 下限</u>	<u>95%CL 上限</u>	<u>斜率</u>	<u>n</u>
SSJ3-Frag 2	46	LC50	0.343	0.234	0.493	1.108	249
		IC50	0.099	0.075	0.125	2.275	96
SSJ3-Frag 3	47	LC50	0.94	0.66	1.344	1.148	252
		IC50	0.237	0.17	0.324	1.393	219

[0259] 实例4:土壤杆菌属介导的玉米转化。

[0260] 对于用本发明的沉默元件对玉米进行的土壤杆菌属介导的转化,采用了Zhao的方法(美国专利号5,981,840,和PCT专利公开WO 98/32326;其内容通过引用结合在此)。例如,这样的构建体可以表达表1中所示的靶标序列的长双链RNA。这样的构建体可以与启动子连接。简言之,从玉米中分离未成熟胚,并将胚与土壤杆菌属的悬浮液接触,其中该细菌能够将包含沉默元件的多核苷酸转移至这些未成熟胚中的至少一个的至少一个细胞中(步骤1:侵染步骤)。在该步骤中,将未成熟胚浸泡在土壤杆菌属的悬浮液中,引发接种。使这些胚与土壤杆菌属共培养一段时间(步骤2:共培养步骤)。在该侵染步骤之后,将这些未成熟胚在固体培养基上进行培养。在此共同培养期之后,设想任选的“静息”步骤。在该静置步骤中,将这些胚在至少一种抗生素的存在下(不添加植物转化子的选择剂)孵育,已知该抗生素抑制土壤杆菌属生长(步骤3:静息步骤)。将这些未成熟胚在有抗生素但没有选择剂的固体培养基上培养,以消除土壤杆菌属并用于经侵染的细胞的静息期。接着,在含有选择剂的培养基上培养经接种的胚,并且回收生长的经转化的愈伤组织(步骤4:选择步骤)。在含选择剂的固体培养基上培养这些未成熟胚,使经转化的细胞选择性生长。然后将愈伤组织再生成植物(步骤5:再生步骤),并将生长在选择培养基上的愈伤组织在固体培养基上培养以再生植物。

[0261] 实例5:沉默元件在玉米中的表达。

[0262] 使用上述测定方法,将确定其IC₅₀值低于2ppm的片段进一步用于植物转化载体构建和植物体内的疗效评价。沉默元件在玉米植物中表达为发夹。在温室环境中测试了RNAi

构建体的T0植物对玉米根虫的杀昆虫活性。

[0263] 简言之,用含有本文披露的至少一种多核苷酸的质粒转化玉米植物,并将表达沉默元件的植物从272V板移植到含有盆栽混合土的温室板中。在移植后约10至14天,将植物(现在处于生长阶段V2-V3)移植到含有盆栽混合土的较大盆中。在送入温室后14天,用200个西方玉米根虫(WCRW)的卵/植物侵染植物。对于后来的设置,第一次侵染后14天用200个WCRW的卵/植物进行第二次侵染,并且在第二次侵染后14天进行评分。侵染后21天,使用CRWNIS对植物进行评分。将那些得分 ≤ 1.0 的植物移植到用于T1种子的大盆中。

[0264] 与转基因阴性品系HC69相比,预期含有DV-SSJ3的片段的T0转基因植物在昆虫损伤评分(CRWNIS)方面显示显著降低。因此,预期在温室里植物体内获得的数据能证实上述饮食测定杀昆虫活性数据(表2)。

[0001]

序列表

<110> 先锋良种国际有限公司 (Pioneer HiBred International Inc.)
Hu, Xu

<120> 用以防治昆虫有害生物的组合物和方法

<130> DvSSJ3

<160> 55

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 1170

<212> DNA

<213> 玉米根萤叶甲

<400> 1

```

cgg tactatc ggcttcattt tata tctctt taaaacgggtg tcgcgagttt tcttatgaaa      60
aatgatgtcc aaagtagaca cacaaatgat gtccaaagca gacacacagg aagatgcctc      120
cttcgccaaa ttggaaaatc agattgctat catcaaatac gtaatactct ttaccaacgt      180
tttgcaatgg gctctcggtg cagcaatctt cgctctttgc ctttggctac gattcgagga      240
gggcattcaa gaatggctcc agaaattgga ttcagaacaa ttttacctcg gagtatatgt      300
acttatagtc gtttcaactga tcgtcatgat tgtgtccttt ataggatgta ttagtgcctt      360
gcaggagagt accatggccc ttttagtgta catcggcacc caagtgetca gttttatatt      420
cggtttatcc ggttcggcgg ttcttctgga taacagcgcc agagattccc acttccaacc      480
gaggatccga gagagtatgc gacgtcttat catgaatgct catcacgacc aatccagaca      540
aacactagcc atgattcagg aaaatgttgg ttgctgcgga gctgatggcg caacagacta      600
cctctctctt cagcagcccc ttccaagtca gtgcagagac accgttactg gaaaccatt      660
cttccacgga tgtgtagatg aactcacctg gttcttcgaa gaaaaatgtg gttggatagc      720
aggtttagct atggcgatat gcatgattaa cgtccttagt attgttttat ctacggtact      780
catccaggca ttgaaaaaag aagaagaagc atccgattca tacaggagat agatttagtg      840
agatagagat ataatgtagt aattagaatt taatgtatct tcaactaat tactttttct      900
ttagagatat acctgaaatt gtaaagaaca gaaaaattaa ataagaacca aaaactaaag      960
tgaaccaaca ataattgaac attccaaaat acactttttt tgtaagtta actaaacgac     1020
ataaatTTTT ctttttttaa gttttttatt gtttttttagt attataattt ggataaggtg     1080
tttttatatt aagtgtgtaa ttataaagtt tttttatagg acggaaccta aattatacag     1140

```

[0002]

tgctagtcaa aagtcctgtac cccacctcgt 1170

<210> 2

<211> 771

<212> DNA

<213> 玉米根萤叶甲

<400> 2

atgatgtcca aagtagacac acaaatgatg tccaaagcag acacacagga agatgcctcc 60

ttcgccaaat tggaaaatca gattgctatc atcaaatacg taatactctt taccaacgtt 120

ttgcaatggg ctctcgggtgc agcaatcttc gctctttgcc tttggctacg attcgaggag 180

ggcattcaag aatggctcca gaaattggat tcagaacaat tttacatcgg agtatatgta 240

cttatagtcg cttcactgat cgtcatgatt gtgtccttta taggatgtat tagtgccctg 300

caggagagta ccatggccct tttagtgtac atcggcaccc aagtgctcag ttttatattc 360

ggtttatccg gttcggcggt tcttctggat aacagcgcca gagattccca cttccaaccg 420

aggatccgag agagtatgcg acgtcttate atgaatgctc atcacgacca atccagacaa 480

acactagcca tgattcagga aaatgttggg tgctgcggag ctgatggcgc aacagactac 540

ctctctcttc agcagcccct tccaagtcag tgcagagaca ccgttactgg aaaccattc 600

ttccacggat gtgtagatga actcacctgg ttcttcgaag aaaaatgtgg ttggatagca 660

ggtttagcta tggcgatatg catgattaac gtccttagta ttgttttate tacgggtactc 720

atccaggcat tgaaaaaaga agaagaagca tccgattcat acaggagata g 771

<210> 3

<211> 4816

<212> DNA

<213> 玉米根萤叶甲

<400> 3

ctttgtttca aagtgcggta ctatcggttt cattttatat ctctttataa cgggtgctcgcg 60

agttttcttg tgaaaaatga tgtccaaagc agacacacag gaagatgcct ccttcgccaa 120

attggaaaat cagattgcta tcatcaaata cgtaatactc tttaccaacg ttttgcaatg 180

ggctctcggg gcagcaatct tcgctctttg cctttggcta cgattcgagg agggcattca 240

agaatggctc cagaaattgg attcagaaca attttacatc ggagtatatg tacttatagt 300

cgcttactg atcgtcatga ttgtgtcctt tataggatgt attagtgcc tgcaggagag 360

taccatggcc cttttagtgt acatcggcac ccaagtgctc agttttatat tcggtttatc 420

[0003]

cggttcggcg gttcttctgg ataacagcgc cagagattcc cacttccaac cgaggatccg	480
agagagtatg cgacgtctta tcatgaatgc tcatcacgac caatccagac aaacactage	540
catgattcag gaaaatgttg gttgctgceg agctgatgge gcaacagact acctctctct	600
tcagcagccc cttccaagtc agtgcagaga caccgttact ggaaacccat tcttccacgg	660
atgtgtagat gaactcacct ggttcttcga agaaaaatgt ggttggatag caggtttagc	720
tatggcgata tgcatgatta acgtccttag tattgtttta tctacggtac tcatccaggc	780
attgaaaaaa gaagaagaag catccgattc atacaggaga tagatttagt gagatagaga	840
tataatgtag taattagact ttaatgtatc ttcaactaaa ttactttttc tttagagata	900
tacctgaaat tgtaaagaac aggaaaatta aataagaacc aaaaactaaa gtgaaccaac	960
aataattgaa cattccaaaa tacacttttt ttgttaagtt aactaaacga cataaatttt	1020
tcatttttta agttttttat tgtttttttt agtattataa tttggataag gtgtttttat	1080
attaagtgtg taattataaa gtttttttat aggacggaac ctaaattata tagaatcata	1140
caataaacta ttgtctgctt attgaatttg gaaaataaac atttggtata tattaanaat	1200
aataatatat ggcttagtga ggaactaatg aaaacgtcta tacatttttg aatttaatac	1260
caacagatat tgtaattatt aattttaatt aatcaactcc aagtcaacat ctggaaagca	1320
atagaaatta aagtaattaa ctaactagta acattctage aacctgtaca tgtggttgta	1380
ttactctggt ttgacattga caaaactage tttgtgatca gttatctcta gcagtaataa	1440
actctagctg tattttgttt tatatatttg tccaacaaaa aaaattttca accaacattc	1500
ctcttgaaat aaaaagacta gtagcagaaa aacgaaaagc cagatcaatt tggcaaagaa	1560
ctcacagacc agacgacagg acagtttata ataacaaaac aagaaactta aaaacagctc	1620
tagaacagat gagaaacaac tcatttgaaa actatgtatc aaacctttcg cgtcaagata	1680
actctatctg gaaaccaatc aaaaacaaaa ataaaccaat aaatacttca cctccaattc	1740
ggaaaaaacac attaccacca ggaccatggg caaaaagcaa caaagaaaaa gctgatttat	1800
ttgctgaaca tctaactgaa gtcttcaagc cacacgacaa tgaccaagta caagaagtag	1860
agcaggaact agccttacca attaatcaac gagagcgact aactttaatt acaccgaagg	1920
agatcaaaga tgaaattaat catttgaatg aaaagaaggc accaggcact gatctcataa	1980
cagcaacaat gctaaaacaa cttcctaaaa aaggataat gaagttattg tacatattaa	2040
atgcaatctt aagacttaat tattggccta tctactaaa aattgcccac gtaattatga	2100

[0004]

taccgaaacc	tggtaaagct	ttaacggatg	tttcatcata	ccgccaata	agtctactgc	2160
caataatgtc	aaaacttctt	gaaaagctgt	tacttaaaag	aattatgagc	gacctagaat	2220
tccaaaactg	gatcccagaa	caccaatttg	gattccgaca	agctcattct	acagtgcaac	2280
aatgccatcg	catatcaaat	gtaattaata	gagcattgga	caataaaca	tattgcacag	2340
cagcctttct	ggacatcagc	caagcatttg	ataaggatg	gcaccagga	ttactttata	2400
aaatcaaaaa	atccctaccc	aacaaatact	ttgacttatt	aaaatcatat	ctaaatcaca	2460
gagaatttga	aactaaagtg	gaggatgaac	tatcaaaccg	taacaaaatt	caatcaggag	2520
tcccacaagg	tagtatactg	ggtccacttc	tttatgtact	gtacacatcc	gatttaccaa	2580
cctttccaca	aaccacaatt	ggagctttcg	ctgatgacac	agcaatattt	gcaactgaag	2640
agaattaaac	agctgcagtc	ttaaaacttc	aagaacacct	agaccaaatt	gtacagtggg	2700
taaagaaatg	gaagataaaa	gctaataaaa	ctaagtcaac	acataatact	ttcacactaa	2760
gaaaagacca	atgcccnaat	attagcctta	atcaagtcaa	cataccccaa	cagaatatcg	2820
tcaaatacct	ggggcttcat	cttgattcta	aataaactgg	aaacaacaca	ttttaaagat	2880
gaataaaca	attgagttga	gagtgaaga	aattaattgg	cttataggtc	gaaaatcttg	2940
actctcaatt	gagaacaaac	tgctaattta	taaaacagtc	atcaaaactta	tatggacgta	3000
cggcatagaa	ctatggagtt	gtgccagcaa	atcaattaca	aaaattatcc	aaagaactca	3060
atcaaaaatt	ctacgcacca	tcgcaaatgc	cccgtggtac	atttccaacc	aaacccttca	3120
tacagaccta	aacatcccgt	tagtcagcac	agtaattcaa	gaaagagcca	acagacacca	3180
cgagaaatta	gaagaccacc	ccaaccaatt	aatattacca	ttactgcagc	cactaaaca	3240
cagaagattg	cgaagattaa	agttattgta	cttgttatca	aattaactca	tagaatatgt	3300
aattctgatt	gtaataaat	gcttacaaaa	aaaaagaagc	ttcgaggcca	aatatttcaa	3360
catccaccaa	agtttctaga	caaataaaga	atattccaag	aaaaaataca	atactataca	3420
ttttttttaa	aatgctttca	aatatttctt	attttcta	taatgaaaca	tacaaaattc	3480
acacaggtat	aacataaat	gatgaaaaca	gatattactt	aattaatacg	tttataacga	3540
taatttccac	ctccactagt	gtcatctctt	tttgtttgcg	aatgtattat	gtttcccatc	3600
ttttgagcta	ttttgcggtt	aattagcgcg	ctcatcactg	tataaaaaaa	acagttggtt	3660
ttagaactct	ttagcgacgt	atagtataaa	ataatattta	tggattactg	tcgaaggcca	3720
tcatgatacc	aaaaaagaaa	atgaatctgc	tgatttttct	agtgacaata	ttgggtatga	3780

[0005]

atccagtatg aatctgtctg ttgagtttat tccgcctagt ttaaaaacag ggttatagtg	3840
tgaattaata aaacttacac tctaattatc atgtcctaca aataaacaaa actatcttga	3900
gctgacaact aggaaaacat gacctgcaac ttttattgca accaatgttg tttaaactgtg	3960
gtattcccca ccatccaact tctcatcaga aataatatta aacaaccact tagcagtgtc	4020
gtcttcaacc cacaacaaat ctatcagtaa tccattgaag attcctaaga caacaccacc	4080
aagaacatcc attatgtaat gtctgttcat taagatcctg ctgaccgaaa ctgatatgct	4140
ccaaaccag agaaaaggta ttaaaagaaa gtttaaaggc catagtttgg tgtaaaagta	4200
tgctacaaat atagccctac tagcatggcc tgaaggaaaa ctaaatacgt ccacatattt	4260
ggcgagagga tcatctttga tgttttttgg tggccgcttg cgctgaagt aagctttggc	4320
tactgtact agtattatat cagtagtaag acctaaaage atgtttactt gcatttggac	4380
tagattagga ttattaaata gccagctaaa ggcaatccaa aatgcaaacc atggaattcc	4440
atggcaggaa atttctaaag ctttacaatg aactctataa gcactaaat ctaagatttt	4500
gtagcccat gtaagaaact cgtttgtaat atatgcatcg tatttcaata tttttgtaa	4560
tgctgggtgga actctacttt taccctccga cattttgcag tatataatgt aaagtccagc	4620
caagacttat ctaaaaaatt aaatattaat gagtacata gatttaaaat atcctttttg	4680
ttttattctg atttgcattg aacttgaaat ttgaacactg acagtttaa agtaaggtta	4740
tgctcgcttt gactctgacc atagatatat aatactctag attgcgcct gcgatcttaa	4800
aatgggtgac ggttgc	4816

<210> 4
 <211> 747
 <212> DNA
 <213> 玉米根萤叶甲

<400> 4	
atgatgtcca aagcagacac acaggaagat gcctccttcg ccaaattgga aatcagatt	60
gctatcatca aatacgtaat actctttacc aacgttttgc aatgggtctc cggtgcagca	120
atcttcgctc tttgcctttg gctacgattc gaggagggca ttcaagaatg gctccagaaa	180
ttggattcag aacaatttta catcggagta tatgtactta tagtcgcttc actgatcgtc	240
atgatttgtt cctttatagg atgtattagt gcctgcagg agagtacat ggccctttta	300
gtgtacatcg gcaccaagt gctcagtttt atattcggtt tatccggttc ggcggttctt	360

[0006]
 ctggataaca ggcagagaga ttcccacttc caaccgagga tccgagagag tatgcgacgt 420
 cttatcatga atgctcatca cgaccaatcc agacaaacac tagccatgat tcaggaaaat 480
 gttggttgct gcggagctga tggcgcaaca gactacctct ctcttcagca gccccttcca 540
 agtcagtgca gagacaccgt tactggaaac ccattcttcc acggatgtgt agatgaactc 600
 acctggttct tcgaagaaaa atgtggttgg atagcaggtt tagctatggc gatatgcatg 660
 attaacgtcc ttagtattgt tttatctacg gtactcatcc aggcattgaa aaaagaagaa 720
 gaagcatccg attcatacag gagatag 747

<210> 5
 <211> 1487
 <212> DNA
 <213> 巴氏根叶甲

<400> 5
 taatttcaaa gatctatgct cagtaagctt tgtttcgaag tgcggtacca tcggtttcat 60
 tttatatttc tgtataacgt tgtecgagct tttcttgtga aaaatgatgt cgaaagtaga 120
 caaagatgaa gacgcctcct tcgcaaaatt ggaaaatcag attgctgtca tcaaatcgt 180
 aatactcttt accaacgtct tgcaatgggc tctcgggtgca gcaatcttcg ctctttgcct 240
 ttggctacga ttcgaggagg gcattcaaga atggctccag aaattggatt cagaacaatt 300
 ttacatcgga gtatatgtac ttatagtcgc ttcaactgac gtcattgattg tgctctttat 360
 aggatgtatt agtgcctcgc aggagagtac tacggccctt ttagtgatac tcggcaccca 420
 agtgcctcagt tttatattcg gtttatccgg ttcggcggtt cttctggata acagcgccag 480
 agattcccac ttccaaccga ggatccgaga gagtatgca cgtcttatca tgaatgctca 540
 tcacgaccaa tccagacaaa cactagccat gattcaggaa aatggttggt gctgcgagac 600
 tgatggcgca acagactacc tctctcttca acagcccctt ccaagtcagt gcagagacac 660
 cgttactgga aaccattct tccacggatg tgtagatgaa ctcacctggt tctttgaaga 720
 aaaatgtggc tggatagcag gtttagctat ggcgatatgc atgattaacg tccttagtat 780
 tgttttatct acggtactca tccaggcatt gaaaaaagaa gaagaagcat ccgattcata 840
 caggagatag atttaattggg atagagatat aatgtagtaa ttagacttta atgtatcttc 900
 aactaaatta ctttgtcttt agaggtatac ctcaaatagt aaaaaacagg aaaattaat 960
 aagaacgaaa aactaaatta accaacaat tgaacattcc aaattactct tttttgtta 1020
 agtgaactaa acgacataaa ttttaattt tttgagttct ttattgtatt tttagtatta 1080

[0007]

tactttggat aaggtgtttt tatagtaagt gtgtaattat taaattattg tataggacgg	1140
aacctaaatt atatagagac atacaacaat aaacttattt ctgcttactt aattatttgg	1200
aaaataaaga ttgggtatgt attaaaaata ataatttctg gcttagtgag gaataattat	1260
tgaaaacttc tatatatattt tgaatttaat accaacagat attctaattt ttaattttat	1320
ttaatcaact tcaactcaac atctagaaaa caataaaaaat taacgtaact aacaactaat	1380
aacattctag caacctatac atgtggttgt attactctgt tttgacattg acaaaaactag	1440
ttattgttcg tccgctataa cttttcccat gcggtacgat tcattca	1487

<210> 6

<211> 747

<212> DNA

<213> 巴氏根叶甲

<400> 6

atgatgtcga aagtagacaa agatgaagac gcctccttcg caaaattgga aaatcagatt	60
gctgtcatca aatacgtaat actctttacc aacgtcttgc aatgggctct cgggtcagca	120
atcttcgctc tttgcctttg gctacgattc gaggagggca ttcaagaatg gctccagaaa	180
ttggattcag aacaatttta catcggagta tatgtactta tagtcgcttc actgatcgtc	240
atgatttgtt cctttatagg atgtattagt gccctgcagg agagtactac ggccctttta	300
gtgtacateg gcaccaagt gctcagtttt atatteggtt tatccggttc ggcggttctt	360
ctggataaca gcgccagaga ttcccacttc caaccgagga tccgagagag tatgcgacgt	420
cttatcatga atgctcatca cgaccaatcc agacaaacac tagccatgat tcaggaaaat	480
gttggttgct gcggagctga tggcgcaaca gactacctct ctcttcaaca gcccttcca	540
agtcagtgca gagacaccgt tacttgaaac ccattcttcc acggatgtgt agatgaactc	600
acctggttct ttgaagaaaa atgtggctgg atagcaggtt tagctatggc gatatgcatg	660
attaacgtcc ttagtattgt tttatctacg gtactcatcc aggcatgaa aaaagaagaa	720
gaagcatccg attcatacag gagatag	747

<210> 7

<211> 3691

<212> DNA

<213> 黄瓜十一星叶甲

<400> 7

ccggttttat tatacatctc tgtataacgt tttcgcgagt tcctaacccc ctttttttgt	60
---	----

[0008]

gaaaaatgat tgggaaagta gacaaagagg aagatgcttc cttcgccaaa ttagaaaatc	120
agattgcgat catcaaatac gtaatactat ttaccaacgt cttgcagtgg gctctcggtg	180
cagcaatctt cgctctttgc ctttggctac gattcgagga gggcattcaa gaatggctcc	240
agaaattgga ttcagaacaa ttttacatcg gagtatatgt acttatagtc gcttcaactga	300
tcgtcatgat tgtgtccttt ataggatgta ttagtgcctt gcaggagagt accatggccc	360
ttttagtgtg catcggcacc caagtgtca gttttatatt cggtttatcc ggttcggcgg	420
ttcttctgga taacagcgcc agagattccc acttccaacc gaggatccga gagagtatgc	480
gacgtcttat catgaatgct catcacgacc aatccagaca aacactagcc atgattcagg	540
aaaatgttgg ttgttgcgga gctgatggcg caacagacta cctacatctc caacagcccc	600
ttccaagtca gtgcagagat acagttactg gaaatccttt cttccacgga tgtgtagatg	660
aactcacctg gttcttcgaa gaaaaatgtg gttggatagc aggtttggcc atggcgatat	720
gtatgattaa tgtccttagt attgttttat ctacggtact catccaggca ttgaaaaaag	780
aagaagaggc ttccgattca tatagaagat agatttaatg ggataaatat atcatgtagt	840
tattacgttt agtgtatctt taattgaatt actttgtatt tggatatata cctcaaatag	900
taaaaaacag gaaaatgaaa taagaaataa aactaaatt gaaccattaa gaaaattgaa	960
acatctaaga taaactgttt ttgttaagtt agctaaatga cataaatttg gagtttttaa	1020
gttctttatt atatttgtaa tattagattt tggataaggt tgttttatac gtggtgttaa	1080
aaagtcttgc atcaccttac caaatacatg aaaatagaag ttttaaggcat ttacctttaa	1140
tattttttaa ccatttacta tctacatcaa acaagcactt aatcacaata atataaaatt	1200
gaaacacagc aaaaattttg attaataaaa aatgtagtt cggaaaatgt tttattcaat	1260
attacaaaaa gtaggctatt tacatcaaga cgatattgta catcacattg aagtaattta	1320
aactaatttt aatatttagt tggccagccc ttgtttttaa taactagttc acatcttttg	1380
ggcatagaat ttattaattt ttgcagttcc tccatggaat tacagtgatg ccaagcgtgg	1440
attagagatt caattaattt cgttttcttt gtgggtttgc ttttgaaaat gatgtttgat	1500
attcttggcc acaaattctc ggtaaaaatta aggtccgggg attgcgctgg ccagtcacac	1560
ctatctattt cattactctc catccaagca ttatcatcct gaaaaatata tttttcttcg	1620
ccaaacaggt attttccact acgcagcacc ttattctgta gtacctcaat gtatttggta	1680
gcattcatca tcccaaagac aacgttttagg cgaccaattc ctcgagcgga catgcaacca	1740

[0009]

catatcataa cggaggttgg atgtttaatt gtgggaagaa cacattttga agaaaattct	1800
tcactaggaa atcttctgac gtaggcattt ccagcatgat tattaatggt gaaagtggat	1860
tcatcattaa atagtacact ctgccactgc tctgctgtcc agattcgatg ttccttggcc	1920
cattgcaaac agtgcaatcg ttgcttttct gaaagcagtg gtttcttccg tgccttacat	1980
cctctaagtc caaaactaat cagtcttttt ttcacagtgg aaatgcatac gcttacatct	2040
gtaaatttag accacagctt cgtcaattgg gtggtattaa ggcttctgtc tgccagactt	2100
gttctttctta acgcagcctc atcccgaaca gaagttttct ttggctggcc actacgcggt	2160
ctgtcttcga tttttccttg ttcagcatac ttctcaatga ctttgattac tgcagattga	2220
ttacagttta ctgcggatgc tatttcgcga ttaaatttgt ctttttatg atgaaaaata	2280
atctcaaac gcttttcgtc caataattta gtttgtttgg tctgggatga tttttgacc	2340
tttttatcaa aaatcaaat aagaataaat gtgttagggt gacaacagtg tttatatagt	2400
agtcaaaaata tgtggcaaat ttgtcattaa catttaattt aatagtactt taacgactta	2460
ataatcacct cataattttc tcggattatg ggaaatcct tcaatcagac tttttaatc	2520
tttttcgtag aattttgagc tagtaattaa aaaaacatta gtaagtatac cgataatgct	2580
atctacaagt acaaacttaa aatgaattag cgaaaatata caaaaaact tgtgttaaac	2640
atcaaaaagc tataaggcgc ttaggtgatg caggactttt gaacaccact atagttagta	2700
tttttaactt tattgtataa gacggaacct aattatataa aaacgtatta cacgtacacg	2760
tacactaatt agaaaataaa gattgtgaat gttatataaa taataatcta ctgcttagtg	2820
acgaattaat aaatagttag ttatgtataa ttttttttac atttattacc aacagattaa	2880
actgcttaca ttattaataa tactgtaaaa ttatatatgg tatatatattt taaatagtgg	2940
ctttgatcct tttatacact aaatagaact gttttggttt acaaatatgt atttaccgat	3000
gacaaaactt tatccattat ttcatttttag tagaaattta tagcaataat ataacatcta	3060
ccataaacca taacactatt ttaattttca cagaatataa tatatttgaa acgttttggt	3120
aaaacatcag cttctaataa aacgaaaaaa taataaaaaa ctagcttact ctttttaggtg	3180
ttaacaacct gtgcatatta tggttgtatt actccttgta actgaataac ccctaaagac	3240
agtaacagtg atcctgcaat attttgttta tttccagaat tatgtttgag ttttgcaatc	3300
cattatatcc agcaattcta tttttttttt gtttatgtaa attttcaaag ttacagttga	3360
attaaagatt tttgtacctt aattgtatgc ctgtatagaa ttgttttttc cattgacaaa	3420

[0010]

agtagctggt ctcagttaat cgcttttttt atagatttgt tatgtatttg gcatattatt 3480
 ttataaaact tattatgtag gtatttcttt gacatatata gctttatttt attttaagta 3540
 ttgcccata gaattgttgg ttattccag agaaaatctg atgttttagct agcttagtag 3600
 attgacttaa attctaaaat tattttatta taagtaccct aagtatgtaa atcgtaagca 3660
 cgacgtttga tataatggta gaaaaataac a 3691

<210> 8

<211> 747

<212> DNA

<213> 黄瓜十一星叶甲

<400> 8

atgattggga aagtagaca agaggaagat gcttccttcg ccaaattaga aaatcagatt 60
 gcgatcatca aatacgtaat actatttacc aacgtcttgc agtgggctct cgggtcagca 120
 atcttcgctc ttgcccattg gctacgattc gaggagggca ttcaagaatg gctccagaaa 180
 ttggattcag aacaatttta catcgagta tatgtactta tagtcgcttc actgatcgtc 240
 atgatttgtt cctttatagg atgtattagt gccctgcagg agagtaccat ggccctttta 300
 gtgtacatcg gcacccaagt gctcagtttt atattcggtt tatccggttc ggcggttctt 360
 ctggataaca gcgccagaga ttcccacttc caaccgagga tccgagagag tatgcgacgt 420
 cttatcatga atgctcatca cgaccaatcc agacaaacac tagccatgat tcaggaaaat 480
 gttggttggt gcggagctga tggegcaca gactacctac atctccaaca gcccttcca 540
 agtcagtgca gagatacagt tactggaaat cctttcttcc acggatgtgt agatgaacte 600
 acctggttct tcgaagaaaa atgtggttgg atagcaggtt tggccatggc gatatgtatg 660
 attaattgct ttagtattgt ttatctacg gtactcatcc aggcatgaa aaaagaagaa 720
 gaggcttccg attcatatag aagatag 747

<210> 9

<211> 1243

<212> DNA

<213> 十字花科条跳甲

<400> 9

cagtaaatag gtggggcaaa attaatctcg caagaaccaa gactctctag ttagcagcgc 60
 gacgttctg tctgagcttt tcttgcgaca aagtgcggta tcggtttcct caacttcttg 120
 tcttccgcgt ttctgtgta acttttcttt tcatcggcgc gtgtgtgtat agcgttccgc 180

[0011]

tttgttgcgg cgaaatggca gggaaaggag acggcaaagg cgaggcgagt atactcaaat	240
tggaaaatca gattgccgtc atcaaatacg tgatactett tgccaacgtc ttgcaatggg	300
ccctcggcgg cgcaatcttt gccctttgcc tttggetgag gttcgaggag ggcattccaag	360
aatggctgca gaaattggat tccgaacaat tttacaacgg agtttatgta cttatagtcg	420
cttcgctgat cgtcatgatt gtgtccttte tgggatgtat tagtgcctg caggagaata	480
cggtgacct tttggcctac atcggcacgc aagtgetgag cttcatatc ggtttagccg	540
ggtcggctgt tcttctggat aacagcgcca gagattceca cttccagccg aggattcggg	600
agagcatgcg acgtcttata atgaatgctc atcacgagcc atccagagta acgctcgcca	660
tgattcagga aaatatcggc tgctgcggtg ctgacggagc agaagattac ttggcgtgc	720
aacagccatt accgagccaa tgcagggaca ccgtcaccgg taatccctat ttccacggat	780
gcgtcgacga gctcacgtgg ttcttcgagg agaagtgcgc ctggatagcc gcattggcca	840
tgtgcatttg cttcttcaac gtttttaaca tcgtgettte cactgtgctg atacaggcgt	900
tgaagaagga agaggaacag gcggattctt acaggaatta ggggtagttt tatatttaa	960
tttagtttta atttcggtaa ttatgtattt tattacgatt agtacgtacg gaaaacaac	1020
attaaaataa acaatgcttt tcatcataat taaaatcacc acaaaggaa tttttatac	1080
ctcgttttta tgacaattaa agtaattttc taaaattttc cacgaatgaa ttttattaat	1140
aaatatgtta aaatgaaaat tttgtatgta cttatatact agtgtttatt aattttaga	1200
ttgtagataa ttaaaaagta ttttgtacct accaataaac gtt	1243

<210> 10

<211> 747

<212> DNA

<213> 十字花科条跳甲

<400> 10

atggcagggg aaggagacgg caaaggcgag gcgagtatac tcaaattgga aaatcagatt	60
gccgtcatca aatacgtgat actctttgcc aacgtcttgc aatgggccct cggcggcgca	120
atctttgccc tttgcctttg gctgaggttc gaggagggca tccaagaatg gctgcagaaa	180
ttggattccg aacaatttta caacggagtt tatgtactta tagtcgcttc gctgatcgtc	240
atgatttgtt cctttctggg atgtattagt gccctgcagg agaatacggg gacccttttg	300
gcctacatcg gcacgcaagt gctgagcttc atattcggtt tagccgggtc ggctgttctt	360

[0012]

ctggataaca ggcagagaga ttcccacttc cagccgagga ttcgggagag catgcgacgt	420
cttatcatga atgctcatca cgagccatcc agagtaacgc tcgcatgat tcaggaaaat	480
atcggctgct gcggtgctga cggagcagaa gattacttgg cgctgcaaca gccattaccg	540
agccaatgca gggacaccgt caccgtaat ccctatttcc acggatgcgt cgacgagctc	600
acgtggttct tcgaggagaa gtgcgcctgg atagccgcat tggccatgtg catttgcttc	660
ttcaacgttt ttaacatcgt gctttccact gtgctgatac aggcgttgaa gaaggaagag	720
gaacaggcgg attcttacag gaattag	747

<210> 11
 <211> 1250
 <212> DNA
 <213> 黄曲条跳甲

<400> 11	
caaatagggtg gggcaaaatt aatttcgcaa gaaccaagag actctctggt atagttagaa	60
gcgcgacgtt cccgtctgag cttttcttct tcccacaaa gtgcggtatc gttttcctcg	120
actttctgtc tccggcgttt ctgtgttcaa ctttctttcc atcgggggcg cgcgtgtgtg	180
tacagctttg ctcggtttg ttgcggcga atggcaggga aaggagacgg caaaggcgag	240
gcgagcatac tcaaattgga aatcagatt gccgcatca aatacgtgat actcttcgcc	300
aacgtcttgc aatgggcct cgccggcgca atctttgcc tttgcctttg gctgaggttc	360
gaggagggca tccaagaatg gctgcagaaa ttggattccg aacaatttta caacggagtt	420
tatgtactta tagtcgcttc gctgatcgtc atgattgtgt cctttctggg atgtattagt	480
gccctgcagg agaatacggg gacccttttg gcctacatcg gcacgcaagt ggtgagcttc	540
atattcgggt tagccggatc ggctgttctt ctggataaca gcgccagaga ttcccacttc	600
cagccgagga ttcgggagag catgcgacgt cttatcatga atgctcatca cgagccatcc	660
agagtaacgc tcgcatgat tcaggaaaat atcggctgct gcggtgctga cggagcagat	720
gattacttgg cgctgcaaca gccattaccg agccaatgca gggacaccgt caccgtaat	780
ccctatttcc acggatgcgt cgacgagctc acgtggtttt tcgaggaaaa gtgcgcctgg	840
atagccggat tggccatgtg catttgcttc ttcaacgttt ttagcatcgt gctttccact	900
gtgctgatac aggcgttgaa gaaagaagaa gaacaggcgg agtcttacag gaaataaggg	960
tagtatttta ttgtagttag taaaagtatt tttattttat ttaagtttgt ttaatattca	1020
gcaattattt tgtaagtgc agtacgtata aacattaaaa taaacaatgc tttttaaaat	1080

[0013]

aattacaatc atcacaaacg gactttttta tacctcgttt tttatgacaa ttaaagtaat 1140
 tttctaaaat ttgacagaa tgaattttat taataattac gttaaaatga aaatgttcta 1200
 tgtacttatg tagtgtttat tgtagattgt agataattaa aaagtatfff 1250

<210> 12
 <211> 747
 <212> DNA
 <213> 黄曲条跳甲

<400> 12
 atggcagggg aaggagacgg caaaggcgag gcgagcatac tcaaattgga aaatcagatt 60
 gccgtcatca aatacgtgat actcttcgcc aacgtcttgc aatgggccct cgccggcgca 120
 atctttgccc ttgacctttg gctgaggttc gaggagggca tccaagaatg gctgcagaaa 180
 ttgattccg aacaatttta caacggagtt tatgtactta tagtcgcttc gctgatcgtc 240
 atgatttgtt cctttctggg atgtattagt gccctgcagg agaatacggg gacccttttg 300
 gcctacatcg gcacgcaagt ggtgagcttc atattcggtt tagccggatc ggctgttctt 360
 ctggataaca gcgccagaga ttcccacttc cagccgagga ttcgggagag catgacgacgt 420
 cttatcatga atgctcatca cgagccatcc agagtaacgc tcgcatgat tcaggaaaat 480
 atcggctgct gcggtgctga cggagcagat gattacttgg cgctgcaaca gccattaccg 540
 agccaatgca gggacaccgt caccggtaat ccctatttcc acggatgcgt cgacgagctc 600
 acgtggtttt tcgaggaaaa gtgcgcctgg atagccggat tgccatgtg catttgcttc 660
 ttcaacgttt ttagcatcgt gctttccact gtgctgatac aggcgttgaa gaaagaagaa 720
 gaacaggcgg agtcttacag gaaataa 747

<210> 13
 <211> 519
 <212> DNA
 <213> 赤拟谷盗

<400> 13
 atgtcgacca aagacagtga gaaggagaaa acgtcacgtg catcaaagtt tccacttgac 60
 ttaaactcgg agctgtatat cggagctcag gttttgggct tcatctttgg actggccgga 120
 gctgcagtcc tgctggacaa cagegcaagg gactcgcatt tccagccgaa aatcagggaa 180
 agcatgcgaa aactcatcat caacgccat cacgagccgt ccagacaagc cttagccatg 240
 attcaagaag gcattggctg ctgcggcgct gatggggcca aggactacct ttcgctgaag 300

[0014]

cagccgttgc cgaacgagtg ccgcgacagt gtgaccggaa atccgttctt ccatggctgc	360
gtggacgaat tgacgtggtt ttctgaacag aaatgcgcct ggggtggccgg ccttgccatg	420
acaatctgct tcttttacgt cataaacatt gtcttggtta cgattctgag ggcggctctg	480
gagaaagaag aggagcaatc ccaaactac agaaaatag	519

<210> 14
 <211> 519
 <212> DNA
 <213> 赤拟谷盗

<400> 14	
atgtcgacca aagacagtga gaaggagaaa acgtcacgtg catcaaagtt tccacttgac	60
ttaaactcgg agctgtatat cggagctcag gttttgggct tcatctttgg actggccgga	120
gctgcagtcc tgctggacaa cagcgcaagg gactcgcatt tccagccgaa aatcagggaa	180
agcatcgcaa aactcatcat caacgcccat cacgagccgt ccagacaagc cttagccatg	240
attcaagaag gcattggctg ctgcggcgct gatggggcca aggactacct ttcgctgaag	300
cagccgttgc cgaacgagtg ccgcgacagt gtgaccggaa atccgttctt ccatggctgc	360
gtggacgaat tgacgtggtt ttctgaacag aaatgcgcct ggggtggccgg ccttgccatg	420
acaatctgct tcttttacgt cataaacatt gtcttggtta cgattctgag ggcggctctg	480
gagaaagaag aggagcaatc ccaaactac agaaaatag	519

<210> 15
 <211> 1624
 <212> DNA
 <213> 马铃薯叶甲

<400> 15	
ctttgtttga tcagtgataa attatcttat cagctgtaaa taggtgaggc agaactaata	60
cgaaataata cgtacggcgt tcagtgttct caatattaca acaaagtgcg gtttcgggtg	120
gctttaacac gttcagacgg ttcagtgatt gaggatattc ttgtttgctt tgtcgtggaa	180
gatggcagga aaggagagcg gagagggatga gggaaacatc ctcaagttgg agaatcaaat	240
tgccgtcatc aagtatgtgc tgatatttac gaatatcttg tcatggatga ctggtgcgtg	300
cattttcgct ctgtgcttgt ggttgagatt tgaacctggc attcaagaat ggctccaaaa	360
attgaacgca gaagttttct acagtgggtt ctacgtcttg attttcgccg ctctactggt	420
tatgattgta tccttcctgg gttgtataag tgccttcaa gaagctgcat tcaccatatt	480

[0015]

catttacatc ggaactcaag ttgccggctt tatatccggt ctgtctggag cgtctgtact	540
gctggataac agcgctagag attcccattt ccagcccagg atccgagaaa gtatgcgacg	600
acttatcatg aatgcccac acgaggaate cagacaaaca ctgccatga ttcaggagaa	660
tattgcttgc tgtggagctg atggtgcaca tgattacctg tctttgcagc aaccgctacc	720
aagcacttgc agagatacag ttactggaaa tcccttttat catggatgcg ttgatgagct	780
gacttggttt ttcgaggaga aatgcccgtg ggtggccgga cttgtcatga tactttgctt	840
gatccaagta ataaacacag tcctgtcaat tatattcett caagctctca agaaagaaga	900
gggacaagct gatacataca gaaaatgaag tgcacattcg cttttacgat ttttgttgtt	960
tcatttttgc atacttgc attcaccata gtcgtatttc aaactgatta atgtttgagt	1020
ttgtagcgta ggtaatagtt tacttaagag tttcattcac atttgttagc aattccgtta	1080
gccgaagaag aaatattctc gagttttggt gggtagttac tgaaaagttt attttatggt	1140
cagcccagac taacgacata tatatatatt atataacca acttattttt tategaatca	1200
ttcgcagttg caagaacttg aaagcatttc cagatatgcc gtaaatttcg attaacatta	1260
taaaatcact agtctgcata atacataaac aattatattt cacctaataga tgtttgtcta	1320
tgaatccatg ttatggcgca gataaaatcg ttttatcata attatgtata gccactgagt	1380
tcatatccc attgaaatga atatgttata tttgttatca tttgattcac atgaattcac	1440
aaatgttcca ttcataagct ggattcaatg caatgttcat agaattcate ctatatatta	1500
gtttggttgt cacatagttg aatcaaagaa ttgatttgaa ataatctcca attttaacat	1560
gttcatgtag ttatattatt ggtacacatt gtatatcate aacctgaaa gttcacagtt	1620
tttt	1624

<210> 16
 <211> 747
 <212> DNA
 <213> 马铃薯叶甲

<400> 16	
atggcaggaa agggagacgg agagggtgag ggaaacatcc tcaagttgga gaatcaaatt	60
gccgtcatca agtatgtgct gatatttacg aatatcttgt catggatgac tgggtcgtgc	120
atcttcgctc tgtgcttgtg gttgagattt gaacctggca ttcaagaatg gctccaaaaa	180
ttgaacgcag aagttttcta cagtggggtc tacgtcttga ttttcgccgc tctactggtt	240

[0016]

atgattgtat ccttctggg ttgtataagt gcccttcaag aagctgcatt caccatattc	300
atttacatcg gaactcaagt tgccggcttt atattcggtc tgtctggagc gtctgtactg	360
ctggataaca gcgctagaga ttcccatttc cagcccagga tccgagaaag tatgcgacga	420
cttatcatga atgccccatca cgaggaatcc agacaaacac tcgccatgat tcaggagaat	480
attgcttgct gtggagctga tgggtcacat gattacctgt ctttgcagca accgctacca	540
agcacttgca gagatacagt tactggaaat cccttttate atggatgcgt tgatgagctg	600
acttggtttt tcgaggagaa atgcggctgg gtggccggac ttgtcatgat actttgcttg	660
atccaagtaa taaacacagt cctgtcaatt atattccttc aagctctcaa gaaagaagag	720
ggacaagctg atacatacag aaaatga	747

<210> 17

<211> 1085

<212> DNA

<213> 墨西哥豆瓢虫 (*Epilachna varivestis*)

<400> 17

gcgatttcgt cgttctaaat ttttatctac aaaacatcga atagtgaaag tgaaaaatgg	60
ctggcacggg ggaggaagt ggccgagcgg ccgttcaaaa attcgagaat catatgaaca	120
tcataagta ttcttactc ttacgaatg ccttcgaagt gattctaggt atttgtatcc	180
tgatcctctg tttttggctg agatatgaag atggcgttta cgaatggctg gacaagctta	240
atgctctgtc attttatgcc ggtgtctata tccttattgt atctggctc ttgattattg	300
gagttgctgt atttggttgc gtcacagcta tggcagaaaa ccagttcttt cttctactgt	360
acattgcaat tcaagcattg gctttcatac ttagtttggtg tggcgcaaca attcttctgg	420
gtaacagcgc acgagattcc agttttcagc caatggtccg agaaagtatg agaaacttga	480
taatgcaagc tcaactatgaa cccgcgagac agagtttaca actcatccag gaaaacatcg	540
gttgctgcgg cgcagatggc gcgaaagatt atctaaattt gaaccatcca ctaccaaatg	600
agtgcagaga cacggtgacg ggaaatccat tctttcacgg ctgtgtcgac gaactgacgt	660
ggttcttcga aagcaagtgc aactgggcag ctggacttgt attgacaata tgccctgcttc	720
atgtcggttaa tgtggtcttc gcgatcattt tcattcaggg aatgaagaag gagcagaagt	780
cactctacta attcttcttg tattcaaate gaacttgcatt actgcaggaa aactcttttt	840
atatgtttcc gactatatac caaattggat caaattcaaa aagtgttttt gttatatatg	900
cactttttct cagaatttga ttggttgtaa aatagaaaat aatagatga aactgatgaa	960

[0017]

aatagttcac agttgtgaat atatittaaa aatittgtga gtttccaccc aataatatac 1020
 acaaactcca tatgcagcaa cagatcaaaa ggacagattt ttattattta acgttttctg 1080
 gaata 1085

<210> 18
 <211> 735
 <212> DNA
 <213> 墨西哥豆瓢虫

<400> 18
 atggctggca cgggggaggg aagtggcgca gcgccgctt c aaaaattcga gaatcatatg 60
 aacatcatca agtattctct actcttcacg aatgccttcg aagtgattct aggtatttgt 120
 atcctgatcc tctgtttttg gctgagatat gaagatggcg tttacgaatg gctggacaag 180
 cttaatgctc tgtcatttta tgccggtgtc tatatcctta ttgtatctgg tctcttgatt 240
 attggagtgt ctgtatttgg ttgcgtcaca gctatggcag aaaaccagtt ctttcttcta 300
 ctgtacattg caattcaagc attggcttcc atacttagtt tgtgtggcgc aacaattctt 360
 ctgggtaaca gcgcacgaga ttccagtttt cagccaatgg tccgagaaag tatgagaaac 420
 ttgataatgc aagctcacta tgaaccgcg agacagagtt tacaactcat ccaggaaaac 480
 atcggttgct gcggcgcaga tggcgcgaaa gattatctaa atttgaacca tccactacca 540
 aatgagtgca gagacacggt gacgggaaat ccattcttcc acggctgtgt cgacgaactg 600
 acgtggttct tcgaaagcaa gtgcaactgg gcagctggac ttgtattgac aatatgcctg 660
 cttcatgtcg ttaatgtggt cttecgatc attttcatc agggaatgaa gaaggagcag 720
 aagtcactct actaa 735

<210> 19
 <211> 1004
 <212> DNA
 <213> 十二斑褐菌瓢虫

<400> 19
 ttatttcate acattgtatt aacgtgtaat ctagagataa gattccaatg ttgatagcct 60
 cctaattagg cagtacaagt ttcgtcgttg tgtggaaaag tgtttcgaaa aaaaaacaat 120
 gacaggaaac ggccaaggga gtggtgcggc agcagtgcaa aaatttgaaa atcatatgaa 180
 cattattaag tataccatgc ttttcacgaa tgctgccgaa gtgattttag gtatttgcac 240
 tctcgtcgta tgcttctggt tgaggtttga agatggagtc tacgaatggc ttgataaact 300

[0018]

gaatgcattg tctttctacg ttggagtcta catcttgate tttgctgctt tagtgataat	360
cggcgtagca atattcggat gcattactgc aatggctgaa aaccaattct tctgctttt	420
gtacatcgtc attcagatat tggcattcct gttcggctt attggagcga caattctgct	480
agcaaacagc gcgagggatt caaatttcca gcctatgggtg agagaaaaca tgaggaattt	540
aattatgcgt gcacactacg aacccgcaag actgagtttg aaaaccatac aggaaacgat	600
tggctgctgt ggagcagatg gttctggcga ttataagage ttgaatcagt tagtgccaaa	660
tgaatgtagg gacaccgtga ctggaaatcc tttctacat ggatgtgtgg ccgagctgac	720
atggttcttc gaaagcaaat gtaactgggc tgctgggac gtcttgagtt tttgctttct	780
acatgtcatc aatgtggttt tctccatcat tttcatcaa ggaatgaaga aagaacaag	840
gtcctattat tagtataatc gtaaaatgta ttcaatagtt tttatatttt cctccacatt	900
tcgaataaaa acctaaaata aacattcgtt tttcccagta atttaaggta attggtagca	960
atgttttcaa ttctcatata ttagggagtc atgtttaatt cctt	1004

<210> 20

<211> 735

<212> DNA

<213> 十二斑褐菌瓢虫

<400> 20

atgacaggaa acggcgaagg gagtgggtgcg gcagcagtc aaaaatttga aaatcatatg	60
aacattatta agtataccat gcttttcaag aatgctgccg aagtgatttt aggtatttgc	120
attctcgtcg tatgcttctg gttgaggttt gaagatggag tctacgaatg gcttgataaa	180
ctgaatgcat tgtctttcta cgttggagtc tacatcttga tctttgctgc tttagtgata	240
atcggcgtag caatattcgg atgcattact gcaatggetg aaaaccaatt cttctgctt	300
ttgtacatcg tcattcagat attggcattc ctgttcggte ttattggagc gacaattctg	360
ctagcaaaca gcgcgaggga ttcaaatttc cagcctatgg tgagagaaaa catgaggaat	420
ttaattatgc gtgcacacta cgaacccgca agactgagtt tgaaaacat acaggaaacg	480
attggctgct gtggagcaga tggttctggt gattataaga gcttgaatca gttagtgcca	540
aatgaatgta gggacaccgt gactggaaat cttttctacc atggatgtgt ggccgagctg	600
acatggttct tcgaaagcaa atgtaactgg gctgctggga tcgtcttgag tttttgcttt	660
ctacatgtca tcaatgtggt tttctccatc attttcatcc aaggaatgaa gaaagaacaa	720

[0019]

aggtcctatt attag 735

<210> 21

<211> 1388

<212> DNA

<213> 烟草天蛾

<400> 21

ttatggtaaa gggtcgaaga atttcgtctc cattgtatca gaacacttga cctgcttttc 60

ctagttgaaa cccaattgga atttgattca acgcgtcaca attagcgaac tcatacaggt 120

gtggtaattc atactttatc tttccgttca tttttatctt agcaaacaca gataacctag 180

ctatgtgtaa tgcgtctatc gcgataacca gttccgattc gatcgagaca gcgaatggac 240

agccctaata cgtttcgaaa tattgtttgt gttaaaagtg tttgaagtga aatggctggg 300

ggacaaggcc cgacggtcgg gaaactggag tcccagatct attgtattaa gtacactctg 360

ttttgcttca acgtgggttt gtggttatc ggcgtctcca tttcgcact atgtctctgg 420

atctgcctgg agcctggatt caacgaatgg atgagaatcc ttgagctcca aaagtacttc 480

atcggcatct atataatcct tategettct ctcggtatca tggtcacgc cttccttggg 540

tgcggctcgg ctctcatgga aaacgtcatg cttttatatg cgtacatagg cacacaaatc 600

gccctattcg tgttcggttt ggtcgggtgcg tgcgtcgtct tggacttctc cacatacgac 660

tccagcatcc aacccttat cagagacgtt atcgtgagge ttatgaacaa tccacagcat 720

gagggcagtc gagagatctt gaggatggg caagaaggta tccggttctg tgggtgctgac 780

ggtcctatgg actacatcaa tctgaacaaa cccttgccag ctgagtgcag ggactctgtc 840

accggcaacg cctacttcca cggatgtgtt gacgagatga cctggatatct ggagggaaag 900

accggctggc tagcaggcat cgtgcttgc tcttgcata tttctgtaat aaatgcagtg 960

atgtccctgg tccttatcca agctgtgaag aaagaagaag aggaatcaac agtatataag 1020

taaataagtt tatatacgaa tttagttgcc gaataaggtt tatatcttat aatagaacgc 1080

taaaatattt tcaatatttt aatcataact accaccgat tttgttattt aagttaaatt 1140

tagatttgta atttgattta tcttattaat taaaagtatt tttacttaa ctaaactttt 1200

ctttatccta taaacaatga tattagtttt aattttatc ataatgtctt atattatttc 1260

ctcaatggaa taatacacat cgtatagata tactcattca tacaaagtgt aagcaaaaat 1320

gtgttaaate ctatccatta atagcaatga gataactaaa tctggacgat ttcttatggt 1380

tgcgtgaa 1388

[0020]

<210> 22
 <211> 732
 <212> DNA
 <213> 烟草天蛾

<400> 22
 atggctggtg gacaaggccc gacggtcggg aaactggagt cccagatcta ttgtattaag 60
 tacactctgt tttgcttcaa cgtgggtgtg tggttattcg gcgtctccat attcgcacta 120
 tgtctctgga tctgcctgga gcctggattc aacgaatgga tgagaatcct tgagctccaa 180
 aagtacttca tcggcatcta tataatcctt atcgttctc tcggtatcat ggtcatcgcc 240
 ttccttggtt gcggctcggc tctcatggaa aacgtcatgc ttttatatgc gtacataggc 300
 acacaaatcg ccctattcgt gttcggtttg gtcgggtcgt gcgtcgtctt ggacttctcc 360
 acatacgact ccagcatcca accccttata agagacgta tcgtgaggct tatgaacaat 420
 ccacagcatg agggcagtcg agagatcttg aggatgggtc aagaaggat cggttgctgt 480
 ggtgctgacg gtcctatgga ctacatcaat ctgaacaaac ccttgccagc tgagtgcagg 540
 gactctgtca ccggcaacgc ctacttccac ggatgtgttg acgagatgac ctggtatctg 600
 gagggaaaga ccggctggct agcaggcatc gtgcttgect cctgcatgat ttctgtaata 660
 aatgcagtga tgtccctggt ccttatacaa gctgtgaaga aagaagaaga ggaatcaaca 720
 gtatataagt aa 732

<210> 23
 <211> 1267
 <212> DNA
 <213> 草地贪夜蛾

<400> 23
 agagcagtta cgattcgatc gaggcagtgg atagacaaca ctgttttagt gttcacaat 60
 aaatttgttt gtgggtgtaa gtgtttagaa gtgaaatggc tggagctggt aggggcgagg 120
 ggagaggccc aggagtcggc aaactggaat cgcagatcta ttgtataaaa tacacactgt 180
 tttgcttcaa cgtcgtattg tggatattcg gcgtatcaat attcgtctt tgtctttgga 240
 tctgtattga gcctggcttc aatgaatgga tgcgcatcct ggagctgcag aaatatttca 300
 ttgggtgtcta cattatcctc attggetcac ttgttatcat ggttgtegcc ttccttgat 360
 gcggttcagc tttgatggaa aatgtcctgt tactatatgc ttacatagga tcacaaatag 420
 ccacatttgt gttgggcctg gttggagcct gtgttgttct cgacttctcc acctatgact 480

[0021]

ccagcatcca gccctgatac agagacgtga ccatgagggt gatgaacaac ccacaacacg	540
aaggcagccg cgagattctc aggatgggtc aggaaggaat tggatgctgc ggtgccgacg	600
gtcccatgga ctatatcaac atgaacaaac ctctgcccgc tgaatgccga gactcgggtca	660
ccggcaacgc ttacttccac ggctgcgttg atgagctgac ctggtaacct gaaggcaaga	720
ctggctgggt ggctggcatc gtccttgctt cctgcatgat tgctgtctgt aatgctgtca	780
tgtccctggg cctcatccaa gccgtcaaga aggaagaaga tgaggcgaca atgtataaat	840
aaatagctaa taataataat atagcattat tatatactaa gctactacta atgttttaat	900
aatagtttta tttttatatt attacgtaac aaatccgaca ttttcacgaa aatattgttt	960
gaatccaacc accgttttta tttaggtata atttagatta taatttttat tatgtatggt	1020
ttttgttttt aaataaagat ttatttttac ggccaattgt gtccattatt attagttaga	1080
ttacttacgt tgctattcga cgaggttact tgactacgtt caacaacac cttgagccca	1140
cagttgtatc atgtatatta tttttattta cacagaaaat atttctact ctcataacct	1200
tctcctcatc aattgaatat gtcccacgat agttattata gaaacaatt aaagattaca	1260
caatttt	1267

<210> 24
 <211> 747
 <212> DNA
 <213> 草地贪夜蛾

<400> 24	
atggctggag ctggtagggg cgaggggaga ggcccaggag tggcaaac ggaatcgcag	60
atctattgta taaaatacac actgttttgc ttcaacgtcg tattgtggat attcggcgta	120
tcaatattcg ctctttgtct ttggatctgt attgagcctg gttcaatga atggatgcgc	180
atcctggagc tgcagaaata tttcattggt gtctacatta tctcattgg ctacttgtt	240
atcatggttg tcgccttcct tggatgcggt tcagctttga tggaaaatgt cctgttacta	300
tatgcttaca taggatcaca aatagccaca tttgtgttgg gctggttgg agcctgtgtt	360
gttctcgact tctccaccta tgactccage atccagcccc tgatcagaga cgtgacctg	420
aggttgatga acaaccaca acacgaagge agccgcgaga ttctcaggat ggtgcaggaa	480
ggaattggat gctgcggtgc cgacgggtccc atggactata tcaacatgaa caaacctctg	540
cccgtgaat gccgagactc ggtcaccgge aacgettaet tccacggctg cgttgatgag	600

[0022]

ctgacctggg acctcgaagg caagactgge tggttggetg gcatcgtect tgcttctctgc 660
 atgattgctg tcgtgaatgc tgtcatgtcc ctggctctca tccaagecgt caagaaggaa 720
 gaagatgagg cgacaatgta taaataa 747

<210> 25
 <211> 1227
 <212> DNA
 <213> 红铃麦蛾

<400> 25

ggcagagggg agagttacaa tttgatccag accgtgaatg gactgccgaa aaaataaaaa 60
 atataaaata ttgtgaagtg tgaacaagtg caatggctgg agcaggcaga ggggaggggc 120
 aagggtccgc agtcggcaaa ctggagtgc agatctattg tatcaaatac actttattct 180
 gtttcaacgt tgtgctctgg ctcttcggaa tatcagtgtt cgcgctctgt ctctggatat 240
 gcatcgagcc tggcttcaac gaatggatga ggggtgcttga gttgagcaag tactttattg 300
 gtatctacat catcctcatc ggtgccctag gcgtgatggt cactgccttc ctcgatgtg 360
 gagctgcttt gatggaaaac gtcttcttgc tttttgtgta cataggaacg caaataggca 420
 tctttgtctt cggcctgggt ggtgcttgtg tggctctgga tttctccacc tacgattcga 480
 gcatccagcc actgatccgt gacgtaatcg tgcgactcat caacaacca caacacgaca 540
 atagccgtgc catcttgaga atggttcagg aggggatcgg ttgctgtggc gctgatggtc 600
 cgatggactt catcaacctg aacaaaccac ttccagetga atgtcgggac tctgtaactg 660
 gcaacgccta cttccacggc tgtgtggatg agatgacctg gtacctcga ggcaagactg 720
 gctggctagc tggcattgtc ttggcttctt gcatgatcgc tgttataaat gccgttatgt 780
 cgatggctct cattcaggca gtgaagaaag aagaagaaga agcgacggtg taaaaaact 840
 aaccttcttt attcttaaat aaattaatat aggcattaaa agtgtgtaat ttccgatata 900
 tttagtaatt taataacgtt ataattctaa aaatagcaac gggaatcgtt tattgatgcc 960
 atacgttttg tgttatagcc atccaccgtt ttctaagtaa ggettagttt ctagaataag 1020
 tttgctaatt ataataattg atatctatgt tttctgtgtt ttatttattt attattgatc 1080
 tattaaaaat aataataaaa atagccgatt tccatataag taactgggag ttttaaagat 1140
 atatacttaa taaactaaat catccatatt tttattgcat cctatgtctt tttgttttgt 1200
 ggcactttat tcataagata tcaaatt 1227

[0023]

<210> 26
 <211> 750
 <212> DNA
 <213> 红铃麦蛾

<400> 26
 atggctggag caggcagagg ggaggggcaa ggtcccgcag tcggcaaact ggagtcgcag 60
 atctattgta tcaaatacac tttattctgt ttcaacgttg tgctctggct cttcggaata 120
 tcagtgttcg cgctctgtct ctggatatgc atcgagcctg gcttcaacga atggatgagg 180
 gtgcttgagt tgagcaagta ctttattggg atctacatca tcctcatcgg tgccctaggc 240
 gtgatggcca ctgccttctt cggatgtgga gctgctttga tggaaaacgt cttcttgctt 300
 tttgtgtaca taggaacgca aataggcacc tttgtcttcg gcctgggtggg tgcttgtgtg 360
 gtccctggatt tctccacctc cgattcgagc atccagccac tgatccgtga cgtaatecgtg 420
 cgactcatca acaaccacac acacgacaat agccgtgcca tcttgagaat ggttcaggag 480
 gggatcggtt gctgtggcgc tgatgggtccg atggacttca tcaacctgaa caaaccactt 540
 ccagctgaat gtcgggactc tgtaactggc aacgcctact tccacggctg tgtggatgag 600
 atgacctggt acctcgaagg caagactggc tggctagctg gcattgtctt ggcttctctg 660
 atgatcgctg ttataaatgc cgttatgtcg atggctctca ttcaggcagt gaagaaagaa 720
 gaagaagaag cgacggtgta caaaaactaa 750

<210> 27
 <211> 1027
 <212> DNA
 <213> 谷实夜蛾

<400> 27
 attcgatcga ctcggtgtat ggacaacacg gcttcagtgt ctaaataataa aattgtttgt 60
 gttgtaaagt gtttttaaag tgcgatggca ggagcaggca cgggtgaagg gaagggccca 120
 atgggtggca agctggagtc ccaaactat tgatcaagt acacattggt ttgcttcaac 180
 gtcgtgttgt ggttgtttgg ggtgtctatt ttcgctctct gtttatggat atgcatcgag 240
 ccaggtttca acgaatgat gaccatcctt gagctgagga agtacttcat tggatctac 300
 attatcctga tcgcttctct cggattatg gtcatecgtt tccttggatg cgggtctgag 360
 ttaatgaaa atgtgatgct actatatgag tacatagcat cacaaatagc cgtgtttatc 420
 ttcggcctgg taggcgctg cgtcgttttg gacttttcta catacgactc cagcatccag 480
 ccgttgataa gagatgttat tgtgagactc atgaacaacc cgcaacatga aggcagtcga 540

[0024]

gagatactac ggatggtgca agaaggaatc ggttgctgcg gagccgaagg tccaatggat 600
tacatcaaca tgaacaagcc cctccccgcg gaatgccgtg actcgggtcac cggcaacgct 660
tacttccacg gctgcattga cgagctcacc tggatatctgg aaggcaagac tggctggctg 720
gctggcattg tgttggcttc ttgcatgatt tctgtcgtga atgctgtcat gtcattggtc 780
ctcatccaag ccgtgaagaa agaagaagac gaagcaacaa tatacaaata gatttattac 840
acttaattaa tataaataca ttatattaag ttagttttat tcttcttaaa taataatfff 900
atfctataa ttcaactaca aatccgacaa aacgaaataa tgfattttta aaacaaccac 960
cgtatfctaa ttaagtaaaa acttagattg taatfctgtt taaccgfttg fcttaataaaa 1020
gagtatt 1027

<210> 28
<211> 747
<212> DNA
<213> 谷实夜蛾

<400> 28
atggcaggag caggcacggg tgaagggaa ggcceaatgg tgggcaagct ggagtcccaa 60
atctattgta tcaagtacac attgtfctgc ttcaacgtcg tgttgtggft gtttggggtg 120
tctatfctcg ctctctgtfct atggatatgc atcgagccag gtttcaacga atggatgacc 180
atccttgagc tgaggaagta cttcattggt atctacatta tctgatcgc ttctctcgga 240
attatggfca tgcggttct tggatgcggg tctgcgttaa tggaaaatgt gatgctacta 300
tatgcgtaca tagcatcaca aatagccgtg fttatcttcg gcctggtagg cgctgcgtc 360
gftttggact fttctacata cgactccagc atccagccgt tgataagaga tgttattgtg 420
agactcatga acaaccgca acatgaaggc agtcgagaga tactacggat ggtgcaagaa 480
ggaatcggft gctgcggagc cgaaggfca atggattaca tcaacatgaa caagccctc 540
cccgcggaat gccgtgactc ggtcaccggc aacgcttact tccacggctg cattgacgag 600
ctcacctggt atctggaagg caagactggc tggctggctg gcattgtgtt ggcttcttgc 660
atgattfctg tegtgaatgc tgtcatgtca ttggfctca tccaagccgt gaagaaagaa 720
gaagacgaag caacaatata caaatag 747

<210> 29
<211> 953
<212> DNA

[0025]

<213> 玉米螟

<400> 29

agttttttat ttgtgaaagt gatagtgaaa tagtaatggc cgggtgcagga aggggtgaag	60
gtacaggccc agcgggtgggc aaactggagt ctcaaattta ttgcatcaaa tacacacttt	120
tctgcttcaa tatcactcta tggctcttcg gtttatccat cttegccttc tgcctatgga	180
tcctcatcga gcctggcttc aacgagttca tgtcggctct ccagctgcag ccatacttca	240
tcggaatcta catcactctc atcgcagcgc tgggtggctat ggtggttgcc ttcttgggat	300
gcgggtccgc gttgatggaa aacgtttgtc ttctttatgc ctacatagga tcacaaatag	360
cgacgttcgt cctgggtttg gttggagcgt gtgtgggtct cgacttctcg acatacgact	420
ccagcataca gcctctcctc agaaactcca tcgtggggct catgaacaac ccccaacatg	480
agggcagcag ggctgtactg cggatggctc aggaagggat cggctgctgc ggagctgacg	540
ggcccatgga ctacatcaac ctgaacaagc ccttcccctc ggagtgcctg gactctgtga	600
ccgggaacgc gtacttccac ggctgtgttg acgagctgac cttctacttg gaaagcaaga	660
ctggctggtt agctggaatt gtactggctg cttgcatgat tgctgttctc aacgcagtca	720
tatcgtttgt ccttattcac gcagtgaaga aagaagaaga tgaagcgata gcttataaat	780
aattatctaa ataactaata acttagtgaa ctaaaaaatt cgaaaaaaaa aattgtttat	840
tattaagtta ggtagtgttt tgtaaactaa ggtaacaatg ttttttcat aaaatatgta	900
ttttgtttca aattatctgt atacagggtg ttaggtaaat gggatatatga gcg	953

<210> 30

<211> 747

<212> DNA

<213> 玉米螟

<400> 30

atggccggtg caggaagggg tgaaggtaca ggcccagcgg tgggcaaact ggagtctcaa	60
atttattgca tcaaatacac acttttctgc ttcaatatca tcctatggct ctteggttta	120
tccatcttcg ccctctgcct atggatcctc atcgagcctg gcttcaacga gttcatgtcg	180
gtcctccage tgcagccata ctccatcgga atctacatca tcctcatcgc agcgtgtgtg	240
gtcatgggtg ttgccttctt gggatgcggg tccgcgttga tggaaaacgt tgtgcttctt	300
tatgcctaca taggatcaca aatagcgacg ttcgtcctgg gtttggttgg agcgtgtgtg	360
gtgctcgact tctcgacata cgactccage atacagcctc tcatcagaaa ctccatcgtg	420

[0026]

gggctcatga acaacccccca acatgagggc agcagggctg tactgcggat ggttcaggaa 480
 gggatcggtt gctgcggagc tgacgggccc atggactaca tcaacctgaa caagcccttc 540
 ccatcggagt gccgtgactc tgtgaccggg aacgcgtact tccacggctg tgttgacgag 600
 ctgaccttct acttgaaaag caagactggc tggttagctg gaattgtact ggctgcttgc 660
 atgattgctg ttatcaacgc agtcatatcg ttgttcctta ttcacgcagt gaagaaagaa 720
 gaagatgaag cgatagctta taaataa 747

<210> 31

<211> 977

<212> DNA

<213> 豌豆长管蚜

<400> 31

taatgggaat atttttatgg ggctacgtgg tgtactcgag gctcgacacg accctccaag 60
 agtgggtcga cgcccttgaa atctggcaag tttatgtggg attgtacgtg ttgatatttg 120
 cgtcgatcgt ggtgatcata gctccgtttt tgtcgtgitt cgccgtctac caggagctca 180
 gccaaactact catggcaaac gccggtgtac atctgttttc gttcttctgc ctcttattgg 240
 gatcagctgt attgctggaa aacaccacga cggggtctgg gatcgtgtca tcgatcaggg 300
 aaagtatgac gaacttaata atgcaatcgc aaaacgagta cgccacgaac acgctgaaca 360
 tgatccaaga atctatcgga tgttgccggag ccgacggacc caacgactac ttgtcgctta 420
 ggaaagcgtt gccaccgag tgcagagaca cgtaaccgg taacgcgttc ttctacggct 480
 gtgccgatga agtgacctgg ttcttgagg acaaatcccg gtggacgacc aacatagcca 540
 tatcgatagc cgctttggag atgcttatat gtgttctcag cgtgatttta gtcaaggctt 600
 tgcaaaagga agaaaaattc aactacaacc gatgataaaa ttacgttaat tattttatct 660
 ttttccaaaa tgtaaaaca tataaattac ctaactgitt ttattttcac caatcgtgtg 720
 atttcatcaa aaaataaaaa ctttcttaca ggacgataat gattttgacg aacgaatttt 780
 tctactaatt attaatgtgt tcaacctttt aatgacatca tttctcttgt aatcgggtta 840
 cctagtttct tctcacttct actgcagaaa tcttactttt gtgaatacct acaactgtac 900
 tttgggacaa acatatttta atagtaataa ctaataaata aattaataaa aataggtact 960
 gtgaaaaaca gttataa 977

<210> 32

<211> 633

[0027]

<212> DNA

<213> 豌豆长管蚜

<400> 32

atgggaatat ttttatgggg ctacgtggtg tactcgagge tcgacacgac cctccaagag 60
 tgggtcgacg cccttgaaat ctggcaagtt tatttgggat tgtacgtgtt gatatttgcg 120
 tcgatcgtgg tgatcatagc tccgtttttg tcgtgtttcg ccgtctacca ggagctcagc 180
 caactactca tggcaaacgc cgggtgtacat ctgttttcgt tcttcgtcct cttattggga 240
 tcagctgtat tgctggaaaa caccacgacg gggctctggga tcgtgtcadc gatcagggaa 300
 agtatgacga acttaataat gcaatcgcaa aacgagtacg ccacgaacac gctgaacatg 360
 atccaagaat ctatcggatg ttgcggagcc gacggacceca acgactactt gtcgcttagg 420
 aaagcgttgc ccaccgagtg cagagacag gtaaccggta acgcgttctt ctacggctgt 480
 gccgatgaag tgacctggtt cttggaggac aatcccggg ggacgaccaa catagccata 540
 tcgatagccg ctttggagat gcttatatgt gttctcagcg tgattttagt caaggctttg 600
 caaaaggaag aaaaattcaa ctacaaccga tga 633

<210> 33

<211> 1804

<212> DNA

<213> 豆荚盲蝽

<400> 33

tggaacacga aaattggtt ggcgcgtcca gttcggaaat ttgaagtctt tattttggtg 60
 atcttatttt ggtgtgttgc ggttccgtt atcgggggtt cggatcacgg agtgagaccc 120
 ggcgagaatg gtgatgggag acaatagtaa ggtggcagag aaggtggata ggaggatcag 180
 agtcatcagg ggcatecttc tttgtttgaa cgccatcact tggttcatct gcattgctgt 240
 gattgctctt tgcttctggc tccgcttcca tgacagcadc cagcaatggg tggatcgttt 300
 ggagatccag tctttctaca tcggcctgta tattctcadc atatcgtccg ccattctctt 360
 catcacgggc ttcataagtt gctttgctac cattagttaa agccttgttc ttctactagc 420
 taacatagtc gtgcagttac tgctcttcat tcttggacta gccggcgcca tgggtgctaat 480
 ggaaaacagc gcctaccaat cagctatcca cccagtgatt aaaacgggtga tgcttcggtt 540
 gatacagadc gcaccaaact atgacaagge atcgtactca ctatccctcc tccaagaaga 600
 cattgggtgt tgtggcgcca acgggggtgga tgattacttc aacatgaaac gagcagtcce 660
 ttccgagtgt cgagatccaa tcacggggaa cgtttactac tacggctgcg cagacgaact 720

[0028]

cacctgggtc ctcgagcagc gctcaggctg gctaatecga ttggtcatec ccctctgctg	780
caagaagatg ctcaacgccg tcctcacagc cattctcate caactcgttc aaaagtacaa	840
caactacagc gtttagtcat tttgatcaac gtgcctgttg actatgatat atttatgtag	900
acgggggtgga aagacacata catgtacact cagaataatt tgatgttcga ttgtataaat	960
tacaacttcc tgacttcaact ataaatactg gtctatatcc accagagAAC tcaatgaaaa	1020
tatcaatagt ggaaaataat cgtacaaaaa tgcctagct aaggactagt aggacatcat	1080
tgacacagga tatgagtagg tttgtgtctt ccatactcct ataaatcaat cattcgtcca	1140
tggttcgagc tagtgaacaa gaaaggttgg aagtcagttt ccatgagtat tctatctcat	1200
tatcgttata gttcacattt ctacctatat agtagttacg tataaatcta ggtgccatta	1260
gggttgtcaa atgtcaagac actgaccgat tgaataattt tacatgaaat aagactgcgg	1320
ttttcaacac cgtgcggaaa agagcgtcaa taatcaacgt tagaaaaaac tcttcatttt	1380
gtactttccc tcaatttatt tggttacatt ttcgaataca tetaacttct ataggtacag	1440
taaattcaca cgcategcac atgccattat cacattattt tcttcattat ttatggtttt	1500
ttaatttctt tttatttttag cgttacttac ctgtaggcaa atagatgtta ctatatcate	1560
aagtgctcgt acatttgtcc tttatgaata ggatagtatt attggaatca aataatgttt	1620
gatataaatt gacagggtag taattaagga gatccggtat gaacgctctt aaaacaacaa	1680
attaaataaa ggaatacggg aagaggcaag aatagaagga atattaaaga ataggcaacc	1740
atacttttagt atgtcaacca cacttcaata ttgettatt ctttttttt tttttttct	1800
catc	1804

<210> 34
 <211> 729
 <212> DNA
 <213> 豆荚盲蝽

<400> 34	
atggtgatgg gagacaatag taaggtggca gagaaggtgg ataggaggat cagagtcate	60
aggggcatcc ttctttgttt gaacgccate acttggttca tctgcattgc tgtgattgct	120
ctttgcttct ggctccgctt cgatgacagc atccagcaat ggggtggatcg tttggagatc	180
cagtctttct acatcggcct gtatattctc atcatatcgt ccgccattct cttcatcacg	240
ggcttcataa gttgctttgc taccattagt gaaagccttg ttcttctact agctaacata	300

[0029]

gtcgtgcagt tactgctctt cattcttggc ctagccggcg ccatgggtgct aatggaaaac 360
 agcgcctacc aatcagctat ccaccagtg attaaaacgg tgatgcttcg gttgatacag 420
 atcgcaccaa actatgacaa ggcatcgtac tcaactatccc tcctccaaga agacattggg 480
 tgttgtggcg ccaacggggg ggatgattac ttcaacatga aacgagcagt cccttccgag 540
 tgtcgagatc caatcacggg gaacgtttac tactacggct gcgcagacga actcacctgg 600
 ttctcgcagc agcgcctcagg ctggctaatac ggattgggtca tcgccctctg ctgcaagaag 660
 atgctcaacg ccgtcctcac agccattctc atccaactcg ttcaaaaagta caacaactac 720
 agcgtttag 729

- <210> 35
- <211> 1498
- <212> DNA
- <213> 狡小花蜻

<400> 35
 gaaaggtgtg aggctcgcag tacctgttcc ggggtttcgc cgtgcaaacg aaagtgtttg 60
 tgtgaaatca aagagtgaaa tagaaaaatt cataaaaaaa catttacgtg aaaaatggcg 120
 acccatgacc gggcgggtcaa tatcatcaaa ggaactctcc tctgcatgaa tttcgtcact 180
 tggttgatag caatagcagt tataggcctt tgcttttggc tgagattcga cagcgatatt 240
 caagaatggg tatccatggt tgaatcagt tcattctaca tcggcctcta tataattctt 300
 gtgtcagcgt ttcttgttgc cataactgga ttagtgagct gcgcagcgcac agtatctgaa 360
 aaccgcagcg ttatagcagc aatgtagta gttcaagtac ttcttttcat acttggaatg 420
 gccggagcgg ccgttttggat ggataacagt acatacaaat catcgataca tcccactatc 480
 cgatccgtca tgctgcggtt gatcgtcctt tatcctgctt acgatgaagc tacaacttca 540
 ttaagcacac ttcaaaaaa cattgggttc tgtgggtcgg acggctctga cgactacatc 600
 aacttaagaa gagctttacc gacgacatgt cgagacacag taacagggaa tgcatattat 660
 tacggctgtg ctgacgaact gacatggttt ttagaacagc gttcttcatg gtttactgcc 720
 ttagttctca tcctctgcgc taagaaaata gtcaacgtcg tcttatccgt catcctcatt 780
 caactttagt accttcaaaa acgaatgggt aaataataat aaatccttaa ttactattct 840
 caataccata aaaacactgg atcataagtt ctttttccag cactagtcac tctctgtctc 900
 actctgtatg cattaactat gttcagccac aaactatatt ttcatctcat cagaattaac 960
 ttttgacact ttctcaaaa ctaatacttc aaaagatcaa tcaatttgta tgaataataa 1020

[0030]

aatgggtatg ttaaagagtt atgaagtgtt gggtaaaaaa taagtaaaag gtatgtgtga	1080
gtacaaaatt tttcaagata ataaaatgaa tcggtatatt ttgttcttac gcgtagaac	1140
ttgcacttta acacacaagg accaatcaaa aagacatitt ttgtccaata aagctaacct	1200
attcttgtta tcctgtaa atcaatgtta tcctaccgac ataataatat agatgataat	1260
ttaatatgat aattttatgt tttttttta cttggtaa attttaggta tttataaatt	1320
accgataggt ggtatttgtt acctttttta tgattgaatg tacctaaaac tgatttcatt	1380
cagccacaaa actaattctt ttgttttgtt aatttttata aagcgtgcaa tcgattttta	1440
agttttaa atcatgtaaga cagcataaaa atattttata aatattggga aaaaaaaa	1498

<210> 36
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> 狡小花蝽

<400> 36	
atggcgaccc atgaccgggc ggtcaatata atcaaaggaa ctctcctctg catgaatttc	60
gtcacttggg tgatagcaat agcagttata ggcccttgct tttggctgag attcgacagc	120
gatattcaag aatgggtatc catggttgaa atcagttcat tctacatcgg cctctatata	180
attcttgtgt cagcgtttct tgttgccatc actggcttag tgagctgcgc agcgacagta	240
tctgaaaacc cgacgcttat agcagcaaat gtagtagttc aagtacttct tttcatactt	300
ggaatggccg gageggccgt tttgatggat aacagtacat acaaatcacc gatacatccc	360
actatccgat ccgtcatgct gcggttgatc gtcctttatc ctgcttacga tgaagctaca	420
acttcattaa gcacacttca aacaaacatt ggttgctgtg gtgcggacgg tcctgacgac	480
tacatcaact taagaagagc tttaccgacg acatgtcgag acacagtaac agggatgca	540
tattattacg gctgtgctga cgaactgaca tggtttttag aacagcgttc ttcattgggtt	600
actgccttag ttctcatcct ctgcgctaag aaaatagtca acgtcgtcct atccgtcacc	660
ctcattcaac ttgtagacct tcaaaaacga atggttaa at aa	702

<210> 37
 <211> 1758
 <212> DNA
 <213> 筛豆龟蝽

<400> 37	
tagttttgtg cgcggttctg ataaaataat tttcatcggt aaaaatgggc gccgatccgg	60

[0031]

agaaaagcaa ggtggtcatc gaatacatac tattctgcct caatgtaatc acgtggctca	120
tcgcagccat cttgattgga atttgctttt gggtagatt cgattcagag atcacaagct	180
ggattgacaa gttgcaagtt agtcagtttt acataggcct ctacatactc atttttactt	240
ccgtcattct catggctact ggatTTTTga gctgcgccag cacattttcc gaaaacacca	300
agctactaac tgtgaatgtc attatccaac ttgtcctggt tctcctggga ctaattggaa	360
cggcagttct catggaaaac ggtacattta aatcatccat ccacgatgca attaaagacg	420
tcatgatacg tctcatacaa ctctatcctt cctacgaacc tgctaacaag atcttagcca	480
atgtccaaga atcgattggc tgctgcggtg gagatggtta caacgattac ttccgcttta	540
accgaccgct accctcagag tgcagggact ctgtgagagg aaatgtccat atctatagct	600
gcgcagattc atttctttgg atcctggagg accggtgcga ctggatagcg ggtctggcaa	660
tcgtcctctg cgccaagaag atgctcaacg ctgtcctctc cgcaattctt atccatctaa	720
tcgccattac ggagtgacac ttaaattaaa tcctttagt ccgaaaaagg agtattgggg	780
aaactttgaa aactcgaaat agggcataaa atctccat atgttaaataat cttcccgcga	840
tcttgagagg cctaacagta ggtaatacca atctacgtgt ttccttcctt ttcacgaaca	900
caatgcttat tctcctctaa tgttgatata aataaaatta tctcatatct gagcccgggg	960
acatctccag cttttccaaa atgccacgtc ccgaagtatt atagaattgt tcaatgacct	1020
tgaaatgacc cttccatttg ttcagcttca atccgaacac gagaagtatg tacatccggt	1080
tgcttcctt caatactatc atgttgaagc aaaaaataa aataaattta agacaaatta	1140
aaaaaaaaa aatttaaatg agtattttac ctctctgata tacaatatgt ggtactcaac	1200
attttatgat tgtaactat ttaaactgta cataattctg atcaatttta aggtcaaata	1260
tccaaatatg attaaaagac aattttgtag gtgtataatg tatatcgact gttaaattta	1320
tattattata aagacgcaca ggggtaatga tatattgtat taacatacat tttaaactgt	1380
ttcgactgct gttttattag ctcgattct catcacattt ctgttcagtt tagtttatag	1440
ctatttagac atagaaattt agtatttata ggagaactat ttttttccca atttttgat	1500
ctttataagg attcaaaatt ttatttataa tgggtgtaat cagtatatga tcgacgtggt	1560
taatattatt attaaatatt gaggatgatt gccaatgaca aatattttat gttattcatg	1620
ggtaaataat ttttaagttag tatttcgtga cagaccaaag tattatttta taaaaatatt	1680
tataaatagc aataagtgga atgtgagctt attgcccatt aaaatatatt ttaaaagctc	1740

[0032]

attaattaca gtttatca 1758

<210> 38
 <211> 693
 <212> DNA
 <213> 筛豆龟蝽

<400> 38
 atgggcgccc atccggagaa aagcaaggtg gtcategaat acatactatt ctgcctcaat 60
 gtaatcacgt ggctcategc agccatcttg attggaattt gcttttgggt gagattcgat 120
 tcagagatca caagctggat tgacaagttg caagttagtc agttttacat aggcctctac 180
 atactcattt ttacttccgt cattctcatg gctactggat ttttgagctg cgccagcaca 240
 ttttccgaaa acaccaagct actaactgtg aatgtcatta tccaacttgt cctgtttctc 300
 ctgggactaa ttggaacggc agttctcatg gaaaacggta catttaaate atccatccac 360
 gatgcaatta aagacgtcat gatacgtctc atacaactct atccttcta cgaacctgct 420
 aacaagatct tagccaatgt ccaagaatcg attggctgct gcggtggaga tggttacaac 480
 gattacttcc gctttaaccg accgctacce tcagagtgca gggactctgt gagaggaaat 540
 gtccatatct atagctgcgc agattcattc tcttggatcc tggaggaccg gtgcgactgg 600
 atagcgggtc tggcaatcgt cctctgcgcc aagaagatgc tcaacgctgt cctctccgca 660
 attcttatcc atctaategc cattacggag tga 693

<210> 39
 <211> 2006
 <212> DNA
 <213> 稻绿蝽

<400> 39
 tgatcatttt acttttctcg gtctccattt aaatcgtacc aaaaaacaaa ccccaatcaa 60
 aatggagacc gagaaaagta aaatgatcat tgaatacatt ttgttttgtc tcaacgtcat 120
 tacttggctt atttgtgtca tcttgattgg aatatgcttt tgggtacgat ttgatccaga 180
 aatcacagac tggattgaga aactggaagt gaaacaattt tatactggat tatatatcct 240
 cattgtgtgc gcgttggccc acategcttc tgggtgcata agctgtatgg gaactttctc 300
 agagaacaag agattacttg ctgtgaatat agttgctcag attctgcttt tcattctctg 360
 cctggctggg gccgctgtct taatggaaaa tagttcttcc aaatcttcaa tccatcacgc 420
 aataaaaaat attatggttg gattaatcca gttgtatcca tctacgagc cagccaataa 480

[0033]

aatcttagcc actatacagg agagtgtcgg ttgttgcggt ggcgaagggt ataacgatta 540
catcagactc cacagggctc tcccttcgga atgccgtgac tcagtgactg ggcacacaca 600
ctattacage tgcgccgatt ccatctcttg gatcctggag ggacgggtcca gctggatcac 660
tggtttggcc atcctcctct gcgccaagaa gatgctcaac gctgtcctct cgactgttct 720
catccacctc atcaatctga gccaggacca ataaagattt gctgggatgc gtttcagaaa 780
atccacgtaa aaaataggtc tcatttcctc actcttaaca tgccccactg catgttgтта 840
ttgtttttgt aaaatgtata cctgaattaa taaattatat acgagagagc attaattggc 900
ataattcata aaataatttt ggtttaccga aaatactcaa ttaaattgatt tcattctctt 960
gtttcacaaa tcaatgatca tttcttaaaa atcgatatga ataaattcag ttatcattac 1020
cttgtaaaag atgtttcttc ccaaaataat aaagaaaaag gataattatt cagataacag 1080
ttacttaaaa ttaataaat gctttgggaa gacttctatc acgtaaagaa ataaaagaca 1140
atgtgtattg ttgcttatta atattaagaa ttttgtattg ttaccaatta atattatgga 1200
tataagaatt gtaaaaatat gttgaaaaag aaaaaaaaa agttttatag aaactagtaa 1260
ttttttattt tctatgtatg tacagtagat aaggcattag tttagtagtt tgtattttat 1320
gggtgtttta ttattcacia ttgatctaaa taaaaatgga aaaactatat ttcaattatt 1380
aaggataatt atagcaatat atataaatag aattcacgaa gagttaacgt ttgcttttgt 1440
aagctttctg tatctataga cctaatacatg caagtattat gtaaaatgaa taattttttg 1500
aaaatcattt aaaaaattt tttatagtgt atgatttatt tagttcaatt tactataatg 1560
tagttctaaa aacaagtaat gaaaattttt attattcctt gtaaatgatt ttaaatcgta 1620
gtatggatgt aatgtattta ccatagcacc attttatgtt ttgtatattt aaagaataat 1680
ttattaaaag tagtttttat attgtttttt tattgaaatg ctattgtcaa agtgttttcg 1740
tcttttaatt aagtagctga tgattttttt ttttaatgag tacactgatc tagataatag 1800
atcacagttc cagagatggt tgtgcatggt gtggcaagt aaagaatatc tcataccaaa 1860
ttgcttgтта aatttttata cattcttttt gtaccacaaa caaaatgttc agcttttagc 1920
agaatgccag cgggtcaaaag tctgctgaat ctaaccagct ttattggtaa taaatttaca 1980
gttacttatt ctatacttta aaaaaa 2006

<210> 40

<211> 693

[0034]

<212> DNA

<213> 稻绿蚜

<400> 40

```

atggagaccg agaaaagtaa aatgatcatt gaatacattt tgttttgtct caacgtcatt      60
acttggctta tttgtgtcat cttgattgga atatgctttt gggtagcatt tgatccagaa      120
atcacagact ggattgagaa actggaagtg aaacaatttt atactggatt atatatcctc      180
attgtgtgcg cgttggccca catcgcttct ggtgtcataa gctgtatggg aactttctca      240
gagaacaaga gattacttgc tgtgaatata gttgtcaga ttctgctttt cattctctgc      300
ctggctggtg ccgctgtctt aatggaaaat agttctttca aatcttcaat ccatcacgca      360
ataaaaaata ttatggttgg attaatccag ttgtatccat cctacgagcc agccaataaa      420
atcttagcca ctatacagga gagtgtcggg tgttgccggg gcgaagggtg taacgattac      480
atcagactcc acagggctct cccttcggaa tgccgtgact cagtgactgg gcacacacac      540
tattacagct gcgccgattc catctcttgg atcctggagg gacgggccag ctggatcact      600
ggtttgcca tcctctcttg cgccaagaag atgctcaacg ctgtcctctc gactgttctc      660
atccacctca tcaatctgag ccaggaccaa taa                                     693

```

<210> 41

<211> 1711

<212> DNA

<213> 茶翅蚜

<400> 41

```

tgtcacacct gtccataata tttatgttcc agagaataag tcacctgtgg gcgaggcttg      60
ttcaaacgta ctgtgtcatc agatttatct tatcagttaa gattaactgt gtatgagtgt      120
ttcatggttt tagttttgtg cacgatttta gtaaaacatt aaccgcgcatc aaaatgtcgg      180
ccgggaaaag taaaatgata attgaataca tattattctg tctcaacgtc attacatggc      240
tcgtttgtat tatcttgatt ggaatatgct tctgggtacg attcgatccg gaaatcactg      300
attgataga aaaactacaa gttaaacaat tttaactgg actgtacatt ctcatgttat      360
gtgctctagc tcacatagca tcgggtgttt taagctgcat gggaactttt gcagaaagca      420
agaaattgct aacgatgaat atagttgcc agcttctgct cttcattctg tgcctagctg      480
gtgccgcegt attgatgaa aatagttcat tcaaatcttc aatccactac gcaataaaaa      540
atattatggt tggtttgatc cagttgtatc catcttacga gccagccaat aaaattttag      600
ccaccataca ggagagtgtt ggggtgctgtg gcggggacgg atacaatgac tacatcagac      660

```

[0035]

tccatagggc tctgccttcc gaatgcaggg actcggtaac tggacacacc cactactaca	720
gctgtgccga ttccatctct tggatcctgg agggacgttc cagctggatc acaggattgg	780
ccatcctcct ttgcgccaag aagatgetta acgctgtect ctcaactgtt ctcatccacc	840
tcatcaacct aagcgatgat gattaaggag taacgagtta cacaaccgaa attttataag	900
aaaatagttc taatctaatt aactttaate cgttccteta ttggttctga ttactcgtaa	960
tataacctgta ttatccaatt ttataaatga agattcatta gcgtgacaaa taattttaga	1020
tacaaaaatt aggaaaacaa ttttagatac caaaaatgct tgtaattaa taatgtaact	1080
ctcttattta ataaaccaat ggttatgtct taaacataag aaaaaacat aattttcaat	1140
gccttataaa aaggtgctac ctcaaaaaaa aaaaatttac ataacacaat gttttgagga	1200
tagctcta atctaatgaa ataaaagaca attcgtattg ttacttatta atattataga	1260
ttttagaatt tttaaaatgt atcaattcca tatgaattta aaaaaataa taataaaaat	1320
aaagctgttt attcattaca aataattctc tattttctaa gttgtacag tagataagtc	1380
attagcttag tagtttatat ttaatgggtg tttagttatt ctttaattgat ccaaacaaaa	1440
atttaaaagt ttatttcaac tattaagggt cataattgca aatgtgtat taatataatt	1500
aattatataa taattaatta ctttatataa aaaaattgac tgatgtttca ctaacagtta	1560
acagtaactt ttgtaagggt ttttgtttta agaaattgta ctttaattaga agataatfff	1620
atatactgaa taattttggt catttattga attcaattta atttttattg atttttatca	1680
ggagataaga aatgataatt tttgatttat t	1711

<210> 42
 <211> 693
 <212> DNA
 <213> 茶翅蝽

<400> 42	
atgtcggccg ggaaaagtaa aatgatcatt gaatacatat tattctgtct caacgtcatt	60
acatggctcg tttgtattat cttgattgga atatgettct gggtacgatt cgatccggaa	120
atcactgatt ggatagaaaa actacaagtt aaacaatfff aactggact gtacattctc	180
attgtatgtg ctctagctca catagcatcg ggtgttttaa gctgcatggg aacttttgca	240
gaaagcaaga aattgctaac gatgaatata gttgccage ttctgtcttt cattctgtgc	300
ctagctgggtg ccgccgtatt gatggaaaat agttcattca aatettcaat ccaactacga	360

[0036]

ataaaaaata ttatggttgg tttgatccag ttgtatccat cttacgagcc agccaataaa	420
atdddtagcca ccatacagga gagtgttggg tgctgtggcg gggacggata caatgactac	480
atcagactcc atagggctct gccttccgaa tgcagggact cggtaactgg acacacccac	540
tactacagct gtgccgattc catctcttgg atcctggagg gacgttccag ctggatcaca	600
ggattggcca tcctcctttg cgccaagaag atgcttaacg ctgtcctctc aactgttctc	660
atccacctca tcaacctaaag cgatgatgat taa	693

<210> 43

<211> 1188

<212> DNA

<213> 褐臭蜻

<400> 43

attdcggtaa aatatacatc tgcatacaaaa tgggggcccga gaaaagtaaa atgatcattg	60
aatacatatt atdddgtctc aacgtcatta cgtgggtaaat tgcagttatc ttgatcggaa	120
tatgctdddg ggtacgattc gatccgaaa ttacggaatg gatagagaaa ctgcaagtac	180
aacaatdddta cactggattg tacatcetta ttgtgtgtgc tctagcccat atcgtctcag	240
gagttgtgag ctgcatggga actdddttcag agaacaagag gttactcgca atgaatataa	300
tagcacagct tgcgctddd cttctgggtc ttgctgggtc cgctgtctta atggaaaaca	360
gttctdddcaa atcgtcaatt catcacgcaa taaaaaatgt tatggttggg ttgatccagt	420
tgatccatc ctacgaacca gctaacagga tdddtagctac catacaagag agtgttdggt	480
gctgcggggg tgatggatac aacgactaca tcagactcca cagagcactg ccttctgaat	540
gcagagactc ggttactggg cacactcatt attacagctg cgcagattcc atctcatgga	600
ttctggaagg acgatccagc tggatcactg gattgacaat cctccttdtc gctaagaaga	660
tgctcaacgc tgtctctca accgttctta tccacctcat aaatcttact aatgaaggat	720
aaagacgaga aagaaatgat acacagtcac ctacagaaat attctaatcc aacaaccctt	780
caaaactaaaa tdddtaaatat tgttctcacc tccttctgt aaatcttagt caccgcgttc	840
ttgaaaacat ttgggtatct gaaaatgtcc tagcagttac acaagagcgg ataagcatta	900
tattatatta cgaaaatgat ttcggatddd gaaaatatddd ataataaatt attataaate	960
tattattdaaa caggttactg gtaacttdaca atgtcttdaaa atagagatga ataaatgcaa	1020
tattcattat ctcttdaaaag gtaacctctt acgaaaggat gtattagtdddd ttdcaaaagat	1080
aatacttdtaa cctaaataaaa tggctctggag atattgataa caaataatga gacaaaagac	1140

[0037]

aaattgtatt gtacccttta attagtatgt gttaagaaat ttaaaaaa 1188

<210> 44
 <211> 693
 <212> DNA
 <213> 褐臭蜻

<400> 44
 atgggggccc agaaaagtaa aatgatcatt gaatacatat tattttgtct caacgtcatt 60
 acgtggttaa ttgcagttat cttgatcgga atatgctttt gggtagcatt cgatccggaa 120
 attacggaat ggatagagaa actgcaagta caacaatfff aactggatt gtacatcctt 180
 attgtgtgtg ctctagccca tategctgca ggagtgtgta gctgcatggg aactttttca 240
 gagaacaaga ggttactcgc aatgaatata atagcacagc ttgcgctttt cattctgggt 300
 cttgctgggtg ccgctgtctt aatggaaaac agttctttca aatcgtcaat tcatcacgca 360
 ataaaaaatg ttatggttgg tttgatccag ttgtatccat cctacgaacc agctaacagg 420
 attttagcta ccatacaaga gagtgttggg tgctgcgggg gtgatggata caacgactac 480
 atcagactcc acagagcact gccttctgaa tgcagagact cggttactgg gcacactcat 540
 tattacagct ggcagattc catctcatgg attctggaag gacgatccag ctggatcact 600
 ggattgaaa tcctcctttg cgctaagaag atgctcaacg ctgtcctctc aaccgttctt 660
 atccacctca taaatcttac taatgaagga taa 693

<210> 45
 <211> 263
 <212> DNA
 <213> 玉米根萤叶甲

<400> 45
 atgattgtgt cctttatagg atgtattagt gccctgcagg agagtacat ggccctttta 60
 gtgtacatcg gcaccaagt gctcagtttt atattcggtt tatccggttc ggcggttctt 120
 ctggataaca gcgccagaga ttcccacttc caaccgagga tccgagagag tatgcgacgt 180
 cttatcatga atgctcatca cgaccaatcc agacaaacac tagccatgat tcaggaaaat 240
 gttggttgct gcggagctga tgg 263

<210> 46
 <211> 262
 <212> DNA
 <213> 玉米根萤叶甲

[0038]

<400> 46
 gatgtccaaa gtagacacac aaatgatgtc caaagcagac acacaggaag atgcctcctt 60
 cgccaaattg gaaaatcaga ttgctatcat caaatacgtata tactcttta ccaacgtttt 120
 gcaatgggct ctcgggtgcag caatcttcgc tctttgcctt tggctacgat tcgaggaggg 180
 cattcaagaa tggctccaga aattggatc agaacaattt tacatcggag tatatgtact 240
 tatagtcgct tcaactgatcg tc 262

<210> 47
 <211> 244
 <212> DNA
 <213> 玉米根萤叶甲

<400> 47
 cgcaacagac tacctctctc ttcagcagcc cttccaagt cagtgcagag acaccgttac 60
 tggaaaccca ttcttccacg gatgtgtaga tgaactcacc tggttcttcg aagaaaaatg 120
 tggttggata gcaggttttag ctatggcgat atgcatgatt aacgtcetta gtattgtttt 180
 atctacggta ctcatccagg cattgaaaaa agaagaagaa gcatccgatt catacaggag 240
 atag 244

<210> 48
 <211> 735
 <212> DNA
 <213> 黑腹果蝇

<400> 48
 atgggcatcg gctatggagc ctccgacgag cagctggaga agcaaattgg ctgcgtgaaa 60
 tacacgctat tttgcttcaa catcgtggcc tggatgatata ccacagcgcg gttegcccta 120
 accgtctggg tgagggctga gcccggcttc aacgaactggt tgcgcatect ggaggcacag 180
 tccttctaca tcggcgtgta cgtgctcacc ggcatcagca ttgtaatgat ggccgctcagc 240
 ttctctggct gcctgagcgc gctcatggag aacaccctgg ctctgtttgt gttegtgggc 300
 acccaggtct ttgggttcat cgccattgtg gccgggtcgg cggctctatt gcagttcagc 360
 actatcaact cgagcctgca gccgctgctg aatgtatcgc tgcgcggctt tgtggccaca 420
 tcggagtata cgtactcgaa ctacgtgctg accatgattc aggagaacat aggttgtttgc 480
 gggggccaccg ggccatggga ttatctcgac ctgcgccagc cactgccaag ctctgcccgc 540
 gacaccgtca gcggcaacgc cttcttcaac ggatgcgtgg acgagctgac ctggttcttc 600

[0039]

gagggcaaaa cgggctggat tgtggctctg gccatgacgc tcggcctgct caacgtcate 660
 tgcgcggtga tgagctttgt gcttgtgcag gcggtcaaaa aggaggagga acaggccagc 720
 aactaccgcc gctga 735

<210> 49
 <211> 735
 <212> DNA
 <213> 黑腹果蝇

<400> 49

atgggcatcg gctatggagc ctccgacgag cagctggaga agcaaattgg ctgcgtgaaa 60
 tacacgctat tttgcttcaa catcgtggcc tggatgatat ccacagcgcgt gttcgcccta 120
 accgtctggt tgagggctga gcccgcttc aacgaactggc tgcgcatcct ggaggcacag 180
 tcctttctaca tcggcgtgta cgtgctcacc ggcatcagca ttgtaatgat ggccgctcagc 240
 ttctctegget gctgagcgc gctcatggag aacaccctgg ctctgtttgt gttcgtgggc 300
 acccaggtct ttgggttcat cgccattgtg gccgggtcgg cggctctatt gcagttcagc 360
 actatcaact cgagcctgca gccgctgctg aatgtatcgc tgcgcggctt tgtggccaca 420
 tcggagtata cgtactcgaa ctacgtgctg accatgattc aggagaacat aggttgttgc 480
 ggggccaccg ggccatggga ttatctcgac ctgcgccagc cactgccaag ctctgcccgc 540
 gacaccgtca gcggcaacgc cttcttcaac ggatgcgtgg acgagctgac ctggttcttc 600
 gagggcaaaa cgggctggat tgtggctctg gccatgacgc tcggcctgct caacgtcate 660
 tgcgcggtga tgagctttgt gcttgtgcag gcggtcaaaa aggaggagga acaggccagc 720
 aactaccgcc gctga 735

<210> 50
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> 黑腹果蝇

<400> 50

Met Gly Ile Gly Tyr Gly Ala Ser Asp Glu Gln Leu Glu Lys Gln Ile
 1 5 10 15

Gly Cys Val Lys Tyr Thr Leu Phe Cys Phe Asn Ile Val Ala Trp Met
 20 25 30

Ile Ser Thr Ala Leu Phe Ala Leu Thr Val Trp Leu Arg Ala Glu Pro

	35		40		45													
	Gly	Phe	Asn	Asp	Trp	Leu	Arg	Ile	Leu	Glu	Ala	Gln	Ser	Phe	Tyr	Ile		
	50						55					60						
	Gly	Val	Tyr	Val	Leu	Ile	Gly	Ile	Ser	Ile	Val	Met	Met	Ala	Val	Ser		
	65					70					75					80		
	Phe	Leu	Gly	Cys	Leu	Ser	Ala	Leu	Met	Glu	Asn	Thr	Leu	Ala	Leu	Phe		
				85						90					95			
	Val	Phe	Val	Gly	Thr	Gln	Val	Phe	Gly	Phe	Ile	Ala	Ile	Val	Ala	Gly		
				100					105					110				
	Ser	Ala	Val	Leu	Leu	Gln	Phe	Ser	Thr	Ile	Asn	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro		
			115					120					125					
	Leu	Leu	Asn	Val	Ser	Leu	Arg	Gly	Phe	Val	Ala	Thr	Ser	Glu	Tyr	Thr		
	130						135					140						
[0040]	Tyr	Ser	Asn	Tyr	Val	Leu	Thr	Met	Ile	Gln	Glu	Asn	Ile	Gly	Cys	Cys		
	145					150					155					160		
	Gly	Ala	Thr	Gly	Pro	Trp	Asp	Tyr	Leu	Asp	Leu	Arg	Gln	Pro	Leu	Pro		
					165					170					175			
	Ser	Ser	Cys	Arg	Asp	Thr	Val	Ser	Gly	Asn	Ala	Phe	Phe	Asn	Gly	Cys		
				180					185					190				
	Val	Asp	Glu	Leu	Thr	Trp	Phe	Phe	Glu	Gly	Lys	Thr	Gly	Trp	Ile	Val		
			195					200					205					
	Ala	Leu	Ala	Met	Thr	Leu	Gly	Leu	Leu	Asn	Val	Ile	Cys	Ala	Val	Met		
	210						215					220						
	Ser	Phe	Val	Leu	Val	Gln	Ala	Val	Lys	Lys	Glu	Glu	Glu	Gln	Ala	Ser		
	225					230					235					240		
	Asn	Tyr	Arg	Arg														

<210> 51

<211> 244
 <212> PRT
 <213> 黑腹果蝇
 <400> 51
 Met Gly Ile Gly Tyr Gly Ala Ser Asp Glu Gln Leu Glu Lys Gln Ile
 1 5 10 15
 Gly Cys Val Lys Tyr Thr Leu Phe Cys Phe Asn Ile Val Ala Trp Met
 20 25 30
 Ile Ser Thr Ala Leu Phe Ala Leu Thr Val Trp Leu Arg Ala Glu Pro
 35 40 45
 Gly Phe Asn Asp Trp Leu Arg Ile Leu Glu Ala Gln Ser Phe Tyr Ile
 50 55 60
 Gly Val Tyr Val Leu Ile Gly Ile Ser Ile Val Met Met Ala Val Ser
 65 70 75 80
 Phe Leu Gly Cys Leu Ser Ala Leu Met Glu Asn Thr Leu Ala Leu Phe
 [0041] 85 90 95
 Val Phe Val Gly Thr Gln Val Phe Gly Phe Ile Ala Ile Val Ala Gly
 100 105 110
 Ser Ala Val Leu Leu Gln Phe Ser Thr Ile Asn Ser Ser Leu Gln Pro
 115 120 125
 Leu Leu Asn Val Ser Leu Arg Gly Phe Val Ala Thr Ser Glu Tyr Thr
 130 135 140
 Tyr Ser Asn Tyr Val Leu Thr Met Ile Gln Glu Asn Ile Gly Cys Cys
 145 150 155 160
 Gly Ala Thr Gly Pro Trp Asp Tyr Leu Asp Leu Arg Gln Pro Leu Pro
 165 170 175
 Ser Ser Cys Arg Asp Thr Val Ser Gly Asn Ala Phe Phe Asn Gly Cys
 180 185 190
 Val Asp Glu Leu Thr Trp Phe Phe Glu Gly Lys Thr Gly Trp Ile Val
 195 200 205

Ala Leu Ala Met Thr Leu Gly Leu Leu Asn Val Ile Cys Ala Val Met
210 215 220

Ser Phe Val Leu Val Gln Ala Val Lys Lys Glu Glu Glu Gln Ala Ser
225 230 235 240

Asn Tyr Arg Arg

<210> 52
<211> 256
<212> PRT
<213> 玉米根萤叶甲

<400> 52

Met Met Ser Lys Val Asp Thr Gln Met Met Ser Lys Ala Asp Thr Gln
1 5 10 15

Glu Asp Ala Ser Phe Ala Lys Leu Glu Asn Gln Ile Ala Ile Ile Lys
20 25 30

[0042]

Tyr Val Ile Leu Phe Thr Asn Val Leu Gln Trp Ala Leu Gly Ala Ala
35 40 45

Ile Phe Ala Leu Cys Leu Trp Leu Arg Phe Glu Glu Gly Ile Gln Glu
50 55 60

Trp Leu Gln Lys Leu Asp Ser Glu Gln Phe Tyr Ile Gly Val Tyr Val
65 70 75 80

Leu Ile Val Ala Ser Leu Ile Val Met Ile Val Ser Phe Ile Gly Cys
85 90 95

Ile Ser Ala Leu Gln Glu Ser Thr Met Ala Leu Leu Val Tyr Ile Gly
100 105 110

Thr Gln Val Leu Ser Phe Ile Phe Gly Leu Ser Gly Ser Ala Val Leu
115 120 125

Leu Asp Asn Ser Ala Arg Asp Ser His Phe Gln Pro Arg Ile Arg Glu
130 135 140

Ser Met Arg Arg Leu Ile Met Asn Ala His His Asp Gln Ser Arg Gln
145 150 155 160

Thr Leu Ala Met Ile Gln Glu Asn Val Gly Cys Cys Gly Ala Asp Gly
165 170 175

Ala Thr Asp Tyr Leu Ser Leu Gln Gln Pro Leu Pro Ser Gln Cys Arg
180 185 190

Asp Thr Val Thr Gly Asn Pro Phe Phe His Gly Cys Val Asp Glu Leu
195 200 205

Thr Trp Phe Phe Glu Glu Lys Cys Gly Trp Ile Ala Gly Leu Ala Met
210 215 220

Ala Ile Cys Met Ile Asn Val Leu Ser Ile Val Leu Ser Thr Val Leu
225 230 235 240

Ile Gln Ala Leu Lys Lys Glu Glu Glu Ala Ser Asp Ser Tyr Arg Arg
245 250 255

[0043]

<210> 53

<211> 248

<212> PRT

<213> 玉米根萤叶甲

<400> 53

Met Met Ser Lys Ala Asp Thr Gln Glu Asp Ala Ser Phe Ala Lys Leu
1 5 10 15

Glu Asn Gln Ile Ala Ile Ile Lys Tyr Val Ile Leu Phe Thr Asn Val
20 25 30

Leu Gln Trp Ala Leu Gly Ala Ala Ile Phe Ala Leu Cys Leu Trp Leu
35 40 45

Arg Phe Glu Glu Gly Ile Gln Glu Trp Leu Gln Lys Leu Asp Ser Glu
50 55 60

Gln Phe Tyr Ile Gly Val Tyr Val Leu Ile Val Ala Ser Leu Ile Val
65 70 75 80

Met Ile Val Ser Phe Ile Gly Cys Ile Ser Ala Leu Gln Glu Ser Thr
85 90 95

Met Ala Leu Leu Val Tyr Ile Gly Thr Gln Val Leu Ser Phe Ile Phe
100 105 110

Gly Leu Ser Gly Ser Ala Val Leu Leu Asp Asn Ser Ala Arg Asp Ser
115 120 125

His Phe Gln Pro Arg Ile Arg Glu Ser Met Arg Arg Leu Ile Met Asn
130 135 140

Ala His His Asp Gln Ser Arg Gln Thr Leu Ala Met Ile Gln Glu Asn
145 150 155 160

Val Gly Cys Cys Gly Ala Asp Gly Ala Thr Asp Tyr Leu Ser Leu Gln
165 170 175

Gln Pro Leu Pro Ser Gln Cys Arg Asp Thr Val Thr Gly Asn Pro Phe
180 185 190

[0044]

Phe His Gly Cys Val Asp Glu Leu Thr Trp Phe Phe Glu Glu Lys Cys
195 200 205

Gly Trp Ile Ala Gly Leu Ala Met Ala Ile Cys Met Ile Asn Val Leu
210 215 220

Ser Ile Val Leu Ser Thr Val Leu Ile Gln Ala Leu Lys Lys Glu Glu
225 230 235 240

Glu Ala Ser Asp Ser Tyr Arg Arg
245

<210> 54

<211> 248

<212> PRT

<213> 巴氏根叶甲

<400> 54

Met Met Ser Lys Val Asp Lys Asp Glu Asp Ala Ser Phe Ala Lys Leu
1 5 10 15

Glu Asn Gln Ile Ala Val Ile Lys Tyr Val Ile Leu Phe Thr Asn Val

	20	25	30
	Leu Gln Trp Ala Leu Gly Ala Ala Ile Phe Ala Leu Cys Leu Trp Leu 35	40	45
	Arg Phe Glu Glu Gly Ile Gln Glu Trp Leu Gln Lys Leu Asp Ser Glu 50	55	60
	Gln Phe Tyr Ile Gly Val Tyr Val Leu Ile Val Ala Ser Leu Ile Val 65	70	75 80
	Met Ile Val Ser Phe Ile Gly Cys Ile Ser Ala Leu Gln Glu Ser Thr 85	90	95
	Thr Ala Leu Leu Val Tyr Ile Gly Thr Gln Val Leu Ser Phe Ile Phe 100	105	110
	Gly Leu Ser Gly Ser Ala Val Leu Leu Asp Asn Ser Ala Arg Asp Ser 115	120	125
[0045]	His Phe Gln Pro Arg Ile Arg Glu Ser Met Arg Arg Leu Ile Met Asn 130	135	140
	Ala His His Asp Gln Ser Arg Gln Thr Leu Ala Met Ile Gln Glu Asn 145	150	155 160
	Val Gly Cys Cys Gly Ala Asp Gly Ala Thr Asp Tyr Leu Ser Leu Gln 165	170	175
	Gln Pro Leu Pro Ser Gln Cys Arg Asp Thr Val Thr Gly Asn Pro Phe 180	185	190
	Phe His Gly Cys Val Asp Glu Leu Thr Trp Phe Phe Glu Glu Lys Cys 195	200	205
	Gly Trp Ile Ala Gly Leu Ala Met Ala Ile Cys Met Ile Asn Val Leu 210	215	220
	Ser Ile Val Leu Ser Thr Val Leu Ile Gln Ala Leu Lys Lys Glu Glu 225	230	235 240
	Glu Ala Ser Asp Ser Tyr Arg Arg		

245

<210> 55
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> 黄瓜十一星叶甲

<400> 55

Met Ile Gly Lys Val Asp Lys Glu Glu Asp Ala Ser Phe Ala Lys Leu
 1 5 10 15

Glu Asn Gln Ile Ala Ile Ile Lys Tyr Val Ile Leu Phe Thr Asn Val
 20 25 30

Leu Gln Trp Ala Leu Gly Ala Ala Ile Phe Ala Leu Cys Leu Trp Leu
 35 40 45

Arg Phe Glu Glu Gly Ile Gln Glu Trp Leu Gln Lys Leu Asp Ser Glu
 50 55 60

[0046]

Gln Phe Tyr Ile Gly Val Tyr Val Leu Ile Val Ala Ser Leu Ile Val
 65 70 75 80

Met Ile Val Ser Phe Ile Gly Cys Ile Ser Ala Leu Gln Glu Ser Thr
 85 90 95

Met Ala Leu Leu Val Tyr Ile Gly Thr Gln Val Leu Ser Phe Ile Phe
 100 105 110

Gly Leu Ser Gly Ser Ala Val Leu Leu Asp Asn Ser Ala Arg Asp Ser
 115 120 125

His Phe Gln Pro Arg Ile Arg Glu Ser Met Arg Arg Leu Ile Met Asn
 130 135 140

Ala His His Asp Gln Ser Arg Gln Thr Leu Ala Met Ile Gln Glu Asn
 145 150 155 160

Val Gly Cys Cys Gly Ala Asp Gly Ala Thr Asp Tyr Leu His Leu Gln
 165 170 175

Gln Pro Leu Pro Ser Gln Cys Arg Asp Thr Val Thr Gly Asn Pro Phe
 180 185 190

Phe His Gly Cys Val Asp Glu Leu Thr Trp Phe Phe Glu Glu Lys Cys
195 200 205

Gly Trp Ile Ala Gly Leu Ala Met Ala Ile Cys Met Ile Asn Val Leu
210 215 220

[0047]

Ser Ile Val Leu Ser Thr Val Leu Ile Gln Ala Leu Lys Lys Glu Glu
225 230 235 240

Glu Ala Ser Asp Ser Tyr Arg Arg
245

```

1.....11.....21.....31.....41.....51.....60
Dv-ssj3 MMSKVDTQMMSKADTQEDASFAKLENQIAIIKYVILFTNVLQWALGAAIFALCLWLRFE
Dv-ssj3b -----MMSKADTQEDASFAKLENQIAIIKYVILFTNVLQWALGAAIFALCLWLRFE
Db-ssj3 -----MMSKVDKDEDASFAKLENQIAVIKYVILFTNVLQWALGAAIFALCLWLRFE
Du-ssj3 -----MIGKVDKEEDASFAKLENQIAIIKYVILFTNVLQWALGAAIFALCLWLRFE
Tsp2A-PA -----MGIGYGASDEQLEKQIGCVKYTLFCFNIVAWMISTALFALTIVWLRAP
Tsp2A-PB -----MGIGYGASDEQLEKQIGCVKYTLFCFNIVAWMISTALFALTIVWLRAP
. . ** : ** : ** . : ** : : * : : * : : * : * : * : * : * : * : *

61.....71.....81.....91.....101.....111.....120
Dv-ssj3 GIQEWLQKLDSEQFYIGVYVLIVASLIVMIVSFIGCISALQESTMALLVYIGTQVLSFIF
Dv-ssj3b GIQEWLQKLDSEQFYIGVYVLIVASLIVMIVSFIGCISALQESTMALLVYIGTQVLSFIF
Db-ssj3 GIQEWLQKLDSEQFYIGVYVLIVASLIVMIVSFIGCISALQESTTALLVYIGTQVLSFIF
Du-ssj3 GIQEWLQKLDSEQFYIGVYVLIVASLIVMIVSFIGCISALQESTMALLVYIGTQVLSFIF
Tsp2A-PA GFNDWLRILEAQSFYIGVYVLIGISIVMMAVSFLGCLSALMENTLALFVFGTQVFGFIA
Tsp2A-PB GFNDWLRILEAQSFYIGVYVLIGISIVMMAVSFLGCLSALMENTLALFVFGTQVFGFIA
* : : * : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *

121.....131.....141.....151.....161.....171.....180
Dv-ssj3 GLSGSAVLLDNSARDSHFQPRIRESMRRLIMNAHHDQSRQTLAMIQENVGCCGADGATDY
Dv-ssj3b GLSGSAVLLDNSARDSHFQPRIRESMRRLIMNAHHDQSRQTLAMIQENVGCCGADGATDY
Db-ssj3 GLSGSAVLLDNSARDSHFQPRIRESMRRLIMNAHHDQSRQTLAMIQENVGCCGADGATDY
Du-ssj3 GLSGSAVLLDNSARDSHFQPRIRESMRRLIMNAHHDQSRQTLAMIQENVGCCGADGATDY
Tsp2A-PA IVAGSAVLLQFSTINSSLQPLLNVS LRGFVATSEYTYSNYVLTMIQENIGCCGATGPWDY
Tsp2A-PB IVAGSAVLLQFSTINSSLQPLLNVS LRGFVATSEYTYSNYVLTMIQENIGCCGATGPWDY
: : * : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *

181.....191.....201.....211.....221.....231.....240
Dv-ssj3 LSLQQPLPSQCRDVTGNPFFHGCVDDEL TWFFEEKCGWIAGLAMAICMINVLSIVLSTVL
Dv-ssj3b LSLQQPLPSQCRDVTGNPFFHGCVDDEL TWFFEEKCGWIAGLAMAICMINVLSIVLSTVL
Db-ssj3 LSLQQPLPSQCRDVTGNPFFHGCVDDEL TWFFEEKCGWIAGLAMAICMINVLSIVLSTVL
Du-ssj3 LHLQQPLPSQCRDVTGNPFFHGCVDDEL TWFFEEKCGWIAGLAMAICMINVLSIVLSTVL
Tsp2A-PA LDLRQPLPSSCRDTVSGNAFFNGCVDEL TWFFEGKTGWIVALAMTLGLLNVICAVMSFVL
Tsp2A-PB LDLRQPLPSSCRDTVSGNAFFNGCVDEL TWFFEGKTGWIVALAMTLGLLNVICAVMSFVL
* * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

241.....251..256
Dv-ssj3 IQALKKEEEASDSYRR
Dv-ssj3b IQALKKEEEASDSYRR
Db-ssj3 IQALKKEEEASDSYRR
Du-ssj3 IQALKKEEEASDSYRR
Tsp2A-PA VQAVKKEEEQASNYRR
Tsp2A-PB VQAVKKEEEQASNYRR
: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

```

图1

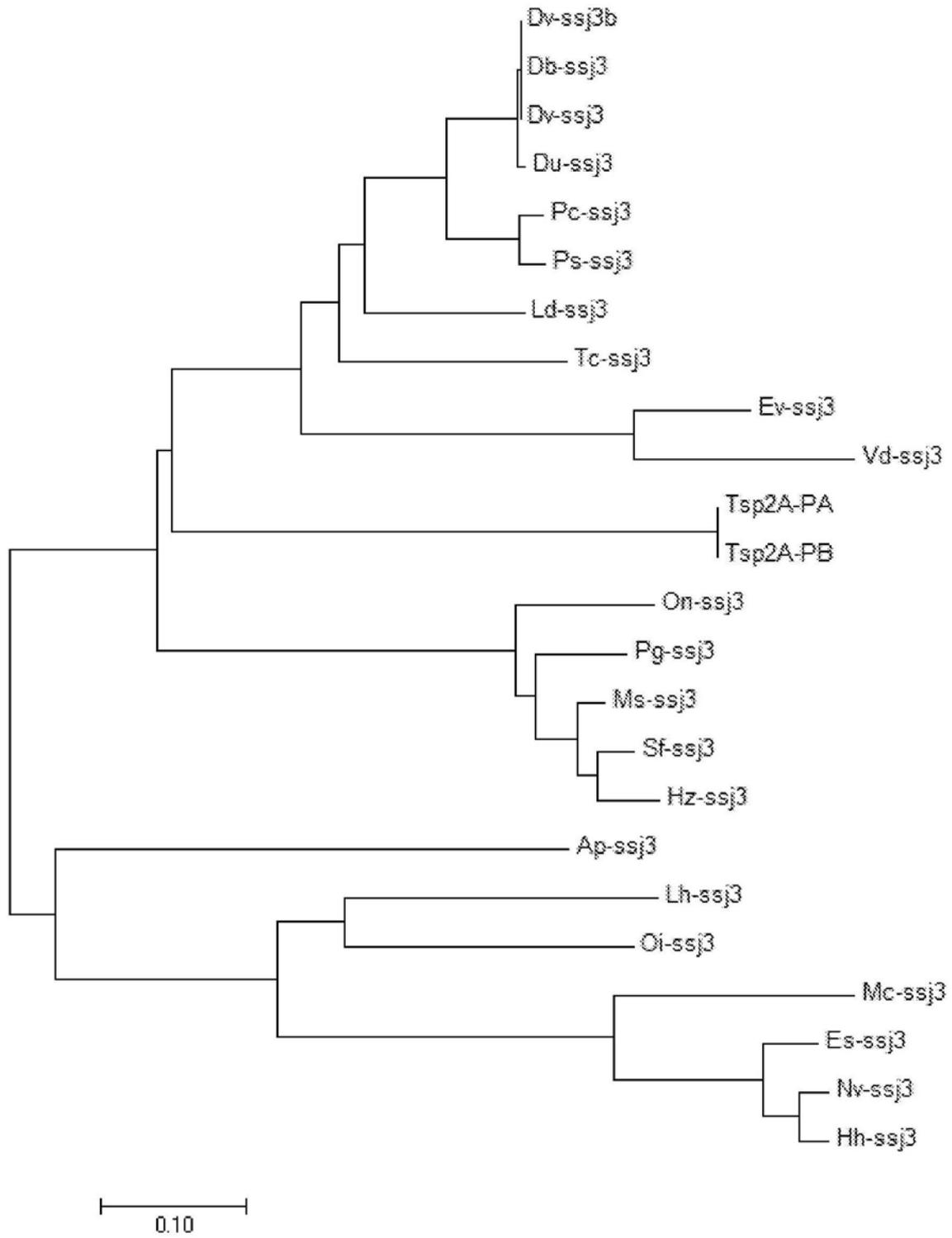


图2

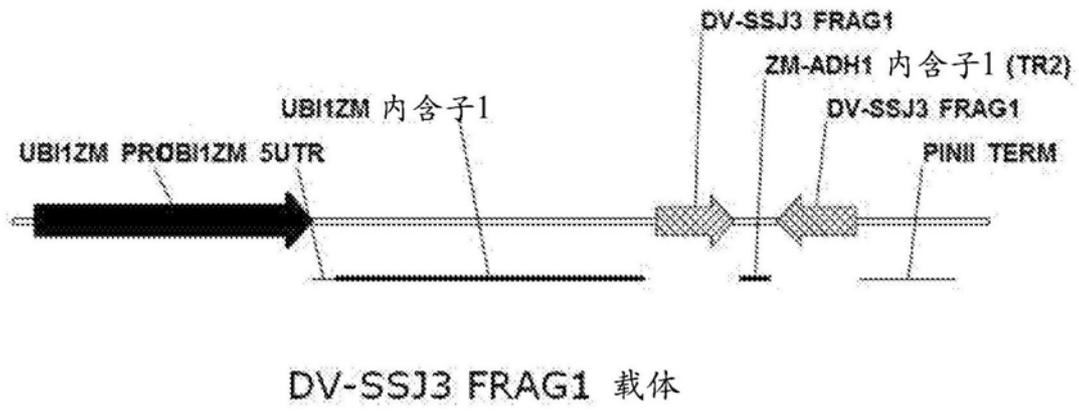


图3