



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107683089 A

(43)申请公布日 2018.02.09

(21)申请号 201680037770.0

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

(22)申请日 2016.05.03

代理人 孟凡宏 王月

(30)优先权数据

62/156,751 2015.05.04 US

(51)Int.Cl.

A01N 57/16(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.12.26

A01K 47/00(2006.01)

A01P 7/02(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/030579 2016.05.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/179180 EN 2016.11.10

(71)申请人 孟山都技术公司

地址 美国密苏里州

申请人 比欧洛吉科斯公司

(72)发明人 A·英贝格 M·卡普尔

权利要求书3页 说明书54页
序列表51页 附图11页

(54)发明名称

用于控制节肢动物寄生虫和害虫侵扰的组合物和方法

(57)摘要

本申请提供和公开了用于控制节肢动物寄生虫和害虫的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子和其钙调蛋白靶基因。具体来说,本申请提供并且公开了靶向瓦螨钙调蛋白基因序列的杀昆虫核酸分子。本申请还提供了用于控制和处理西方蜜蜂(蜜蜂)蜂巢中的寄生虫和害虫的方法和组合物。

1. 一种选择性杀昆虫剂组合物,其包含具有与所靶向的钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA的区域基本上互补或基本上同一的序列的核酸分子,其中所述核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列。

2. 一种蜜蜂可摄取的组合物,其包含蜜蜂饲料和具有与所靶向的钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA的区域基本上互补或基本上同一的序列的核酸分子,其中所述核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列。

3. 一种核酸构建体,其包含与所靶向的钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA的区域基本上同一或基本上互补的核酸分子,所述核酸分子可操作地连接至在宿主细胞中具有功能的启动子序列并且当被引入到所述宿主细胞中时能够产生dsRNA,其中所述核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列。

4. 一种向蜜蜂提供组合物的方法,其包括向所述蜜蜂提供有效量的包含与靶钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA的区域基本上同一或基本上互补的核酸分子的组合物,其中所述核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列,并且借此使所述核酸存在于蜜蜂组织中。

5. 一种减少狄斯瓦螨对蜜蜂的寄生的方法,其包括向所述蜜蜂提供有效量的核酸分子组合物,其中所述核酸分子与靶狄斯瓦螨钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA的区域基本上同一或基本上互补,其中所述核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列,由此减少狄斯瓦螨对所述蜜蜂的所述寄生。

6. 一种减少蜜蜂蜂巢的寄生虫负荷的方法,其包括向所述蜂巢提供有效量的与所靶向的寄生虫钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA的区域基本上同一或基本上互补的核酸分子,其中所述核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列,并且借此减少所述蜂巢的所述寄生虫负荷。

7. 一种选择性地处理节肢动物种类的寄生虫的方法,其包括向节肢动物种类递送有效量的与靶寄生虫钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA的区域基本上同一或基本上互补的核酸分子,其中所述核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列。

8. 一种处理或预防蜂群的蜂群崩溃失调症的方法,其包括向蜜蜂提供有效量的包含具有与靶狄斯瓦螨钙调蛋白基因序列的区域基本上同一或基本上互补的序列的核酸分子的组合物,其中所述核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列,并且借此降低狄斯瓦螨侵扰的水平或预防这种侵扰。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的组合物或方法,其中所述核酸分子与所述所靶向的钙调蛋白基因序列相比有至少一个核苷酸、至少两个核苷酸、至少三个核苷酸或至少四个核苷酸缺失。

10. 如权利要求9所述的组合物或方法,其中所述至少两个、至少三个或至少四个核苷酸在所述所靶向的钙调蛋白基因序列中不是连续的。

11. 如权利要求1至8中任一项所述的组合物或方法,其中所述核酸分子与所述所靶向的钙调蛋白基因序列相比包含至少一个、至少两个、至少三个或至少四个核苷酸取代。

12. 如权利要求[Error!Reference source not found.],所述的组合物或方法,其中所述至少两个、至少三个或至少四个核苷酸不是连续的。

13. 如权利要求1至8中任一项所述的组合物或方法,其中所述所靶向的钙调蛋白基因序列是选自SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35、69-89和93。

14. 如权利要求1至8中任一项所述的组合物或方法,其中所述所靶向的钙调蛋白基因序列与选自SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35、69-89和93的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。

15. 如权利要求1至8中任一项所述的组合物或方法,其中所述核酸分子与选自SEQ ID NO:90-92和94的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。

16. 如权利要求1至8中任一项所述的组合物或方法,其中所述核酸分子包含选自SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35、69-92和94的序列的至少18个连续核苷酸。

17. 如权利要求1、2和4至8中任一项所述的组合物或方法,其中所述核酸分子是dsRNA。

18. 如权利要求17所述的组合物或方法,其中所述dsRNA是siRNA。

19. 如权利要求17所述的组合物或方法,其中所述dsRNA包含选自SEQ ID NO:90-92或94的核酸序列。

20. 如权利要求1所述的选择性杀昆虫剂组合物,其还包含赋形剂。

21. 如权利要求20所述的选择性杀昆虫剂组合物,其中所述组合物是蜜蜂可摄取的或蜜蜂可吸收的。

22. 如权利要求20所述的选择性杀昆虫剂组合物,其中所述组合物是螨可摄取的或螨可吸收的。

23. 如权利要求20所述的选择性杀昆虫剂组合物,其中所述赋形剂是选自由蛋白质、花粉、碳水化合物、聚合物、液体溶剂、糖浆、糖固体和半固体饲料组成的组。

24. 如权利要求23所述的选择性杀昆虫剂组合物,其中所述液体溶剂是选自由蔗糖溶液和玉米糖浆溶液组成的组。

25. 如权利要求23所述的选择性杀昆虫剂组合物,其中所述蛋白是选自由花粉和大豆蛋白组成的组。

26. 如权利要求23所述的选择性杀昆虫剂组合物,其中所述赋形剂是选自糖固体、糖替代物或糖补充剂。

27. 如权利要求26所述的选择性杀昆虫剂组合物,其中所述糖固体包括浸渍有所述核酸分子的糖微粒。

28. 如权利要求17所述的选择性杀昆虫剂组合物,其中所述组合物还包含一种或多种核酸分子。

29. 如权利要求17所述的选择性杀昆虫剂组合物,其中所述一种或多种核酸分子包含与所靶向的钙调蛋白基因序列的第二区域互补的第二核酸序列。

30. 如权利要求29所述的选择性杀昆虫剂组合物,其中所述第二核酸分子包含一个或多个核酸片段。

31. 如权利要求2所述的蜜蜂可摄取的组合物,所述蜜蜂饲料包括选自由玉米糖浆、花粉替代物、花粉、花粉饼和方旦软糖组成的组的蜜蜂食物。

32. 如权利要求3所述的核酸构建体,其还包含选自由翻译前导序列、内含子、增强子、茎-环结构、阻遏物结合序列、终止序列、中止序列和多聚腺苷酸识别序列组成的组的至少

一个调控元件。

33. 如权利要求3所述的核酸构建体,其中所述宿主细胞是选自由细菌细胞和酵母细胞组成的组。

34. 如权利要求4所述的方法,其中所述靶钙调蛋白基因序列是狄斯瓦螨钙调蛋白基因序列。

35. 如权利要求4所述的方法,其中所述蜜蜂是属于某个蜂群的蜜蜂,并且所述饲喂降低了所述蜂群对狄斯瓦螨的易感性。

36. 如权利要求4或5所述的方法,其中所述蜜蜂是采集蜂或蜂巢蜂。

37. 如权利要求5所述的方法,其中所述蜜蜂是属于某个蜂群的蜜蜂,并且所述饲喂减少了狄斯瓦螨对所述蜂群的寄生。

38. 如权利要求37所述的方法,其中对所述蜂群的寄生的所述减少包括所述狄斯瓦螨的存活率低于25%、15%、10%或5%。

39. 如权利要求6或7所述的方法,其中所述寄生虫是狄斯瓦螨。

40. 如权利要求6所述的方法,其中所述蜜蜂蜂巢具有每100只蜜蜂至少1个、2个、3个、5个、10个或更多个寄生虫的初始寄生虫负荷。

41. 如权利要求40所述的方法,其中将所述寄生虫负荷降至每100只蜜蜂少于2个、少于3个、少于5个或少于10个寄生虫。

42. 如权利要求7所述的方法,其中所述处理降低所述节肢动物种类的寄生虫负荷、减少所述节肢动物种类的死亡或预防对所述节肢动物种类的寄生。

43. 如权利要求7所述的方法,其中所述节肢动物种类是选自由西方蜜蜂、东方蜜蜂、极小无刺蜂、集蜂科、熊蜂某种、姬蜂总科(寄生蜂)、跳蚤、蝇、虱、蜱和螨组成的组。

44. 如权利要求7所述的方法,其中所述节肢动物种类是群体种类。

45. 如权利要求7所述的方法,其中所述节肢动物种类是西方蜜蜂。

46. 如权利要求7所述的方法,其中所述寄生虫是选自由蜱螨亚纲(蜱、螨)、虱蝇总科(蝇)、姬蜂总科(寄生蜂)、狂蝇科(肤蝇)、虱目(虱)、蚤目(跳蚤)、微虾纲、豆蟹和蟹奴属组成的组。

47. 如权利要求46所述的方法,其中所述蜱螨亚纲是小蜂螨、鹿蜱或二斑叶螨。

48. 如权利要求7所述的方法,其中所述递送包括选自由通过饲喂器递送、喷洒在蜂巢架上和使用浸渍有所述组合物的蜂巢内装置来接触组成的组的方法。

用于控制节肢动物寄生虫和害虫侵扰的组合物和方法

[0001] 序列表的并入

[0002] 计算机可读形式的序列表通过电子递交方式与本申请一起提交,并且以引用的方式整体并入本申请中。该序列表包括在2016年5月3日创建的文件中,该文件的文件名为“SEQUENCE_LISTING_61478_ST25.txt”,并且大小为67,223字节(如在MS-Windows®操作系统中所测量)。

[0003] 本公开的领域

[0004] 提供了用于控制节肢动物的寄生虫和害虫侵扰的方法和组合物。还提供了用于控制蜜蜂的瓦螨侵扰的方法和组合物。

[0005] 背景

[0006] 正越来越多地以工业规模培养各个种类的节肢动物。昆虫和它们的幼虫很有营养,而且在很多文化中被生食和烹熟食用。诸如蟹、龙虾、小龙虾、虾和对虾之类的甲壳类动物以大型商业规模养殖,并且成为了人类饮食的一个重要部分。除了培养节肢动物种类供食用以外,还培养节肢动物作为害虫控制策略的一部分,包括用于对其它节肢动物进行生物控制,例如培养寄生蜂用于控制蟑螂和火蚁。节肢动物还可以充当诸如染料、药品、药物和抗生素的原材料来源。随着节肢动物培养的重要性增加而增长的是各种害虫和寄生虫,它们破坏节肢动物群体或大大降低从节肢动物培养物获得的产物产量。因此,日益需要控制节肢动物害虫和寄生虫的方法。

[0007] 培养的节肢动物中最重要的种类是蜜蜂。蜜蜂西方蜜蜂为作物有效授粉所需要,并且因此对世界农业非常重要。蜜蜂还产生了经济上重要的产物,包括蜂蜜和蜂蜡。蜜蜂易受众多寄生虫和病原体感染,包括外寄生螨狄斯瓦螨 (*Varroa destructor*)。

[0008] 瓦螨(狄斯瓦螨)是管控的蜜蜂(西方蜜蜂)的头号寄生虫,并且对商业养蜂来说是最大的全球性威胁(Rosenkranz等2010)。成螨通常被蜜蜂幼蜂信息素所吸引而在封盖前进入工蜂和雄蜂的抚幼室中。螨潜入蜜蜂放在预期封盖的巢室内的幼蜂食物中,从而最可能避免被保育蜂认出并去除。在保育蜂将幼蜂巢室封盖后,螨附着至幼虫并且开始吞食蜂幼虫的血淋巴。这个过程是为螨的卵子发生做准备,并且继而在几天后产下雄性卵和雌性卵。最终,成体瓦螨离开巢室并且紧紧抓住出房的蜜蜂。瓦螨用多种方式直接损害蜜蜂,最值得注意的是通过消耗资源、不利地影响先天蜜蜂免疫系统和通过作为非常有效的病毒载体(Di Prisco等2011),已知其中一些在螨中复制,因此显著增加了病毒负载。

[0009] 瓦螨问题的安全、有效且持久的解决方案是当前面临的一个有待解决的挑战。当前,养蜂人使用了过多的方法来控制瓦螨水平,包括各种化学杀螨剂,其中大部分已经失效并且有毒和/或在蜂蜡和蜂蜜中留有残留。其它方法包括施用草酸或甲酸、单萜类(百里酚)和各种其它控制操作,效果千差万别,包括对所处理的群体存在毒性。培育蜜蜂对瓦螨的抗性,诸如选择卫生的行为,从而除去受侵扰的幼蜂提供了有限的实际成果。

[0010] 蜜蜂的蜂群崩溃失调症(CCD)对毁灭美国和世界农业存在威胁。实际上,在美国最近爆发CCD的2006年至2007年冬季,240万蜜蜂蜂巢有估计25%或更多由于CCD而蒙受损失。在2006年至2007年的冬季,美国有估计23%的养蜂经营遭受CCD,影响了平均45%的养蜂人

经营。在2007年至2008年冬季,USDA-ARS的CCD行动小组估计所有商业经营蜂巢的总计36%被CCD破坏。

[0011] CCD以蜂群的成蜂群体快速损失为特征,死亡的成蜂通常在距蜂群一定距离处被发现。在崩溃的最后阶段,蜂王仅由少数新出房的成蜂照顾。崩溃的蜂群往往有大量封盖的幼蜂和食物储存。2006年首次报道了CCD现象;然而,养蜂人早在2004年就注意到了符合CCD的独特蜂群衰退。已经假定诸如螨和感染物、气候模式、电磁(蜂窝天线)辐射、杀虫剂、营养不良和应激之类的各种因素为诱因。迄今为止,CCD的控制集中在瓦螨控制、卫生和去除受影响的蜂巢、处理机会性感染(诸如小孢子虫属)和改善营养。迄今为止还没有开发出有效的预防措施。

[0012] 瓦螨寄生于蛹和成蜂,并且在蛹抚幼室内繁殖。所述螨用它们的嘴刺破蜜蜂的外骨骼并以蜜蜂的血淋巴为食。外骨骼中的这些受伤部位藏有细菌感染,诸如引起欧洲蜜蜂幼虫腐烂病的蜂房蜜蜂球菌。除了它们的寄生作用以外,还怀疑瓦螨充当众多蜜蜂病原体,包括畸翅病毒(DWV)、喀什米尔蜜蜂病毒(KBV)、急性蜜蜂麻痹病病毒(ABPV)和黑蜂王台病毒(BQCV)的媒介物,并且可以削弱它们的宿主的免疫系统,从而让它们易受感染。如果不处理,那么瓦螨侵扰通常造成蜂群层级的死亡。

[0013] 当前处理瓦螨侵扰的方法被证明是无效的,因为螨对现有杀螨剂产生了抗性。另外,使用此类杀螨剂可能将有害化学品引入准备供人消费的蜂蜜中。

发明概要

[0014] 本公开提供了并且包括选择性杀昆虫剂组合物,所述选择性杀昆虫剂组合物包含具有与钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA的区域基本上互补或基本上同一的序列的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子。在一些方面,所述组合物还包含赋形剂。

[0015] 若干实施方案涉及一种抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子与瓦螨钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA的区域基本上互补或基本上同一,并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子与选自SEQ ID NO: 1-4、6、23、26-35、69-89和93的参考瓦螨钙调蛋白基因序列相比包括一个或多个核酸的缺失,使得所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列。在一些实施方案中,所述非靶生物体基因序列为瓦螨钙调蛋白基因序列的直系同源物。在一些实施方案中,所述非靶生物体基因序列为瓦螨钙调蛋白基因序列的同系物。在一些实施方案中,所述非靶生物体基因序列与瓦螨钙调蛋白基因序列无关。在一个方面,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子与所述所靶向的钙调蛋白基因序列相比在所述区域中有至少一个核苷酸缺失。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子与所述所靶向的钙调蛋白基因序列相比在所述区域中有至少两个、至少三个或至少四个核苷酸缺失。在一些实施方案中,所述至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述所靶向的钙调蛋白基因序列中是连续的。在其它实施方案中,所述至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述所靶向的钙调蛋白基因序列中不是连续的。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸包含与选自SEQ ID NO:90-92和94的序列基本上同一或基本上互补的序列。

[0016] 在一个方面,所述选择性杀昆虫剂组合物中的核酸分子是dsRNA。在一些方面,所述dsRNA是siRNA。

[0017] 在一个方面,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子与选自SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35、69-89和93的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在另一个方面,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子与选自SEQ ID NO:90-92和94的序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在一些方面,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子包含选自SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35和69-93的序列的至少18个连续核苷酸。在一些方面,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列。在一些方面,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子由选自SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35和69-93的序列组成。

[0018] 在一个方面,所述选择性杀昆虫剂组合物还包含与钙调蛋白基因序列的第一区域基本上互补或基本上同一的一种或多种抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子。在一些方面,所述一种或多种核酸分子包含与钙调蛋白基因序列的第二区域互补的第二核酸序列。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子与靶钙调蛋白基因序列相比在所述第一区域和/或第二区域中有至少一个、至少两个、至少三个或至少四个核苷酸缺失。在一些实施方案中,所述靶钙调蛋白基因序列与选自SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35、69-89和93的序列或其片段基本上同一或基本上互补。在一些实施方案中,所述至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述靶钙调蛋白基因序列中是连续的。在其它实施方案中,所述至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述靶钙调蛋白基因序列中不是连续的。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸包含与选自SEQ ID NO:90-92的序列基本上同一或基本上互补的序列。

[0019] 在一个方面,所述选择性杀昆虫剂组合物为蜜蜂可摄取的、蜜蜂可吸收的、螨可摄取的或螨可吸收的。

[0020] 在一个方面,所述赋形剂是选自由蛋白、花粉、碳水化合物、聚合物、液体溶剂、糖浆、糖固体和半固体饲料组成的组。在一些方面,所述液体溶剂是选自由蔗糖溶液和玉米糖浆溶液组成的组。在一些方面,所述蛋白是选自由花粉和大豆蛋白组成的组。在另一个方面,所述赋形剂是选自糖、糖替代物或糖补充剂的固体。在一些方面,所述糖固体包括浸渍有dsRNA核酸的糖微粒。

[0021] 在一个方面,本申请公开了蜜蜂可摄取的组合物,所述蜜蜂可摄取的组合物包含蜜蜂饲料和具有与钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA的一个或多个区域基本上同一或基本上互补的序列的核酸分子。在一些实施方案中,所述核酸分子与瓦螨钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA的区域基本上互补或基本上同一,并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列。在一些实施方案中,所述核酸分子与靶瓦螨钙调蛋白基因序列相比在所述一个或多个区域中有至少一个、至少两个、至少三个或至少四个核苷酸缺失。在一些实施方案中,所述靶瓦螨钙调蛋白基因序列与选自SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35、69-89和93的序列或其片段基本上互补或基本上同一。在一些实施方案中,所述至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述所靶向的钙调蛋白基因序

列中是连续的。在其它实施方案中,所述至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述所靶向的钙调蛋白基因序列中不是连续的。在一些实施方案中,所述核酸分子包含与选自SEQ ID NO:90-92和94的序列基本上同一或基本上互补的序列。在一些方面,所述蜜蜂饲料包括选自由玉米糖浆、花粉替代物、花粉、花粉饼和方旦软糖组成的组的蜜蜂食物。在一些方面,所述蜜蜂饲料还包括矿物盐、精油、啤酒酵母、酵母提取物、海藻糖、胰蛋白胨、奶粉、卵磷脂和维生素C中的一种或多种。精油的实例包括但不限于冬青油、留兰香油、薄荷油、柠檬草油和茶树油。

[0022] 在另一个方面,本申请公开了一种核酸构建体,所述核酸构建体包含编码与钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA的区域基本上同一或互补的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸序列,可操作地连接至在宿主细胞中具有功能的启动子序列并且当被引入到所述宿主细胞中时能够产生dsRNA。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与所靶向的钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA的区域基本上互补或基本上同一,并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸序列与靶钙调蛋白基因序列相比包括至少一个、至少两个、至少三个或至少四个核苷酸的缺失。在一些实施方案中,所述所靶向的钙调蛋白基因序列与选自SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35、69-89和93的序列或其片段基本上同一或基本上互补。在一些实施方案中,所述至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述所靶向的钙调蛋白基因序列中是连续的。在其它实施方案中,所述至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述所靶向的钙调蛋白基因序列中不是连续的。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸包含与选自SEQ ID NO:90-92和94的序列基本上同一或基本上互补的序列。在一些方面,所述核酸构建体还包含选自由翻译前导序列、内含子、增强子、茎-环结构、阻遏物结合序列、终止序列、中止序列和多聚腺苷酸识别序列组成的组的至少一个调控元件。在一些方面,所述宿主细胞是细菌或酵母细胞。

[0023] 在另一个方面,本申请公开了一种向蜜蜂提供组合物的方法,所述方法包括向所述蜜蜂提供有效量的包含与钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA的一个或多个区域基本上同一或基本上互补的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸的组合物,借此使所述核酸存在于蜜蜂组织中。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与所靶向的钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA的区域基本上互补或基本上同一,并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列。在一些实施方案中,所述非靶生物体是蜜蜂。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶钙调蛋白基因序列相比在所述一个或多个区域中包含至少一个、至少两个、至少三个或至少四个核苷酸的缺失。在一些实施方案中,所述所靶向的钙调蛋白基因序列与选自SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35、69-89和93的序列或其片段基本上同一或基本上互补。在一些实施方案中,所述至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述所靶向的钙调蛋白基因序列中是连续的。在其它实施方案中,所述至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述所靶向的钙调蛋白基因序列中不是连续的。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸包含与选自SEQ ID NO:90-92和94的序列基本上同一或基本上互补的序列。在另一个方面,本申请公开了一种治疗或预防蜂群的疾病的方法,所述方法包括向蜜蜂提供有效量的包含与钙调蛋白基因序列的一个或多个区域基本上同一或基本上互补的抗寄生虫、抗害虫或杀昆

虫核酸的组合物,借此使所述核酸存在于蜜蜂组织中。在一些方面,所述钙调蛋白基因序列是狄斯瓦螨钙调蛋白基因序列。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与瓦螨钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA的区域基本上互补或基本上同一,并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶钙调蛋白基因序列相比在一个或多个区域中包含至少一个、至少两个、至少三个或至少四个核苷酸的缺失。在一些实施方案中,所述靶钙调蛋白基因序列与选自SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35、69-89和93的核酸序列或其片段基本上互补或基本上同一。在一些实施方案中,所述至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述所靶向的钙调蛋白基因序列中是连续的。在其它实施方案中,所述至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述所靶向的钙调蛋白基因序列中不是连续的。

[0024] 在另一个方面,本申请公开了一种减少狄斯瓦螨对蜜蜂的寄生的方法,所述方法包括向所述蜜蜂提供有效量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸组合物,其中所述核酸与狄斯瓦螨钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA的一个或多个区域基本上同一或基本上互补,从而减少狄斯瓦螨对所述蜜蜂的寄生。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸包含与选自SEQ ID NO:90-92和94的序列基本上同一或基本上互补的序列。

[0025] 在另一个方面,本申请公开了一种减少蜜蜂蜂巢的寄生虫负载的方法,所述方法包括向所述蜂巢提供有效量的与寄生虫钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA的一个或多个区域基本上同一或基本上互补的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸,借此减少所述蜂巢的寄生虫负载。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子与靶寄生虫钙调蛋白基因序列相比在一个或多个区域中包含至少一个、至少两个、至少三个或至少四个核苷酸的缺失。在一些实施方案中,所述靶寄生虫钙调蛋白基因序列与选自SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35、69-89和93的核酸序列基本上互补或基本上同一。在一些实施方案中,所述至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述所靶向的钙调蛋白基因序列中是连续的。在其它实施方案中,所述至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述所靶向的钙调蛋白基因序列中不是连续的。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸包含与选自SEQ ID NO:90-92和94的序列基本上同一或基本上互补的序列。

[0026] 在另一个方面,本申请公开了一种选择性处理节肢动物种类的寄生虫的方法,所述方法包括向节肢动物物种递送有效量的与寄生虫钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA的一个或多个区域基本上同一或基本上互补的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶节肢动物钙调蛋白基因序列相比在一个或多个区域中有至少一个、至少两个、至少三个或至少四个核苷酸缺失。在一些实施方案中,所述靶节肢动物钙调蛋白基因序列与选自SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35、69-89和93的序列或其片段基本上互补或基本上同一。在一些实施方案中,所述至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述所靶向的钙调蛋白基因序列中是连续的。在其它实施方案中,所述至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述所靶向的钙调蛋白基因序列中不是连续的。在一些实施方案中,所述抗寄

生虫、抗害虫或杀昆虫核酸包含与选自SEQ ID NO:90-92和94的序列基本上同一或基本上互补的序列。

[0027] 在另一个方面,本申请提供并且公开了一种处理或预防蜂群的蜂群崩溃失调症的方法,所述方法包括向蜂群提供有效量的包含具有与狄斯瓦螨钙调蛋白基因序列的一个或多个区域基本上同一或基本上互补的序列的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子的组合物,借此降低或预防狄斯瓦螨侵扰的水平。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶钙调蛋白基因序列相比在一个或多个区域中有至少一个、至少两个、至少三个或至少四个核苷酸缺失。在一些实施方案中,所述靶节肢动物钙调蛋白基因序列与选自SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35、69-89和93的序列或其片段基本上互补或基本上同一。在一些实施方案中,所述至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述所靶向的钙调蛋白基因序列中是连续的。在其它实施方案中,所述至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述所靶向的钙调蛋白基因序列中不是连续的。

[0028] 附图简述

[0029] 图1提供了来自不同的物种的钙调蛋白(CAM)基因的系统发生树。紧挨物种名称前的数字对应于序列标识号(SEQ ID NO)。

[0030] 图2提供了在处理第3天的直接饲喂生物测定中暴露于包含与SEQ ID NO:3(CAM373)同一或互补的序列的核酸的螨相对于未处理的对照组(CNTR)或非特异序列(SCRAM,SEQ ID NO:5)的存活率。

[0031] 图3图A提供了在用包含与SEQ ID NO:3(CAM373)同一或互补的序列的核酸或者与SEQ ID NO:4(CAM186)同一或互补的序列的核酸处理后第五天相对于对照组的基因表达分析。图B示出了暴露于包含与SEQ ID NO:3(CAM373)或4(CAM186)同一或互补的序列的核酸的螨相对于对照组的存活率。

[0032] 图4提供了经处理的蜂巢相对于未处理的对照组在不同的时间段内的螨负载/100只蜜蜂。

[0033] 图5提供了用包含与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:89同一或互补的序列的核酸处理的螨在处理第5天(D5)或第6天(D6)相对于未处理(NTC)的存活率%。

[0034] 图6提供了用包含与SEQ ID NO:3同一或互补的序列的核酸或者包含与SEQ ID NO:88或SEQ ID NO:89同一或互补的序列的核酸的混合物处理的螨在第5天(5)、第6天(6)和第7天(7)相对于未处理(NTC)的存活率%。

[0035] 图7提供了经处理的蜂巢相对于未处理的对照组在17周时间段内的瓦螨负载/100只蜜蜂。最左侧的条形表示用非特异序列(SCRAM,SEQ ID NO:5)处理的蜂巢,中间的条形是未处理的蜂巢,而最右侧的条形是用SEQ ID NO:3(CAM 373)处理的蜂巢。

[0036] 图8提供了用包含与SEQ ID NO:3同一或互补的序列的核酸、包含与SEQ ID NO:90同一或互补的序列的核酸或包含与SEQ ID NO:92同一或互补的序列的核酸处理的螨在第5天(D5)或第6天(D6)相对于未处理(NTC)的存活率%。

[0037] 图9提供了用包含与SEQ ID NO:3同一或互补的序列的核酸、包含与SEQ ID NO:91同一或互补的序列的核酸或者包含与SEQ ID NO:90或SEQ ID NO:92同一或互补的序列的

核酸的混合物处理的螨在第4天 (D4) 相对于未处理 (NTC) 的存活率%。

[0038] 图10提供了如在第4天通过QuantiGene™ (QG) 针对SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:90与SEQ ID NO:92的混合物的处理相对于未处理 (NTC) 所测量的钙调蛋白基因表达分析。

[0039] 图11提供了经处理的蜂巢相对于未处理的对照组在19周时间段内的瓦螨负载/100只蜜蜂。最左侧的条形表示未处理的蜂巢,中间的条形是用包含与SEQ ID NO:94同一或互补的序列的核酸处理的蜂巢,而最右侧的条形是用包含与SEQ ID NO:91同一或互补的序列的核酸处理的蜂巢。

[0040] 详细描述

[0041] 除非另外定义,否则如本文中所使用的技术和科学术语具有与普通技术人员通常理解的含义相同的含义。本领域技术人员将会认识到,众多方法可以用于实施本公开。实际上,本公开决不限于所描述的方法和材料。本文中所引用的任何参考文献都以引用的方式整体并入。出于本公开的目的,在下文定义以下术语。

[0042] 应该理解,本申请中公开的任何序列标识号 (SEQ ID NO) 都可以指DNA序列或RNA序列,这取决于提及SEQ ID NO之处的上下文,即使该SEQ ID NO仅以DNA序列形式或RNA序列形式表示。举例来说,SEQ ID NO:1是以DNA序列形式表示 (例如,列出T表示胸腺嘧啶),但其可以指对应于成熟狄斯瓦螨钙调蛋白核酸序列的DNA序列,或成熟狄斯瓦螨钙调蛋白分子核酸序列的RNA序列。类似地,尽管SEQ ID NO:3是以RNA序列形式表示 (例如,列出U表示胸尿嘧啶),但取决于所描述的分子的实际类型,SEQ ID NO:3可以指包括dsRNA的有义股或反义股,或者对应于所示出的RNA序列的DNA分子的序列。任何情况下,预见到带有任何取代的具有所公开的序列的DNA和RNA分子。

[0043] 如本文中所使用,术语“约”是指±10%。

[0044] 除非上下文另外明确指出,否则如本文中所使用,单数形式“一 (a,an)”和“所述 (the)”包括复数指代物。举例来说,术语“一种化合物”或“至少一种化合物”可以包括多种化合物,包括其混合物。

[0045] 如本文中所使用,“基本上同一”或“基本上互补”是指在生理条件下与内源基因、从其转录的RNA或其片段杂交从而实现所述内源基因的调控或抑制的核酸 (或双链核酸的至少一条链或其部分,或单链核酸的一部分)。举例来说,在一些方面,核酸当与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60或更多个连续核苷酸的区域相比时具有100%序列同一性或至少约83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。在一些方面,核酸当与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60或更多个连续核苷酸的区域相比时具有100%序列互补性或至少约83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列互补性。在一些方面,核酸与给定靶基因 (基因的编码或非编码序列) 的一个等位基因或一个家族成员具有100%序列同一性或互补性。在一些方面,核酸与给定靶基因的多个等位基因或家族

成员具有至少约83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性或互补性。在一些方面,核酸与给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有100%序列同一性或互补性。

[0046] 在一些方面,所述核酸与靶害虫的内源钙调蛋白基因或从其转录的RNA的至少约10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70或更多个连续核苷酸基本上同一或基本上互补。在一些方面,所述核酸不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列。在一些方面,所述核酸与选自SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35、69-89和93的靶钙调蛋白基因序列相比包含至少一个核苷酸缺失。在一方面,所述核酸序列与靶害虫的内源参考钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA相比有至少一个核苷酸缺失,使得所述核酸不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列。所述核酸可以是单链DNA、单链RNA、双链RNA、双链DNA或双链DNA/RNA杂合体。在一些方面,所述所靶向的钙调蛋白基因序列是狄斯瓦螨钙调蛋白基因序列。在一方面,所述所靶向的钙调蛋白基因序列是选自SEQ ID NO:1的钙调蛋白基因序列。在一方面,所述所靶向的钙调蛋白基因序列是选自SEQ ID NO:2的钙调蛋白基因序列。在一方面,所述所靶向的钙调蛋白基因序列是选自SEQ ID NO:3的钙调蛋白基因序列。在一方面,所述所靶向的钙调蛋白基因序列是选自SEQ ID NO:4的钙调蛋白基因序列。在一方面,所述所靶向的钙调蛋白基因序列是选自SEQ ID NO:69的钙调蛋白基因序列。在一方面,所述所靶向的钙调蛋白基因序列是选自SEQ ID NO:70的钙调蛋白基因序列。在一方面,所述所靶向的钙调蛋白基因序列是选自SEQ ID NO:71-87的钙调蛋白基因序列。在一方面,所述所靶向的钙调蛋白基因序列是选自SEQ ID NO:88的钙调蛋白基因序列。在一方面,所述所靶向的钙调蛋白基因序列是选自SEQ ID NO:89的钙调蛋白基因序列。在一方面,所述所靶向的钙调蛋白基因序列是选自SEQ ID NO:93的钙调蛋白基因序列。在一方面,所述核酸与靶害虫的内源钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA相比有至少一核苷酸缺失。在一方面,所述核酸与靶害虫的内源钙调蛋白基因序列或从其转录的RNA相比有至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个或至少十个核苷酸缺失。在一些方面,所述至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个或至少十个缺失的核苷酸在靶内源钙调蛋白基因序列中是连续的。在其它方面,所述至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个或至少十个缺失的核苷酸在所述靶内源钙调蛋白基因序列中不是连续的。在一个方面,所述所靶向的钙调蛋白基因序列与选自SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35、69-89和93的序列基本上互补或基本上同一。在一个方面,所述核酸包含选自SEQ ID NO:90-92和94的序列。

[0047] 如本文中所使用,术语“处理”包括消除、实质上抑制、减缓或逆转病状的进展、实质上改善病状的临床或美学症状或者实质上预防病状的临床或美学症状的出现。在根据本公开的一方面,组合物可以用于处理生物体或生物体群体的寄生影响。在一方面,核酸组合物可以用于处理宿主生物体或群体的寄生虫。在一方面,所述宿主生物体是蜜蜂,并且所述寄生虫是螨狄斯瓦螨。

[0048] 如本文中所使用,短语“RNA沉默”是指由RNA分子介导的一组调控机制(例如,RNA干扰(RNAi)、转录基因沉默(TGS)、转录后基因沉默(PTGS)、压制、共抑制和翻译阻遏),其引起对应的蛋白质编码基因或蜂病原体RNA序列的表达的抑制或“沉默”。已经在许多类型的

生物体中观察到RNA沉默,包括植物、动物和真菌。在根据本公开的诸多方面,核酸组合物提供RNA沉默。在某些方面,所述核酸组合物在寄生虫中提供RNA沉默和致死性。

[0049] 如本文中所使用,术语“RNA沉默剂”是指与靶基因或由所述靶基因或其片段表达的RNA的多核苷酸序列实质上同源或互补并且能够抑制或使靶基因表达“沉默”的核酸。一般关于RNA沉默剂所针对的靶序列来描述RNA沉默剂。所述靶序列可以包括但不限于启动子区、5'非翻译区、可以包括内含子区的转录物编码区、3'非翻译区或这些区域的组合。在一些实施方案中,所述靶序列可以包括编码序列或非编码序列或两者。在一些实施方案中,所述靶序列与信使RNA同一或互补,例如在所述靶序列是cDNA的实施方案中。在一些实施方案中,所述靶序列是靶害虫中内源表达的天然钙调蛋白基因序列。在一些实施方案中,所述靶序列是选自SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35、69-89和93的钙调蛋白基因序列或其部分。在一些实施方案中,所述参考钙调蛋白基因序列包含选自SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35、69-89和93的序列的至少18个连续核苷酸、至少19个连续核苷酸、至少20个连续核苷酸、至少21个连续核苷酸、至少22个连续核苷酸或更多个。

[0050] 在某些方面,所述RNA沉默剂能够通过转录后沉默机制防止mRNA分子的完整加工(例如,完全翻译和/或表达)。RNA沉默剂可以是单链或双链RNA或者单链或双链DNA或者双链DNA/RNA杂合体或者其经修饰的类似物。在一些方面,所述RNA沉默剂是选自由以下各项组成的组:(a)单链RNA分子(ssRNA)、(b)自杂交而形成双链RNA分子的ssRNA、(c)双链RNA分子(dsRNA)、(d)单链DNA分子(ssDNA)、(e)自杂交而形成双链DNA分子的ssDNA以及(f)被转录为RNA分子的包括经修饰的P_o1 III基因的单链DNA分子、(g)双链DNA分子(dsDNA)、(h)被转录为RNA分子的包括经修饰的P_o1 III启动子的双链DNA分子、(i)双链杂交RNA/DNA分子或者其组合。在一些方面,这些多核苷酸包括经化学修饰的核苷酸或非典型核苷酸。在一些方面,所述RNA沉默剂是非编码RNA分子,例如包含配对股链的RNA双链体,以及可以由其产生此类小非编码RNA的前体RNA。在一些方面,所述RNA沉默剂为dsRNA,诸如siRNA、miRNA和shRNA。在一个方面,所述RNA沉默剂能够诱导RNA干扰。在另一个方面,所述RNA沉默剂能够介导翻译阻遏。在一方面,所述RNA沉默剂能够抑制钙调蛋白基因的表达。在另一个方面,所述RNA沉默剂能够用在抑制靶基因的表达并且由此杀死靶生物体的方法中。在某些方面,所述靶基因是钙调蛋白基因,并且所述靶生物体是狄斯瓦螨。

[0051] RNA干扰是指动物中由小RNA介导的序列特异性转录后基因沉默过程。在植物中,对应的过程通常称为转录后基因沉默或RNA沉默,而在真菌中还称为压制。尽管并不局限于任何具体理论,但认为转录后基因沉默过程是用于防止外来基因表达的进化上保守的细胞防御机制,并且被不同的植物群和门所共有。这种防止外来基因表达可以响应于来源于病毒感染或者来源于经由特异性破坏同源单链RNA或病毒基因组RNA的细胞应答而将转座子元件随机整合至宿主基因组中的双链RNA(dsRNA)的产生而进化。在根据本公开的诸多方面,核酸组合物在靶生物体中引起RNA干扰。在某些方面,所述核酸组合物在狄斯瓦螨存在于宿主生物体蜜蜂中时在狄斯瓦螨中引起RNA干扰。根据本公开的诸多方面,选择性杀昆虫剂可以在靶生物体中引起RNA干扰,而在非靶生物体中不具有RNA干扰活性。

[0052] 如本文中所使用,“小RNA”是指长度为至少15个碱基对、一般15至30个核苷酸长、优选20至24个核苷酸长的任何RNA分子。在根据本公开的诸多方面,“小RNA”长度大于50个碱基对。在一方面,所述小RNA长度大于50个碱基对但小于约500个碱基对。在一方面,所述

小RNA长度大于100个碱基对但小于约500个碱基对。在一方面,所述小RNA长度大于200个碱基对但小于约500个碱基对。小RNA可以是双链的或单链的。小RNA包括但不限于miRNA(微RNA)、ta-siRNA(反式激活siRNA)、siRNA、激活RNA(RNAa)、nat-siRNA(天然反义siRNA)、hc-siRNA(异染色质siRNA)、顺式作用siRNA、lmiRNA(长miRNA)、lsiRNA(长siRNA)和easiRNA(表观基因激活的siRNA)以及其相应的前体。在一些实施方案中,本公开的siRNA分子是miRNA分子、ta-siRNA分子和RNAa分子以及其相应的前体。小RNA可以由生物体在体内加工成活性形式。根据本公开的诸多方面,选择性杀昆虫剂可以是小RNA。

[0053] 在根据本公开的诸多方面,直接提供呈组合物形式的小RNA。在其它方面,由生物体在体内从DNA或RNA前体产生小RNA。在一些方面,小RNA在生物体,例如酵母或细菌细胞中作为转基因产物产生。在某些方面,作为转基因产物产生的小RNA是作为前体产生,所述前体在被生物体摄取或吸收后在体内进行加工。在其它方面,作为转基因产物产生的小RNA是作为前体产生,所述前体在被生物体摄取或吸收后在体内进行加工。

[0054] 在一些方面,所述RNA沉默剂可以是人工微RNA。如本文中所使用,“人工微RNA”(amiRNA)是一种类型的miRNA,它是通过从天然miRNA前体中置换天然miRNA双链体而得到。一般来说,人工miRNA是通过用对应于人工miRNA序列的目标序列交换天然存在的前miRNA分子的miRNA序列进行工程改造的由前miRNA分子骨架产生的非天然存在的miRNA分子。在根据本公开的诸多方面,核酸组合物可以是amiRNA组合物。

[0055] 各种研究证明了长dsRNA可以用于使基因表达沉默,而不会诱导应激反应或引起明显的脱靶效应,参见例如(Strat等,Nucleic Acids Research,2006,第34卷,第13期,3803-3810;Bhargava A等,Brain Res. Protoc.2004;13:115-125;Diallo M.等,Oligonucleotides.2003;13:381-392;Paddison P.J.等,Proc.Natl Acad.Sci.USA.2002;99:1443-1448;Tran N.等,FEBS Lett.2004;573:127-134)。本公开提供了并且包括具有长dsRNA的方法和组合物。

[0056] 如本文中所使用,关于核酸序列、核酸分子或基因,术语“天然”或“原本”意指相应的序列或分子存在于野生型生物体中,没有经过人为基因修饰或操作。天然靶向靶基因的小RNA分子是指存在于野生型生物体中的小RNA分子,细胞没有经过人为基因修饰或操作,靶向相应的生物体中天然存在的靶基因。

[0057] 如本文中所使用,术语“同源性”和“同一性”在关于核酸使用时描述两个或更多个核苷酸序列之间的相似性程度。两个序列之间的“序列同一性”百分比是通过在比较窗口上比较两个最佳对齐的序列来确定,为了实现该两个序列的最佳对齐,所述比较窗口中的序列部分相较于参考序列(其不包含插入或缺失)可能包含插入或缺失(空位)。如下计算该百分比:通过确定两个序列中存在同一核酸碱基或氨基酸残基的位置数以产生匹配的位置数,将匹配的位置数除以比较窗口中的总位置数,并且将结果乘以100以产生序列同一性百分比。相较于参考序列在每个位置上都同一的序列被称为与参考序列是同一的,反之亦然。可以使用任何合适的计算机程序来进行两个或更多个序列的比对。举例来说,用于进行序列比对的被广泛使用并接受的计算机程序是CLUSTALW v1.6(Thompson等,Nucl. Acids Res.,22:4673-4680,1994)。

[0058] 如本文中所使用,关于生物体的术语“外源多核苷酸”和“外源核酸分子”是指天然情况下不表达于该生物体内的异源核酸序列。可以将外源核酸分子以稳定或瞬时方式引入

生物体内。外源核酸分子可以包含与所述生物体或该生物体的害虫或病原体的内源核酸序列同一或部分同源的核酸序列。在某些方面，“外源多核苷酸”和“外源核酸分子”可以指在宿主中瞬时或稳定表达或存在的寄生虫核酸序列。本公开提供了并且包括包含外源多核苷酸和外源核酸分子的组合物以及将它们引入靶生物体中的方法。在一些方面，本公开提供了并且包括包含外源多核苷酸和外源核酸分子的组合物以及将它们引入作为靶生物体宿主的非靶生物体中的方法。

[0059] 如本文中所使用，“对照生物体”意指不含为了控制害虫或寄生虫而提供的重组DNA、小RNA或其它核酸（例如，对蛋白质、miRNA、小RNA具有抗性的靶mRNA、dsRNA、靶模拟物）的生物体。对照生物体一般来自于相同的物种并且处于相同的发育阶段，它与经处理的生物体在相同的生长条件下生长。类似地，“对照群体”意指不含为了控制害虫或寄生虫而提供的重组DNA、小RNA或其它核酸（例如，对蛋白质、miRNA、小RNA具有抗性的靶mRNA、靶模拟物）的生物体的群体。对照生物体群体一般来自相同的物种并且处于相同的发育阶段，它们在与经处理的生物体群体相同的生长条件下生长。作为一个非限制性实例，对照生物体可以是提供了不含本公开的核酸的组合物的蜜蜂。在另一个非限制性实例中，对照生物体可以是提供了含有在蜜蜂或寄生虫内不充当RNA沉默剂的核酸，诸如SEQ ID NO:5的组合物的蜜蜂。

[0060] 如本文中所使用，术语“改善”和“增加”是指相较于对照生物体或群体，生物体或群体总数增加、生物体或群体的产量增加（例如，蜂蜜产量增加）、生物体或群体的生长率增加或繁殖率增加的程度为至少约2%、至少约3%、至少约4%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或更大。本公开提供了通过提供选择性杀昆虫组合物来改善生物体或群体的健康的方法。

[0061] 如本文中所使用，诸如蛋白质或mRNA之类的试剂的水平的“降低”意指该水平相对于缺乏能够降低该试剂的核酸的生物体或群体而言有所降低。同样如本文中所使用，“降低”在提及寄生作用或寄生虫负载时意指该水平相对于缺乏能够降低寄生虫的存活力、繁殖力或数目的核酸（诸如dsRNA分子）的生物体或群体而言有所降低。本公开提供了并且包括降低蛋白质或mRNA的水平以及降低寄生虫的水平或数目的方法和组合物。

[0062] 如本文中所使用，诸如蛋白质或mRNA之类的试剂的水平的术语“至少部分降低”意指该水平相对于缺乏能够降低该试剂的核酸（诸如dsRNA分子）的生物体或群体而言降低了至少25%。同样如本文中所使用，“至少部分降低”在提及寄生作用或寄生虫负载时意指该水平相对于缺乏能够降低寄生虫的存活力、繁殖力或数目的核酸（诸如dsRNA分子）的生物体或群体而言降低了至少25%。本公开提供了并且包括至少部分降低蛋白质或mRNA的水平以及至少部分降低寄生虫的水平或数目的方法和组合物。

[0063] 如本文中所使用，诸如蛋白质或mRNA之类的试剂的水平的“大幅降低”指该水平相对于缺乏能够降低该试剂的核酸（诸如dsRNA分子）的生物体或群体而言有所降低，其中该试剂水平的降低是至少75%。如本文中所使用，“大幅降低”在提及寄生作用或寄生虫负载时意指该水平相对于缺乏能够降低寄生虫的存活力、繁殖力或数目的核酸（诸如dsRNA分子）的生物体或群体而言降低了至少75%。本公开提供了并且包括大幅降低蛋白质或mRNA的水平以及大幅降低寄生虫的水平或数目的方法和组合物。

[0064] 如本文中所使用,诸如蛋白质或mRNA之类的试剂的“有效消除”是相对于缺乏能够降低该试剂的dsRNA分子的生物体或群体,其中该试剂水平的降低超过95%。诸如dsRNA分子之类的试剂优选能够提供诸如蛋白质或mRNA之类的另一种试剂或寄生虫的至少部分降低,更优选大幅降低,或最优选有效消除,其中该试剂基本上不影响、实质上不影响或部分地不影响第二试剂的水平或宿主生物体。同样如本文中所使用,“有效消除”在提及寄生作用或寄生虫负载时意指该水平相对于缺乏能够降低寄生虫的存活力、繁殖力或数目的核酸(诸如dsRNA分子)的生物体或群体而言降低了至少95%。本公开提供了并且包括有效消除蛋白质或mRNA以及有效消除寄生虫的方法和组合物。

[0065] 如本文中所使用,术语“抑制”、“遏制”和“下调”当提及核酸分子在生物体内的表达或活性时在本文中等同使用,并且意指应用本公开的方法之后,所述核酸分子在生物体细胞内的表达或活性水平与应用该方法之前其在该生物体细胞内的表达或活性相比或者与缺乏本公开的核酸分子的对照生物体相比而言较低。本公开提供了并且包括抑制、遏制和下调蛋白质或mRNA的水平以及抑制、遏制和下调寄生虫的水平或数目的方法和组合物。

[0066] 如本文中所使用,术语“受抑制”、“受遏制”和“受下调”是同义的,并且在本文中意指所靶向的核酸分子的较低、优选明显较低的表达或活性。同样如本文中所使用,“受抑制”、“受遏制”和“受下调”在提及寄生作用或寄生虫负载时意指寄生作用或寄生虫负载的水平相对于缺乏能够降低寄生虫的存活力、繁殖力或数目的核酸(诸如dsRNA分子)的生物体或群体而言较低、优选明显较低。本公开提供了并且包括抑制、遏制和下调蛋白质或mRNA的表达或活性以及抑制、遏制和下调寄生虫的活性的方法和组合物。

[0067] 如本文中所使用,诸如蛋白质、mRNA或RNA之类的试剂的水平或活性的“抑制”、“遏制”或“下调”意指该水平或活性相对于在实质上相同的条件下生长的缺乏本公开的核酸,例如缺乏与本公开的重构构建体或重组载体dsRNA或siRNA互补的区域的基本上相同的细胞、生物体或群体而言有所降低。如本文中所使用,对诸如由靶基因表达的preRNA、mRNA、rRNA、tRNA、snoRNA、snRNA和/或由靶基因编码的蛋白质产物之类的试剂的水平或活性的“抑制”、“遏制”或“下调”意指相对于缺乏本公开的重构核酸分子的细胞、生物体或群体而言,量降低了10%或更多,例如20%或更多,优选30%或更多,更优选50%或更多,甚至更优选70%或更多,最优选80%或更多,例如90%。本公开提供了并且包括用于相较于未处理的生物体或群体抑制、遏制和下调诸如蛋白质、mRNA、RNA之类的试剂或寄生虫的方法和组合物。

[0068] 如本文中所使用,术语“节肢动物”是指具有外骨骼(外部骨骼)、分节的身体和有关节的附肢的无脊椎动物的成体和蛹二者。节肢动物是节肢动物门的成员,并且包括昆虫、蜘蛛和甲壳类动物。根据本公开的节肢动物包括但不限于西方蜜蜂、东方蜜蜂(*Apis cerana*)、极小无刺蜂(*Trigona minima*)、集蜂科(Halictidae)、熊蜂属(*Bombus* sp.)、跳蚤、蝇蝇、虱、蜱、螨和有益昆虫。本公开提供了并且包括用于处理作为宿主或者作为寄生虫或害虫的节肢动物的方法和组合物。

[0069] 在一方面,节肢动物可以是昆虫。在某些方面,昆虫可以是蜜蜂。如本文中所使用,术语“蜜蜂”是指成体蜜蜂和其蛹体。根据一个方面,该蜜蜂在蜂巢内。成体蜜蜂被定义为膜翅目(Hymenoptera)蜜蜂总科(Apoidea)的几种有翅、身体有毛、通常有刺的昆虫中的任一种,包括独居和群居种类,并且以用于收集花蜜和花粉的吮吸式口器和咀嚼式口器为特征。

蜜蜂种类的实例包括但不限于蜜蜂属 (*Apis*)、熊蜂属、无刺蜂属 (*Trigona*)、壁蜂属 (*Osmia*) 等等。在一个方面,蜜蜂包括但不限于大黄蜂 (欧洲熊蜂 (*Bombus terrestris*))、蜜蜂 (西方蜜蜂) (包括采集蜂和蜂巢蜂) 以及东方蜜蜂。本公开提供了并且包括用于处理作为诸如瓦螨之类的寄生虫的宿主的蜂类的方法和组合物。

[0070] 根据一个方面,蜜蜂是蜂群的一部分。术语“蜂群”是指蜜蜂群体,包括几十只至通常几万只蜜蜂,它们在蜂巢搭建、食物收集和幼蜂抚养方面协作配合。蜂群正常情况下具有单个蜂王,其剩蜜蜂是“工蜂”(雌性)或“雄蜂”(雄性)。蜂群的社会结构由蜂王和工蜂维持,并且依赖于有效的交流系统。工蜂等级内的劳动分工主要取决于蜜蜂的年龄,但也随蜂群的需要而变化。繁殖和蜂群力度取决于蜂王、食物储存量和工蜂势力的大小。蜜蜂还可以细分为以下类别:“蜂巢蜂”,通常是工蜂一生的前一部分,在此期间“蜂巢蜂”在蜂巢内执行任务;和“采集蜂”,这是蜜蜂一生的后一部分,在此期间“采集蜂”从蜂巢外部找到并收集花粉和花蜜,并且将花蜜或花粉带进蜂巢以供消费和保存。本公开提供了并且包括用于处理昆虫群体的方法和组合物。

[0071] 如本文中所使用,术语“害虫”是指侵扰性或多育性、有害的、令人烦恼的、有毒的、有破坏性的、危害植物或动物或生态系统的生物体的成体和幼虫形式。寄生虫是一种类型的害虫。生物体有可能在一种情况下是害虫,但在另一种情况下是有益的、驯养的或可接受的。

[0072] 如本文中所使用,术语“寄生虫”是指直接从损害另一生物体获益,例如通过以宿主的血液或体液为食、在宿主生物体细胞内生存或在宿主生物体体内生存的生物体的成体和幼虫形式。寄生虫包括作为动物、真菌、细菌或植物的生物体,并且通过它们与宿主的消极或有害相互作用来鉴定。在一些方面,如本文中所使用,寄生虫又可以作为第二寄生虫的宿主。在一些方面,寄生虫和宿主可以是相同类型的生物体(例如,节肢动物宿主和节肢动物寄生虫)。寄生虫包括但不限于,蜱螨亚纲 (*Acari*) (蜱、螨)、虱蝇科 (*Hippoboscoidea*) (蝇)、姬蜂总科 (*Ichneumonoidea*) (寄生蜂)、狂蝇科 (*Oestridae*) (肤蝇)、虱目 (*Phthiraptera*) (虱)、蚤目 (*Siphonaptera*) (跳蚤)、微虾纲 (*Tantulocarida*)、豆蟹和蟹奴 (*Sacculina*)。如本文中所使用,害虫可以包括寄生和非寄生生命阶段。本公开提供了并且包括用于处理寄生虫的方法和组合物。在一方面,所述寄生虫可以是狄斯瓦螨。

[0073] 如本公开中所提供和包括,寄生虫和/或害虫包括狄斯瓦螨、肩突硬蜱 (*Ixodes scapularis*)、红火蚁 (*Solenopsis invicta*)、二斑叶螨 (*Tetranychus urticae*)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)、致倦库蚊 (*Culex quinquefasciatus*)、豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*) 以及人虱 (*Pediculus humanus*)。在根据本公开的诸多方面,选择性杀昆虫剂可以是对狄斯瓦螨、肩突硬蜱、红火蚁、二斑叶螨、埃及伊蚊、致倦库蚊、豌豆蚜以及人虱具有选择性,并且对非靶生物体诸如宿主生物体不具活性或具有显著较低的活性。

[0074] 如本文中所使用,术语“赋形剂”是指制剂中的任何无活性物质,该制剂具有活性成分,诸如抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸,包括但不限于 dsRNA、小 RNA、miRNA 和反义 RNA。在一些实施方案中,赋形剂包括可以给组合物提供不同于抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸的额外功能性的物质。赋形剂包括但不限于“增积剂”、“填充剂”、“稀释剂”和“载体”。体积增大允许方便并精确地分配本公开的组合物。赋形剂还可以用来促进生物体摄取组合物,并且包括各种碳水化合物、蛋白质、脂肪酸、花粉和花粉替代物。赋形剂还可以用于促进生

物体吸收组合物,并且包括例如活性成分的水性或非水性溶液。赋形剂的非限制性实例包括玉米糖浆、糖浆、糖固体、糖半固体、花粉、大豆蛋白、花粉和蛋白质混合物。赋形剂还可以包括引诱剂、缓冲剂和营养补充剂。本公开的组合物可以涂覆有赋形剂、包封在赋形剂中、溶解在赋形剂中、与赋形剂混合,或者以其它方式与赋形剂组合。如本文中所使用,术语赋形剂可以指非活性物质的混合物。

[0075] 本申请提供并公开了抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,它们与钙调蛋白靶基因或从所述钙调蛋白靶基因表达的RNA或其片段的多肽序列实质上同源或互补,并且起抑制钙调蛋白靶基因的作用或者产生敲低表型。在一些方面,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列。在一些方面,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子与钙调蛋白靶基因相比包含一个或多个核酸的缺失,使得所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的19个或更多个连续核苷酸的序列。所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子能够抑制或使靶物种中的钙调蛋白靶基因的表达“沉默”。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不影响非靶生物体中的钙调蛋白基因的表达,又能够抑制或使靶物种中的钙调蛋白靶基因的表达“沉默”。一般在描述所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子时涉及其“靶序列”。在一些实施方案中,所述靶序列选自SEQ ID NO:1、2及6-77。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子与所述靶序列相比包含至少一个、至少两个、至少三个或至少四个核苷酸缺失。在一些实施方案中,所述至少一个、至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述靶序列中是连续的。在其它实施方案中,所述至少一个、至少两个、至少三个或至少四个缺失的核苷酸在所述靶序列中不是连续的。所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子可以是单链DNA(ssDNA)、单链RNA(ssRNA)、双链RNA(dsRNA)、双链DNA(dsDNA)或双链DNA/RNA杂合体。所述核酸分子可以包含天然存在的核苷酸、经修饰的核苷酸、核苷酸类似物或其任何组合。在一些实施方案中,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子可以并入更大的多核苷酸内,例如pri-miRNA分子中。在一些实施方案中,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子可以被加工成小干扰RNA(siRNA)。在一些实施方案中,提供或公开了选择性抗寄生虫或杀螨的核酸分子,和调节其靶基因的表达或活性以便从群体或群中减少或消除寄生虫的方法。在一些实施方案中,提供或公开了选择性抗寄生虫或杀螨、调节瓦螨钙调蛋白基因的表达或活性以便从蜜蜂群体或群中减少或消除瓦螨寄生虫而不影响非靶生物体中的钙调蛋白基因的核酸分子。

[0076] 在根据本公开的诸多方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子包含与选自由SEQ ID NO:1至94组成的组的序列或序列的一部分具有至少80%、85%、88%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列。在某些方面,所述核酸分子是选自由ssDNA、ssRNA、dsRNA、dsDNA或DNA/RNA杂合体组成的组。若干实施方案涉及一种dsRNA,所述dsRNA包含与选自由SEQ ID NO:1至94组成的组的序列或序列的一部分具有至少80%、85%、88%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核苷酸序列。若干个实施方案涉及一种dsRNA,所述dsRNA包含与选自由SEQ ID NO:1至94组成的组的序列或序列的一部分具有至少100%序列同一性的核苷酸序列。在另一个方面,提供了一种编码至少一种核酸,诸如ssRNA或dsRNA的DNA,所述DNA包含选自由SEQ ID NO:1至94组成的组或与SEQ ID NO:1至94或其部分具有至少80%、85%、88%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%

序列同一性的核苷酸序列或核苷酸序列的一部分。在又另一个方面,提供了一种编码至少一种核酸,诸如ssRNA或dsRNA的重组DNA,所述重组DNA包含选自由SEQ ID NO:1至94组成的组的核苷酸序列或核苷酸序列的一部分、异源启动子和转录终止子序列。在另一个方面,本公开提供了一种编码至少一种核酸,诸如ssRNA或dsRNA的重组DNA,所述重组DNA包含与选自由SEQ ID NO:1至94组成的组的序列或序列的一部分具有至少80%、85%、88%、90%、92%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列,并且还包含异源启动子和转录终止子。

[0077] 在根据本公开的诸多方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的10至17个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的18至25个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的20至30个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的25至35个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的30至40个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的40至50个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的50至60个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的45至60个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至多60个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至多50个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至多40个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至少25个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至少35个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至少40个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至少50个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至少60个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:1-89或93的基因。在一方面,靶基因可以

是包含SEQ ID NO:1的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:2的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:3的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:4的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:69的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:70的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:88的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:89的基因。在一方面,靶基因可以是包含选自SEQ ID NO:71-87的序列的基因。在一方面,靶基因可以是包含选自SEQ ID NO:6-68的序列的基因。

[0078] 在根据本公开的诸多方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的10至17个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的18至25个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的20至30个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的25至35个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的30至40个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的40至50个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫组合物包含与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的50至60个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性的核酸分子。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的45至60个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至多60个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至多50个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至多40个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至少25个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至少35个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至少40个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至少50个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至少60个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一些方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少98%序列同一性。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少97%序列同一性。在一些方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基

因的区域具有至少96%序列同一性。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少95%序列同一性。在一些方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少94%序列同一性。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少93%序列同一性。在一些方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少92%序列同一性。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少91%序列同一性。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与如以上提供的靶基因的区域具有至少约83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%同一性。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:1-89或93的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:1的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:2的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:3的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:4的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:69的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:70的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:88的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:89的基因。在一方面,靶基因可以是包含选自SEQ ID NO:71-87的序列的基因。在一方面,靶基因可以是包含选自SEQ ID NO:6-68的序列的基因。

[0079] 在根据本公开的诸多方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因(基因的编码序列或非编码序列)的一个等位基因或一个家族成员中的10至17个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因)的一个等位基因或一个家族成员的18至25个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的20至30个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的25至35个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的30至40个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,该核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的40至50个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的50至60个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的45至60个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的至多60个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的至多50个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的至多40个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的至少25个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,

组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的至少35个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的至少40个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的至少50个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的至少60个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:1-89的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:1的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:2的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:3的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:4的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:69的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:70的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:88的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:89的基因。在一方面,靶基因可以是包含选自SEQ ID NO:71-87的序列的基因。在一方面,靶基因可以是包含选自SEQ ID NO:6-68的序列的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:93的基因。

[0080] 在根据本公开的诸多方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的10至17个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的18至25个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的20至30个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的25至35个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的30至40个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的40至50个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的50至60个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的45至60个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的至多60个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的至多50个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的至多40个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的至少25个连续核苷酸的区域

具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的至少35个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的至少40个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的至少50个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的至少60个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一些方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少98%序列同一性。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少97%序列同一性。在一些方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少96%序列同一性。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少95%序列同一性。在一些方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少94%序列同一性。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少93%序列同一性。在一些方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少92%序列同一性。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少91%序列同一性。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与如以上提供的靶基因的区域具有至少约83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%同一性。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:1-89的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:1的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:2的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:3的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:4的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:69的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:70的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:88的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:89的基因。在一方面,靶基因可以是包含选自SEQ ID NO:71-87的序列的基因。在一方面,靶基因可以是包含选自SEQ ID NO:6-68的序列的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:93的基因。

[0081] 在根据本公开的诸多方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的10至17个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与给定靶基因的一个等位基因或一个家族成员的18至25个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,该核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的20至30个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的25至35个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的30至40个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的40至50个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗

害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的50至60个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的45至60个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的至多60个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的至多50个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的至多40个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的至少25个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的至少35个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的至少40个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的至少50个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的至少60个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:1-89的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:1的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:2的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:3的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:4的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:69的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:70的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:88的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:89的基因。在一方面,靶基因可以是包含选自SEQ ID NO:71-87的序列的基因。在一方面,靶基因可以是包含选自SEQ ID NO:6-68的序列的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:93的基因。

[0082] 在根据本公开的诸多方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的10至17个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,该核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的18至25个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的20至30个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的25至35个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核

酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的30至40个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的40至50个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的50至60个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的45至60个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的至多60个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的至多50个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的至多40个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的至少25个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的至少35个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的至少40个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的至少50个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与跟给定靶基因的多个等位基因或家族成员具有同一性或互补性的至少60个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性。在一些方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少98%序列同一性。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少97%序列同一性。在一些方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少96%序列同一性。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少95%序列同一性。在一些方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少94%序列同一性。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少93%序列同一性。在一些方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少92%序列同一性。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少91%序列同一性。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与如以上提供的靶基因的区域具有至少约83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%同一性。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:1-89的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:1的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:2的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:3的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:4的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:69的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:70的基因。在一方面,靶基因可以是包含

SEQ ID NO:88的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:89的基因。在一方面,靶基因可以是包含选自SEQ ID NO:71-87的序列的基因。在一方面,靶基因可以是包含选自SEQ ID NO:6-68的序列的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:93的基因。

[0083] 在根据本公开的诸多方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的10至17个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的18至25个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的20至30个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的25至35个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的30至40个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的40至50个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的50至60个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的45至60个或更多个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至多60个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的

基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至多50个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至多40个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至少25个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至少35个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至少40个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至少50个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至少60个连续核苷酸的区域具有100%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:1-89或93的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:1的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:2的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:3的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:4的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:69的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:70的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:88的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:89的基因。在一方面,靶基因可以是包含选自SEQ ID NO:71-87的序列的基因。在一方面,靶基因可以是包含选自SEQ ID NO:6-68的序列的基因。

[0084] 在根据本公开的诸多方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的10至17个或更多个连续核苷酸的区域具

有99%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的18至25个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的20至30个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的25至35个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的30至40个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的40至50个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫组合物包含与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的50至60个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性的核酸分子,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的45至60个或更多个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至多60个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,组合物包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子,所述核酸分子与靶基因或从所述靶基因转录的RNA中的至多50个连续核苷酸的区域具有99%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸

[illegible]

13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少93%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一些方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少92%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因的区域具有至少91%序列同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与如以上提供的靶基因的区域具有至少约83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%同一性,其中所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸100%同一或互补的序列。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:1-89或93的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:1的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:2的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:3的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:4的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:69的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:70的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:88的基因。在一方面,靶基因可以是包含SEQ ID NO:89的基因。在一方面,靶基因可以是包含选自SEQ ID NO:71-87的序列的基因。

[0085] 在一些实施方案中,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶基因序列相比有至少一个核苷酸缺失。在一个方面,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸不含有与非靶向生物体中的基因序列同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列。在一个实施方案中,所述非靶向生物体是蜜蜂。在另一个实施方案中,所述非靶向生物体是人类。在另一个实施方案中,所述非靶向生物体是帝王蝶。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸与靶序列相比有至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个、至少十二个、至少十三个、至少十四个、至少十五个或更多个核苷酸缺失。在一些实施方案中,所述至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或至少六个缺失的核苷酸在参考钙调蛋白基因序列中是连续的。在其它实施方案中,所述至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个、至少十二个、至少十三个、至少十四个、至少十五个或更多个缺失的核苷酸在所述靶序列中不是连续的。在一方面,所述靶序列可以选自SEQ ID NO:1-89、93或其部分。在一方面,靶序列可以是包含SEQ ID NO:1或其部分的基因。在一方面,靶序列可以是包含SEQ ID NO:2或其部分的基因。在一方面,靶序列可以是包含SEQ ID NO:3或其部分的基因。在一方面,靶序列可以是包含SEQ ID NO:4或其部分的基因。在一方面,靶序列可以是包含SEQ ID NO:69或其部分的基因。在一方面,靶序列可以是包含SEQ ID NO:70或其部分的基因。在一方面,靶序列可以是包含SEQ ID NO:88或其部分的基因。在一方面,靶序列可以是包含SEQ ID NO:89

或其部分的基因。在一方面,靶序列可以是包含选自SEQ ID NO:71-87的序列或其部分的基因。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸包含与选自SEQ ID NO:90-92或94的序列或其部分具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸包含与选自SEQ ID NO:90-92或94的序列或其部分具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列的反向互补序列。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸包含选自SEQ ID NO:90-92或94的序列的至少18个连续核苷酸。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸包含选自SEQ ID NO:90-92或94的序列或其部分。在一些实施方案中,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸包含选自SEQ ID NO:90-92或94的序列以及选自SEQ ID NO:90-92和94的序列的反向互补序列。

[0086] 本申请提供并且公开了包含抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子以及赋形剂物质的组合物。在一方面,所述赋形剂可以是一种或多种无活性组分的组合。在一些方面,所述赋形剂包括糖。示例性的糖包括己糖类、二糖类、三糖类和高级糖类。赋形剂糖类包括,例如,果糖、葡萄糖、蔗糖、海藻糖、乳糖、半乳糖、核糖。在其它方面,所述赋形剂包含糖和溶剂。在其它方面,所述赋形剂包括蛋白质。在一方面,所述蛋白质为大豆蛋白。在其它方面,所述赋形剂可以是花粉。在根据本公开的诸多方面,所述赋形剂可以是蜂粮。在一些方面,所述赋形剂包括胰蛋白胨。在一些方面,所述赋形剂包括酵母提取物。在一些方面,所述赋形剂包括精油。

[0087] 蜜蜂饲喂是养蜂人的常见做法,用于提供营养和其它,例如补充需要。蜜蜂通常以蜂蜜和花粉为食,但已知还摄取非天然饲料。可以用各种食品饲喂蜜蜂,包括但不限于乳清酵母(生长在白干酪上的奶制品酵母)、大豆粉、酵母(例如啤酒酵母、圆酵母)和酵母产品(单独或组合饲喂)和作为干混合物或湿润块状物在蜂巢内饲喂或者作为干混合物在蜂巢外部的敞开饲喂器中饲喂的大豆粉。还可用的是糖或糖浆。向喂给蜜蜂的补充物中加入10%至12%花粉改善了可口性。加入25%花粉改善了蜜蜂生命活动所需的必需营养物的质量和数量。甘蔗或甜菜糖、异构化玉米糖浆、以及50型糖浆是蜜蜂天然饮食中令人满意的蜂蜜替代品。后两者可以仅作为液体提供给蜜蜂。液体饲料可以在蜂巢内部提供给蜜蜂,例如通过以下方法中的任一种:摩擦顶部桶(friction-top pail)、育幼室内的脾、隔板饲喂器、博得曼(boardman)饲喂器等。可以通过将一镑或两镑放在倒置的内盖上来饲喂干糖。必须让蜜蜂随时可获得提供的水。在一方面,可以设想存在诸如木片、软木或塑料海绵之类的漂浮支撑物的盘子或碟子。关于蜜蜂补充饲料的详细描述可以在例如Standifer等1977年所著的标题为“Supplemental Feeding of Honey Bee Colonies”的USDA出版物(USDA, Agriculture Information Bulletin第413期)中找到。

[0088] 在根据本公开的诸多方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸,例如dsRNA是可吸收的。如本文中所使用,“可吸收的”是指为了不通过吞食来进行核酸摄取而提供的机制。在一方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸可以通过生物体的皮肤或节肢动物的外骨骼来吸收。在一方面,将可吸收的核酸溶解在赋形剂中。在其它方面,使可吸收的核酸悬浮在赋形剂中。用于溶解或悬浮的赋形剂可以是水性的或非水性的。在一些方面,所述抗寄生虫、抗害

虫或杀昆虫核酸通过饲喂被宿主生物体吸收并且转移至寄生虫生物体。在其它方面,所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸通过吸附被宿主生物体吸收并且转移至寄生虫生物体。在一方面,本公开的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸直接被寄生虫吸收。

[0089] 在根据本公开的诸多方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸,例如dsRNA与赋形剂组合。在一方面,所述核酸可以作为一定的核酸对赋形剂的比率提供。在一方面,所述比率可以是一份核酸对4份赋形剂。在一方面,所述核酸对赋形剂的比率可以是1:1、1:2、1:5或1:10。在其它方面,所述核酸对赋形剂的比率可以是1:20、1:25、1:30、1:40或更多。在一方面,核酸对赋形剂的比率可以是1:50。在根据本公开的诸多方面,所述比率可以确定为体积对体积(v/v)比率、重量:重量(w/w)比率。在某些方面,所述比率可以表示为重量:体积(w/v)比率。在某些方面,核酸和赋形剂可以是dsRNA和赋形剂。

[0090] 在根据本公开的诸多方面,所述组合物可以包含与赋形剂组合的一定重量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸。在一方面,所述核酸可以构成所述组合物的总重量的一定百分比。在一方面,所述核酸可以构成所述组合物的约0.1重量%。在一方面,所述核酸可以构成所述组合物的约0.2重量%。在一方面,所述核酸可以构成所述组合物的约0.3重量%。在另一方面,该核酸可以构成组合物的约0.4重量%。在一方面,所述核酸可以构成所述组合物的多达0.5重量%。在一方面,所述核酸可以构成所述组合物的多达0.6重量%。在一方面,所述核酸可以构成所述组合物的多达0.7重量%。在一方面,所述核酸可以构成所述组合物的多达0.8重量%。在另一方面,该核酸可以构成组合物的多达1.0重量%。在其它方面,所述核酸可以构成所述组合物的多达1.5重量%。在其它方面,所述核酸可以构成所述组合物的多达2.0重量%或2.5重量%。在某些方面,核酸和赋形剂可以是dsRNA和赋形剂。

[0091] 本公开提供了并且包括具有0.1重量%至5重量%的一种或多种抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸的组合物。在其它方面,组合物可以包含0.1重量%至4重量%、0.1重量%至3重量%、0.1重量%至2重量%、0.1重量%至1重量%、0.1重量%至2重量%、0.1重量%至3重量%或0.1重量%至4重量%的核酸。在一方面,组合物可以包含0.2重量%至5重量%的核酸。在其它方面,组合物可以包含0.2重量%至4重量%、0.2重量%至3重量%、0.2重量%至2重量%、0.2重量%至1重量%、0.2重量%至2重量%、0.2重量%至3重量%或0.2重量%至4重量%的核酸。在其它方面,组合物可以包含多达1%、多达2%、多达3%、多达4%或多达5%的核酸。在其它方面,组合物可以包含多达7.5%、多达10%或多达15%的核酸。在某些方面,核酸和赋形剂可以是dsRNA和赋形剂。

[0092] 本公开提供了并且包括具有0.1mg/ml至10mg/ml的一种或多种抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸的组合物。在其它方面,组合物可以包含0.1mg/ml至1.0mg/ml、0.1mg/ml至2.0mg/ml、0.1mg/ml至2.5mg/ml、0.1mg/ml至5mg/ml、0.1mg/ml至10mg/ml、0.1mg/ml至15mg/ml或0.1mg/ml至20mg/ml核酸。在某些方面,组合物包含至少0.1μg/ml核酸。在某些其它方面,组合物包含至少1.0μg/ml核酸。在又其它方面,组合物包含至少10μg/ml核酸。在一方面,组合物可以包含0.5mg/ml至10mg/ml核酸。在其它方面,组合物可以包含0.5mg/ml至1.0mg/ml、0.5mg/ml至2.0mg/ml、0.5mg/ml至2.5mg/ml、0.5mg/ml至5mg/ml、0.5mg/ml至10mg/ml、0.5mg/ml至15mg/ml或0.5mg/ml至20mg/ml核酸。在一方面,组合物可以包含1.0mg/ml至10mg/ml核酸。在其它方面,组合物可以包含1.0mg/ml至2.0mg/ml、1.0mg/ml至2.5mg/ml、1.0mg/ml至5mg/ml、1.0mg/ml至10mg/ml、1.0mg/ml至15mg/ml或1.0mg/ml至

20mg/ml 核酸。在某些实施方案中,所述组合物中的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸包括 dsRNA。

[0093] 本公开提供了并且包括选择性杀昆虫剂组合物和使用选择性杀昆虫剂组合物的方法。

[0094] 如本文中 so 使用,“选择性杀昆虫剂组合物”是对一种或多种节肢动物种类更有效而对一种或多种不同的节肢动物种类不太有效的组合物。选择性杀昆虫剂组合物包括杀死成体或未成熟节肢动物的组合物,并且包括作为杀幼虫剂和杀卵剂的组合物。选择性杀昆虫剂可以是通过处理过的食物而掺入的系统性杀昆虫剂,所述食物包括从宿主生物体获得的血液或血淋巴。选择性杀昆虫剂可以是接触性杀昆虫剂,它们对发生直接接触的某些昆虫有毒,而对某些其它昆虫无毒或低毒。在一些实施方案中,选择性杀昆虫剂组合物是抗害虫的。在一些实施方案中,选择性杀昆虫剂组合物是抗寄生虫的。在一些实施方案中,选择性杀昆虫剂组合物是杀螨剂。在一些实施方案中,选择性杀昆虫剂组合物对靶寄生虫或有害昆虫是有毒的,而对非靶生物体是无毒或低毒的。非靶生物体的实例包括但不限于有益昆虫、线虫类、鸟类、哺乳动物以及植物。在一些实施方案中,选择性杀昆虫剂组合物对寄生昆虫例如瓦螨是有毒的,而对宿主生物体例如蜜蜂是无毒或低毒的。在一些实施方案中,选择性杀昆虫剂组合物对选自自由狄斯瓦螨、肩突硬蜱、红火蚁、二斑叶螨、埃及伊蚊、致倦库蚊、豌豆蚜以及人虱组成的组的一种或多种害虫或寄生昆虫是有毒的。

[0095] 在根据本公开的某些方面,选择性杀昆虫剂可以通过基因修饰而并入细菌或酵母(例如,经工程改造以表达本公开的核酸的转基因细菌或酵母)中。通过对细菌或酵母进行基因修饰而引入的选择性杀昆虫剂可以直接作用于害虫生物体,或者通过被害虫生物体的宿主吞食而间接地起作用。

[0096] 在根据本公开的一方面,选择性杀昆虫剂可以是相对于一种或多种第二昆虫而言对一种或多种第一昆虫更有效的杀昆虫剂。在一方面,选择性杀昆虫剂可以对第一昆虫有毒,而对第二昆虫无作用。在一方面,选择性杀昆虫剂可以对第一昆虫有毒,而需要明显更高的浓度或量才能对第二昆虫有作用。在一方面,选择性杀昆虫剂对第一昆虫的毒性与第二昆虫相比可以是2倍或更多倍。在一方面,选择性杀昆虫剂对第一昆虫的毒性与第二昆虫相比可以是4倍或更多倍。在一方面,选择性杀昆虫剂对第一昆虫的毒性与第二昆虫相比可以是5倍或更多倍。在一方面,选择性杀昆虫剂对第一昆虫的毒性与第二昆虫相比可以是10倍或更多倍。

[0097] 在一方面,选择性杀昆虫剂可以抑制第一昆虫的生长、发育或繁殖,而对第二昆虫无作用。在一方面,选择性杀昆虫剂可以抑制第一昆虫的生长、发育或繁殖,而需要明显更高的浓度或量才能对第二昆虫有作用。在一方面,选择性杀昆虫剂可能需要2倍或更多倍的活性成分来抑制第二昆虫的生长、发育或繁殖。在一方面,选择性杀昆虫剂可能需要4倍或更多倍的活性成分来抑制第二昆虫的生长、发育或繁殖。在一方面,选择性杀昆虫剂可能需要5倍或更多倍的活性成分来抑制第二昆虫的生长、发育或繁殖。在一方面,选择性杀昆虫剂可能需要10倍或更多倍的活性成分来抑制第二昆虫的生长、发育或繁殖。

[0098] 若干个实施方案涉及一种改变抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子以减少或消除与非靶生物体的基因序列具有序列互补性或同一性的区域的方法。在一些实施方案中,使用任何序列比对软件,诸如可获自NCBI服务器的BLAST软件(可获自因特网

www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 将潜在抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸序列与一种或多种非靶生物体(非靶生物体的非限制性实例包括人、蜜蜂、帝王蝶、小鼠、大鼠等)的适当基因组数据库相比较。在一些实施方案中,过滤掉表现出与一种或多种非靶生物体的基因序列存在明显同源性的推定抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子。在一些实施方案中,对表现出与非靶生物体的基因序列具有序列互补性或同一性的区域的推定抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子的核苷酸序列进行改变,以便减少、消除或破坏此种具有序列互补性或同一性的区域。在一些实施方案中,与靶序列相比,对一个或多个核苷酸进行改变、添加或缺失,以破坏具有与非靶生物体的基因序列同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或更多个连续核苷酸的序列。在一些实施方案中,与靶序列相比,对1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个核苷酸进行改变、添加或缺失,以使得所述抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子不包含与非靶生物体的基因序列同一或互补的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或更多个连续核苷酸的序列。

[0099] 本公开还包括并且提供了处理或预防蜂群的蜂群崩溃失调症的方法,所述方法包括向蜜蜂提供有效量的组合物,所述组合物包含与狄斯瓦螨钙调蛋白基因序列的区域基本上同一或基本上互补的核酸,借此降低狄斯瓦螨侵扰的水平。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与SEQ ID NO:1的至少19个连续核苷酸基本上同一或基本上互补并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与SEQ ID NO:2的至少19个连续核苷酸基本上同一或基本上互补并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与SEQ ID NO:69的至少19个连续核苷酸基本上同一或基本上互补并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与SEQ ID NO:70的至少19个连续核苷酸基本上同一或基本上互补并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与SEQ ID NO:3一致并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与SEQ ID NO:4一致并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与SEQ ID NO:88一致并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述

方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与SEQ ID NO:89一致并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与SEQ ID NO:90一致的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与SEQ ID NO:91一致的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与SEQ ID NO:92一致的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与SEQ ID NO:93一致的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与SEQ ID NO:94一致的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与SEQ ID NO:90一致的核酸和作为SEQ ID NO:90的反向互补序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与SEQ ID NO:91一致的核酸和作为SEQ ID NO:91的反向互补序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与SEQ ID NO:92一致的核酸和作为SEQ ID NO:92的反向互补序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与SEQ ID NO:93一致的核酸和作为SEQ ID NO:93的反向互补序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与SEQ ID NO:94一致的核酸和作为SEQ ID NO:94的反向互补序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含具有选自SEQ ID NO:3、4、88、89、90-93组成的组的序列的两种或更多种核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:71-87的序列的至少19个连续核苷酸基本上同一或基本上互补并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:71-87的序列的至少23个连续核苷酸基本上同一或基本上互补并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:71-87的序列的至少30个连续核苷酸基本上同一或基本上互补并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:71-87的序列的至少40个连续核苷酸基本上同一或基本上互补并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:71-87的序列的至少50个连续核苷酸基本上同一或基本上互补并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:71-87的序列的至少60个连续核苷酸基本上同一或基本上互补并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:71-87的序列的至少70个连续核苷酸基本上同一或基本上互补并且不包含与

非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:71-87的序列的至少80个连续核苷酸基本上同一或基本上互补并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:71-87的序列的至少90个连续核苷酸基本上同一或基本上互补并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:71-87的序列的至少100个连续核苷酸基本上同一或基本上互补并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:71-87的序列的至少110个连续核苷酸基本上同一或基本上互补并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:71-87的序列的至少120个连续核苷酸基本上同一或基本上互补并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:71-87的序列的至少130个连续核苷酸基本上同一或基本上互补并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:71-87的序列的至少140个连续核苷酸基本上同一或基本上互补并且不包含与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:71-87的序列基本上同一或基本上互补的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:71-87的序列一致的核酸。在一方面,所述方法包括提供有效量的组合物,所述组合物包含与选自SEQ ID NO:90-94的序列一致的核酸。

[0100] 本公开提供了并且包括降低宿主生物体的寄生虫负载的方法。在一方面,所述寄生虫负载是指每个单独宿主的寄生虫数目。在一方面,所述寄生虫负载是指每100个宿主生物体的平均寄生虫数目。在一方面,所述寄生虫负载是指每个寄生虫宿主群体的寄生虫数目。在本公开的诸多方面,所述寄生虫是狄斯瓦螨,并且所述宿主是蜜蜂,即西方蜜蜂。在某些方面,所述寄生虫负载是指群体中每100只蜜蜂的狄斯瓦螨寄生虫数目。在一些实施方案中,本公开提供了并且包括用于将寄生虫负载降至群体中每100只蜜蜂的狄斯瓦螨寄生虫少于6个的方法和组合物。在一些实施方案中,本公开提供了并且包括用于将寄生虫负载降至群体中每100只蜜蜂的狄斯瓦螨寄生虫少于5个的方法和组合物。在一些实施方案中,本公开提供了并且包括用于将寄生虫负载降至群体中每100只蜜蜂的狄斯瓦螨寄生虫少于4

个的方法和组合物。在一些实施方案中,本公开提供了并且包括用于将寄生虫负载降低至群体中每100只蜜蜂的狄斯瓦螨寄生虫少于2个的方法和组合物。

[0101] 在一方面,所述降低寄生虫负载的方法包括向宿主生物体提供有效量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸组合物。有效量的本公开的组合物导致寄生虫负载在一段时间内降低。在一方面,可以在提供有效量的核酸组合物一天内测量寄生虫负载的降低。在一方面,可以在两天后测量寄生虫负载。在一方面,可以在3天后测量寄生虫负载。在其它方面,可以在5天后或1周后测量寄生虫负载。在另一方面,可以测量寄生虫负载不止一次,例如每3天、每5天、每周或每个月一次。在某些方面,根据本公开,可以测量寄生虫数目的减少,并且与未处理的对照生物体或群体进行比较。在根据本公开的诸多方面,所述寄生虫是狄斯瓦螨,并且所述宿主是蜜蜂,即西方蜜蜂。

[0102] 在根据本公开的诸多方面,一段时间后寄生虫负载的降低意指寄生虫数目的减少。在一方面,寄生虫的数目在测量之间可以减少10%、20%、30%或更多。在另一方面,寄生虫的数目在测量之间可以减少40%或更多。在另一方面,寄生虫的数目在测量之间可以减少50%或更多。在另一方面,寄生虫的数目在测量之间可以减少60%或更多。在另一方面,寄生虫的数目在测量之间可以减少70%或更多。在另一方面,寄生虫的数目在测量之间可以减少80%或更多。在另一方面,寄生虫的数目在测量之间可以减少90%或更多。

[0103] 在其它方面,寄生虫负载可以测量为每个宿主生物体的平均寄生虫数目。在一方面,降低的寄生虫负载可以包括每100个宿主生物体少于20个寄生虫。在一方面,降低的寄生虫负载可以包括每100个宿主生物体少于15个寄生虫。在一方面,降低的寄生虫负载可以包括每100个宿主生物体少于10个寄生虫。在一方面,降低的寄生虫负载可以包括每100个宿主生物体少于5个寄生虫。在一方面,降低的寄生虫负载可以包括每100个宿主生物体少于4个寄生虫。在一方面,降低的寄生虫负载可以包括每100个宿主生物体少于3个寄生虫。在一方面,降低的寄生虫负载可以包括每100个宿主生物体少于2个寄生虫。在一方面,降低的寄生虫负载可以包括每100个宿主生物体少于1个寄生虫。在一方面,降低的寄生虫负载可以包括每1000个宿主生物体少于20个寄生虫。在一方面,降低的寄生虫负载可以包括每1000个宿主生物体少于15个寄生虫。在一方面,降低的寄生虫负载可以包括每1000个宿主生物体少于10个寄生虫。在一方面,降低的寄生虫负载可以包括每1000个宿主生物体少于5个寄生虫。在一方面,降低的寄生虫负载可以包括每1000个宿主生物体少于4个寄生虫。在一方面,降低的寄生虫负载可以包括每1000个宿主生物体少于3个寄生虫。在一方面,降低的寄生虫负载可以包括每1000个宿主生物体少于2个寄生虫。在一方面,降低的寄生虫负载可以包括每1000个宿主生物体少于1个寄生虫。

[0104] 在根据本公开的诸多方面,宿主生物体群体在被提供有效量的核酸的来源之前具有初始寄生虫负载。在一方面,初始寄生虫负载可以包括每100个宿主生物体少于20个寄生虫。在一方面,初始寄生虫负载可以包括每100个宿主生物体少于15个寄生虫。在一方面,初始寄生虫负载可以包括每100个宿主生物体少于10个寄生虫。在一方面,初始寄生虫负载可以包括每100个宿主生物体少于5个寄生虫。在一方面,初始寄生虫负载可以包括每100个宿主生物体少于4个寄生虫。在一方面,初始寄生虫负载可以包括每100个宿主生物体少于3个寄生虫。在一方面,初始寄生虫负载可以包括每100个宿主生物体少于2个寄生虫。在一方面,初始寄生虫负载可以包括每100个宿主生物体少于1个寄生虫。

[0105] 在根据本公开的诸多方面,有效量可以周期性地或连续地提供。在一方面,有效量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸组合物可以每天提供一次、两次或三次。在其它方面,有效量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸组合物可以每天提供一次。在另一方面,有效量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸组合物可以每隔一天提供一次或多次。在一方面,有效量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸组合物可以每两天、每三天或每周提供一次。在一方面,有效量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸组合物可以每两周提供一次。在一方面,有效量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸组合物可以每三周提供一次。在一方面,有效量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸组合物可以每个月提供一次。在一方面,有效量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸组合物可以每两个月提供一次。在一方面,有效量的核酸组合物可以连续提供至有需要的生物体,例如通过提供连续的食物来源。在一个方面,有效量的核酸组合物可以作为蜜蜂可摄取的组合物连续提供。在根据本公开的诸多方面,所述寄生虫是狄斯瓦螨,并且所述宿主是蜜蜂,即西方蜜蜂。在根据本公开的诸多方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸可以是dsRNA。

[0106] 在根据本公开的诸多方面,寄生虫负载可能在一段时间内降低。在一方面,寄生虫负载降低所必需的时间段可以是15周。在另一方面,用于寄生虫负载降低的时间段可以是12周。在一方面,寄生虫负载降低在10周的时间段发生。在一方面,寄生虫负载降低所必需的时间段可以是5周。在另一方面,用于寄生虫负载降低的时间段可以是2周。在一方面,寄生虫负载降低在1周的时间发生。在一些方面,寄生虫负载可以在一天、两天或三天后降低。

[0107] 本公开提供了降低对蜜蜂群体的寄生作用的方法,所述方法包括向蜜蜂群体提供有效量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸组合物。有效量的本公开的组合物导致寄生作用在一段时间内降低。在一方面,可以在提供有效量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸组合物一天内测量寄生作用的降低。在一方面,可以在两天后测量寄生作用的降低。在一方面,可以在3天后测量寄生作用的降低。在其它方面,可以在5天后或1周后测量寄生作用的降低。在另一方面,可以不止一次测量寄生作用的降低,例如每3天、每5天、每周或每个月一次。在某些方面,根据本公开,可以测量寄生作用的降低,并且与未处理的对照生物体或群体进行比较。

[0108] 在根据本公开的诸多方面,一段时间后寄生作用的降低意味着寄生虫总数目的减少。在一方面,寄生虫的数目在测量之间可以减少10%、20%、30%或更多。在另一方面,寄生虫的数目在测量之间可以减少40%或更多。在另一方面,寄生虫的数目在测量之间可以减少50%或更多。在另一方面,寄生虫的数目在测量之间可以减少60%或更多。在另一方面,寄生虫的数目在测量之间可以减少70%或更多。在另一方面,寄生虫的数目在测量之间可以减少80%或更多。在另一方面,寄生虫的数目在测量之间可以减少90%或更多。

[0109] 在其它方面,寄生作用的降低可以测量为每个宿主生物体的平均寄生虫数目。在一方面,寄生作用的降低可以包括每100个宿主生物体少于20个寄生虫。在一方面,寄生作用的降低可以包括每100个宿主生物体少于15个寄生虫。在一方面,寄生作用的降低可以包括每100个宿主生物体少于10个寄生虫。在一方面,寄生作用的降低可以包括每100个宿主生物体少于5个寄生虫。在一方面,寄生作用的降低可以包括每100个宿主生物体少于4个寄生虫。在一方面,寄生作用的降低可以包括每100个宿主生物体少于3个寄生虫。在一方面,寄生作用的降低可以包括每100个宿主生物体少于2个寄生虫。在一方面,寄生作用的降低

可以包括每100个宿主生物体少于1个寄生虫。

[0110] 在根据本公开的诸多方面,引起寄生作用降低的有效量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸可以周期性地或连续地提供。在一方面,有效量的核酸组合物可以每天提供一次、两次或三次。在其它方面,有效量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸组合物可以每天提供一次。在另一方面,有效量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸组合物可以每隔一天提供一次或多次。在一方面,有效量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸组合物可以每两天、每三天或每周提供一次。在一方面,有效量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸组合物可以连续提供至有需要的生物体,例如通过提供连续的食物来源。在一个方面,有效量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸组合物可以作为蜜蜂可摄取的组合物连续提供。在根据本公开的诸多方面,所述寄生虫是狄斯瓦螨,并且所述宿主是蜜蜂,即西方蜜蜂。在根据本公开的诸多方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子可以是dsRNA。

[0111] 在根据本公开的诸多方面,寄生作用降低可以在一段时间内减少。在一方面,寄生作用降低所必需的时间段可以是15周。在另一方面,用于寄生作用降低的时间段可以是12周。在一方面,寄生作用降低在10周的时间段发生。在一方面,寄生作用降低所必需的时间段可以是5周。在另一方面,用于寄生作用降低的时间段可以是2周。在一方面,寄生作用降低在1周的时间段发生。在一些方面,寄生作用降低可以在一天、两天或三天后发生。

[0112] 在根据本公开的诸多方面,通过将存活寄生虫数目与宿主生物体群体内的寄生虫数目的初始测量值进行比较来测量寄生作用降低。在一方面,所述寄生虫可以是狄斯瓦螨,并且所述宿主可以是蜜蜂,即西方蜜蜂。在一方面,存活寄生虫的数目可以是初始寄生虫数目的25%。在一方面,存活寄生虫的数目可以是初始寄生虫数目的15%。在一方面,存活寄生虫的数目可以是初始寄生虫数目的10%。在一方面,存活寄生虫的数目可以是初始寄生虫数目的5%。在一方面,在向宿主群体提供有效量的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸组合物之后,存活寄生虫的数目可能少于5%或者甚至检测不到。

[0113] 在一方面,本公开提供了用于降低蜜蜂对瓦螨侵扰的易感性的方法和组合物。在其它方面,本公开提供了用于防止侵扰蜜蜂群体的方法和组合物。在另一方面,本公开提供了用于降低蜜蜂被螨狄斯瓦螨寄生的方法和组合物。

[0114] 根据本公开,提供有抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸来源的宿主生物体可以在宿主体内、通常是血淋巴内积累核酸。通过带有核酸,此类宿主生物体变得对寄生作用具有抗性或者不太易感。在其它方面,提供有核酸来源的宿主生物体群体可以在所述群体的众多成员的宿主体内积累核酸,由此提供对寄生虫的抗性 or 降低易感性。可以使用本领域普通技术人员已知的方法来检测提供有核酸来源的宿主生物体内存在的核酸。在根据本公开的诸多方面,抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸分子可以是dsRNA。

[0115] 在本公开的一方面,提供了通过下调钙调蛋白和钙调蛋白相关的瓦螨基因产物来处理蜜蜂的瓦螨侵扰的方法和组合物。在一方面,所述组合物包含对应于SEQ ID NO:1的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸。在一方面,所述组合物包含对应于SEQ ID NO:2的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸。在一方面,所述组合物包含对应于SEQ ID NO:69的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸。在一方面,所述组合物包含对应于SEQ ID NO:70的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸。在一些方面,所述组合物包含对应于选自SEQ ID NO:71-87的狄斯瓦

螨钙调蛋白序列的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸。在另一方面,所述组合物包含对应于选自SEQ ID NO:3、4和88-93的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸。在一方面,所述组合物包含对应于SEQ ID NO:1的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的小RNA。在一方面,所述组合物包含对应于SEQ ID NO:2的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的小RNA。在一方面,所述组合物包含对应于SEQ ID NO:69的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的小RNA。在一方面,所述组合物包含对应于SEQ ID NO:70的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的小RNA。在一些方面,所述组合物包含对应于选自SEQ ID NO:71-87的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的小RNA。在另一方面,所述组合物包含对应于选自SEQ ID NO:3、4、88和89的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的小RNA。在另一方面,所述组合物包含对应于选自SEQ ID NO:90-93的序列的小RNA。在一方面,所述组合物包含对应于SEQ ID NO:1的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的dsRNA。在一方面,所述组合物包含对应于SEQ ID NO:2的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的dsRNA。在一方面,所述组合物包含对应于SEQ ID NO:69的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的dsRNA。在一方面,所述组合物包含对应于SEQ ID NO:70的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的dsRNA。在一些方面,所述组合物包含对应于选自SEQ ID NO:71-87的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的dsRNA。在另一方面,所述组合物包含对应于选自SEQ ID NO:3、4、88和89的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的dsRNA。在另一方面,所述组合物包含对应于选自SEQ ID NO:90-93的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的dsRNA。在一方面,所述组合物包含对应于SEQ ID NO:1的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的siRNA。在一方面,所述组合物包含对应于SEQ ID NO:2的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的siRNA。在一方面,所述组合物包含对应于SEQ ID NO:69的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的siRNA。在一方面,所述组合物包含对应于SEQ ID NO:70的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的siRNA。在一些方面,所述组合物包含对应于选自SEQ ID NO:71-87的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的siRNA。在另一方面,所述组合物包含对应于选自SEQ ID NO:3、4、88和89的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的siRNA。在另一方面,所述组合物包含对应于选自SEQ ID NO:90-93的狄斯瓦螨钙调蛋白序列的siRNA。在根据本公开的诸多方面,所述组合物可以包含对应于SEQ ID NO:1或2的区域的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸。在根据本公开的其它方面,所述组合物可以包含对应于SEQ ID NO:69或70的区域的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸。在根据本公开的又其它方面,所述组合物可以包含对应于选自SEQ ID NO:3、4、88和89的序列的区域的核酸。在根据本公开的又其它方面,所述组合物可以包含对应于选自SEQ ID NO:90-94的序列的区域的核酸。

[0116] 瓦螨寄生于蛹和成体蜜蜂,并且在蛹抚幼室内繁殖。所述螨用它们的嘴刺破蜜蜂的外骨骼并且以蜜蜂的血淋巴为食。诸位发明人意外地发现,施用至蜜蜂以处理瓦螨侵扰的多核苷酸试剂存在于蜜蜂的血淋巴中,由此变得对螨有效。

[0117] 诸位发明人已经证明,靶向钙调蛋白的dsRNA片段可以成功地转移至瓦螨(参见例如图2),dsRNA可以在瓦螨中起下调钙调蛋白基因表达的作用(参见例如图3A),以及还证明靶向钙调蛋白基因以便下调可以降低瓦螨的数目(参见例如图3B)。

[0118] 因此,根据本公开的一个方面,提供了预防或处理蜜蜂的狄斯瓦螨侵扰的方法,所述方法包括对蜜蜂施用有效量的核酸试剂,所述核酸试剂包含下调狄斯瓦螨钙调蛋白基因表达的核酸序列,由此预防或处理蜜蜂的狄斯瓦螨侵扰。

[0119] 根据本公开的这个方面,本公开的试剂用于防止狄斯瓦螨作为寄生虫生活在蜜蜂或其幼虫上。短语“狄斯瓦螨”是指侵袭蜜蜂东方蜜蜂和西方蜜蜂的外部寄生螨。该螨可以

处于以蜜蜂为食的成虫阶段,或者处于待在蜜蜂抚幼室内部的幼虫阶段。

[0120] 如所提到的,本公开的试剂能够选择性地下调狄斯瓦螨的基因产物的表达。如本文中所使用,短语“基因产物”是指RNA分子或蛋白质。根据一个方面,所述狄斯瓦螨基因产物是螨生存所必需的基因产物。此类基因产物的下调典型地将杀死瓦螨。根据另一方面,所述狄斯瓦螨基因产物是螨繁殖所必需的基因产物。此类基因产物的下调典型地将防止瓦螨繁殖并且最终清除螨群。根据又另一方面,所述狄斯瓦螨基因产物是在蜜蜂中产生致病性症状所需的基因产物。在一些方面,所述狄斯瓦螨基因产物是钙调蛋白基因。在某些方面,所述钙调蛋白基因可以包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2一致的核酸序列。在某些方面,所述钙调蛋白基因可以包含与SEQ ID NO:69或SEQ ID NO:70一致的核酸序列。

[0121] 根据本公开的这个方面可以下调的基因产物的实例包括但不限于钙调蛋白基因。

[0122] 在根据本公开的一方面,能够下调狄斯瓦螨或其它寄生虫的基因产物的表达的试剂可以将所述基因产物在其它动物(诸如蜜蜂或其它非靶生物体)内的表达下调至较小程度。因此,本公开的某些试剂能够区分螨基因与蜜蜂基因,从而将前者下调至比后者更大的程度。在一些方面,本公开的某些试剂能够区分靶生物体内的靶基因与非靶生物体内的直系同源物,从而将前者下调至比后者更大的程度。在其它方面,下调寄生虫的靶基因,而不下调同源宿主基因。在又另一方面,寄生虫的靶基因在宿主内没有同源物。根据另一方面,本公开的试剂不下调任何蜜蜂基因。举例来说,这可以通过靶向在螨中差异性表达而在蜜蜂中不表达的基因,例如螨钠通道基因-FJ216963来实现。替代地,本公开的试剂可以靶向在螨和蜜蜂二者中都得以表达的基因的螨特异性序列。

[0123] 根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于5个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于6个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于7个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于8个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于9个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于10个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于11个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于12个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于13个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于14个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于15个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公

开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于16个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于17个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于18个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于19个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于20个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于21个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于22个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于23个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于24个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于25个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于26个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于27个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于28个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于29个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。根据一个方面,本公开的试剂靶向瓦螨基因中至少100个碱基长并且不携带任何长于30个碱基的与任何蜜蜂基因组序列或人基因组序列完全同源的序列的区段。尽管应当了解,可以靶向不止一个基因以便使对瓦螨的细胞毒性作用最大化,但是包含一种或几种小RNA的组合物将因为可以减少与其它昆虫的交叉反应性而增加了作为选择性杀昆虫剂组合物的可能性。

[0124] 根据一个方面,可以制备对应于狄斯瓦螨钙调蛋白-1和钙调蛋白-2基因的dsRNA组合物(例如,使用具有如SEQ ID NO:1-4以及69-89中所阐述的序列、它们的互补序列或针对其区域的核酸的核酸试剂)。

[0125] 应当了解,除了下调众多基因以外,本公开还提供了并且包括使用众多试剂来下调同一基因(例如,众多核酸或dsRNA,每一种与同一基因的不同区段杂交)。举例来说,在一方面,一种或多种对应于选自由SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35以及69-89组成的组的序列的核酸的组合可以用于增强组合物的细胞毒性作用和抗寄生虫作用。能够鉴定物种特异性序列的工具可以用于这个目的,例如BLASTN和其它这类计算机程序。美国专利公布号20090118214和20120108497提供了dsRNA用于预防和处理蜜蜂的病毒感染的用途。美国专利公布号20120258646提供了dsRNA用于控制蜜蜂的狄斯瓦螨的用途。每一公布整体并入在

此。

[0126] 本公开提供了并且包括用于下调靶生物体内的基因表达的组合物和方法。在一方面,所述靶生物体可以是寄生虫。在某些方面,所述寄生虫可以是狄斯瓦螨。如本文中所使用,术语“下调表达”是指直接或间接地引起所期望的基因的转录的下降、所述基因的转录产物(例如RNA)的量、稳定性或可翻译性的下降,和/或由所期望的基因编码的多肽的翻译的下降。下调狄斯瓦螨的基因产物的表达可以监测,例如,通过直接检测基因转录物(例如,通过PCR)、通过检测由基因或蜜蜂病原体RNA编码的多肽(例如,通过免疫印迹或免疫沉淀)、通过检测由基因编码的多肽的生物学活性(例如,催化活性、配体结合等等),或者通过监测狄斯瓦螨的变化(例如,所述螨的增殖下降、所述螨的病毒性下降、所述螨的活动力下降等)以及通过测试蜜蜂感染性/致病性。

[0127] 可以使用各种干扰转录和/或翻译的试剂(例如,RNA沉默试剂、核酶、脱氧核酶和反义核酸分子)在基因组和/或转录物层级上实现害虫或寄生虫基因产物的下调。可以使用各种干扰转录和/或翻译的试剂(例如,RNA沉默试剂、核酶、脱氧核酶和反义核酸分子)在基因组和/或转录物层级上实现狄斯瓦螨基因产物的下调。

[0128] 根据一个方面,该下调害虫或寄生虫基因产物的表达的试剂是小RNA,诸如RNA沉默试剂。根据这个方面,所述小RNA的长度大于15个碱基对。在另一方面,所述小RNA的长度大于50个碱基对。在一方面,所述小RNA的长度大于50个碱基对,但小于约500个碱基对。在一方面,所述小RNA的长度大于100个碱基对,但小于约500个碱基对。在一方面,所述小RNA的长度大于200个碱基对,但小于约500个碱基对。在一方面,所述害虫或寄生虫可以是狄斯瓦螨。

[0129] 另一种下调害虫或寄生虫基因产物的方法是通过引入小抑制性RNA(siRNA)。另一种下调瓦螨基因产物的方法是通过引入小抑制性RNA(siRNA)。

[0130] 在本公开的一个方面,可以如下实现适用于本公开的RNA沉默试剂的合成。首先,在AUG起始密码子下游扫描害虫或寄生虫靶mRNA中的AA二核苷酸序列。将每一AA的出现以及3'相邻的19个核苷酸记录为潜在siRNA靶位点。优选地,siRNA靶位点是选自开放阅读框,这是因为非翻译区(UTR)富含调控蛋白结合位点。UTR结合蛋白和/或翻译引发复合物可能干扰siRNA内切核酸酶复合物的结合(Tuschl ChemBiochem.2:239-245)。但应当了解,针对非翻译区的siRNA也可能是有效的,如针对GAPDH所证明,其中针对5'UTR的siRNA介导了细胞GAPDH mRNA减少约90%并且完全消除了蛋白质水平(可获自因特网www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html)。

[0131] 其次,使用任何序列比对软件,例如可获自NCBI服务器的BLAST软件(可获自因特网www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)将潜在靶位点与非靶生物体(例如,人、蜜蜂、帝王蝶、小鼠、大鼠等)的适当基因组数据库进行比较。在一些实施方案中,过滤掉表现出与其他编码序列存在明显同源性的推定靶位点。在一些实施方案中,与靶序列相比,对一个或多个核苷酸进行改变或缺失,以破坏具有与非靶生物体的基因序列100%同一或互补的5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个连续核苷酸的序列。

[0132] 选择合格的靶序列作为siRNA合成的模板。优选的序列是包括低G/C含量的序列,因为这些已经被证明在介导基因沉默方面与具有高于55%的G/C含量的那些相比更有效。优选沿着用于评价的靶基因或序列的长度选择若干个靶位点。为了更好地评价所选siRNA,

优选联合使用阴性对照物。阴性对照siRNA优选包括与所述siRNA相同的核苷酸组成,但缺乏与基因组的明显同源性。因此,优选使用siRNA的乱序核苷酸序列,只要其不显示出与任何其它基因或害虫或寄生虫靶序列存在任何明显同源性即可。乱序核苷酸序列的实例提供在SEQ ID NO.5。

[0133] 举例来说,可以用在本公开的这个方面siRNA是靶向螨特异性钙调蛋白基因的siRNA。siRNA的实例提供在SEQ ID NO:3、4、88和89中。

[0134] 应当了解,本公开的RNA沉默试剂并不限于仅含有RNA的那些分子,而是还涵盖化学修饰过的核苷酸和非核苷酸。

[0135] 在一些方面,本文中所提供的RNA沉默试剂可能在功能上与细胞穿透肽相关联。如本文中所使用,“细胞穿透肽”是包含短(约12个残基)氨基酸序列或功能基序的肽,其赋予与输送穿膜复合物越过细胞的质膜和/或核膜相关的能量无关性(即,非内吞性)易位特性。用在本公开的穿膜复合物中的细胞穿透肽优选包含至少一个非功能性半胱氨酸残基,所述残基或者是游离的,或者是经过衍生化而与双链核糖核酸形成二硫键,所述核糖核酸因此类键合而经修饰。赋予此类特性的代表性氨基酸基序在美国专利号6,348,185中列出,所述专利的内容通过引用明确并入本文中。本公开的细胞穿透肽优选包括但不限于穿膜肽(penetratin)、转运素(transportan)、pIs1、TAT(48-60)、pVEC、MTS、以及MAP。

[0136] 另一种能够下调害虫或寄生虫基因产物的试剂是能够特异性切割蜜蜂病原体多肽的mRNA转录物或DNA序列的脱氧核酶分子。脱氧核酶是单链多核苷酸,其能够切割单链和双链靶序列(Breaker, R.R.和Joyce, G. Chemistry and Biology 1995;2:655;Santoro, S.W.&Joyce, G.F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997;94:4262)。已经提出了脱氧核酶的通用模型(“10-23”模型)。“10-23”脱氧核酶具有存在15个脱氧核糖核苷酸的催化结构域,所述催化结构域侧接两个各存在七至九个脱氧核糖核苷酸的底物识别结构域。这种类型的脱氧核酶可以在嘌呤:嘧啶连接处有效地切割其底物RNA(Santoro, S.W.&Joyce, G.F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999;关于脱氧核酶的综述,参见Khachigian, LM, Curr Opin Mol Ther 4:119-21(2002))。在一方面,所述害虫或寄生虫基因产物可以是瓦螨基因产物。害虫或寄生虫基因产物的下调还可以通过使用能够与编码所述害虫或寄生虫基因产物的mRNA转录物特异性杂交的反义多核苷酸来实现。必须在考虑对反义方法重要的两方面的同时实现对可用于有效下调害虫或寄生虫基因产物的反义分子的设计。第一方面是将寡核苷酸递送至适当细胞的细胞质中,而第二方面是设计以抑制翻译的方式特异性结合细胞内的指定mRNA或RNA靶序列的寡核苷酸。在一方面,所述害虫或寄生虫基因产物可以是瓦螨基因产物。在另一方面,所述害虫或寄生虫基因产物可以是钙调蛋白基因产物。

[0137] 众多递送策略可以用于将寡核苷酸有效地递送至多种细胞类型中(参见例如Luft J Mol Med 76:75-6(1998);Kronenwett等, Blood 91:852-62(1998);Rajur等, Bioconjug Chem 8:935-40(1997);Lavigne等, Biochem Biophys Res Commun 237:566-71(1997);及Aoki等, (1997) Biochem Biophys Res Commun 231:540-5(1997))。

[0138] 另外,还可获得基于热力学循环来鉴定与它们的靶mRNA具有最高预测结合亲和力的那些序列的算法,所述热力学循环解释了靶mRNA和寡核苷酸二者内的结构变化的能量学(参见例如, Walton等, Biotechnol Bioeng 65:1-9(1999))。此类算法已经被成功地用于在细胞内实施反义方法。举例来说,由Walton等开发的算法使得科学家能够成功地设计针对

兔β球蛋白 (RBG) 和小鼠肿瘤坏死因子-α (TNFα) 转录物的反义寡核苷酸。该研究小组最近已经报告如通过动态PCR技术所评价,合理选择的针对细胞培养物中的三种模型靶mRNA (人乳酸脱氢酶A和B以及大鼠gp1) 的寡核苷酸的反义活性在几乎所有情况下都被证明是有效的,包括利用磷酸二酯和硫代磷酸酯寡核苷酸化学性质进行的对两个细胞类型中的三种不同靶标的试验。另外,还公布了使用体外系统设计和预测特定寡核苷酸的有效性的若干种方法 (Matveeva等, *Nature Biotechnology* 16:1374-1375 (1998))。

[0139] 另一种能够下调害虫或寄生虫基因产物的试剂是能够特异性切割编码瓦螨基因产物的mRNA转录物的核酶分子。核酶正在被越来越多地用于通过切割编码目标蛋白质的mRNA而序列特异性地抑制基因表达 (Welch等, *Curr Opin Biotechnol* 9:486-96 (1998))。设计核酶来切割任何特定靶RNA (包括病毒RNA) 的可能性使得它们在基础研究和治疗应用中都是有价值的工具。在一方面,所述害虫或寄生虫基因产物可以是瓦螨基因产物。在另一方面,所述害虫或寄生虫基因产物可以是钙调蛋白基因产物。

[0140] 另外的下调细胞内害虫或寄生虫基因产物表达的方法是经由三链体形成寡核苷酸 (TF0)。最近的研究已经证明,可以设计能以序列特异方式识别并且结合至双链螺旋DNA中的聚嘌呤/聚嘧啶区域的TF0。以下文献概述了这些识别规则: Maher III, L.J. 等, *Science* (1989) 245:725-7; Moser, H.E. 等, *Science*, (1987) 238:645-6; Beal, P.A. 等, *Science* (1992) 251:1360-1363; Cooney, M. 等, *Science* (1988) 241:456-459; 及 Hogan, M.E. 等, 欧洲专利公布375408。寡核苷酸的修饰诸如引入嵌入剂和骨架取代,以及优化结合条件 (pH值和阳离子浓度), 有助于克服TF0活性的固有障碍, 诸如电荷排斥和不稳定, 并且最近证明,合成的寡核苷酸可以靶向特定序列 (关于最近的综述, 参见 Seidman 和 Glazer, *J Clin Invest* 2003; 112:487-94)。在一方面,所述害虫或寄生虫基因产物可以是瓦螨基因产物。在另一方面,所述害虫或寄生虫基因产物可以是钙调蛋白基因产物。

[0141] 一般来说,形成三链体的寡核苷酸具有序列对应性:

	寡核苷酸	3'--A	G	G	T
[0142]	双链体	5'--A	G	C	T
	双链体	3'--T	C	G	A

[0143] 但是,已经证明,A-AT和G-GC三链体具有最大的三螺旋稳定性 (Reither 和 Jeltsch, *BMC Biochem*, 2002年9月12日, 电子公布)。其作者已经证明,根据A-AT和G-GC规则设计的TF0不形成非特异性三链体,表明三链体形成实际上是序列特异性的。

[0144] 三链体形成寡核苷酸的长度优选至少15个、更优选25个、又更优选或更多个核苷酸, 多达50或100bp。

[0145] 用TF0转染细胞 (例如,经由阳离子脂质体) 并且与靶DNA形成三螺旋结构诱导了空间和功能变化,从而阻断了转录起始和延长,允许在内源DNA中引入所期望的序列变化并且导致基因表达的特异性下调。

[0146] 有效TF0的设计、合成和施用的详细描述可以在颁予Froehler等的美国专利公布号2003/017068和2003/0096980以及颁予Emanuele等的2002/0128218和2002/0123476以及颁予Lawn的美国专利号5,721,138中找到。

[0147] 本公开的多核苷酸下调试剂可以根据本领域中已知的任何多核苷酸合成方法生

成,诸如酶合成或固相合成。用于执行固相合成的设备和试剂是例如从Applied Biosystems商购。还可以采用任何其它的用于此类合成的手段;多核苷酸的实际合成完全在本领域技术人员的能力范围内,并且可以经由例如以下文献中所详述的方法:“Molecular Cloning: A Laboratory Manual” Sambrook等,(1989);“Current Protocols in Molecular Biology”第I-III卷,Ausubel,R.M.编(1994);Ausubel等,“Current Protocols in Molecular Biology”,John Wiley and Sons,Baltimore,Maryland(1989);Perbal,“A Practical Guide to Molecular Cloning”,John Wiley & Sons,New York(1988);及“Oligonucleotide Synthesis” Gait,M.J.编(1984),利用固相化学反应(例如,氰基乙基亚磷酰胺),继而进行去保护、脱盐并且通过例如自动化加三苯甲基法(trityl-on method)或HPLC进行纯化来实现。

[0148] 本公开的多核苷酸试剂可以包含由键合在3'至5'磷酸二酯键合中的嘌呤类和嘧啶类碱基组成的杂环核苷酸。优选使用的多核苷酸试剂是在骨架、核苷间键合或碱基中经过修饰的那些,如在下文中广泛描述的。

[0149] 根据本公开的这个方面,可用的多核苷酸的具体实例包括含有经修饰的骨架或非天然核苷间键合的多核苷酸试剂。具有经修饰的骨架的多核苷酸试剂包括在骨架中保留了磷原子的那些,例如美国专利号4,469,863、4,476,301、5,023,243、5,177,196、5,188,897、5,264,423、5,276,019、5,278,302、5,286,717、5,321,131、5,399,676、5,405,939、5,453,496、5,455,233、5,466,677、5,476,925、5,519,126、5,536,821、5,541,306、5,550,111、5,563,253、5,571,799、5,587,361和5,625,050中所公开。

[0150] 经修饰的多核苷酸骨架包括例如具有正常3'-5'键合的硫代磷酸酯类、手性硫代磷酸酯类、二硫代磷酸酯类、磷酸三酯类、氨基烷基磷酸三酯类、甲基和其它烷基磷酸酯类(包括3'-亚烷基磷酸酯类和手性磷酸酯类)、次磷酸酯类、亚磷酰胺类(包括3'-氨基亚磷酰胺类和氨基烷基亚磷酰胺类)、硫羰基亚磷酰胺类、硫羰基烷基磷酸酯类、硫羰基烷基磷酸三酯类以及硼磷酸酯类、这些多核苷酸骨架的2'-5'连接的类似物,以及具有反转极性的那些多核苷酸骨架,其中相邻的核苷单元对是连接的3'-5'与5'-3'或2'-5'与5'-2'。还可以使用各种盐、混合盐或游离酸形式。

[0151] 替代地,其中不包括磷原子的经修饰的多核苷酸骨架具有通过短链烷基或环烷基核苷间键合、混合的杂原子和烷基或环烷基核苷间键合或者一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键合形成的骨架。这些包括具有吗啉基键合(部分地由核苷的糖部分形成);硅氧烷骨架;硫化物、亚砷和砷骨架;甲缩醛和硫代甲缩醛骨架;亚甲基甲缩醛和硫代甲缩醛骨架;含烯的骨架;氨基磺酸酯骨架;亚甲基亚胺基和亚甲基胍基骨架;磺酸酯和磺酰胺骨架;酰胺骨架;以及其它具有混合的N、O、S和CH₂组成部分的骨架的那些,如美国专利号5,034,506、5,166,315、5,185,444、5,216,141、5,235,033、5,264,562、5,264,564、5,405,938、5,470,967、5,489,677、5,541,307、5,561,225、5,596,086、5,602,240、5,602,240、5,608,046、5,610,289、5,618,704、5,623,070、5,663,312、5,214,134、5,466,677、5,610,289、5,633,360、5,677,437和5,677,439中所公开。

[0152] 可以根据本公开使用的其它多核苷酸试剂是核苷酸单元的糖和核苷间键合二者(即,骨架)都经过修饰、被新的基团置换的那些。维持碱基单元与适当的多核苷酸靶标互补。此类多核苷酸模拟物的实例包括肽核酸(PNA)。PNA多核苷酸是指其中糖骨架被含酰胺

的骨架、具体来说氨基乙基甘氨酸骨架置换的多核苷酸。碱基得以保留,并且直接或间接地与所述骨架的酰胺部分的氮杂氮原子结合。教导了PNA化合物的制备的美国专利包括但不限于美国专利号5,539,082、5,714,331和5,719,262,所述美国专利各自通过引用并入本文中。可以用在本公开中的其它骨架修饰在美国专利号6,303,374中有公开。

[0153] 本公开的多核苷酸试剂还可以包括碱基修饰或取代。如本文中所使用,“未修饰的”或“天然的”碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。经修饰的碱基包括但不限于其它合成或天然碱基,诸如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基和其它烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基和其它烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶和2-硫代胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶和胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶、5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫代尿嘧啶、8-卤代、8-氨基、8-硫醇、8-硫代烷基、8-羟基和其它8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤、5-卤代具体来说是5-溴代、5-三氟甲基和其它5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。其它碱基包括美国专利号3,687,808中所公开的那些、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering,第858-859页,Kroschwitz,J.I.编,John Wiley&Sons,1990中所公开的那些、Englisch等,Angewandte Chemie,国际版,1991,613中所公开的那些,以及Sanghvi,Y.S., Antisense Research and Applications,第15章,第289-2页,Crooke,S.T.和Lebleu,B.编,CRC Press,1993中所公开的那些。此类碱基对于增加本公开的寡聚化合物的结合亲和力特别有用。这些包括5-取代的嘧啶;6-氮杂嘧啶以及N-2、N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤;5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。5-甲基胞嘧啶取代已经被证明使核酸双链体稳定性增加0.6-1.2℃(Sanghvi YS等,(1993) Antisense Research and Applications,CRC Press,Boca Raton 276-278),并且是当前优选的碱基取代,甚至更具体来说是当与2'-O-甲氧基乙基糖修饰组合时。

[0154] 在合成后,本公开的多核苷酸试剂可以任选地进行纯化。举例来说,可以通过用溶剂或树脂提取、沉淀、电泳、光谱或其组合而从混合物中纯化出多核苷酸。替代地,多核苷酸可以不经纯化或经过最低程度的纯化便使用,以避免由于样品处理带来的损失。多核苷酸可以经过干燥以便保存,或者溶解在水性溶液中。所述溶液可以含有缓冲剂或盐以促进退火和/或稳定双链体。

[0155] 应当了解,本公开的多核苷酸试剂可以作为其本身提供,或者作为包含编码所述多核苷酸试剂的核酸序列的核酸构建体来提供。通常,所述核酸构建体包含在宿主细胞中有功能的启动子序列,如下文所详述。

[0156] 在可操作地连接的启动子序列控制下的本公开的多核苷酸序列还可以进一步侧接其它的有利地影响其转录和/或所得转录物的稳定性的序列。此类序列一般位于启动子上游和/或表达构建体3'端的下游。

[0157] 如在提及调控序列和结构核苷酸序列时所使用,术语“可操作地连接的”是指所述调控序列引起所连接的结构核苷酸序列的受调控的表达。“调控序列”或“控制元件”是指位于结构核苷酸序列上游、内部或下游的核苷酸序列,它们影响转录的时序和水平或量、RNA加工或稳定性,或者相关联的结构核苷酸序列的翻译。调控序列可以包括启动子、翻译前导

序列、内含子、增强子、茎环结构、阻遏物结合序列、终止序列、中止序列、多聚腺苷酸化识别序列等等。

[0158] 应当了解,核酸试剂可以用多种方式递送至害虫或寄生虫。根据一个方面,所述核酸试剂被直接递送至害虫或寄生虫(例如,通过对螨侵扰的蜂巢进行喷雾)。所述核酸试剂或编码所述核酸试剂的构建体可以通过扩散进入螨体内。在这个方面,所述核酸构建体的启动子在螨细胞内通常是起作用的。在一方面,所述害虫或寄生虫可以是狄斯瓦螨。

[0159] 应当了解,因为很多寄生虫使用它们的嘴刺破宿主节肢动物外骨骼并且以节肢动物的血淋巴为食,所以本公开考虑将本公开的多核苷酸试剂递送至所述节肢动物,借此使它们存在于节肢动物血淋巴中,由此变得对害虫或寄生虫有效。因此,根据另一方面,所述核酸试剂被间接递送至害虫或寄生虫(例如,经由宿主蜜蜂至螨)。在这个方面,所述核酸构建体的启动子在宿主细胞内通常是起作用的。在某些方面,所述害虫或寄生虫可以是狄斯瓦螨,并且所述宿主节肢动物可以是蜜蜂。

[0160] 根据一个方面,通过喷雾将所述核酸试剂递送至受侵扰的宿主。所述核酸试剂或编码所述核酸试剂的构建体可以通过扩散进入宿主体内。在某些方面,所述害虫或寄生虫可以是狄斯瓦螨,并且所述宿主节肢动物可以是蜜蜂。

[0161] 根据另一方面,经由宿主的食物将所述核酸试剂递送至宿主。诸位发明人考虑到,在吞食本公开的核酸试剂后,所述试剂可以存在于例如宿主节肢动物的宿主血淋巴中,借此对寄生虫,例如瓦螨有效。

[0162] 因此,可以在体外或体内(例如在细菌或酵母细胞中)合成本公开的多核苷酸,并且加入到食物中。举例来说,可以通过在基因区段的末端添加两个相对的启动子(例如T7启动子)来合成双链RNA,其中将所述启动子放在紧接所述基因的5'处,并且在相对的方向上将所述启动子放在紧接所述基因区段的3'处。然后,可以通过用T7RNA聚合酶在体外转录来制备dsRNA。

[0163] 根据本公开的诸多方面,用于合成核酸,包括dsRNA的序列的实例提供在SEQ ID NO:1-4、6、23、26-35以及69-93中。

[0164] 应当了解,一些害虫或寄生虫在宿主节肢动物的外骨骼中造成损伤位点。此类损伤位点藏有细菌感染。举例来说,宿主蜜蜂损伤位点可能藏有细菌,诸如蜂房蜜蜂球菌(*Melissococcus pluton*),所述细菌引起欧洲蜜蜂幼虫腐臭病。除了它们的寄生影响以外,已知寄生虫还充当多种其它病原体和寄生虫的媒介物。举例来说,怀疑瓦螨充当多种蜜蜂病原体,包括畸翅病毒(deformed wing virus, DWV)、喀什米尔蜜蜂病毒(Kashmir bee virus, KBV)、急性蜜蜂麻痹病毒(acute bee paralysis virus, ABPV)和黑蜂王台病毒(black queen cell virus, BQCV)的媒介物,并且可以削弱它们宿主的免疫系统,让它们易受感染。

[0165] 因此,通过杀死害虫或寄生虫(或防止它们繁殖),本公开的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫试剂可以用于预防和/或处理宿主生物体的细菌感染。举例来说,以上指出的病毒在宿主蜜蜂中引起蜂房蜜蜂球菌和病毒感染。因为瓦螨侵扰和病毒感染被认为是蜂群崩溃失调症(CCD)的原因,所以本试剂还可以用于预防或降低蜜蜂群体对CCD的易感性。

[0166] 应当了解,除了饲喂抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫核酸试剂以用于降低蜜蜂病原体感染和侵染外,加强适当的卫生条件(例如,制止再使用受侵染的蜂巢)可以增强处理效

果和预防感染。

[0167] 本公开还包括并且提供了表达选择性杀昆虫剂的转基因细菌和酵母细胞。在一个方面,将编码本文中所使用的小RNA、dsRNA、miRNA或者抗小RNA或miRNA的靶核酸分子的核酸可操作地连接至启动子和任选地终止子。在一些实施方案中,例如通过施加热或者压力将所述转基因细菌和酵母细胞杀死。在一些实施方案中,在向靶生物体提供选择性杀昆虫剂之前将所述转基因细菌和酵母细胞溶解。在一些实施方案中,没有溶解所述转基因细菌和酵母细胞。

[0168] 在一个方面,本文中所使用的外源核酸分子是小RNA或编码小RNA,或者在具体方面是siRNA,其可以调节靶生物体内的基因表达。在一方面,外源核酸编码与选自SEQ ID NO:1-4和6-94组成的组的序列有至少80%、85%、88%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的小RNA。在另外一方面,本文中所使用的外源核酸分子是dsRNA分子或编码dsRNA分子。在另一方面,本文中所使用的外源核酸分子是人工miRNA或编码人工miRNA。在另外一方面,本文中所使用的外源核酸分子是siRNA或编码siRNA。在一个方面,本文中所使用的外源核酸分子是小RNA前体或编码小RNA前体。在另一方面,本文中所使用的外源核酸分子是miRNA或siRNA前体或编码miRNA或siRNA前体。在一个方面,本文中所使用的外源核酸分子是天然存在的分子。在另一方面,本文中所使用的外源核酸分子是合成的分子。

[0169] 在一个方面,本文中所使用的外源核酸分子是小RNA的茎环前体或编码小RNA的茎环前体,或者在具体方面,是miRNA的茎环前体或编码miRNA的茎环前体,它包含与选自SEQ ID NO:1-4和6-94组成的组的序列具有至少80%、85%、88%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。本文中所使用的茎环前体包含与选自SEQ ID NO:1-4和6-94组成的组的序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、88%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0170] 在一个方面,本文中所使用的外源核酸分子是裸RNA或者从核酸表达构建体表达而来,其中它被可操作地连接至调控序列。

[0171] 在一个方面,本文中所公开的重组DNA构建体或转基因还包含转录终止子。

[0172] 可以预料,在从本申请成熟为专利期间,可能开发出很多用于下调基因产物表达的相关方法,并且术语“下调狄斯瓦螨基因产物的表达”意在预先包括所有此类新技术。

[0173] 应当了解,出于清楚性的原因而在单独的方面的内容中加以描述的本公开的某些特征还可以以组合形式在单个方面中提供。相反地,出于简便性的原因而在单个方面的内容中加以描述的本公开的各种特征还可以分开地或者以任何合适的次组合形式或者在适合时在本公开的任何其它所描述的方面中提供。各个方面的内容中所描述的某些特征不当被视为那些方面的必需特征,除非所述方面没有那些要素便不起作用。如上文所描绘和如所附权利要求书部分中所要求保护的各个方面和本公开的诸多方面在以下实施例中得到实验支持。

实施例

[0174] 实施例1. 瓦螨钙调蛋白基因序列

[0175] 将表1中提供的钙调蛋白(CAM)基因(SEQ ID NO:1和2)或它们的对应转录物用作

多核苷酸组合物的靶标,所述多核苷酸组合物包含作为与那些基因或转录物同一或互补的至少18个连续核苷酸的多核苷酸。将表1中提供的基因序列、由那些基因编码的蛋白质序列或那些基因内含有的序列用于从其它节肢动物害虫和寄生虫种类获得表1中未列出的直系同源钙调蛋白 (CAM) 基因。然后,此类直系同源基因和它们的转录物可以充当本文中提供的多核苷酸的靶标,或者作为特别设计用来靶向所述直系同源基因或转录物的抗寄生虫、抗害虫或杀昆虫多核苷酸的来源。

[0176] 表1.狄斯瓦螨的靶钙调蛋白 (CAM) 基因

[0177]	基因名称	SEQ ID	开放阅读框DNA序列
	CAM-1	1	ATGGCTGATCAGCTAACTGAGGAACAGATGCCCGAGTTCAAAGAGGGCGTTAGCCTGTTTGACAAGG ACGAGATGCGCAAGATCAAGACAAAGCAGCTCGGTACGGTAAATGCCATCTCTCCTGCGGACGAAACCCAC TGAAGCTGAATGCTCAAGATCGATGATCAACGAGGTGACGCGCGACGGCTCCGGAAGACGATGATTTCCCT GAGTTCTCTCACAATGATGCGCAAGAAAGATGAAGGACACCGACTCCGAGGAGGAGATGCCAGAGGGCT TCCGGGTATTTGACAAGGATGGCAACGGTTTCATTTTCGGCTGGCTGAGCTCAGGGACGGTATGACGCA CCTTGGCGGCAAGCTTACGGACGAGCGAGGTAGATGAGATGATTTCCGAGGAGGACATATTTACGGTGAT GCTACGCTCAACTACCAAGAGTTTGTCTACCATGATGACATGCTCAAGTAA
[0178]	CAM-2	2	ATGCCGATCAGCTGACCGAGGACCAATTCGCCGAATTCAGGAGGCTTTACGCTCTTTGATAAAG ACGGTGAATGCGCAAAATTACGACCAAGGACTAGGAGACCTGATCGGTTCTCTTGGCGGAGAAACCTTAC TGAAGCTGAGCTTCAAGACATGATCAAGGAGGTGCGGCTGACGGTAAACGGGACATTTGACTTTCCG GATTTCTCAAGATGATGCGCGGTAAATGAAGGACCGGACTCCGAGGAGGAGATCCGGGAGCTT TTAGGGTTTTTGATAAAGACCGAAATGGCTTCATTTCCGGCTGACAGCTGAGCGACCTGAATGACCAA CCTTGGCGGCAAGCTCAGCGACGAGGACTGACGACGATGATGCCGCGGCGGAGATATCGAAGCGGAC GGAGGATGAACTACCGAGAGTTCTCTCAAGATGATGATGATCAAGATGA

[0179] 对于SEQ ID NO:1和2中提供的每一种钙调蛋白DNA基因序列,对生长在皮氏培养皿上的瓦螨体外饲喂有义或反义方向或双向的单链或双链DNA或RNA片段,或者局部施用至蜂巢以影响CAM靶基因的表达并且实现减少狄斯瓦螨螨群。

[0180] 实施例2.抑制狄斯瓦螨的钙调蛋白 (CAM) 基因。

[0181] 提供了对应于SEQ ID NO:3和4(表2)的用于抑制狄斯瓦螨中的钙调蛋白(CAM)基因表达的多核苷酸,并且用于抑制狄斯瓦螨中的钙调蛋白(CAM)基因的表达。SEQ ID NO:3和4分别描述了选自CAM-1(SEQ ID NO:1)的373bp dsRNA多核苷酸序列和186bp dsRNA多核苷酸序列。对应于dsRNA多核苷酸CAM_L/CAM373的SEQ ID NO:3涵盖了钙调蛋白CAM-1(SEQ ID NO:1)基因的大部分开放阅读框。对应于dsRNA多核苷酸CAM_S/CAM186的SEQ ID NO 4是CAM_L/CAM373(SEQ ID NO:3)的部分片段,并且也源自于CAM-1(SEQ ID NO:1)。表2中的SEQ ID NO:5是与任何已知的狄斯瓦螨基因具有不超过19bp序列同一性的对照dsRNA序列多核苷酸。

[0182] 表2. 靶向狄斯瓦蟻鈣調蛋白 (CAM) 基因的dsRNA

dsRNA 名称	SEQ ID	核酸序列
CAM_L/ CAM373	3	ACGCAPOCCGAGUUCNAAGAGCGUUGTAGGCGUUGUGCAAGCGAGCGCAAGGCCACGACACGACCAAGSAG CUGCGUAGCGUAAUCCGAUCUCUCGCGCCAGAACCCACUGAGGCCUGAAGUCCGAGGACAGUACCAACGAGGUCG AGCGCCAGCGUCCGCGAAGCGAAGAUUUCGCGAGUUCCTCACCAUGAUGCGGCAAGAAAGAAAGAGGACACCGGA CUCGCGAGCGAGGAGAUCCGAGAGCGGUUCCCGCGUAIUCCGACACAGCAUGGCCAACGCUUUCAUUUUCGCGCGCGAG CUCAGGCGCGUAGAGACCAACUCUUGGCGACAGCTUACCGAGAGSAGGAGGAGCGUACGUGCAUUAUUGCGGAGCGAG AUAUUGAC
CAM_S/ CAM186	4	ACAAUCAGGGGACACAAAGAGGAAGGAGACCCGACUCGCGACGAGGAGAGUCCGAGAGUUCGCGGUAAUUCGCA AGGAGCGGCAAGCGUUCUUCUUGCGCGCGCGGCGAGCGCGGCAAGGUGAGCAAGACUUCUGCGCGAGAGUUCGCA AGGAGGAGGAGCAUGAGAGGUAUUCGCGAGAGGACAGUAUUGAC
SCRAM	5	AACCTACCGGUCGCAAGUUBUAUCGAGGAGGAGGCCAACGCGCCCGCGCUUAAAAACUGCGGAGCAGACGAAACGA CUCGCGCAGAGGAGGAAAGGCGUCUGAUGGUGGAGCUUAAGAAACGUAACCUUGCGAGCAAAAGGAGGAGUAGACG CUGGCGCAGCCCGAGUAGUGUUAUGUUCUUCGAGCUGAGUUGGCCACGACGUAUCGCGGACAGCAAGCAAGAGAGUUGG CGUUCGUGGUGAGGCGGAGAAAGCAUCCUGGAGACUUGCGGCGGCGUACAGUACUAC

[0184] 实施例3.在用特异性dsRNA处理后第3天的狄斯瓦螨生物测定

[0185] 从蜜蜂群体中收集成体雌性螨,并且放在皮氏培养皿内的人工食物溶液上,所述

人工食物溶液含有1%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物、1%NaCl和15mg/mL琼脂的混合物。在本实施例中,对所述食物补充50 μ g卡那霉素/1mL食物溶液。对所述食物/琼脂溶液进一步补充200–500 μ g/mL的dsRNA,并且将所得溶液倾倒在皮氏培养皿上。本实施例中的dsRNA由SEQ ID NO:3 (CAM_L/CAM373)或SEQ ID NO:5 (SCRAM)组成。将十五个螨施加至每一皿,并且以一式三份进行实验。在29℃和50–60%相对湿度下孵育存在螨的食物皿。在特定的时间间隔对皿进行检查,并且对死亡的螨进行计数并移除。对于死亡率研究,在置于食物上之后三天时对螨进行计数(图2)。图2显示,与未处理的皿或者螨以补充了非特异(SCRAM)dsRNA多核苷酸的食物为食的皿相比,所有的螨在处理三天都死了。

[0186] 实施例4.用靶向钙调蛋白的dsRNA处理后第5天的狄斯瓦螨生物测定

[0187] 从蜜蜂群体中收集成体雌性螨,并且放在皮氏培养皿内的人工食物溶液上。所述人工食物含有1%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物、1%NaCl和15mg/mL琼脂的混合物。在本实施例中,对所述食物进一步补充8 $\times$ 最终浓度的抗霉菌溶液(100 $\times$,Sigma Aldrich)、500 μ g/mL卡那霉素和220U/mL制霉菌素。对所述食物/琼脂溶液进一步补充200–500 μ g/mL的dsRNA,并且将所得溶液倾倒在皮氏培养皿上。本实施例中的dsRNA由SEQ ID NO:3 (CAM_L/CAM373)或SEQ ID NO:4 (CAM_S/CAM186)或SEQ ID NO:5 (SCRAM)组成。将十五个螨施加至每一皿,并且以一式三份进行实验。在29℃和50–60%相对湿度下孵育存在螨的食物皿。在特定的时间间隔对皿进行检查,并且对死亡的螨进行计数并移除。对于死亡率研究,在置于食物上之后五天时对螨进行计数(图3)。对于分子分析,从皿中取出活螨,在液氮中速冻并且进行TAQMAN™分析以评价钙调蛋白(CAM)RNA的水平。图3A.暴露于SEQ ID NO:3 (CAM_L/CAM373)或SEQ ID NO:4 (CAM_S/CAM186)的螨中的钙调蛋白(CAM)基因的RNA水平与非特异性(SCRAM)处理或未处理(CNTR)相比大大降低。图3B.处理后5天时在暴露于针对钙调蛋白(CAM)的dsRNA的螨中观察到统计学上显著的死亡率。

[0188] 实施例5.使用喷雾干燥或半固体制剂递送靶向瓦螨基因的dsRNA多核苷酸的方法。

[0189] 如表3中所说明将用于抑制瓦螨靶钙调蛋白(CAM)基因表达的dsRNA制备成制剂,所述制剂含有处于磷酸盐缓冲液(1.15mM KH₂PO₄(一价)和8mM Na₂HPO₄(二价)的溶液,pH 8.0)中的1份dsRNA和约14份海藻糖。使用Büchi B-290迷你喷雾干燥器,将液体制剂雾化成小滴,并且用气体加热以制造可流动的粉末。

[0190] 表3.制剂制备

[0191]

dsRNA	储备 缓冲 液 (X% w/v 海藻 糖+ 磷酸 盐缓 冲 液)	最终 缓冲 液 (X% w/v 海藻 糖+ 磷酸 盐缓 冲 液)	总体 积 (mL)	储备 缓冲 液 (mL)	dsRNA 储备液 (mL)	比 率	活性成 分(AI) 浓度 (mg/mL)	活性 成分 (AI) 浓度 (固 体%)	AI (dsRNA)与缓冲 液(海藻 糖+磷酸 盐缓冲 液)的比 率
CAM_L/CAM37 3	40	10	1100	275.00	825.00	1/4	7.20	0.72 0	13.9
CAM_S/CAM186	40	10	1285	321.21	963.75	1/4	6.75	0.67 5	14.8

[0192] 将所得颗粒与粉末状糖一起配制,并且通过将粉末状糖均匀散布在蜂巢架顶上而均匀地施用至蜂巢。在其它方面,将喷雾干燥物质的半固体制剂与水一起制备,并且通过允许蜜蜂以此为食而将糖水(“蜜蜂糖果”)制剂供应给蜜蜂蜂巢。

[0193] 实施例6.用靶向钙调蛋白(CAM)基因的dsRNA处理后蜂巢中的瓦螨的体内减少。

[0194] 收集侵扰蜂巢中的成体蜜蜂的瓦螨,并且使用标准螨计数方法进行计数。根据实施例7用包含SEQ ID NO:3(CAM-L)、SEQ ID NO:4(CAM-S)的喷雾干燥的dsRNA或无处理(对照)来处理蜂巢。在实验开始时以及处理后2周、4周和12周时评价每一蜂巢的螨负载。图4示出了经过处理的蜂巢与未接受处理的蜂巢相比的螨负载。将计数的螨数目相对于100只成体蜜蜂进行正规化,并且代表瓦螨负载。

[0195] 实施例7.用靶向钙调蛋白(CAM)基因的dsRNA处理后对瓦螨中的过渡性小RNA的检测。

[0196] 从用SEQ ID NO:3dsRNA多核苷酸处理过的蜂巢中收集瓦螨,并且在处理后7天从蜂巢收集瓦螨。提取瓦螨RNA,并且使用SOLiD平台进行小RNA测序分析。检测到大多数的小RNA分子在dsRNA序列区域之外,并且特异性朝向SEQ ID NO:3的dsRNA区域的3'部分。另外,大多数的过渡性读数相对于钙调蛋白(CAM)基因转录物序列呈反义取向。此外,尽管用据预测对CAM-1(SEQ ID NO:1)具有特异性的SEQ ID NO:3dsRNA处理蜂巢,但本实验中检测到对CAM-2(SEQ ID NO:2)具有特异性的小RNA。这一观察结果支持了这样的假设:即使当两个基因之间仅有小片段在DNA层级上共有完全同一性(在这种情况下,23个核苷酸)时,抑制瓦螨的RNA表达和过渡性小RNA生成也起作用。

[0197] 实施例8.来自节肢动物害虫和寄生虫种类的钙调蛋白(CAM)基因同源物以及对应的dsRNA多核苷酸。

[0198] 使用标准生物信息学技术和狄斯瓦螨的序列SEQ ID NO:1和2,在侵扰其它节肢动物或哺乳动物并且将被靶向以进行基因调控的节肢动物害虫种类中鉴定出一组31个保守

钙调蛋白 (CAM) 基因序列。鉴定这些序列,并且作为系统发生树呈现在图1中。通过鉴定每一序列内对应于SEQ ID NO:3 (CAM_L/CAM373) 的保守373bp结构域来对图1中的DNA序列进行进一步分析。表4列出了新鉴定的钙调蛋白 (CAM) 基因序列的SEQ ID NO以及对应的373bp dsRNA多核苷酸触发序列。将在直接饲喂测定中针对它们相应的节肢动物种类对所述373bp多核苷酸dsRNA序列进行单独或组合测试。

[0199] 表4. 从节肢动物害虫或寄生虫鉴定的钙调蛋白 (CAM) 基因序列以及它们对应的373bp RNA多核苷酸。

[0200]

SEQ ID NO	基因名称	生物体/物种	类型
6	CAM-3	狄斯瓦螨	cDNA
7	CAM-1	肩突硬蜱	cDNA
8	CAM-1	埃及伊蚊	cDNA

[0201]

9	CAM-1	致倦库蚊	cDNA
10	CAM-1	豌豆蚜	cDNA
11	CAM-1	印度跳蚊	cDNA
12	CAM-1	人体虱	cDNA
13	CAM-1	冈比亚按蚊	cDNA
14	CAM-1	红火蚁	cDNA
15	CAM-1	肩突硬蜱	RNA
16	CAM-1	埃及伊蚊	RNA
17	CAM-1	致倦库蚊	RNA
18	CAM-1	豌豆蚜	RNA
19	CAM-1	印度跳蚊	RNA
20	CAM-1	人体虱	RNA
21	CAM-1	冈比亚按蚊	RNA
22	CAM-1	红火蚁	RNA
23	CAM-3	狄斯瓦螨	RNA
24	CAM-1	二斑叶螨	cDNA
25	CAM-1	二斑叶螨	RNA
26	CAM-4	狄斯瓦螨	cDNA
27	CAM-4	狄斯瓦螨	RNA
28	CAM-5	狄斯瓦螨	cDNA
29	CAM-5	狄斯瓦螨	RNA
30	CAM-7	狄斯瓦螨	cDNA
31	CAM-7	狄斯瓦螨	RNA
32	CAM-8	狄斯瓦螨	cDNA
33	CAM-8	狄斯瓦螨	RNA
34	CAM-9	狄斯瓦螨	cDNA
35	CAM-9	狄斯瓦螨	RNA
36	CAM	肩突硬蜱	cDNA
37	CAM	肩突硬蜱	RNA
38	CAM	肩突硬蜱	cDNA
39	CAM	肩突硬蜱	RNA
40	CAM	肩突硬蜱	cDNA
41	CAM	肩突硬蜱	cDNA
42	CAM	肩突硬蜱	RNA
43	CAM	埃及伊蚊	cDNA
44	CAM	埃及伊蚊	RNA
45	CAM	埃及伊蚊	cDNA
46	CAM	埃及伊蚊	RNA

[0202]

47	CAM	埃及伊蚊	cDNA
48	CAM	埃及伊蚊	RNA
49	CAM	致倦库蚊	cDNA
50	CAM	致倦库蚊	RNA
51	CAM	致倦库蚊	cDNA
52	CAM	致倦库蚊	RNA
53	CAM	致倦库蚊	cDNA
54	CAM	致倦库蚊	RNA
55	CAM	致倦库蚊	cDNA
56	CAM	致倦库蚊	RNA
57	CAM	豌豆蚜	cDNA
58	CAM	豌豆蚜	RNA
59	CAM	豌豆蚜	cDNA
60	CAM	豌豆蚜	RNA
61	CAM	人虱	cDNA
62	CAM	人虱	RNA
63	CAM	人虱	cDNA
64	CAM	人虱	RNA
65	CAM	人虱	cDNA
66	CAM	人虱	RNA
67	CAM	人虱	cDNA
68	CAM	人虱	RNA

[0203] 实施例9. 瓦螨钙调蛋白 (CAM) 基因转录物和dsRNA触发序列。

[0204] 将表5中提供的钙调蛋白 (CAM) 序列 (SEQ ID NO:69和70) 或它们对应的转录物用作多核苷酸组合物的靶标,所述多核苷酸组合物包含作为与那些基因或转录物同一或互补的至少18个连续核苷酸的多核苷酸。通过RNA测序来鉴定瓦螨钙调蛋白序列的5'和3'UTR序列。

[0205] 表5. 狄斯瓦螨钙调蛋白 (CAM) 基因的目标转录物

[0206]

基因名称和物种	SEQ ID NO	类型
CAM-1; 狄斯瓦螨	69	RNA
CAM-2; 狄斯瓦螨	70	RNA

[0207] 将SEQ ID NO:69和70平铺在150bp的片段中。表6示出了平铺在SEQ ID NO:69和70上的150bp片段的上部链 (5'-3')。

[0208] 表6. CAM-1和CAM-2基因的平铺多核苷酸序列

[0209]

基因名称	SEQ ID NO	转录物序列内的位置
CAM-1	71	1-150
CAM-1	72	151-300
CAM-1	73	301-450
CAM-1	74	451-600
CAM-1	75	601-750
CAM-1	76	751-900
CAM-1	77	901-1050
CAM-1	78	1051-1200
CAM-1	79	1201-1350
CAM-1	80	1351-1500
CAM-2	81	1-150
CAM-2	82	151-300
CAM-2	83	301-450
CAM-2	84	451-600
CAM-2	85	601-750
CAM-2	86	751-900
CAM-2	87	901-1050

[0210] 将包含选自SEQ ID NO:71-87的序列的一种或多种dsRNA体外提供给生长在皮氏培养皿上的瓦螨,或局部施用至蜜蜂蜂巢,以影响CAM靶基因的表达并且实现狄斯瓦螨螨群的减少。

[0211] 实施例10.瓦螨中靶向钙调蛋白(CAM)的触发剂的体外生物测定

[0212] 基于CAM-1与CAM-2序列之间的保守序列重叠生成了靶向钙调蛋白(CAM)-1和CAM-2的多核苷酸触发序列。这些呈现为SEQ ID NO:88和89(分别靶向CAM-1和CAM-2)。

[0213] 在体外生物测定中测试选自SEQ ID NO:88和89的多核苷酸序列抑制成体瓦螨存活的能力。从蜜蜂群体中收集成体雌性螨,并且放在皮氏培养皿内的人工食物溶液顶上。所述人工食物含有1%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物、1%NaCl和15mg/mL琼脂的混合物。在本实施例中,对所述食物进一步补充8×最终浓度的抗霉菌溶液(100×,Sigma Aldrich)、500 μg/mL卡那霉素和220U/mL制霉菌素。对所述食物/琼脂溶液进一步补充200-500 μg/mL的dsRNA,并且将所得溶液倾倒在皮氏培养皿上。本实施例中的dsRNA由SEQ ID NO:3(CAM373)、SEQ ID NO:88(CAM-1)或SEQ ID NO:89(CAM-2)或未处理的对照(NTC)组成。将十五个螨施加至每一皿,并且以一式三份进行实验。在29℃和50-60%相对湿度下孵育存在螨的食物皿。在特定的时间间隔对皿进行检查,并且对死亡的螨进行计数并移除。对于死亡率

研究,在置于食物上之后五天和六天时对螨进行计数(图5)。另外,将SEQ ID NO:88(CAM-1)和SEQ ID NO:89(CAM-2)的dsRNA以等摩尔量混合,并且如以上所描述饲喂给螨。图6示出了这种施用的结果。

[0214] 对于分子分析,从皿中取出活螨,在液氮中速冻并且进行TAQMAN™分析,以评价钙调蛋白(CAM)RNA的水平。

[0215] 实施例11.用靶向钙调蛋白(CAM)基因的dsRNA处理后现场处理的蜜蜂蜂巢中的瓦螨侵扰的体内现场减少。

[0216] 通过将磷酸盐缓冲液中的dsRNA储备液与66%糖浆混合来制备用于抑制瓦螨所靶向的钙调蛋白(CAM)基因的表达的dsRNA。将液体制剂作为糖浆供应给蜜蜂,允许以它为食,直至完全消耗(大约2至3天)。每一现场试验组由33个蜂巢组成。诸组由未处理的蜂巢、非特异性触发剂处理的蜂巢(SEQ ID NO:5)和特异性触发剂处理的蜂巢(SEQ ID NO:3)组成。对蜜蜂进行两轮处理,每一轮由间隔两周的两次饲喂组成:在递送开始时(第0周)和两周后(第2周),然后在第13周和第15周重复。在第4周、第9周、第13周、第15周和第17周进行蜜蜂存活率评价(图7)。在用特异性触发剂(SEQ ID NO:3)处理后第9周观察到对瓦螨群的显著抑制。

[0217] 实施例12.瓦螨中靶向钙调蛋白(CAM)的触发剂的体外生物测定

[0218] 基于CAM-1与CAM-2序列之间的保守序列重叠生成了靶向钙调蛋白(CAM)-1和CAM-2的多核苷酸触发序列。这些在表7中被呈现为SEQ ID NO:3。另外,对所述多核苷酸序列进行修饰,以避免含有与非靶生物体的基因序列同一或互补的19个碱基的连续序列串。这些修饰得到了多核苷酸SEQ ID NO:90-92。

[0219] 表7.靶向CAM-1和CAM-2的触发剂

[0220]

基因靶标	SEQ ID NO	天然的还是经过修饰的
CAM-1	3	天然
CAM-1	90	4bp缺失
CAM-1	91	4bp缺失
CAM-2	92	1bp缺失

[0221] 在体外生物测定中测试多核苷酸序列抑制成体瓦螨存活力的能力。从蜜蜂群体中收集成体雌性螨,并且放在皮氏培养皿内的人工食物溶液顶上。所述人工食物含有1%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物、1%NaCl和15mg/mL琼脂的混合物。在本实施例中,对所述食物进一步补充8×最终浓度的抗霉菌溶液(100×,Sigma Aldrich)、500μg/mL卡那霉素和220U/mL制霉菌素。对所述食物/琼脂溶液进一步补充200-500μg/mL的dsRNA(SEQ ID NO:3(CAM373)、SEQ ID NO:90(CAM-1)或SEQ ID NO:92(CAM-2)),并且将所得溶液倾倒在皮氏培养皿上。还制备了盛有不含dsRNA的人工食物的皿(未处理的对照(NTC))。将十五个螨施加至每一皿,并且以一式三份进行实验。在29℃和50-60%相对湿度下孵育存在螨的食物皿。在特定的时间间隔对皿进行检查,并且对死亡的螨进行计数并移除。在置于食物上之后五天和六天时对螨进行计数以确定死亡率。

[0222] 如图8中所示,用dsRNA(SEQ ID NO:3(CAM373)、SEQ ID NO:90(CAM-1)或SEQ ID NO:92(CAM-2)处理过的螨与未接受RNA的螨相比在处理5天和6天时表现出增加的死亡

率。

[0223] 如以上所描述进行进一步体外生物测定,其中用以下项的等摩尔混合物对螨进行处理:包含SEQ ID NO:90 (CAM-1) 和SEQ ID NO:92 (CAM-2) 的dsRNA;包含SEQ ID NO:3 (CAM373) 的dsRNA;或包含SEQ ID NO:91 (CAM-1) 的dsRNA。如图9中所示,用包含SEQ ID NO:3的dsRNA、包含SEQ ID NO:91的dsRNA或者包含SEQ ID NO:90和SEQ ID NO:92的dsRNA混合物处理过的螨在第4天(D4)时表现出存活力下降。对活螨进行分子分析。从皿中取出螨,在液氮中速冻并且进行QuantiGene™分析,以评价钙调蛋白(CAM) RNA的水平。结果在图10中示出。

[0224] 实施例13. 用靶向钙调蛋白(CAM) 基因的dsRNA处理后现场处理的蜜蜂蜂巢中的瓦螨侵扰的体内现场减少。

[0225] 通过将磷酸盐缓冲液中的dsRNA储备液与66%糖浆混合来制备用于抑制瓦螨所靶向的钙调蛋白(CAM) 基因的表达的dsRNA。将液体制剂作为糖浆供应给蜜蜂,允许以它为食,直至完全消耗(大约2至3天)。每一现场试验组由40个蜂巢组成。诸组由未处理的蜂巢和特异性触发剂处理的蜂巢(SEQ ID NO:91或SEQ ID NO:94) 组成。SEQ ID NO 94与SEQ ID NO 3同一,除了在所述触发剂的5'端添加三个碱基。对蜜蜂进行两轮处理,每一轮由间隔两周的两次饲喂组成:在递送开始时(第0周) 和两周后(第2周),然后在第13周和第15周重复。剂量由每个蜂巢大约200mg触发剂组成。在第0周、第3周、第6周、第8周、第14周和第19周进行蜜蜂存活率评价(图11)。在用特异性触发剂(SEQ ID NO:91和94) 处理后第3周已经观察到对瓦螨群的显著抑制。

序列表

<110> Beeologics, Inc
Monsanto Technology LLC
Inberg, Alex
Kapoor, Mahak

<120> 用于控制节肢动物寄生虫和害虫侵扰的组合物和方法

<130> P34304W000

<160> 94

<170> PatentIn 第 3.5 版

<210> 1

<211> 450

<212> DNA

<213> 狄斯瓦螨

<400> 1

[0001]

```
atggctgatc agctaactga ggaacagatc gccgagttca aagaggcgtt tagcctgttt      60
gacaaggacg gagatggcac gatcacgaca aaggagctcg gtacggtaat gcgatctctc      120
ggccagaacc ccactgaggc tgaactgcag gacatgatca acgaggtcga cgcgcgacggc      180
tccggaacga tagatttccc tgagttcctc acaatgatgg caagaaagat gaaggacacc      240
gactcggagg aggagatccg agaggcgttc cgcgtattcg acaaggatgg caacggtttc      300
atttcggcgg ccgagctcag gcacgttaig accaaccettg gcgagaagct tacggacgag      360
gaggtagatg agatgattcg ggaggcagat attgacgggtg atggtcaggt caactacgag      420
gagttcgtca ccatgatgac gtccaagtaa                                         450
```

<210> 2

<211> 450

<212> DNA

<213> 狄斯瓦螨

<400> 2

```
atggcggatc agctgaccga ggagcaaatc gccgaattca aggaggcttt cagcctgttc      60
```

	gataaagacg gtgatggcac aattacgacc aaggaactag ggaccgtcat gcggtccctc	120
	ggccagaacc ctactgagge tgagcttcaa gacatgatca acgaggtega cgctgacggt	180
	aacggcacta ttgactttcc agagtitttc acgatgatgg cgcgtaaaat gaaggacacc	240
	gactccgagg aggagatccg ggaagctttt agggtttttg ataaagacgg aaatggcttc	300
	atttcggctg cagagctgag gcacgtaatg accaaccctg gcgaaaagct cacggacgag	360
	gaagtggacg agatgatccg cgaggcggat atcgacggcg acggacaggt caactacgag	420
	gagttcgtea cgatgatgac atcaaaatga	450
	<210> 3	
	<211> 373	
	<212> RNA	
	<213> 狄斯瓦螨	
	<400> 3	
[0002]	acagaucgcc gagucaaag aggcguuuag ccuguuugac aaggacggag auggcacgau	60
	cacgacaaag gaggucggua cgguaaugcg aucucucggc cagaacccca cugaggcuga	120
	acugcaggac augaucaacg agguccagcg cgacggcucc ggaacgauag auuucccuga	180
	guuccucaca augauggcaa gaaagaugaa ggacaccgac ucggaggagg agauccgaga	240
	ggcguuccgc guauucgaca aggauggcaa cgguuucauu ucggcggccg agcucaggca	300
	cguuaugacc aaccuuggcg agaagcuuac ggacgaggag guagaugaga ugauucggga	360
	ggcagauauu gac	373
	<210> 4	
	<211> 186	
	<212> RNA	
	<213> 狄斯瓦螨	
	<400> 4	
	acaauauggg caagaaagau gaaggacacc gacucggagg aggagaucgg agaggcguuc	60

cgcguaauucg acaaggaugg caacgguuuc auuucggcgg ccgagcucag gcacguuaug	120
accaaccuug gcgagaagcu uacggacgag gagguagaug agaugaauuc ggaggcagau	180
auugac	186
<210> 5	
<211> 274	
<212> RNA	
<213> 未知	
<400> 5	
auacuuaucg gugcuaauuu uuaucgagga ugeccaacuc cccccacuuu aaaacugcga	60
ucauacuaac gaacucccgaggagugaaa ggugucuaug uugagcuuaa uaaccuaccu	120
ugcgagcaaa gaaggacuag uugaccucgg gcaccuuaa uuguuauguu guuucgaacu	180
gaguuggcac ccaugcugca caugcaacaa acaugucggc cuucgugucu auccuagaaa	240
aguaccugug aacuuggcug ucuacaucan cauc	274
[0003]	
<210> 6	
<211> 432	
<212> DNA	
<213> 狄斯瓦螨	
<400> 6	
ctgccggagg aacaggtggc tgaatttaa gaggcctttc ttttgttga caaggacgc	60
gatggaatga ttaeggcgc ogaactagc gtcgtcatgc gatcgcttg ccagcgacct	120
acggagcaag agctcaagaa aatggttacc atggttgacc aggacggcaa tggtaaatc	180
gagttcaacg agtttttgat gatgatgtc cgcaaatga aggaggcaga ctcgaggaa	240
gaactccggg aggcgttcg tgtgttcgat cgagacggtg acggattcat ctccgggac	300
gagctcagtg tcgtcatgaa caacctcggc gagaaattaa gtgacgatga tgttgaggat	360
atgattcgag agccgatct ggacggcgat ggcaagatta actaccaaga gtttgtctc	420
attatcacct cc	432

<210> 7
 <211> 480
 <212> DNA
 <213> 肩突硬蜱

<400> 7
 atggctgac agettacaga agaacagatt gcagttcaag gaggcgttct tcgctgttcg 60
 acaaggacgg aggatggcac catcacgacc aaggagctgg gcacggtcac gcgctcgctc 120
 ggccagaacc cgacggaggc ggagctgcag gacatgatca acgaggtgga cgcagacggc 180
 aacggaacga tcgacttccc cgagttcctt acgatgatgg cgcgcaagat gaaggacacg 240
 gactctgagg aggagatccg ggaggcgctt cgggtgttcg acaaggacgg caacggcttc 300
 atctctgcgg cggagctgcg ccacgtcatg accaacctgg gcgagaagct gacggacgag 360
 gaggtggacg agatgatccg ggaggcggac atcgacgggg acgggcaggt caactacgaa 420
 ggtgggcacg ctttccctcc cttggttatc ctcttctat gctttctgca gttgtgtga 480

[0004]

<210> 8
 <211> 450
 <212> DNA
 <213> 埃及伊蚊

<400> 8
 atggccgac aacttacaga agagcagatt gccgaattca aagaagcgtt ttgctgttc 60
 gacaaagacg gtgacggcac aatcacaacc aaggaaactgg gaaccgtgat gcgacgtta 120
 ggccagaacc ccacagaagc agaactgcaa gatatgataa acgaagtcca cgcggacggc 180
 aacggcacga tcgatttccc cgaattcctg accatgatgg ctgcgaaaat gaaggacacc 240
 gatagcgaag aggaaatccg ggaggcgctt cgagtccttcg acaaggacgg caacggcttc 300
 atctcggcag ctgagctgcg tcatgtcatg accaatctcg gcgagaagct aacggacgag 360
 gaggtggatg agatgatccg cgaagccgac atagatggcg atggccaagt taattatgaa 420

	gaattcgtaa caatgatgac atcgaagtga	450
<210>	9	
<211>	450	
<212>	DNA	
<213>	致倦库蚊	
<400>	9	
	atggccgatac aacttacaga ggaacagatc gccgagttea aagaagcggt ctcgctgttc	60
	gacaaagacg gtgacggcac gatcacgacc aaggagctgg gcaccgtgat gcgacgtta	120
	ggccagaacc ccacagaagc agagctgcaa gacatgataa acgaggtcga tgcggacggc	180
	aacggcaega tcgacttccc cgagtttttc accatgatgg ctgcacaaat gaaggacacc	240
	gatagcgaag aggaaatccg ggagcggttc cgagtcttcg acaaggacgg caacggcttc	300
	atctcgggcg ccgagctgcg ccacgtcatg accaatctcg gcgagaagct caccgacgag	360
	gaggtggatg agatgatccg cgaggccgac attgacggcg atggccaagt taattatgaa	420
[0005]	gaattcgtaa caatgatgac atcgaagtga	450
<210>	10	
<211>	450	
<212>	DNA	
<213>	豌豆长管蚜	
<400>	10	
	atggctgate aactaacaga agaacagatt gccgaattca aagaggcggt ttctctattc	60
	gacaaggacg gagatggtac caccaccacc aaagaacttg gaaccgtcat gaggtcttta	120
	ggccaaaatc cgactgaagc tgaactccaa gatatgatta acgaggtcga tgctgatggc	180
	aacggcacga tagatttccc agagttcttg actatgatgg cccgcaaaat gaaggatacc	240
	gatagtgagg aagaaatcag agaggcttcc cgtgtatttg ataaggatgg aaacggcttt	300
	attagtgacg ctgagctgcg tcatgigatg actaaccttg gagaaaagct caccgatgaa	360
	gaggttgatg aaatgatcag ggaagctgac attgatgggt atggccaagt caactatgaa	420

	gagttcgtga ccatgatgac ttctaagtga	450
<210>	11	
<211>	441	
<212>	DNA	
<213>	印度跳蚁	
<400>	11	
	caactcacag aggaacagat cgcagagttt aaggaagcct tctcgtatt cgacaaagat	60
	ggcgaaggca ctataacgac taaagaattg ggtacagtea tgcgaccct gggtaaaat	120
	cccacagagg ccgagttaca agacatgatt aatgaagtag acgcagatgg taacggtaga	180
	atcgacttcc cggagttctt gaccatgatg gcacgcaaaa tgaaggatac ggacagcgag	240
	gaggagatca gggaggcctt cagagtgttc gataaggatg gaaatggttt catatccga	300
	gcggaactca gacatgttat gacaaatctg ggcgagaaac tgaccgatga ggaagtagat	360
[0006]	gaaatgatac gggaggcaga tatcgacggc gatggccaag tgaattatga agaatttgtg	420
	acgatgatga catcaaagtg a	441
<210>	12	
<211>	459	
<212>	DNA	
<213>	人体虱	
<400>	12	
	atggtttctt tttttttgcg agctgatcag ttgaccgaag aacaaattgc cgaattcaag	60
	gaagcatttt ccttatfca caaagatgga gatggtacca taacaactaa ggaattgggt	120
	acggttatga gateactcgg tcagaatccc acagaagcag aattacaaga tatgattaat	180
	gaagtggatg cagatggtaa tggtagcatc gattttcccg agttcctcac catgatggct	240
	agaaaaatga aggatacaga cagcgaagaa gaaattagag aagcattcag agttttcgat	300
	aaggatggta atggttttat atcggcagcc gagctaagga acgtcatgac gaacctgggt	360

	gaaaaattaa cagacgaaga agtggatgaa atgattcgag aggctgatat cgacggagat	420
	ggacaagtga attacgaaga atttgtggaa aacttgtga	459
	<210> 13	
	<211> 459	
	<212> DNA	
	<213> 冈比亚按蚊	
	<400> 13	
	atggccgac aacttacgga agaacagac gctgaattca aagaagcgtt ctcgtgttc	60
	gacaaggacg gcgatggcac aatcaccacc aaggaattag gcaccgtgat gcatcgcga	120
	ggccagaacc ccacagaagc tgaattgcaa gacatgatca acgaagtcga cgcggacggt	180
	aacggcacga tcgatttccc cgagtttcta acaatgatgg ctcgtaaaat gaaggacacg	240
	gacagtgaag aggaaatccg ggaggcattc cgagtcttcg acaaggacgg caacggtttt	300
	atctctgcag ctgagctgcg ccacgtcatg actaatctgg gcgagaagct aacagacgag	360
[0007]	gaggtcgacg agatgatecg tgaagccgat atagatggcg atggccaggt taattatgaa	420
	ggtaagagtt gccttttcg cccacaccaa gcattgttt	459
	<210> 14	
	<211> 501	
	<212> DNA	
	<213> 红火蚁	
	<400> 14	
	atgateggca cgataacgac gagaaattcc attatttcag aattcaaaga ggcatttatg	60
	cttttcgaca aggacgaaga tggcacgatt acgatggcgg aattaggggt tgtcatgcgg	120
	tctctcggtc aaagaccgtc ggagacggaa ctgcgcgata tggatgaatga ggtagatcaa	180
	gatggaaatg gtaccatcga gtttaacgaa tttctgcaga tgatgtcgaa gaagatgaaa	240
	agcgcgcacg gagaggacga acttcgcgag gcgttccgag tgttcgataa gaacaacgat	300
	ggcttaatat cttegaaga gttgcgacac gtaatgacga atcttgggtga aaagctctct	360

	gaggaggagg tcgatgatat gattaaggag gcggatctag atggcgacgg aatggtcaac	420
	tacgaaggta acattttgtt ttgcctagat gtttatteta taatagattt agaatttatt	480
	ctaagcgata tagatgaatt g	501
<210>	15	
<211>	364	
<212>	RNA	
<213>	肩突硬蜱	
<400>	15	
	aguucaagga ggcuuucuuu gcuguucgac aaggacggag gauggcacca uacgaccaa	60
	ggagcugggc acggucaugc gcucgcucgg ccagaacccg acggaggcgg agcugcagga	120
	caugaucaac gagguggacg cagacggcaa cggaacgauc gacuuecccg aguuccuuac	180
	gaugauggcg cgcaaugauga aggacacgga cucugaggag gagaucggg aggcguuccg	240
[0008]	gguguucgac aaggacggca acggcuucau cucugcggcg gacugcgcc acgucaugac	300
	caaccugggc gagaagcuga cggacgagga gguggacgag augauccggg aggcggacau	360
	cgac	364
<210>	16	
<211>	372	
<212>	RNA	
<213>	埃及伊蚊	
<400>	16	
	gcagauugcc gaaucaaaag aagcguuuu gcuguucgac aaagacggug acggcacaau	60
	cacaaccaag gaacugggaa ccgugaugcg aucguuagcg cagaacccca cagaagcaga	120
	acugcaagau augauaaacg aagucgacgc ggacggcaac ggcacgaucg auuuecccg	180
	auuccugacc augauggcuc gcaaaaugaa ggacaccgau agcgaagagg aaauccggga	240
	ggcguuccga gucuucgaca aggacggcaa cggcuucau ucggcagcug agcugcguca	300

	ugucaugacc aaucucggcg agaagcuaac ggacgaggag guggaugaga ugauccgca	360
	agccgacaua ga	372
	<210> 17	
	<211> 373	
	<212> RNA	
	<213> 致倦库蚊	
	<400> 17	
	acagaucgcc gaguucaaag aagcguucuc gcuguucgac aaagacggug acggcacgau	60
	cacgaccaag ggcugggca ccgugaugcg aucguuagge cagaaccca cagaagcaga	120
	gcugcaagac augauaaacg aggucgaugc ggacggcaac ggcacgaucg acuuccccga	180
	guuucucacc augauggcuc gcaaaaugaa ggacaccgau agcgaagagg aaauccggga	240
	ggcguuccga gucuucgaca aggaaggcaa cgguucauc ucggcgccg agcugcgca	300
	cgucaugacc aaucucggcg agaagcucac ggacgaggag guggaugaga ugauccgca	360
[0009]	ggccgacauu gac	373
	<210> 18	
	<211> 372	
	<212> RNA	
	<213> 豌豆长管蚜	
	<400> 18	
	acagaugccc gaauucaazag aggcguuuuc gcuaauugac aaggacggag augguaccuu	60
	caccacccaaa gaacuuggaa ccgucaugag gucuuuagge caaaauccga cugaagcuga	120
	acuccaagau augauuaacg aggucgaugc ugauggcaac ggcacgauag auuucccaga	180
	guucuugacu augauggccc gcaaaaugaa ggauaccgau agugaggaag aaucagaga	240
	ggcuuuccgu guauuugaua aggauggaaa cgguuuuuu agugcagcug agcugcgua	300
	ugugaugacu aaccuuggag aaaagcucac cgaugaagag guugaugaaa ugaucaggga	360
	agcugacauu ga	372

<210>	19	
<211>	373	
<212>	RNA	
<213>	印度跳蚁	
<400>	19	
acagaucgea gaguuuaagg aagecuucuc gcuaauucgac aaagauggcg auggcacua	60	
aacgacuaaa gaauugggua cagucaugcg auccuggggu caaaauecca cagaggccga	120	
guuacaagac augauuaug aaguagacgc agaugguaac gguacaaucg acuuuccgga	180	
guucuuagacc augauggcac gcaaaaugaa ggauacggac agcgaggagg agaucaggga	240	
ggccuucaga guguuugaua aggauggaaa ugguuucaua uccgcagcgg aacucagaca	300	
uguuuagaca aaucugggcg agaaacugac cgaugaggaa guagaugaaa ugauacggga	360	
ggcagauauc gac	373	

[0010]	<210>	20	
	<211>	373	
	<212>	RNA	
	<213>	人体虱	
	<400>	20	
	acaaaugcc gaauucaagg aagcauuuuc cuuauucgac aaagauggcg augguacc	60	
	aacaacuaag gaauugggua cgguuaugag aucacucggg cagaauccca cagaagcaga	120	
	auuacaagau augauuaug aaguggaugc agaugguaau gguaccaucg auuuuccgga	180	
	guuccucacc augauggcua gaaaaaugaa ggauacagac agcgaagaag aaauuagaga	240	
	agcauucaga guuuucgaua aggaugguaa ugguuuuaua uccgcagccg agcuaaggca	300	
	cgucaugacg aaccugggug aaaaauuac agacgaagaa guggaugaaa ugauucgaga	360	
	ggcugauauc gac	373	
	<210>	21	

	<211> 372	
	<212> RNA	
	<213> 冈比亚按蚊	
	<400> 21	
	acagaucgcu gaauucaaaag aagcguucuc gcuguucgac aaggaeggcg auggcacaa	60
	caccaccaag gaauuaggca ccgugaugcg aucgcuaggc cagaacccca cagaagcuga	120
	auugcaagac augaucaacg aagucgacgc ggacgguaac ggcacgaucg auuuccccga	180
	guuucuaaca augauggcuc guaaaaugaa ggacacggac agugaagagg aaauccggga	240
	ggcauuccga gucuucgaca aggacggcaa cgguuuuuuc ucugcagcug agcugcgcca	300
	cgucaugacu aaucugggcg agaagcuaac agacgaggag gucgacgaga ugauccguga	360
	agccgauuaa ga	372
[0011]	<210> 22	
	<211> 364	
	<212> RNA	
	<213> 红火蚁	
	<400> 22	
	cagaauuca aagaggcauuu augcuuuucg acaaggacga agauggcacg auuacgaugg	60
	cggaauuagg gguugucaug cggucucucg gucaaagacc gucggagacg gaacugcgcg	120
	auauggugaa ugagguagau caagauggaa augguaccan cgaguuaac gaauuucugc	180
	agaugauguc gaagaagau aaagcgccg acggagagga cgaacuucg gagcgguucc	240
	gaguguucga uaagaacaac gauggcuuua uaucuucgaa agaguugcga cacguaauga	300
	cgaauucugg ugaagagcuc ucugaggagg agguccauga uaugauuaag gaggcggauc	360
	uaga	364
	<210> 23	
	<211> 373	
	<212> RNA	
	<213> 狄斯瓦蜥	

	<400> 23	
	acagguggcu gaauuuuaag aggccuuucu uuuguugac aaggacgccg auggaugau	60
	uacggcggcc gaacuaggcg ucguaugcg aucguuggc cagcgaccua cggagcaaga	120
	gcucaagaaa augguuaeca ugguugacca ggacggcaau gguacaaucg aguucaacga	180
	guuuuugaug augaugucuc gcaaugaa ggagcgagac ucggaggaag aacuccggga	240
	ggcguuccgu guguucgauc gagacgguga cggauucauc ucgcgggacg agcucagugu	300
	cgucaugaac aaccucggcg agaaauaag ugacgaugau guugaggaua uguuucgaga	360
	ggccgaucug gac	373
	<210> 24	
	<211> 627	
	<212> DNA	
	<213> 二斑叶螨	
[0012]	<400> 24	
	attcatcaga tttaaaatta ttcaccttgt acctgaatta aaacaatagt attatataag	60
	atggctgacc agctaactga agagcaaatt gctgaattta aggaggcctt ttcattgttt	120
	gataaagatg gtgatgttac aattaccacc aaggaattgg gaactgttat gagaagtcta	180
	ggtcaaaatc caacagaagc ggaattacaa gatatgatca atgaagtiga tgccgatggt	240
	aatggtacta ttgattttcc tgaattcttg actatgatgg ctagaaaaat gaaggataca	300
	gactcagagg aggaaatccg tgaagcttc cgtgtttttg ataaagatgg taatggtttt	360
	attictgctg ctgaattgag acatgtaatg accaatttgg gtgaaaaatt gaccgacgaa	420
	gaagtagatg aaatgattcg tgaagccgat attgacggtg atggtaagt taattatgaa	480
	gaatttgtaa cgatgatgac atccaaatga ataaaagcac aaggtaatt gticatttta	540
	attagatcca atggatccca tcagtacag ggataaaaat taatcaataa aagatgaaaa	600
	gcaaaaaata catggaagct atcatca	627

	<210>	25	
	<211>	372	
	<212>	RNA	
	<213>	二斑叶螨	
	<400>	25	
	caaauugcug	aauuuaagga	ggccuuuucā uuguuuugaua aagaugguga ugguacaauu 60
	accaccaagg	aauugggaac	uguuauagaga agucuagguc aaaauccaac agaagcggaa 120
	uuacaagaua	ugaucāauga	aguugaugcc gaugguaaug guacuaauuga uuuuccugaa 180
	uuuugacua	ugauggcuag	aaaaaugaag gauacagacu cagaggagga aauccgugaa 240
	gcuuuccgug	uuuuugauaa	agaugguaau gguuuuauuu cugcugcuga auugagacau 300
	guaaugacca	auuuggguga	aaaauugacc gacgaagaag uagaugaaau gauucgugaa 360
	gccgauauug	ac	372
[0013]	<210>	26	
	<211>	1114	
	<212>	DNA	
	<213>	狄斯瓦螨	
	<220>		
	<221>	unsure	
	<222>	(1).. (1114)	
	<223>	在所有 n 个位置上都不确定	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1100).. (1110)	
	<223>	n 为 a、c、g 或 t	
	<400>	26	
	ggctcgtaca	ccgagagaga	acggtggact ccattgctgt cctgagtgcg ttctctcgtcg 60
	gctgtgtcgt	attgcgtgtc	tgtcegtget ttctgtgcaca taagttttct ttccacattg 120
	gagatattgt	gaatagtatc	ctttgtgttt agtgcctgaa caafatttga aatcgtcgaa 180

	cgtatcaaga cataaaaacg agccaaaatg gctgatcaac ttacggaaga acaaategca	240
	gaattttaagg aageattttc actatttgat aaagatggag atggtaccat cacaactaaa	300
	gagttgggta cagttatgcg atcactaggt caaaatecca cagaagetga gcttcaggat	360
	atgattaatg aagttgatgc agatggtaat ggcacaatcg attttcegga attcttaact	420
	atgatggctc gtaaaaatgaa agatactgat agtgaggaag aaattaggga ggcttcaga	480
	gtatttgata aggatggaaa tggtttcata tccgcagcag aactcagaca tgttatgaca	540
	aatcttggcg agaaactcac tgatgaagaa gttgatgaaa tgattcggga ggctgacatt	600
	gatggtgatg gccaaagttaa ttatgaagaa ttctgcacaa tgatgacatc aaagtgaatg	660
	caacctgtgt aatggaaaaa cttgcaactt ggagtgggtg tgacgtatta agataaatca	720
	agaaacaaag aaaaatataa tgtaacaaa aaacgaatcg accagaaagt gaaaaaaatc	780
	ttgtatctgg acgcaaagat gtctataaaa cgcgaaaaat taacgtccaa cagcgttaa	840
[0014]	tcatcattaa cgataagtaa tacagggcaa ttgtttaatt aaaagagtta taccactaaa	900
	aatcattatc tctaaataca caaaacttaa ttacacaaca tgaacataaa aatacatatt	960
	actcgcgcac atacatgaat acaaaaaaat atacagcaca cagaaatacc atctacataa	1020
	aagataattt atttccgtat taaaaagtat ataattaaaa aatgttagag atatatatat	1080
	ataatatata tatatatatn nnnnnnnnnn gtaa	1114
<210>	27	
<211>	372	
<212>	RNA	
<213>	狄斯瓦螨	
<400>	27	
	acaaaucgca gaauuaagg aagcauuuuc acuaauugau aaagauggag augguaccan	60
	cacaacuaaa gaguugggua caguuaugcg aucacuaggu caaaauccea cagaagcuga	120
	gcuucaggau augauuaug aaguugaugc agaugguaau ggcacaaucg auuuuucgga	180

	auucuuaacu augauggcuc guaaaaugaa agauacugau agugaggaag aaaauaggga	240
	ggccuucaga guauuugaua aggauggaaa ugguuucuaa uccgcagcag aacucagaca	300
	uguuuagaca aaucuuggcg agaaacucac ugaugaagaa guugaugaaa uguuucggga	360
	ggcugacauu ga	372
	<210> 28	
	<211> 822	
	<212> DNA	
	<213> 狄斯瓦螨	
	<400> 28	
	tttttttttt ttttgaaga aatcgtatca tcgaacateg gatcgaattt cgatecacga	60
	cgetcgaatt acatgcaacg aagtgaatgt cagagggggg ggggcagggg aaaagtatgc	120
	gacgaacgig tacgtccgtc gtcgctggc tcgtcgttaa ttcttctat ctaacacaga	180
	cacgagaata agtaagatec tagtagcccg gggacagcac ctctctctcc tegtctctct	240
[0015]	cgctcgtcgtc gatccccggc tctccgagcg cgtggacgaa ttcttagaaa tcgatacggc	300
	egtctccgtc cactgcaact tcttgatac tatctctgat ctctctctcc gacaagtcct	360
	cgcgagaca ttgcagcaact gccctcaaat cggatgcggg gatgtatcct cgatttgtgt	420
	tatcgaatac ccggaacgca tccctcagct cctgtctctc ctgacccga tccgtggggg	480
	cggtttcatt cgcacctatg ttgtcacga ttccacgaa ctcttcgaag ctgacatttc	540
	catccccgtc gatgtcgatc tctgcaaca tgggtgcgcag ctctcggcc ctgcgaatt	600
	gccccaacga ggcatacacc ctcccgagct cctcctctgt gatgtcccg tccccgtcct	660
	tgctgaacag tctgaacgt tccctgaatt ctttcatttg agatttgat atattgctcg	720
	gtatcttggt ggacgactca gaggcggatt ttttcggcga cgcaggtaag gagaagagga	780
	cgttggtcga caatttgccg gccctcgtgg acgaggagge cg	822
	<210> 29	

	<211> 300	
	<212> RNA	
	<213> 狄斯瓦螨	
	<400> 29	
	aacguguaag uccgucgucc gcuggcuegu eguaauueg uucuaucuaa cacagacacg	60
	agaauaagua agauecuagu agcccgggga cagcaccucc uccuecucgu ccuccucguc	120
	gucgucgauc cccggcucuc cgagegcgug gacgaauueg uagaaaucga uacggccguc	180
	uccguccacg uccacuuecu ugaucuaauc cuegaucucu ucuuecgaca aguccucgcc	240
	gagacaaugc agcacugccc ucaaaucgga ugcggugaug uauccucgau uguguuuauc	300
	<210> 30	
	<211> 2577	
	<212> DNA	
	<213> 狄斯瓦螨	
	<400> 30	
[0016]	ctgctgctgc tgctgctgct gctgctgccg tgttaagaac tagacaaagg caacaaccgg	60
	aagacatctg ttaggccagt tgggtgaagg gaaataaact cgcaacaag agctactgtt	120
	gcaaaagcta tctgttctga gtectagact agactgggat cgactaaca ctctgcaggc	180
	cgtggaccac tatcaactgaa caacgccga ggaccgagcg attgagaagt tggccgcggc	240
	tgggacgctc tggctcactt gatctgatta ctacttacac caggtcaatt taaccaagcc	300
	gttgaaccac tctacatgg aaacacacat ctacactctc atccaattgt gtacacgcga	360
	agcaaacgac aacggtatta gcagegacac taacaaaaac gaatctgcca gaaaccgagt	420
	aacgctgatt tctgcagcgg cgttctacg aacttaccac agacccggtc ggcacaatag	480
	tttgaaggtt agcatcggcc cgtgaactat agtgaaagga actgagcgaa atactatagt	540
	tgttgaacag caggettcaa agtaagaag tgaafattct tatggtgaca acaaattttg	600
	tctglagigg tcaagacct acitcaalgaa glgagaagcg aaticatag lgctcagtta	660
	tagcagttgt ttgtcgtaat gccgceaata tacgacgtct gtgtgtctcg atactggeg	720

	atctgactga ttccgatcgg tgtcattgat ctgcaaagcc aattgttttc tttaacgtccc	780
	ggatagagea aacgatcatg gcaacggaaa catttgccct gccggaggaa caggtggctg	840
	aatttaaaga ggcctttctt ttgtttgaca aggacgccga tggaatgatt acggccgccg	900
	aactaggegt cgtcatgcca tcgcttgccc agcgacctac ggagcaagag ctcaagaaaa	960
	tggttaccat ggttgaccag gacggcaatg gtacaatcga gttaacagag tttttgatga	1020
	tgatgtctcg caagatgaag gaggcagact cggaggaaga actccgggag gcgttcctg	1080
	tgttcgateg agacggtagc ggattcatct cgggggacga gctcagtgtc gtcatgaaca	1140
	acctcggcga gaaattaagt gacgatgatg ttgaggatat gattcgagag gccgatctgg	1200
	acggcgatgg caagattaac taccaagagt ttgtgtcat taccacctcc gccaaagtagg	1260
	ccttgaggtt gctcgcgcac acacatgcta ttctcttgt cctacacgac aaacactata	1320
	cacgttaciaa tacggaaaaa tgaataaaaa gcacagtcac acctattcat tcattcacag	1380
[0017]	aggatcactg gcgtgtctc attaatatgg ctgacaaata ctattgattt gtctcgactg	1440
	agctatcagg cacacgeata ttgtctgttc cgatacgtgc aataataggt aaagtgggtg	1500
	tagcttgagc accttacggt ttacatttat tccgtattaa cggtagtatg tctcaatagt	1560
	catgtcgcag cattagccag ctaacattaa atttagttga tttttatttt atttttttac	1620
	acaacaagaa ttatcttact atttggaag ctgactgcga gtagtaaaat taccctagta	1680
	aaaaaaaaag gctttaaaaa cgatttaaca aaggtgcgtc catttaaaaa agtatgacac	1740
	aagctaattg gttcgatcgc ggtcggttgc attcgcccag ttigtgagac gcgaaattta	1800
	ccagcagccg tcaacaacga tggaataatt atatattaaa tataaataat aaaatatctg	1860
	ttacacattc taigtgaata aagttataca tatatatata catacaacag caatgatata	1920
	tatgatgata cgtatactat atagaagtat ccaatgatat aggataatgg gaaattctgg	1980
	aaaggagaaa acatatctct ctttcataat taatgaatta tcatcgagca cctcaagaat	2040

	ttgcttagac atattacaaa aaaaaaatta attcactata tataaataat cgcaattaat	2100
	caaaaaaaaa atacggtcac ttaiggeata ccttaggita ataaacttea taaaggtacc	2160
	tatataatata tcttttttac tgctcttta atcgtcatta tacatagtga cgattaaaga	2220
	gagagagtaa aaaagaggtc aaaataaaag acttgaagtc gattgagggtt aatttttatt	2280
	ctagggtata tgtgttttag cggatttata gigtgctcgt tgtaaaagtt gacgtaagga	2340
	gttgaaacgc ggagagcagt ataacagtaa aatggagagg aagttagaa gttaggaaat	2400
	aaatgatttg ctactaattg gaaattacaa aaatgaccat ttaaagaact tatcattaga	2460
	attttaatat ctgccacact gaaccgtttt gtcattatft cgaccatage gattttcaca	2520
	cagttgtctc acgtttgagg ccttategtt taaaggctaa cggaaatttc tctaaag	2577
[0018]	<210> 31	
	<211> 373	
	<212> RNA	
	<213> 狄斯瓦螨	
	<400> 31	
	acagguggeu gaauuuaaag aggecuuucu uuuguugac aaggacgccg auggaaugau	60
	uacggcgccc gaacuaggcg ucgucaugcg aucgcuuggc cagcgaccua cggagcaaga	120
	gcucaagaaa augguuacca ugguugacca ggacggcaau gguacaaucg aguucaacga	180
	guuuuugaug augaugucuc gcaagaugaa ggaggcagac ucggaggaag aacuccggga	240
	ggcguuccgu guguucauc gagacgguga cggauucauc ucgcgggacg agcucagugu	300
	cgucaugaac aaccucggcg agaaauaaag ugacgaugau guugaggaua ugauucgaga	360
	ggccgaucug gac	373
[0018]	<210> 32	
	<211> 693	
	<212> DNA	
	<213> 狄斯瓦螨	

<400> 32	
cgccctctata cagtgaaaaa gtcggataag gttatgttac tcagtaactt aaccttatct	60
tggataacgt tatttgacac gtaaacgaaa agtaataaca aagttttgta ttatggctcg	120
ttattttcga gaggaagata tagatgaatt cagggaatgt ttttatctat tigcaaggaa	180
tggtc aaata cgtactttgg atgagcttac aatcattatg agatcattag gattaagtcc	240
aactattgca gaattaaata aatatttgaa agataaaggt ggaaaaatgt cttttgccga	300
tttcttggaa gttatgcate tacaaactag agctgaagat ttaccaaaag aagtgataga	360
tgcttttcaa gctgcagata aatttaggac tggcactata ccagctagac agtttagcgca	420
tatgttactc cactgggggtg aacaattaaag taacaaagaa gtggagcaaa ttttcagaga	480
ggcaaatgtg tctccaaatg gacaagtaaa gtacgaagat tttgttaaaa tagcttgtgc	540
acctgtacct gattactatt aaaataaata tttttcatai tttttaaaga tatttatata	600
[0019] ctttttacac aatacacacg tatttaatta ataaaaggat aaaaatgatc ataaaagaaa	660
aagaatttat tcttccagca acttatcttc gac	693
<210> 33	
<211> 315	
<212> RNA	
<213> 狄斯瓦螨	
<400> 33	
augcuuuuca agcugcagau aaauuuagga cuggcacuau accagcuaga caguuagcgc	60
auauguuacu ccacuggggg gaacaauuaa guaacaaaga aguggagcaa auuuucagag	120
aggcaaaugu gucucaaaau ggacaaguua aguacgaaga uuuuguuaaa auagcuugug	180
caccuguacc ugauuacuau uaaaauaaa auuuuucaua uuuuuuaag auauuuauau	240
acuuuuuaca caauacacac guauuuuuuu aaauaaaagga uaaaaaugau cauaaaagaa	300
aaagaauuuu uucuu	315

<210> 34
 <211> 612
 <212> DNA
 <213> 狄斯瓦鳞

<400> 34
 cgtttttttta atttcaaaga ctcttgattt tcttttcttt tcctttectt caaacccaaac 60
 acaagctaga aagagggttcg atttttgcag gaagaagaag gaacaatggc tgatcagctc 120
 accgatgacc agatctctga gtttaaggaa gccttcagcc tcttcgataa ggatggagat 180
 ggttgtatca ccaccaagga gcttggaact gtgatgaggt ctcttggeca gaaceccact 240
 gaggcagagc tccaggacat gatcaacgag gtggatgctg atggcaatgg aacaattgac 300
 ttctctgagt tcttaaacct catggccagg aagatgaagg ataactgattc tgaggaggag 360
 ctcaaggaag ctttcgcgt gtttgacaag gaccagaatg gcttcatttc tgcggtgag 420
 ctccgccatg ttatgacgaa tcttggtgag aagctcacag acgaggaagt tgatgagatg 480
 [0020] atccgtgagg ctgatgtaga tggtagcggc cagattaact acgaggagtt tgtcaaagtc 540
 atgatggcca agtgaggatc attaaccaaa ccttaaaatt tegaaageat aaacatttaa 600
 aaaaaaaaaa aa 612

<210> 35
 <211> 371
 <212> RNA
 <213> 狄斯瓦鳞

<400> 35
 cagaucucug aguuaaagga agccuucagc cucuucgaua aggauggaga ugguuguauc 60
 accaccaagg agcuuggaac ugugaugagg ucucuuggcc agaaccaccac ugaggcagag 120
 cuccaggaca ugaucaacga gguggaugcu gauggcaaug gaacaauga cuuuccugag 180
 uuuuuaaacc ucauggccag gaagaugaag gauacugauu cugaggagga gcucaaggaa 240
 guuuuccgcg uguuugacaa ggaccagaau ggcuucauuu cugcggcuga geucegccau 300

	guuauagacga aucuugguga gaagcucaca gacgaggaag uugaugagau gauecgugag	360
	gcugauguag a	371
	<210> 36	
	<211> 659	
	<212> DNA	
	<213> 肩突硬蜱	
	<400> 36	
	acaccgcgct cgacgagAAC tcgcgcaagg agcgcgtgct aacgccgata gctctcgtaC	60
	aaaagaaaac taaagaattg acacgcTcaa taccgatctt tcacattttc agcaaaattt	120
	gagcattccg aatatggacc tgactccgga agagatcgcg gacateaaagg gagcgittct	180
	gctgtttgac cgcaacggcg acggaaccat ctccaagact gagctagaga tggtcctccg	240
	cgccatgggc gaacggecca gtcttccca getggcccg atagtgcggc aaattgacag	300
	cgaccgcaat ggaagcatcg acttccaaga gtttctcttt ttcattggcg gcaggatttc	360
[0021]	ccacaaaggc ctctccaaaa gcgcagtcct caaggccttc caactcttcg acgcgatgg	420
	caatggatac atcaccaggg aggaactcgt ccacattttc acgcacgttg ggcagagcat	480
	gagccaagaa gacgccgaaa agataatccg cgaagtggat gtggacaagg acggaagat	540
	ccattacact gaattggtea acaaggtgct gccaccaag aagcaaaaag aagaaaccaa	600
	aacctagaag gtctcgtctt ggcacgtctt ttattattaa acaagtgtt tatcgttg	659
	<210> 37	
	<211> 374	
	<212> RNA	
	<213> 肩突硬蜱	
	<400> 37	
	agaucgcgga caucaaggga gcguuucugc uguuugaccg caacggcgac ggaaccaucu	60
	ccacgacuga gcuaagagau guccucccg ccaugggcga acggcccagu ccuucccagc	120
	uggcccgauu agugcggcaa auugacagcg accgcaaugg aagcaucgac uuccaagagu	180

	uuucuuuuuu cauggccggc aggaauuucc acaaaggccu cuccaaaagc gcaguccuca	240
	aggccuuucca acucuucgac cgcgauggca auggauacau caccagggag gaacucgucc	300
	acauuuuac gcacguuggg cagagcauga gccaaaga cgcgaaaag auaauccg	360
	aaguggaugu ggac	374
	<210> 38	
	<211> 549	
	<212> DNA	
	<213> 肩突硬蜱	
	<400> 38	
	gattcgteca ettatittgt cctattctt cgtccgcagt cgtectcgag gaaaagtgcg	60
	tcaggtgcgg gctacaagcg gaaactgagc ggaaagccag aaccgagcga ggagcagaag	120
	aatgacatga aggaagcgtt cagtctcttc gateccagtg gcacgggctt catggagtct	180
[0022]	aaagatatga agtttgcaat gagagcactg ggttttgaac caaaaaagga ggaagtgaaa	240
	aaactgatag cagagattga caagcagggg actggaaaaa ttcccttgga ggagttcatg	300
	agcgtcatgt ccacgagcgt ggetgagaaa gacataaatg aggagattat gaaggcggtt	360
	cagctgtttg atgaggatgg cactgggaag atttcttita agaacctcaa gaatgtggcc	420
	aaggaactgt cggagaacct cacagatgag gagcttcagg aaatgatcaa tgaagctgac	480
	agggatggag atggcgaagt gaaccaagag gagttcctta ggataatgaa gaagacctgc	540
	ctctactga	549
	<210> 39	
	<211> 373	
	<212> RNA	
	<213> 肩突硬蜱	
	<400> 39	
	ugaaggaagc guucagucuc uucgauccea guggcacggg cuucauggag ucuaaagaua	60

	ugaaguuugc aaugagagca cuggguuuug aaccacaaaaa ggaggaagug aaaaaacuga	120
	uagcagagau ugacaagcag gggacuggaa aaauuccuu ggaggaguuc augageguca	180
	uguccacgag gcuggcugag aaagacauaa augaggagau uaugaaggcg uuucagcugu	240
	uugaugagga uggcacuggg aagauuucu uuaagaaccu caagaaugug gccaaaggaac	300
	ugucggagaa ccucacagau gaggagcuuc aggaaaugau caaugaagcu gacagggaug	360
	gagauggcga agu	373
	<210> 40	
	<211> 234	
	<212> DNA	
	<213> 肩突硬蜱	
	<400> 40	
	atggccaaga acgtccgcgc cctggacacc gaggaggaga ttttggagge cttcaaagtc	60
[0023]	ttcgaccgca acggcgacgg ctctgtgagc acagecgagc tccgtcacgt gatgaccacg	120
	ttaggcgaga agttgacgca cgaagaagtg gacgagatga tccgcgagge cgaccgcgac	180
	ggcgacggac agatcaacta cgacgagttc gtggccatga tgacttccaa gtga	234
	<210> 41	
	<211> 213	
	<212> DNA	
	<213> 肩突硬蜱	
	<400> 41	
	cctggaaccg aggaggagat tctggaggec ttcaaagtct tcgaccgcaa cggcgacggc	60
	ttcgtgagca cggccgagct ccgtcacgtg atgaccacgc taggcgagaa gttgacgcac	120
	gaagaagtgg acgagatgat ccgcgaggec gaccgtgacg gcgacggaca gatcaactac	180
	gacgagttcg tggccatgat gacctccaag tga	213
	<210> 42	
	<211> 200	

<212> RNA

<213> 肩突硬蜱

<400> 42

gaggaggaga uucuggaggc cuucaaaguc uucgaccgca acggcgacgg cuucgugagc 60

acggccgagc uccgucacgu gaugaccacg cuaggcgaga aguugacgca cgaagaagug 120

gacgagauga ucccgagaggc cgaccgugac ggcgacggac agaucaacua cgacgaguuc 180

guggccauga ugaccuccaa 200

<210> 43

<211> 450

<212> DNA

<213> 埃及伊蚊

<400> 43

atgtccgccc atagtetaac agaggaacaa gggcgccagt tccgtcagat gttegagatg 60

ttcgacaaaa atggcgacgg ttcgatcagc acatcggaac tgggateggt cattcgggcc 120

ttgggtatga atccctccat tgcggaaatc gagcaaatga tccacgaggt cgatttggac 180

ggaagtgggt cgattgagtt gaacgaattt ctcatactga tggcacgtaa gtcacgggag 240

ggttccacac aggaagagct acgggatgcg ttcaaaattt ttgacaagga tggagatgga 300

tttctcacgg ttgacgagtt gtcggctggt atgaagaact ttggcgagag attgaccgat 360

gacgaactag cagatctgct ggaggaagcc gacategatg gagacgaaa gatcaactat 420

gaagaatttg tcatcatggt gagcaagtga 450

[0024]

<210> 44

<211> 300

<212> RNA

<213> 埃及伊蚊

<400> 44

acagaggaac aagggcgcca guuccgucag auguucgaga uguucgacaa aaauggcgac 60

gguucgauca gcacaucgga acugggaucg gucauucggg ccuuggguau gaauccucc 120

	auugcggaau ucgagcaau gauccacgag gucgauuugg acggaagugg gucgauugag	180
	uugaacgaau uucucauacu gauggcacgu aagucacggg agggauccac acaggaagag	240
	cuacgggaug cguucaaaaau uuuugacaag gauggagaug gauuucucac gguugacgag	300
<210>	45	
<211>	465	
<212>	DNA	
<213>	埃及伊蚊	
<400>	45	
	atgtccgecc aaaccccgec agacaagctt tcccaggatc aaatcgaaga actgcgggaa	60
	gctttctccc tgttcgacac caacggcgac ggaaccataa cctgttcaga acttggcaca	120
	gtccttcgat cccttgcaa aaatgtatcc gacgcggaag tgaagaact gctcaaagaa	180
	gtcaacgtcg accacgaagg aatgatccac ttccggact tcgtggcaat gatgtccatc	240
[0025]	cgattgcggg acttcaatag cgaggaggaa ctaaggaag ccttcggat ctccgaccgc	300
	aacggagatg ggctgatttc ggccgacgaa ttgcgagcgg ctctccaatc ttccggggaa	360
	cagctggccg aggaggaaat cgaagaactg ctccgggagg cggatgtcaa ctgcgacgga	420
	caaatagaact acgaggagtt tgttaaaatg atcacgctga aataa	465
<210>	46	
<211>	300	
<212>	RNA	
<213>	埃及伊蚊	
<400>	46	
	caaaucgaag aacugcgga agcuuucucc cuguucgaca ccaacggcga cggaaccaua	60
	accuguucag aacuuggcac aguccuucga ucccuuggca aaaauguauc cgacgcggaa	120
	guggaagaac ugcucaaaga agucaacguc gaccacgaag gaaugaacca cuuuccggac	180
	uucguggcaa ugauguccau ccgauugcgg gacuucaua gcgaggagga acucaaggaa	240

	gccuuuccgga ucuucgaccg caacggagau gggcugauuu cggcggacga auugegagcg	300
<210>	47	
<211>	1150	
<212>	DNA	
<213>	埃及伊蚊	
<400>	47	
	tcgtcaagga tatccggcaa ctgattatga cccggcaaac caacgatecc aacggccagc	60
	aacaggaaca gaacgaacca gaatccagtc agaacacca gagegaccaa agcaacaacc	120
	ageccacgca gegattggga ggaaccacct cggacttcag tgtcagctcc gcggccaacta	180
	atcgaagtat gcccggccac caggaggaca atcccaatca accggccagc gactgttcca	240
	gcctcgaggg aaatgtattc gtcgaggcg gatecggcac cggagcgcac ccgaaaacac	300
	gcegetcgca aacttcgat tcatcaact ccagcaactt caactacagt ctcaaccgga	360
[0026]	ggttcataac gaagaaccag atgaaggagt ttcgagaagc gtcccggtg ttcgacaagg	420
	ataatgacgg ctcaatcacc aaggagaac tgggaactgt catgaggctg ttgggacaat	480
	ttgctcgctt ggaagaatta caagagatgt tactggagat tgatgttgat ggcatggaa	540
	acglaagttt cgaagagttt gtcgacatca tgccaacat gacggatacc gtggcggaaa	600
	catcgccgca ccaggaggaa cgtgagctac gtgatgcctt cgtgtcttc gacaagcaca	660
	atcgagggtt cattacggca tcagatctac gggcggttct tcaatgtctg ggccaagatt	720
	tggatgaaga agaaattgaa gacatgatca aagaagtgga cgtggatgga gacggacgga	780
	tcgatttcta cgaattcgta catgctcttg gagaaccgga agattcccaa gaaaacgacg	840
	acgaagacga ggcagtgtcc cccattcgc tgcctgtga cgtgcatgtc taagaaccgc	900
	caggagaaaa atagctaacg ccaacgaatc gcattcctaa caaatgtcg aacaatctag	960
	agacattgac cagatitfff ttaaaatfff aacacacaaa aaaacttcgc ttaacgccat	1020
	tgtacttctc catacgttg ataacagatt ccagaacacc taatgaattt atcaatctat	1080

acataataac tattcatctc taatcacgaa aaaagttaa ataaacatat caaattgagc 1140

aaccaataag 1150

<210> 48

<211> 300

<212> RNA

<213> 埃及伊蚊

<400> 48

gaguuucgag aagcguuccg gcuguucgac aaggauaaug acggcucaau caccaaggaa 60

gaacugggaa cugucaugag gucguuggga caauuugcuc gcguggaaga auuacaagag 120

auguuacugg agauugaugu ugauggcgau ggaaacguaa guuucgaaga guuugucgac 180

aucaugucca acaugacgga uaccguggcg gaaacaucgg ccgaccagga ggaacgugag 240

cuacgugaug ccuuccgugu cuucgacaag cacaucgag guuacauuac ggcaucagau 300

[0027]

<210> 49

<211> 450

<212> DNA

<213> 致倦库蚊

<400> 49

atgtcgccc actcgctcac cgacgaacag cagcgccagt accggcaaat gttcgaaacg 60

ttcgacaagg atggcaacgg ttccatcacg acgacggaac tgggaacgct agtgcgagcg 120

ctaggcttta atccttcgat cgccgagatc gagcagatga tccacgaggt cgacctggac 180

ggaagcggga cgatcgagct gaacgagttt tacgtgtga tggeccggaa gcacgaggaa 240

gcctcgtcgg aggacgagct gaggcagct ttcaaggtgt ttgacaagaa cgaggatggg 300

ttcttgacgg tggaggaact gtcgatggtg atgaagaact ttggtgagcg gttgagcgat 360

gaagagttgg cggatttggt ggaggaggcg gatgttgaca aggacggtcg gattaattac 420

gaggaatttg tgaccaatgtt gaccaagtag 450

<210>	50	
<211>	300	
<212>	RNA	
<213>	致倦库蚊	
<400>	50	
	acagcagcgc caguaccggc aaauuguuca aacguucgac aaggauaggca acgguuccau	60
	cacgacgacg gaacugggaa cgcuagugcg agcgcuaaggu cuuaauccuu cgaucgccga	120
	gaucgagcag augauccacg agguccgaccu ggacggaagc gggacgaucg agcugaacga	180
	guuuuacgug cugaugggccc ggaagcaucg ggaagccucg ucggaggacg agcugaggca	240
	ggcnuucaag gugunigaca agaacgagga. uggguucuuug acgguggagg aacugucgau	300
<210>	51	
<211>	477	
<212>	DNA	
<213>	致倦库蚊	
[0028]	<400>	51
	atgtcatcgt ctteccgcea ccccaaacc acccgggacc cctgaccaa ggagcaaate	60
	gaagaactgc gcgaagcggt caccctgttc gacaccaacg gegacggaac gatttcggcg	120
	tcggaactgt ccaccgtgct gcgggccctc ggcaagaacg tctcggaacg cgaagtcgag	180
	gaactgctga aggaggtccg caccgacgac gaggggccga tccggttcgg ggactttgtg	240
	gccatgatga cggtcgggtt gaaggacttt aacaacgagg accagctgca ggaggcgttt	300
	cggatcttcg atcgggacgg gaatgggcgg atttcggcgg aagagctacg ggtcgcgttg	360
	aggtcgtttg gggagcagtt gaccgaagag gagctggagg agttgctgcg cgaggcggac	420
	gtcaacagtg acggccagat tgactacggg gagtttgtgc ggatgataac gcagtga	477
<210>	52	
<211>	300	
<212>	RNA	
<213>	致倦库蚊	

	<400> 52	
	gcgaagcggu caccugguuc gacaccaacg gcgacggaac gaaauccggc ucggaacugu	60
	ccaccgugcu gggggcccuc ggcaagaacg ucucggacgc cgaagucgag gaacugcuga	120
	aggaggucgg caccgacgac gagggcgcga uccgguuagg ggacuugug gccaugauga	180
	cgguccgguu gaaggacuuu aacaacgagg accagcugca ggaggcguuu cggauuuucg	240
	aucgggacgg gaauggggcg auuucggcgg aagagcuacg ggucgcguug agguccguug	300
	<210> 53	
	<211> 927	
	<212> DNA	
	<213> 致倦库蚊	
	<400> 53	
	atgaccgatt ttctccagct tcccgaatgc aatactcgac aaaccaacga cccaaacagc	60
	gcgagcagc aacaacagag cgaaccgaa tgaaccaga gcagcagca ccagagcagc	120
[0029]	agccacagct accagcagcc gtctcaacg cagcaccggt tggccggatc tccgtcagc	180
	agtgccaacg cgagtccegt gatcgccgg aacatgccc gccaccagca ccaggacacc	240
	ggccccagtg acgatgggac ctgagcagt ctggacggga gtgtctttgc cgccgacgga	300
	actccgaccg ctccgggggc gttggccagg acgcgccgt cgcagacctc ggaatcgatc	360
	acctccagca acttcaacta cagtttgaac cggaggttca tctccaagaa ccagatgaaa	420
	gagttccggg aggcgttccg gctgtttgac aaggacaacg acgggtcgat cacgaaggag	480
	gagctgggca cggatgatcg atcaactggg cagtttgcce gtgtcgagga actgcaggag	540
	atgtctctgg agattgacgt cgatggtgat ggcaacgtca gcttcgagga gtttctcgac	600
	atcatgtcca acatgaccga cagggtggcg gaggcatccg ccgaccagga ggagcgcgaa	660
	ctccgggatg cgttccgct gtttgacaag cacaaccggg gctacatcac ggcgtctgat	720
	ctgcggggcg ttctgcagtg tctgggagaa gatttggacg aggaagaaat cgaagacatg	780
	atcaaggagg tggacgtcga cggcgatgga cggatcgact ttacagatt tgtgcacgcc	840

ctcggagagc cggaaagattc acaggagaac gacgacgagg aggacccctt gtcacctccg 900

tcactgtcgt gtgacgtaaa cgcctaa 927

<210> 54

<211> 300

<212> RNA

<213> 致倦库蚊

<400> 54

gaguuccggg aggcguuccg gcuguuugac aaggacaacg acgggucgau cacgaaggag 60

gagcugggca cggugaugcg aucacugggg caguuugccg gugucgagga acugcaggag 120

augcugcugg agauugacgu cgauggugau ggcaacguca gcuucgagga guuugucgac 180

aucaugucca acaugaccga cacgguggcg gaggcauccg ccgaccagga ggagcgcgaa 240

cuccgggaug cguucccgcu guuugacaag cacaaccggg gcuacaucac ggcgucugau 300

[0030]

<210> 55

<211> 333

<212> DNA

<213> 致倦库蚊

<400> 55

atggtcggtg tccaagctgg ccatttgata tctcaateac ggcggggcgg ctccgcgtgc 60

gaaaacgggg aaattttgat tgatgacggc ggcggcgggg agcggcgggt tttaaacctg 120

ttctacaagg ggaataaaaa tgccgateaa cttacagagg aacagatcgc cgagttcaaa 180

gaagcgttct cgtgttgcg caaagacggt gacggcaega tcacgacca gtagctgggc 240

accgtgatgc gatcgtagg ccagaacccc acagaagcag agctgcaaga catgataaac 300

gaggtcgatg cggacggact gcatccgctt taa 333

<210> 56

<211> 300

<212> RNA

	<213> 致倦库蚊	
	<400> 56	
	guuggugucc aagcuggcca uuugauaucu caaucacgge gggcgggcuc egcgugcgaa	60
	aacggggaaa uuuugauuga ugacggcggc ggcggggagc ggcggguuuu aaaccuguuc	120
	uacaagggga auaaaaaugc cgaucaacuu acagaggaac agaucgccga guucaaagaa	180
	gcguucuegc uguucgacaa agacggugac ggcacgauca cgaccaagga gcugggcacc	240
	gugaugcgau cguuaggcca gaaccccaaca gaagcagagc ugcaagacau gauaaacgag	300
	<210> 57	
	<211> 934	
	<212> DNA	
	<213> 豌豆长管蚜	
	<400> 57	
	gctgtgcacg ttttgtttac ccgaaaaatg tgattcaaac tticagtttt ttaaatctta	60
[0031]	actgcgttgt ttaagaaaaa aaaaacccta aatttattat tgtttattaa taataaatca	120
	atcgatcgaa taatcgtttg cgggtatacc taagtacgaa gtaaaatatg agtgcacaaa	180
	atagtataa tgaccgttat aaaaaggaat attcgagaat aaggaaactg acgagtagat	240
	atgacatacg gaetcaatca aatgaatttg gtttgcgga agatcaagtt gcggaattca	300
	aagaagcatt taigtgttgc gataaagacc atgatggacg gattactgag gcagaactag	360
	gagtggcat gagatctttg ggtcaaaggc ctactgaaac tgatttgcga ggtatggta	420
	aagaagtgga taaagatggc aatggtagta ttgagtttga tgaattcctg ctaatgatgg	480
	ctagaaaact aaaagcagca gatggcgagg aagaaatgca ccaagctttt aaagtatttg	540
	acaaaaatgg cgatggattc ataacatttg atgaactcaa acgtgttatg tgcagtatcg	600
	gagaaaggct cactgatgaa gaaattgagg acatgataaa agaagcagat ttaaatggtg	660
	ataaaaaaat tgattataaa gaatttatta caataataag ttctaagaaa taaaacgaat	720
	tacggacttg gatgtaccct catatggcat tegttcctca tctgcatctg tgtcattggc	780

	tgctaagact ttacttaata ataaaccttg atctttctcta ctagaataaa atagctctgg	840
	atcctaaagt aaaatataca gtataatttt aaaatagteg tatacaaatt tttttttaaa	900
	tattgagtgt acctcatcca ttccagecaag ttcc	934
<210>	58	
<211>	372	
<212>	RNA	
<213>	豌豆长管蚜	
<400>	58	
	ucaaguugcg gaauucaag aagcauuuau guuguucgau aaagaccaug auggacggau	60
	uacugaggca gaacuaggag uggucaugag aucuuugggu caaaggccua cugaaacuga	120
	uuugcgaggu augguuaaag aaguggauaa agauggcaau gguaguauug aguuugauga	180
	auuccugcua augauggcua gaaaacuaaa agcagcagau ggcgaggaag aaaugcacca	240
[0032]	agcuuuuaaa guauuugaca aaaauggcga uggauucaua acauuugaug aacucaaacg	300
	uguuaugugc aguaucggag aaaggcucac ugaugaagaa auugaggaca ugauaaaaga	360
	agcagauuua aa	372
<210>	59	
<211>	2509	
<212>	DNA	
<213>	豌豆长管蚜	
<400>	59	
	gatttttctgt ttaaataacc cccccgggtt tcggataaac tcggtgtgcg tgtggacgcc	60
	gccgccgccg cgtgagcggtt atttcgctcg ctgtgattac gaacgctcgt gcagtcgtcg	120
	tcatgcagca tctccgagac ccggcgaaaag accatcagag tacgtgaaca ctgcacatca	180
	cactccatcg cgatatactt atctgtagga cgacaccctt taccgaggac acaatgatat	240
	acacgttata atactatcgt acatcgtata tattgtatcc ttatcatcta atattatatt	300

	atcacaaatg ttatattgta ttatagaatt attgtatata gttttaattt gacacgatac	360
	gacatttggg gtgagaatc ggcagagag agaaagagag agagaaaaag agagaataga	420
	tattttgatg taaataatta ttacaatata atattgtatt tgaaaataga aacagataat	480
	tggtcggtga ggcagttctc acctttttaa gatatacata ttatattata tataaacagt	540
	attttgtttt actcettiga gtgaacattt cgtttaacta taccacaatt tattaatatt	600
	atataatata tateatggac ggtaaaatat categggtatt cgaaaaatac ttttcacctt	660
	caccgcctgg gaaccaaata aggaattttg tcaatcgga aatagacgag caaacgccac	720
	aaaacgtaag cacacaacca accgcgttag cgaaacitca cagtaataat gtagtgaacg	780
	geaccaetcc gaaacceate acaagcaacg aaaaaccaac ggaagtccaa gtacatccac	840
	aaccacttca gccctgcgat agaaacttag tgcacgttac taaagcacag atgaaagaat	900
	ttcaagaagc atttaggta ttgataaag acggtgaagg cagcatcact aaagaggaat	960
[0033]	tgggtcgagt tatgcggagt cttggacagt ttgctagaga agaagaattg gagacaatgt	1020
	tacaagaagt cgacatcgat ggcatggag cgttcagttt tcaagagttt gtagaaattg	1080
	tgtacaatat ggggtgtaca gcagaaaaga cggcggacca agaggaaaaa gagctccgag	1140
	acgcatttag ggatattgac aaacataacc gaggatatat aagtgcgtcg gacttgagag	1200
	ctgtccitca atgtttgggt gaagatttgt cagaagaaga aatcgaggat atgatcaagg	1260
	aagtagacgt ggacggagat ggaagaatcg atttttaaga atttgtgaat gcccttgag	1320
	aaccaggaga tgattatgat gaaaacgacg aagatgaaga agatatttat ccccaattgg	1380
	acattcaaac ataacttata aacaattaca cgttttagta tgatgcgata acaagttcag	1440
	ttaaaattga attatcaaaa atgataacaa tattttttgt aaacttaggt taaaatgta	1500
	aaaacttacc cattttgtaa tttctatcag gaataaacac accaatatct gtttttttt	1560
	tgccaactaa tgaletctaa taagtaaaac atattttact ttaatalcaa tglactactg	1620
	tagtatigtt aagtaattta tgcattttc aatgtttaat gtataaatta atcattta	1680

	ggtacaatca gtaattcacc ttaagacceca attatattatt aaaaacatat tatatcatta	1740
	attfacitaa tgtatacatt ttagtcaaaa aacattcagt tatatgttat aagtcgttat	1800
	aactatttat ttaagaaact ataaaaaatt attatattatt ataatagttt acgtatctat	1860
	ttacttccat ggaaggtatt tataaataga aaatgttaag gtaacttaat taaaacaata	1920
	attatgaaca agtatitttta ctttaaaaaa attacataat tatattgtca gtattcttite	1980
	aaatacaatt aattcaaatt tgtgaaattg tccattcttc ctttatgett tgtgaactaa	2040
	atttaaatac attaagaacc agagtacaat taaaggaaat agtcagctgc gtgttttttt	2100
	gttgccatfc ctgggttttc ttgtggigtct gccfcaata ttgtaaaatc tctttgaagt	2160
	gtttcactga gtccaatat tgccgcaacg ttaccacatc tattattttac aattagtatt	2220
	aacaattaaa taacagcatt aataaataaa tagtataatg taatttttag agtagtattt	2280
	accgataaca atagtgggt getgaccaa cagtaagcac ggtttcatca aaatgccatt	2340
[0034]	tatatccttc catgactagt tgatgagctc gacaaataat atctatatca tttgtagtat	2400
	taaactggga gacaacatca gaaccaaata ggtatccagc accecgagga ctcacacccc	2460
	atccctgagt atctaaaata attgtgtatg ttaaaaatct atttttttt	2509
	<210> 60	
	<211> 294	
	<212> RNA	
	<213> 豌豆长管蚜	
	<400> 60	
	acagaugaaa gaauuuaag aagcauuuag guuauuugau aaagacggug acggcagcau	60
	cacuaaagag gaauuggguc gaguuauagc gagucuugga caguuuugcua gagaagaaga	120
	auuggagaca auguuacaag aagucgacau cgauggcgau ggagcguuca guuuucaaga	180
	guuuuguagaa auuguguaca auauugggugg uacagcagaa aagacggcgg accaagagga	240
	aaaagagcuc cgagacgcau uuaggguauu ugacaaacau aaccgaggau auau	294

<210> 61
 <211> 477
 <212> DNA
 <213> 人虱

<400> 61
 atggccgacg aaacgacgac ggaattaccg gaggaaaatc tttcggttga aaaaatcgca 60
 gaattccgcg aagctttcaa ccttttcgac aaagatggcg acggtaacat aacgaccaaa 120
 gaattgggta cttgcatgag gtctctcggg cagaatccga cggaagegga aatcgcgag 180
 ctgatttgcg aagtagacgt agagggaaca ggtttaatcg attcacatc gttcgttttg 240
 ataatggcta aaaagataaa agacgtcgac aacgaggaag aactcagaga agctttttaga 300
 atattcgata aggaaggtaa cggattcata accgcatccg agctcaggca cataatgatg 360
 aacttgggtg aaaaattaac ggaagaagaa tgcgacgaaa tgattaggga agcggatgtc 420
 atgggtgacg gaaatatcaa ttacgaagaa ttcgtcacca tgatgatgtc aaagtga 477

[0035]

<210> 62
 <211> 379
 <212> RNA
 <213> 人虱

<400> 62
 aaaaaucgca gaauuccgcg aagcuuucac cuuuuucgac aaagauggcg acgguaacau 60
 aacgaccaaaa gaauugggua cuugcaugag gucucucggg cagaauccga cggaagegga 120
 aaucgcggag cugauuugcg aaguagacgu agagggaaca gguuuauucg auuucacauc 180
 guucguuuug auaauggcua aaaagauaaa agacgucgac aacgaggaag aacucagaga 240
 agcuuuuaga auauucgaua aggaagguaa cggauucaua accgcauccg agcucaggca 300
 cauaauggaug aacuugggug aaaaauuuac ggaagaagaa ugcgacgaaa ugauuaggga 360
 agcggauguc augggugac 379

<210> 63
 <211> 537
 <212> DNA
 <213> 人虱

<400> 63
 atggatgcta ggaatgaagt ttacaacacc gaatataatc gtttaagaaa attgacgtgt 60
 agaacggaaa ttaaattatc ttgctetgaa tatggtetta cggaggaaca agtegtgaa 120
 tttaaagaag cttttatget ttttgacaaa gatgaagatg gacaaataac aatggecgaa 180
 ttaggagtcg ttatgagatc tttgggacaa cgtccgacag aaacggaatt aagagacatg 240
 gttaaagagg ttgatcaaga tggaaatggt acaatcgaat tcaatgaatt tttaacaaatg 300
 atggcāaaaa aaatgaaagg agctgatggt gaagaagaac ttcgagaagc attcagggtg 360
 tttgataaaa ataacgatgg aetcatitca tccattgaac ttcgacatgt catgacaaat 420
 ttaggtgaga aactttcaga cgaagaagtt gatgatatga taaaagaagc agatttagat 480
 [0036] ggagatggta tggttaacta caatgaattt gtaacgatat taacatcaaa aaattaa 537

<210> 64
 <211> 417
 <212> RNA
 <213> 人虱

<400> 64
 acaagucgcu gaauuuāaag aagcuuuuau gcuuuuugac aaagaugaag auggacāaaau 60
 aacaauaggcc gaauuaggag ucguuauagag aucuuuggga caacguccga cagaaacgga 120
 auuaagagac augguuāaag agguūgaucā agauggāaaū gguacaauuc āauucauga 180
 auuuuuācāā augauggcāā āāāāāaugāā aggagcugau ggugaagaag āacuucgaga 240
 agcauucagg guguuugauā āāāāūāacga uggacucāuū ucauccāuug āacuucgacā 300
 ugucāugacā āāūūūāggug āgāāācūūūc āgācgaagāā guugaugāūā ugāūāāāgā 360
 āgcagāūūūā gāuggāgāug guāuggūūāā cūācāūgāā uūūgūāacgā uāūūāāc 417

	<210>	65	
	<211>	648	
	<212>	DNA	
	<213>	人虱	
	<400>	65	
	atgactacga aacataatat atctggaaga atacgggacg aaccaggggg acaaaggga	60	
	aaaaatggaa atgtaaccgg tcgaacaata acatatccaa caacaggga caaaagaaat	120	
	attgatacaa tgacgaaaaa taacatatca aaatcgcaaa tgaaggaatt tcgagaagct	180	
	tttegacttt ttgacaaaga tggatgatgt agtataactc aagaagaact tggaagagtt	240	
	atgagatctt taggacaatt tgccagagaa gaagaactac aagaaatgct taaggaagtt	300	
	gatatagatg gagatggaaa ttttagcttt gaagaatttg ttgaaatcgt atcaaatatg	360	
	ggaggtgcag caactgaaaa aacagctgat gaagaagaga aagaacttag agatgetttt	420	
[0037]	agagtatttg ataaacataa tcgaggtttt ataagtgtt ctgactcteg agctgttttg	480	
	caatgtctgg gtgaagaatt atcagaagaa gaaaaaatga taagagaagt tgatgtggat	540	
	ggagatggta gaattgattt ttctgaattt gtctgagctt tgggtacaca ctacaggcaa	600	
	aatttctttt tcaggtttct atccatttat attattagca cagtttga	648	
	<210>	66	
	<211>	449	
	<212>	RNA	
	<213>	人虱	
	<400>	66	
	aucgcaaaug aaggaauuuc gagaagcuuu ucgacuuuuu gacaaagaug gugaugguag	60	
	uauaacucaa gaagaacuug gaagaguauu gagaucuuua ggacaauuug ccagagaaga	120	
	agaacuacaa gaaaugcuua aggaaguuga uauagaugga gauggaaaau uuagcuuuga	180	
	agaauuuuguu gaaauuguau caaaauuggg aggugcagca acugaaaaaa cagcugauga	240	

	agaagagaaa gaacuuagag augcuuuuag aguauuugau aaacauaauc gagguuuuau	300
	aagugcuucu gaucuucgag cuguuuugca augucugggu gaagaauuau cagaagaaga	360
	aaaaaugaua agagaaguug auguggaugg agaugguaga auugauuuuu ucgaauuugu	420
	ucgagcuuug gguacacacu acaggcaaa	449
	<210> 67	
	<211> 648	
	<212> DNA	
	<213> 人虱	
	<400> 67	
	atgatgaaaa acaaaactga cagcagtctc ggagctgagc attcagattt gaaacattcg	60
	acgagtgaaa ccgaagaact ccaatccctc gaactcgaag tgataaaaga tgaagagcct	120
	caaatagatc tgagacagtt tetgacgaaa gaacaagtgc aagaattcaa aagaatttgc	180
	caggettacg atgtcaacaa cgaagataaa atcccggcca aagccatcgg aatcattttg	240
[0038]	agaaacatgg gattgaatcc gtccaaggcg attctcaaga gaatgacaaa ggaaatcgat	300
	ccggataaaa acggttacgt ggatttcgaa atgtttttac atcccatggc acgaatgata	360
	cacgaagtcc cggaaaatca cgaggacata atcgcagcat tcaaagtttt cgacgaagac	420
	gacgaaggtt tcgtatccgt taaagctttg accgaatacc tcacgaacct gggcgaagat	480
	ttggaagatt tcgaaattga taatttgatt aaaatggcgg atcccaaagg cacgggccga	540
	gtctactacg aaggattcgt cgagaaaatt ttcggaatcg taagaaacgg gaaaaaaaag	600
	aaaaatctca aagggaaaaa gggaaaaaaa cgaaaaaaa atgaatga	648
	<210> 68	
	<211> 451	
	<212> RNA	
	<213> 人虱	
	<400> 68	
	ucaaaauagau cugagacagu uucugacgaa agaacaagug caagaauuca aaagaauuuu	60

	ccagggcuuac gaugucaaca acgaagauaa aaucgccguc aaagccaucg gaaucauuuu	120
	gagaaacaug ggauugaau cguccaaggc gauucauag agaauagaca aggaaauca	180
	uccggauaaa aacgguuacg uggauuucga aauguuuuu caucceaugg cacgaauau	240
	acacgaaguc ccggaaaauc acgaggacau aaucgcagca uucaaaaguu ucgacgaaga	300
	cgacgaaggu uucguauccg uuaaagcuuu gaccgaauac cucacgaacc ugggcgaaga	360
	uuuggaagau uucgaaauug auaaauugau uaaaauugcg gaucceaaag gcacgggccg	420
	agucuacuac gaaggauucg ucgagaaaau u	451
	<210> 69	
	<211> 1546	
	<212> RNA	
	<213> 狄斯瓦螨	
	<400> 69	
[0039]	guuuagccca uuucgcgcu gugucuguc ggcacugcg aaguacugag cuagcugagu	60
	cguggugcuu agaaggcagu ggcagugagu ggcaucagcg guauaagug agggacaaca	120
	gccggagagu cgugucgguu gguaggucgg uucguugccg auuaaugccc ccaugugag	180
	uuacgucggg ugcuuuuucc gcugugcauu ggacguuaca uacagagagu cagguguagu	240
	uuauuuuaga cgaauaacua ccagcacuac cugauacagc gacccaacgu agagaggga	300
	agagaaagag cuguuguuuc gcuagguuag uucugaaca uuggauugau ucgcaauug	360
	acgcuuuguc ggcuacgggu ugaacggacu gugcaaacug cggauagugc gugaacuagc	420
	agacaacaua uccaauaacu aacuacacgg uuauuuuga uacaaacacc uaguucagac	480
	agacaauuuc gguuugcuuu guuggcacua uaaggaguaa gugauuuugu uuuuuguuuu	540
	ucagucggcc uaguauuguc ggugcacuua cggauaacag gagaggcagu acaaaggcaa	600
	cucgaucac uaucguuac gggcgcuau acagcgaaau auuaauagge aaagcaagca	660
	agccagccgg ccaagccaa accccgggcg aaacgcagau accaacagcg cugaagugcg	720

	uggcaaacga caacgggaca guagggcaua agcuagacag cauauagcuu uucuaaccuu	780
	ggcugaucag cuaacugagg aacagaucgc cgagucaaaa gaggcguuuu gccuguuuga	840
	caaggacgga gauggcacga ucacgacaaa ggagcucggu acgguaaugg gaucucucgg	900
	ccagaacccc acugaggcug aacugcagga caugaucaac gagguccagc cccacggcuc	960
	cggaacgaia gauuucccug aguuccucac aaugauggca agaaagauga aggacaccga	1020
	cucggaggag gagaucagag aggcguuccg cguaucgac aaggauggca acgguuucuu	1080
	uucggcggcc gagcucaggc acguuauagc caaccuuggc gagaagcuua cggacgagga	1140
	gguaagagag augauncggg aggcagauau ugacggugau ggucagguaa acuaagagga	1200
	guucguacc augaugacgu ccaaguaaau auaugauaau guuggcuguc ucguguaaug	1260
	ucgugagaaa gaaagcgcgc gcgaaagaaa gagagaaagg aaugaaaaac uauaaaauagc	1320
	uuguuguuaa agcaacgcaa caacaagcug uaagcaacaa acauuuuua cgaaguauac	1380
[0040]	gauaaugaaa gucagacaggg aagcaagcac ggauauauau gaaaacuaag cgaaugacg	1440
	ucgucaucau caccagcagc agcagcagea gcagcagcag cagcagcage accaccacca	1500
	ccaccaucac gaccaccacc accaccacca ccaucacgac caccac	1546
<210>	70	
<211>	1136	
<212>	RNA	
<213>	狄斯瓦蛎	
<400>	70	
	guucggcucg gggacuagcu gaucggucgg uguuauugu ugguauugg caaagaccgu	60
	uguugagugg gcucgcugca cugagcguuu aaucuggug aaucguugg caauggcgga	120
	ucagcugacc gaggagcaaa ucgccgaauu caaggaggcu uucagccugu ucgaauaaga	180
	eggugauggc acauuuacga ccaaggaacu agggaccguc auggcguccc ucggccagaa	240
	ccuacugag gcugagcuuc aagacaugau caacgagguc gacgcugacg guaacggcac	300

	uauugacuuu ccagaguuuc ucacgaugau ggcgcguaaa augaaggaca ccgacuccga	360
	ggaggagauc cgggaagcuu uuaggguuuu ugauaaagac ggaaauggcu ucauuucggc	420
	ugcagagcug aggcacguaa ugaccaaccu uggcgaaaag cucacggacg aggaagugga	480
	cgagaugauc cgcgaggcgg auaucgacgg cgacggacag gucaacuacg aggaguucgu	540
	cacgaugaug acaucaaaaau gaagggcuca cuauugcgcg ggaaaagcag cccaacaaag	600
	aaaccuagag ugcgaaagcg agaacguuaa acacgaugau augcuuauga uauuacauac	660
	gacuagagga cagaaagaca gacagacaga cugagcagac gaacgggcaa guugaagaaa	720
	agccgaguug aacuggcuaa ccguugggua cucauucaua uucgauaguu acagacaaca	780
	acaugaaaaa cgacagcaac aaucgcgaac aaacacacgg agauugcaca caaugaggu	840
	aaacugaaca uggugcagcg gaaguuggau ggcagcgua cacagugcug cuacugcugc	900
	ugcugcaaa ugcuaacacuc aauaaugaua auaaauaaua uaaauaauaga aauaугаиua	960
[0041]	uguuguccaa aagagaaaca aacaacacaa acaaagcuau uaaaaaucug aauaaaagcu	1020
	aagaagaaau caaguagcag ucgacauggg gaguggcaaa cgauaagagu ccacagaaaa	1080
	cugaagcggc cgaaagaaaa cacgaggcaa aaggcaaugu auucauuuag acgagg	1136
	<210> 71	
	<211> 150	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成序列	
	<400> 71	
	guuuagccca uuuucgcgu gugucugucg gcgacugcgg aaguacugag cuagcugagu	60
	cguggugcuu agaaggcagu ggcagugagu ggcaucagcg guaaaaagug agggacaaca	120
	gccggagagu cgugucgguu gguaggucgg	150

<210> 72
 <211> 150
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 72
 uucguugccg auuaaugccc cacaugugag uuacgugcgg ugcuuuguucc gcugugcauu 60
 ggacguuaca uacagagagu cagguguagu uuauuuuaga cgaaaaacua ccagcacuac 120
 cugauacagc gacceaacgu agagagggaa 150

<210> 73
 <211> 150
 <212> RNA
 <213> 人工序列

[0042] <220>
 <223> 合成序列

<400> 73
 agagaaagag cuguuguuuc gcuagguuag uucugaacaa uuggauugau ucgcaaauug 60
 acgcuuguac ggcuaacggu ugaacggacu gugcaaacug cggauagugc gugaacuagc 120
 agacaacaua uccaauaacu aacuacacgg 150

<210> 74
 <211> 150
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 74
 uuauuuuga uacaaacacc uaguucagac agacaauuuc gguuugcuuu guuggcacua 60
 uaaggaguua gugauauugu uuuuuuguua ucagucggcc uaguauuguc ggugcacuaa 120

	cggauaacag gagaggcagu acaaaggcaa	150
	<210> 75	
	<211> 150	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成序列	
	<400> 75	
	cucgauucac uaucguucac gggcgcuau acagegaaau auuaauaggc aaagcaagca	60
	agccagccgg ccaagcccaa accccgggcg aaacgcagau accaacageg cugaagugcg	120
	uggcaaacga caacgggaca guagggcaua	150
	<210> 76	
	<211> 150	
	<212> RNA	
[0043]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成序列	
	<400> 76	
	agcuagacag cauauagcuu uucuaaccuu ggcugaucag cuaacugagg aacagaucgc	60
	cgagucaaaa gaggcguuua gccuguuuga caaggacgga gauggcacga ucacgacaaa	120
	ggagcucggg acgguaaugg gaucucuegg	150
	<210> 77	
	<211> 150	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成序列	
	<400> 77	

ccagaacecc acugaggcug aacugcagga caugaucaac gaggucgacg ccgacggcuc	60
cggaacgaua gauuucccug aguuccuac aaugauggca agaaagauga aggacaccga	120
cucggaggag gagaucgag aggeguuccg	150

<210> 78
 <211> 150
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 78	
cgauuucgac aaggauaggca acgguuucan uucggcggcc gaggucaggc acguuauagc	60
caaccuuggc gagaagcuua cggacgagga gguagaugag augauucggg aggcagauau	120
ugacggugau ggucagguca acuaagagga	150

[0044]

<210> 79
 <211> 150
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 79	
guucgucacc augaugacgu ccaaguaaa auauagauau guuggcuguc ucguguaaug	60
ucgugagaaa gaaagcgccg cgcgaaagaaa gagagaaagg aaugaaaaac uauaaaauagc	120
uuguuguuaa agcaacgcaa caacaagcug	150

<210> 80
 <211> 150
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 80

uaagcaacaa acaauuuua cgaaguauac gaauaugaaa gucgacaggg aagcaagcac 60

ggauauauau gaaaacuaag cgaaugacg ugcucaucau caccagcagc agcagcagca 120

gcagcagcag cagcagcagc accaccacca 150

<210> 81

<211> 150

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 81

guucggcucg gggacuagcu gaucggucgg uguguauugu uggcuauugg caaagaccgu 60

uguugagugg gcucgcugca cugagcguuu aaucuggug aaucguugg caauggcgga 120

ucagcugacc gaggagcaaa ucgccgaauu 150

[0045]

<210> 82

<211> 150

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 82

caaggaggcu uucagccugu ucgaauaaga cggugauggc acaauuacga ccaaggaacu 60

agggaccguc augcggucce ucggccagaa ccuacugag gcugagcuuc aagacaugau 120

caacgagguc gacgcugacg guaacggcac 150

<210> 83

<211> 150

<212> RNA

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成序列	
	<400> 83	
	uauugacuuu ccagaguuuc uacgaugau ggcgcguaaa augaaggaca ccgacuccga	60
	ggaggagauc cgggaagcuu uuaggguuuu ugauaaagac ggaaauggcu ucuuuucggc	120
	ugcagagcug aggcacguaa ugaccaaccu	150
	<210> 84	
	<211> 150	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成序列	
[0046]	<400> 84	
	uggcgaaaag cucacggacg aggaagugga cgagaugauc cgcgagggcg auaucgacgg	60
	cgacggacag gucaacuacg aggaguucgu cacgaugaug acaucaaaau gaagggcuca	120
	cuauugcgcg ggaaaagcag cccaacaaag	150
	<210> 85	
	<211> 150	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成序列	
	<400> 85	
	aaaccuagag ugcgaaagcg agaacguuaa acacgaugau augcuuauga uaauacauac	60
	gacuagagga cagaaagaca gacagacaga cugagcagac gaacgggcaa guugaagaaa	120
	agccgaguug aacuggcuaa ccguugggua	150

	<210> 86	
	<211> 150	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成序列	
	<400> 86	
	cucauucaua uucgauaguu acagacaaca acaugaaaaa cgacagcaac aaucgcgaac	60
	aaacacacgg agauugcaca caaugagggg aaacugaaca uggugcagcg gaaguuggau	120
	ggcagcggua cacagugcug cuacugcugc	150
	<210> 87	
	<211> 150	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0047]	<223> 合成序列	
	<400> 87	
	ugcugcaaa ugcuaacacuc aaauaugaua auauuaauua uauuuauaga aaauaugaua	60
	uguuguccaa aagagaaaca aacaacacaa acaaagcuau uaaaaaucug aaauaaagcu	120
	aagaagaaau caaguagcag ucgacauggg	150
	<210> 88	
	<211> 156	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成序列	
	<400> 88	
	ggcaacgggu ucauuucggc ggccgagcuc aggcacguua ugaccaaccu uggcgagaag	60
	cuuacggacg aggagguaga ugagaugauu cgggaggcag auauugacgg ugauggucag	120

gucaacuacg aggaguucgu caccaugaug acgucc 156

<210> 89

<211> 257

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 89

ggcggaucag cugaccgagg agcaauccgc cgaauucaag gaggcuuuca gccugucga 60

uaaagacggu gauggcacia uuacgaccaa ggaacuagg accgucaugc gguccucgg 120

ccagaacccu acugaggcug agcuucaaga caugaucaac gagguccgac cugacgguaa 180

cggcacuauu gacuuucag aguuucucac gaugauggcg cguaaauga aggacaccga 240

cuccgaggag gagauc 257

[0048]

<210> 90

<211> 420

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 90

ggaacagauc gccgaguuca aagaggcguu uagccuguuu gacaaggacg gagauggcac 60

gaucacgaca aaggagcucg guacgguaau gcgaucucuc ggccagaacc cacugaggcu 120

gaacugcagg acaugaucaa cgaggucgac gccgacggcu ccggaacgau agauuuccu 180

gaguuccuca caaugaugca agaaagauga aggacaccga cucggaggag gagaucgaga 240

ggcguuccgc guauucgaca aggaugcaac gguuucuuu cggcggccga gcucaggcac 300

guuaugacca accuuggcga gaagcuuacg gacgaggagg uagaugagau gauucggag 360

gcagauauug acggugaugg ucaggucaac uacgaggagu ucguaccacau gaugacgucc 420

	<210>	91	
	<211>	372	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成序列	
	<400>	91	
		ggaacagauc gccagauca aagaggcguu uagccuguuu gacaaggacg gagauggcac	60
		gaucacgaca aaggagcucg guacgguaau gcgaucucuc ggccagaacc cacugaggeu	120
		gaacugcagg acaugaucaa cgaggucgac gccgacggeu ccggaacgau agauuucccu	180
		gaguuccuea caaugaugea agaaagauga aggacaccga cucggaggag gagaucgaga	240
		ggcguuccgc guauucgaca aggaugcaac gguuucauuu cggcggccga gcucaggcac	300
		guuaugacca accuuggcga gaagcuuacg gacgaggagg uagaugagau gauucgggag	360
[0049]		gcagauauug ac	372
	<210>	92	
	<211>	477	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成序列	
	<400>	92	
		ggcggaucag cugaccgagg agcaaaucgc cgaauucaag gaggcuuua gccuguucga	60
		uaaagacggu gauggcacaa uuacgaccaa ggaacuaggg accgucauge ggucccucgg	120
		ccagaaccuu acugaggcug agcuucaaga caugaucaac gaggucgacg cugacgguaa	180
		cggcacuauu gacuuuccag aguuucucac gaugauggcg cguaaaauga aggacaccga	240
		cuccgaggag ggauccggga agcuuuuagg guuuuugaua aagacggaaa uggecucauu	300

	ucggcugcag ageugaggca cguaaugacc aaccuuggcg aaaagcucac ggacgaggaa	360
	guggacgaga ugauccgcga ggcggauauc gacggcgacg gacaggucac cuacgaggag	420
	uucgucacga ugaugacauc aaaaugaagg gcucacuaau gcgcgggaaa agcagcc	477
	<210> 93	
	<211> 373	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成序列	
	<400> 93	
	ggagatcgcc gattcaaag aggcgtttag cctgtttgac aaggacggag atggcacgat	60
	cacgacaaag gagctcggtc cggtaatgcg atctctcgge cagaacecca ctgaggetga	120
	actgcaggac atgatcaacg aggtcgacgc cgacggetcc ggaacgatag atttcectga	180
[0050]	gttcttcaca atgatggcaa gaaagatgaa ggacaccgac tcggaggagg agatccgaga	240
	ggcgttccgc gtattcgaca aggatggcaa cggtttcatt tcggcgcccg agctcaggca	300
	cgttatgacc aaccttggcg agaagcttac ggacgaggag gtagatgaga tgattcggga	360
	ggcagatatt gac	373
	<210> 94	
	<211> 376	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成序列	
	<400> 94	
	ggaacagauc gccgaguuca aagaggcguu uagccuguuu gacaaggacg gagauggcac	60
	gaucacgaca aaggagcucg guacgguaau gcgaucucuc gcccagaacc ccacugagge	120
	ugaacugcag gacaugauca acgaggucga cggcgacggc uccggaacga uagauuuccc	180

	ugaguuccuc acaaugaugg caagaaagau gaaggacacc gacucggagg aggagauccg	240
	agaggcguuc cgcguauucg acaaggaugg caacgguuuc auuucggcgg ccgagcucag	300
[0051]	gcacguuaug accaaccuug gcgagaagcu uacggacgag gagguagaug agaugauucg	360
	ggaggcagau auugac	376

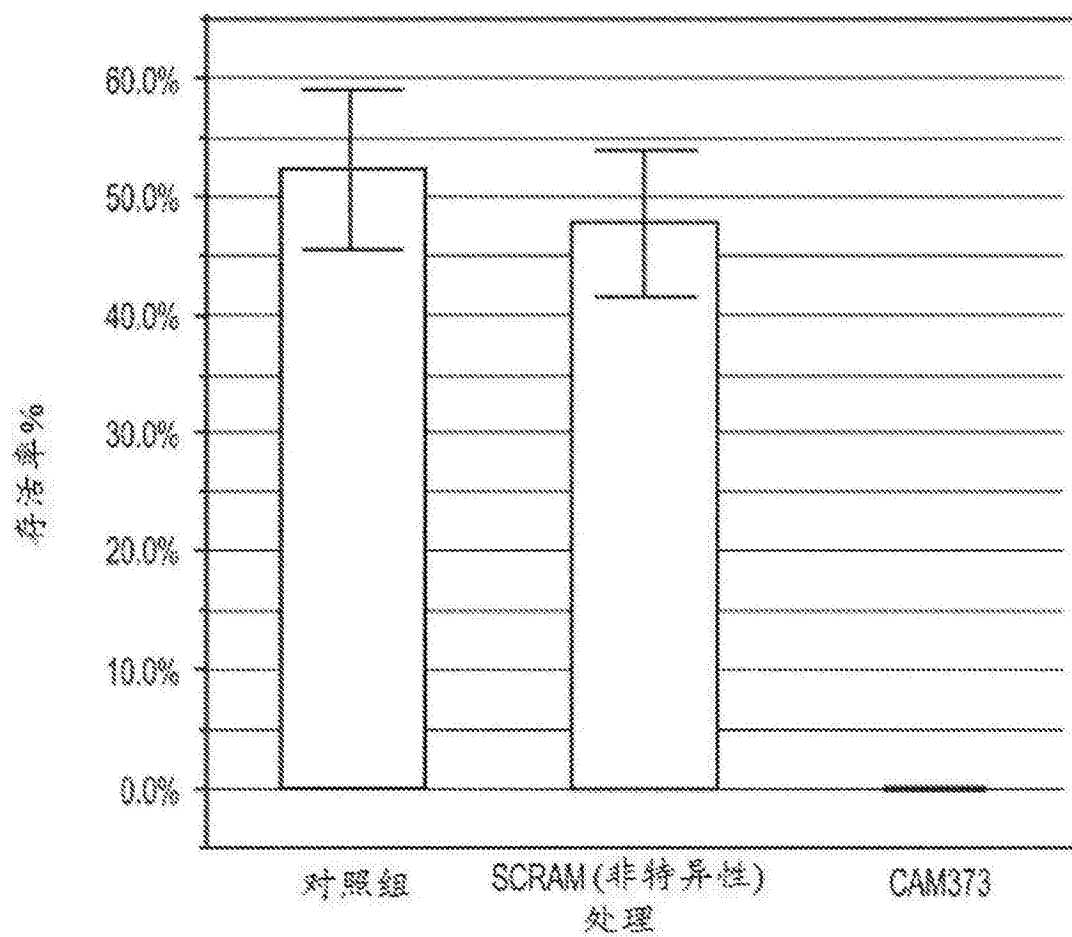


图2

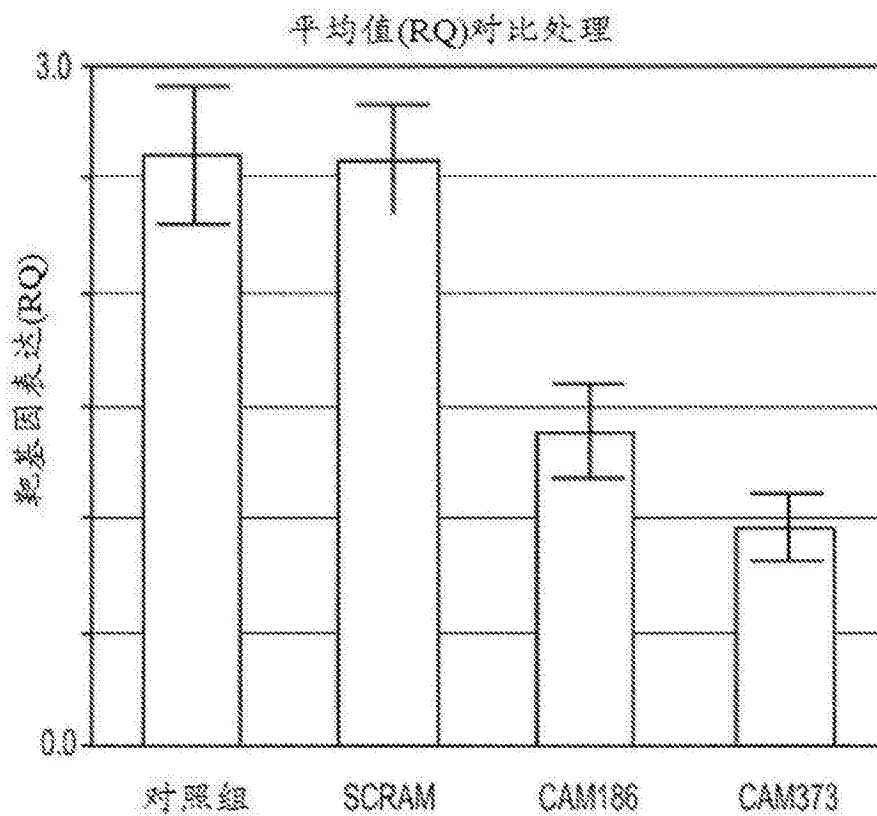


图3A

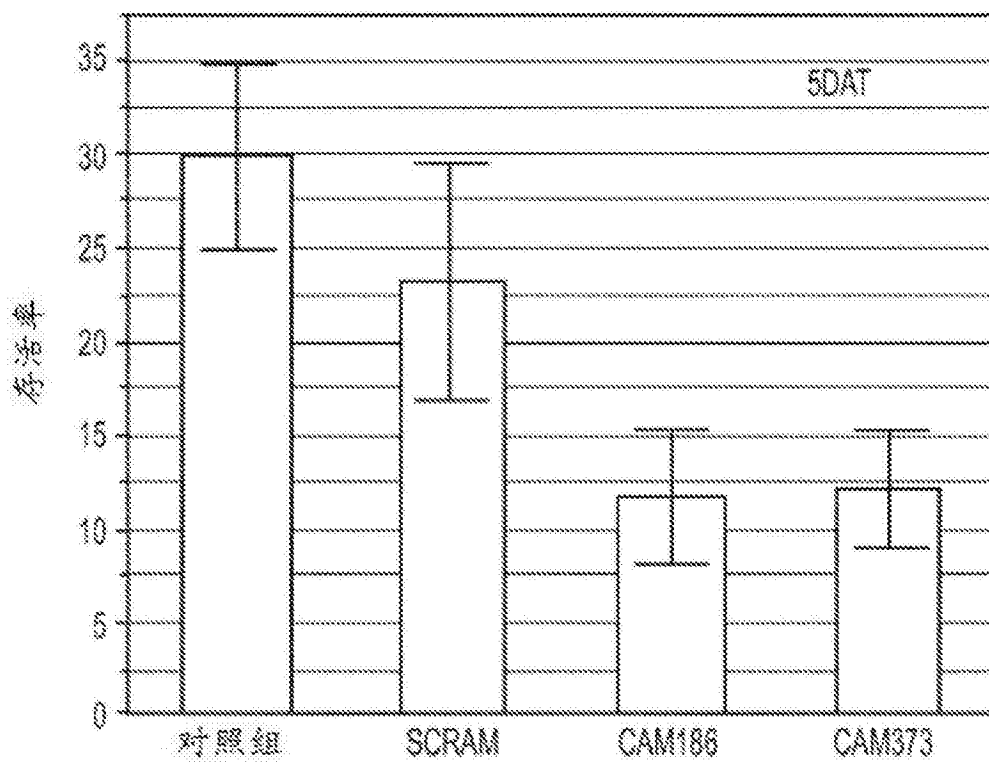


图3B

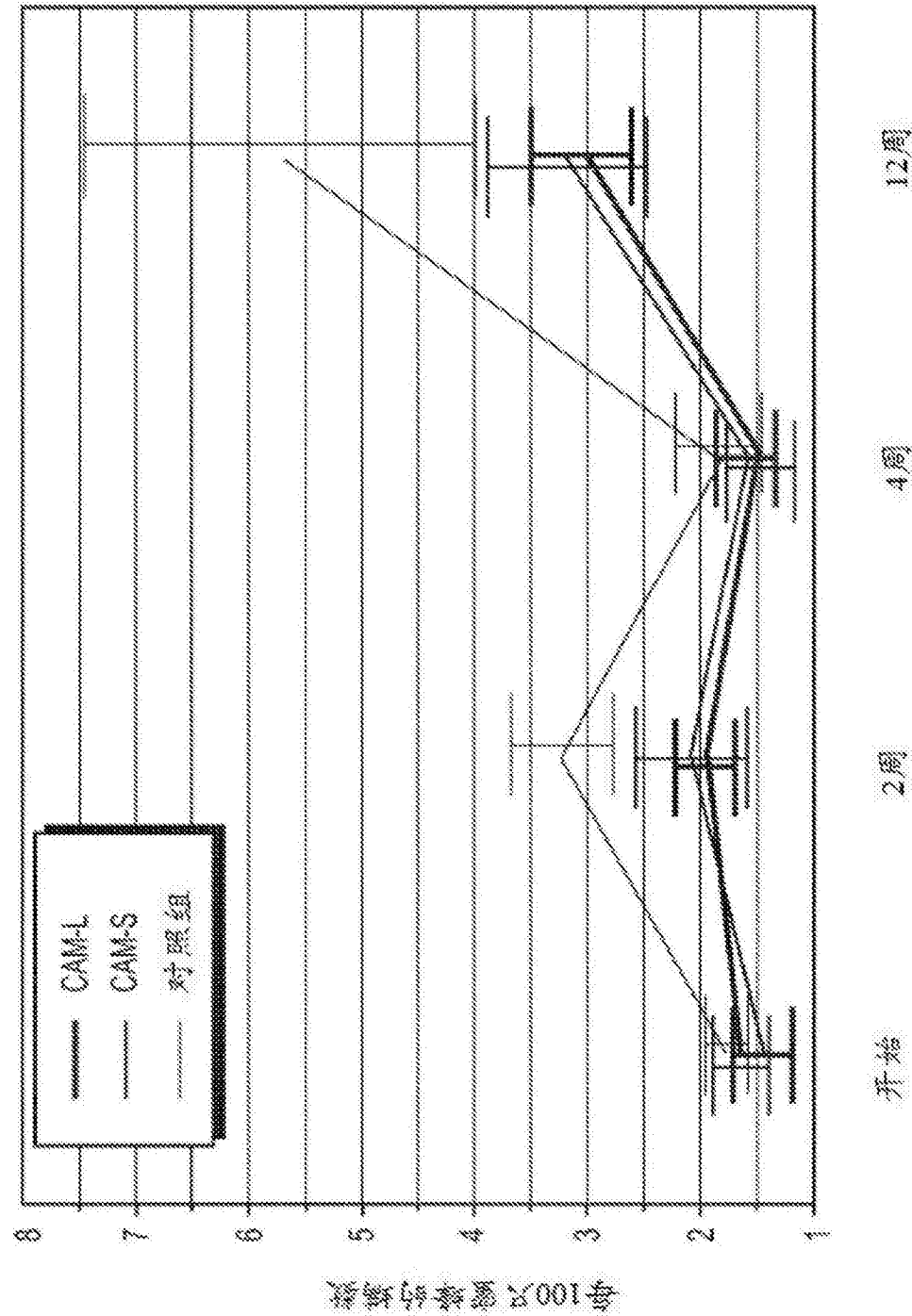


图4

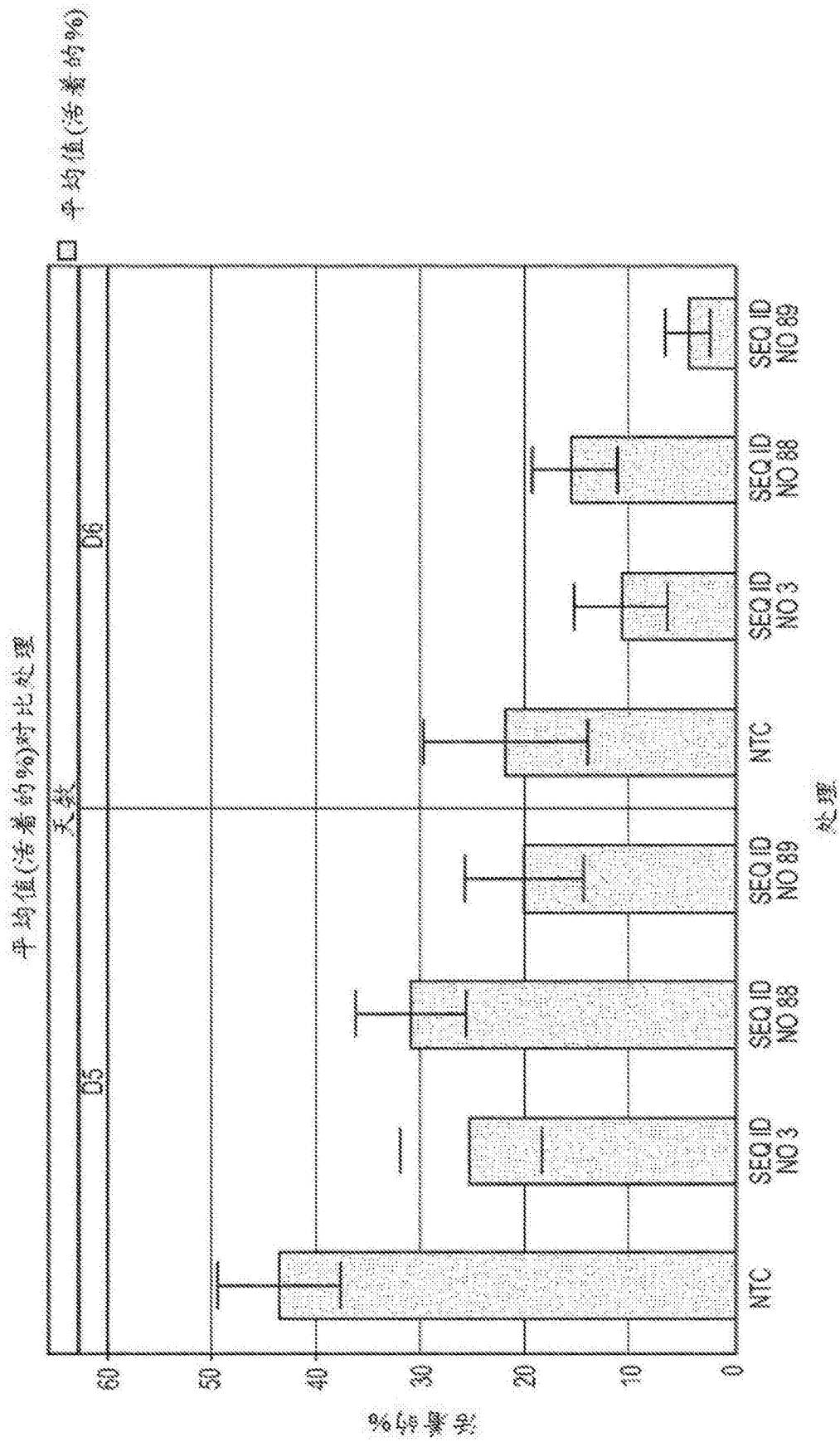


图5

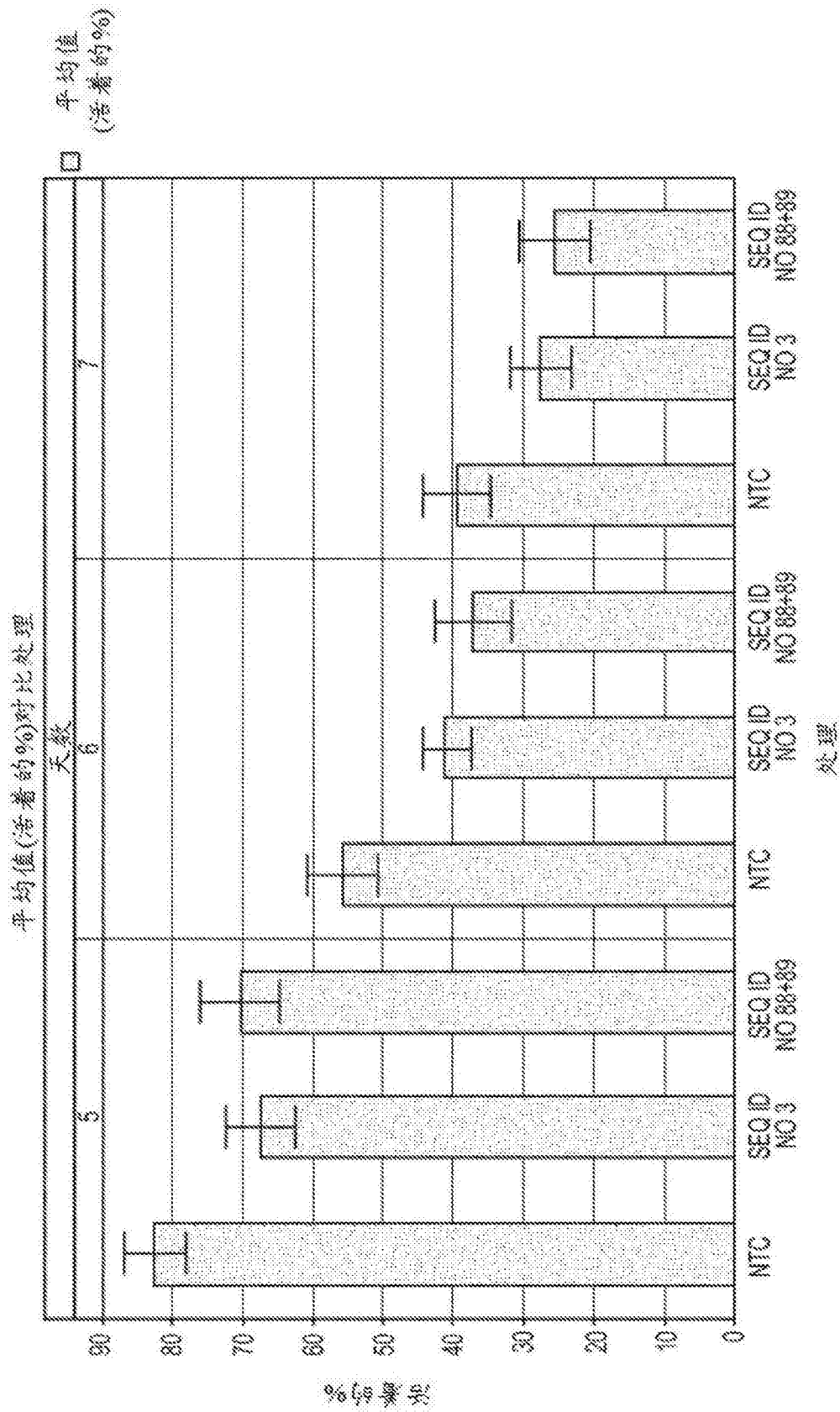


图6

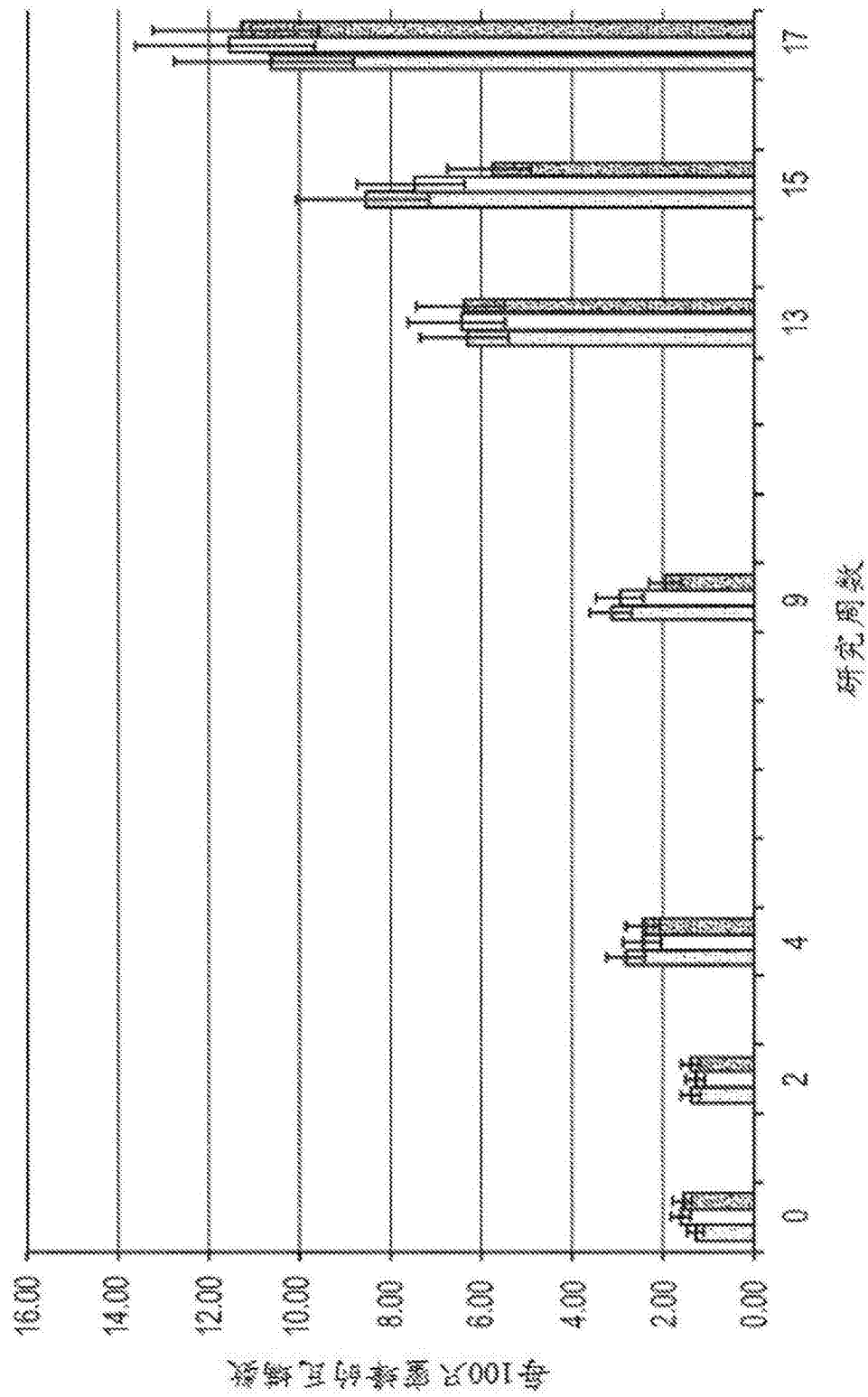


图7

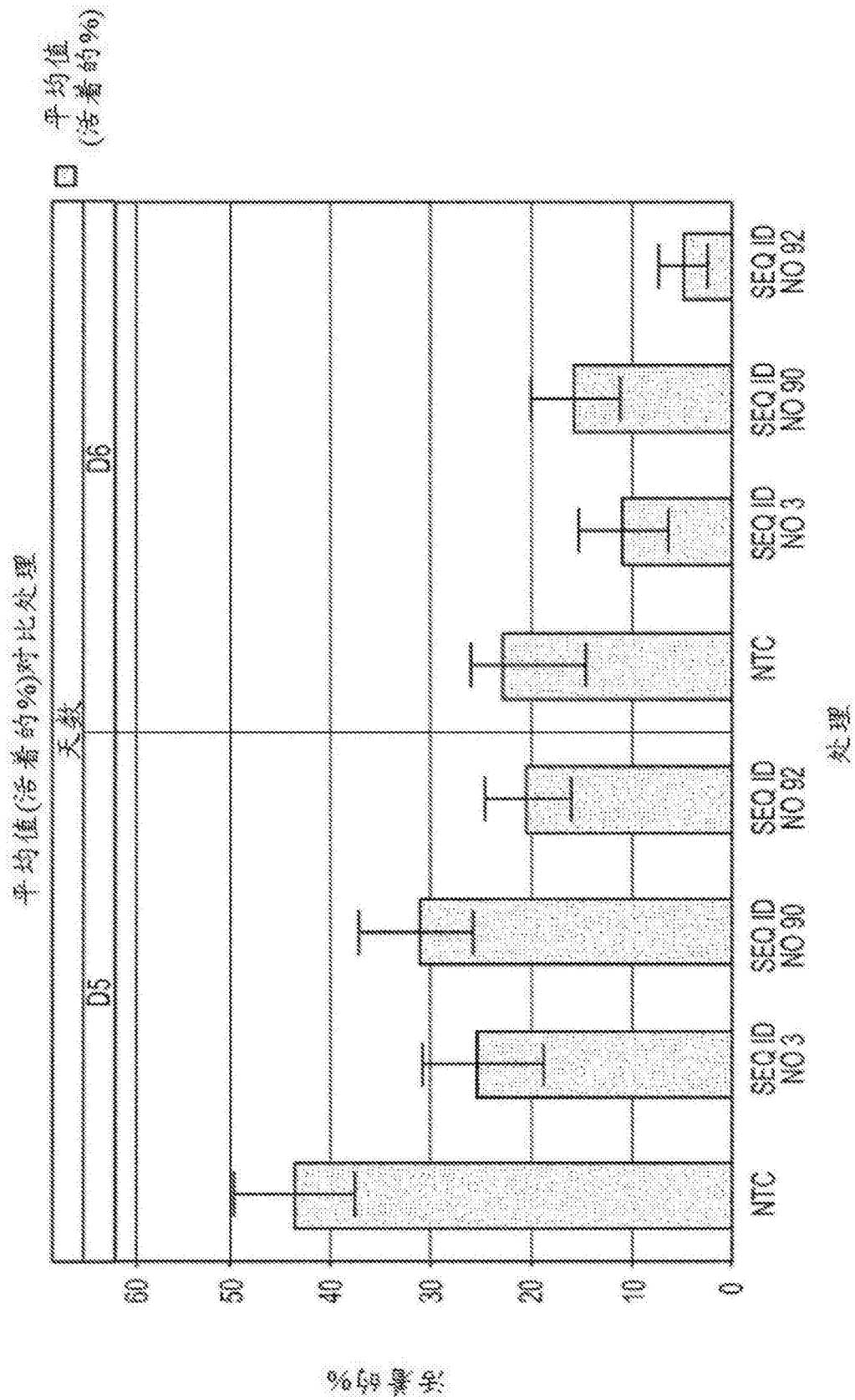


图8

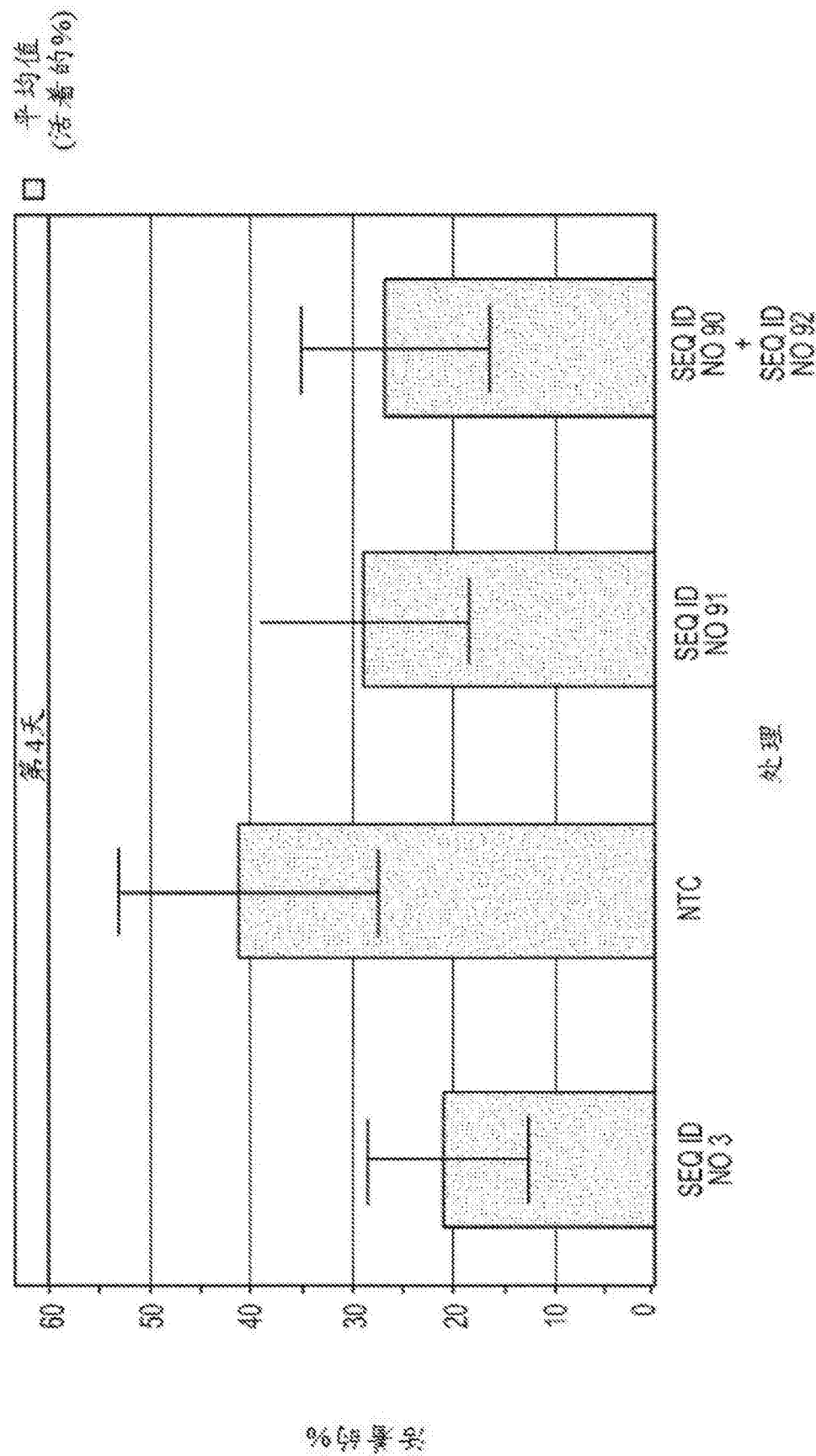


图9

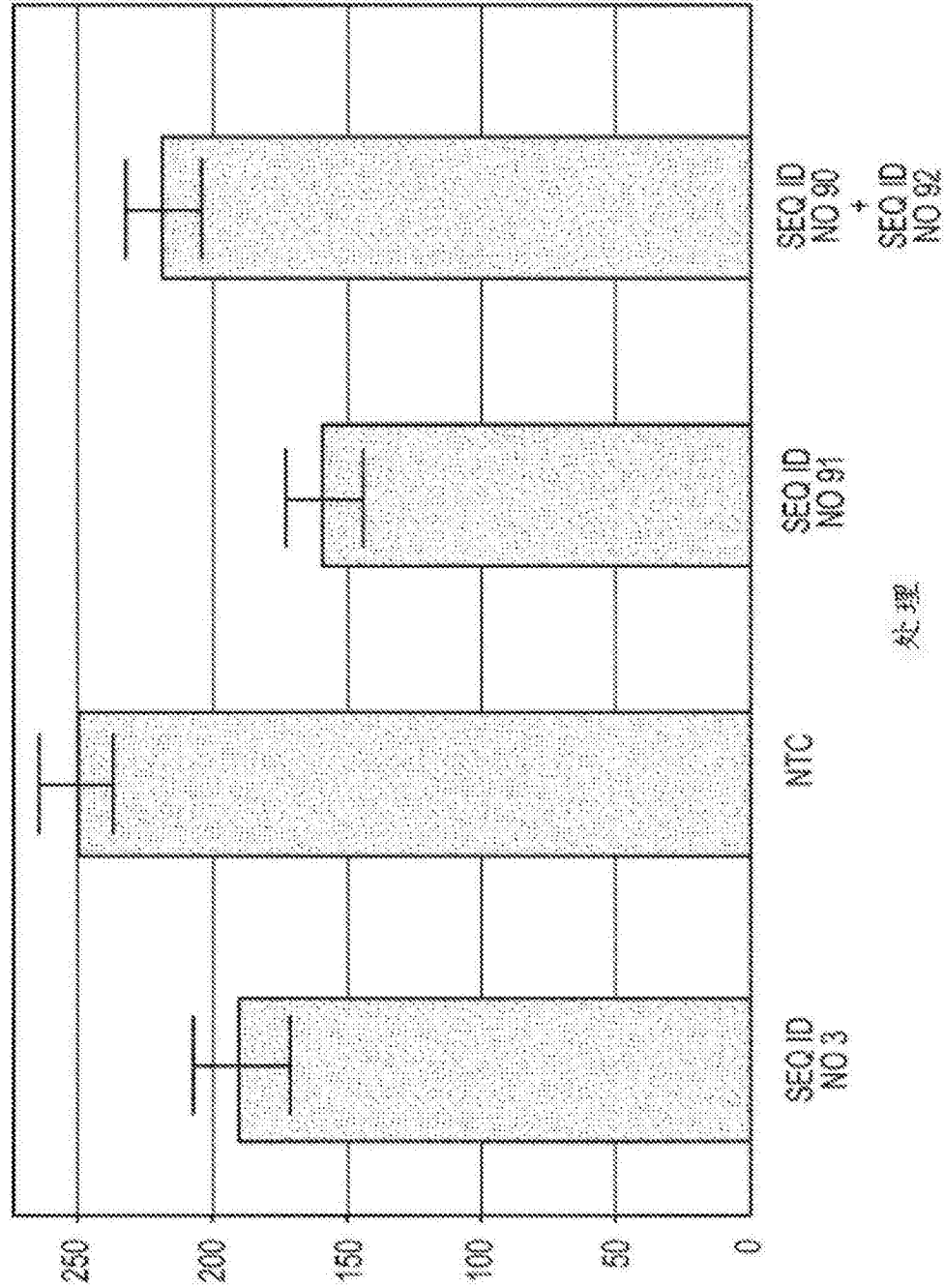


图10

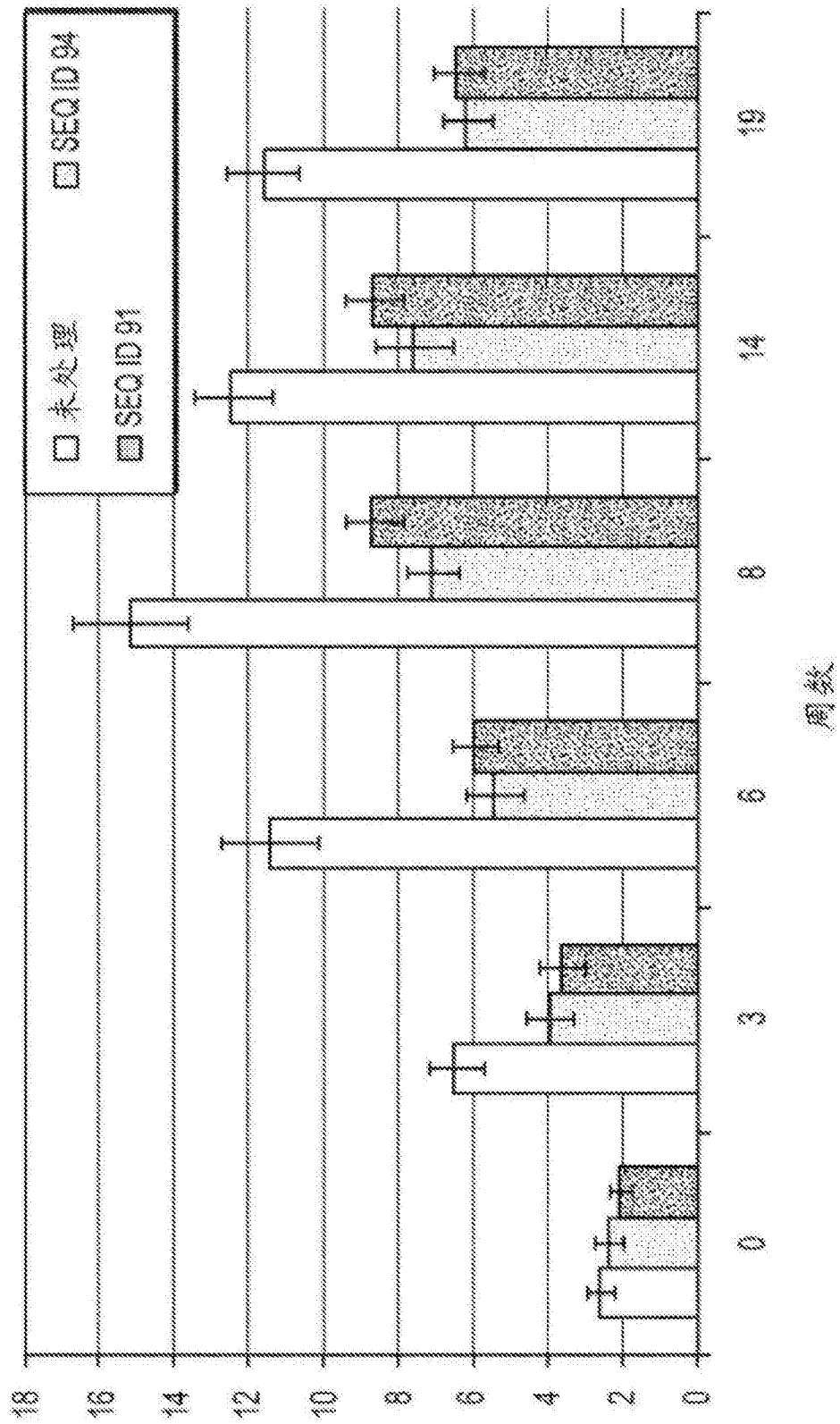


图11