



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201730201 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：105141884

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 12 月 16 日

(51)Int. Cl. : C07H21/04 (2006.01)

C12N15/31 (2006.01)

(30)優先權：2015/12/18 美國

62/269,382

(71)申請人：陶氏農業科學公司 (美國) DOW AGROSCIENCES LLC (US)

美國

(72)發明人：納爾瓦 肯尼士 NARVA, KENNETH (US)；費希萊維奇 伊蓮 FISHILEVICH, ELANE (US)；倫格沙米 木魯蓋森 RANGASAMY, MURUGESAN (US)；弗瑞梅根 L FREY, MEGHAN L. (US)；洛 溫蒂 LO, WENDY (US)；沃登 莎拉 E WORDEN, SARAH E. (US)；甘德拉 普雷姆昌德 GANDRA, PREMCHAND (US)

(74)代理人：惲軼群；劉法正

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：60 項 圖式數：2 共 222 頁

(54)名稱

賦予對鞘翅目及半翅目害蟲之抗性的核糖體蛋白質 L 40 (R P L 4 0) 核酸分子
RIBOSOMAL PROTEIN L40 (RPL40) NUCLEIC ACID MOLECULES THAT CONFER RESISTANCE TO COLEOPTERAN AND HEMIPTERAN PESTS

(57)摘要

此揭示係有關於核酸分子及使用其等用於控制鞘翅目及/或半翅目害蟲的方法，其係透過 RNA 干擾-媒介的靶定編碼與轉錄的非編碼序列在鞘翅目及/或半翅目害蟲中之抑制作用。本揭示亦有關於用於製造基因轉殖植物的方法，該植物表現對控制鞘翅目及/或半翅目害蟲有用的核酸分子，以及由此獲得的植物細胞與植物。

This disclosure concerns nucleic acid molecules and methods of use thereof for control of coleopteran and/or hemipteran pests through RNA interference-mediated inhibition of target coding and transcribed non-coding sequences in coleopteran and/or hemipteran pests. The disclosure also concerns methods for making transgenic plants that express nucleic acid molecules useful for the control of coleopteran and/or hemipteran pests, and the plant cells and plants obtained thereby.

【發明摘要】

G07H 21/04 (2006.01)

G12N 15/31 (2006.01)

【中文發明名稱】

賦予對鞘翅目及半翅目害蟲之抗性的核糖體蛋白質L40(RPL40)核酸分子

【英文發明名稱】

RIBOSOMAL PROTEIN L40 (RPL40) NUCLEIC ACID MOLECULES THAT
CONFER RESISTANCE TO COLEOPTERAN AND HEMIPTERAN PESTS

【中文】

此揭示係有關於核酸分子及使用其等用於控制鞘翅目及/或半翅目害蟲的方法，其係透過RNA干擾-媒介的靶定編碼與轉錄的非編碼序列在鞘翅目及/或半翅目害蟲中之抑制作用。本揭示亦有關於用於製造基因轉殖植物的方法，該植物表現對控制鞘翅目及/或半翅目害蟲有用的核酸分子，以及由此獲得的植物細胞與植物。

【英文】

This disclosure concerns nucleic acid molecules and methods of use thereof for control of coleopteran and/or hemipteran pests through RNA interference-mediated inhibition of target coding and transcribed non-coding sequences in coleopteran and/or hemipteran pests. The disclosure also concerns methods for making transgenic plants that express nucleic acid molecules useful for the control of coleopteran and/or hemipteran pests, and the plant cells and plants obtained thereby.

【指定代表圖】(無)

【代表圖之符號簡單說明】

(無)

【特徵化學式】

(無)

【發明說明書】

【中文發明名稱】

賦予對鞘翅目及半翅目害蟲之抗性的核糖體蛋白質
L40(RPL40)核酸分子

【英文發明名稱】

RIBOSOMAL PROTEIN L40 (RPL40) NUCLEIC
ACID MOLECULES THAT CONFER
RESISTANCE TO COLEOPTERAN AND
HEMIPTERAN PESTS

【技術領域】

【0001】發明領域

優先權主張

此申請案主張2015年12月18日提申之美國專利臨時申請案第62/269,382號之利益，其之整體揭示係在此併入以作為參考資料。

【0002】本發明一般而言係有關於由鞘翅目及/或半翅目害蟲造成的植物損害之遺傳控制。在特定的具體例中，本揭示有關於辨識靶定的編碼與非編碼序列，以及使用重組DNA技術用於轉錄後壓制或抑制靶定的編碼與非編碼序列在鞘翅目及/或半翅目害蟲細胞中的表現，以提供植物保護的效果。

【先前技術】

【0003】發明背景

西方玉米根蟲(western corn rootworm)(WCR)，玉米根螢葉甲(*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte)，為

北美最具破壞性的玉米根蟲物種中之一者，且在美國中西方的玉米種植區為特別重要的事。北方玉米根蟲(northern corn rootworm)(NCR)，北方玉米根蟲 (*Diabrotica barberi* Smith and Lawrence)，為一種密切相關的物種，該者共棲於WCR許多相同的範圍。在美洲還有其他數種相關的葉甲(*Diabrotica*)亞種為重大的害蟲：墨西哥玉米根蟲(Mexican corn rootworm) (MCR)，墨西哥玉米根葉甲 (*D.virgifera zea* Krysan and Smith)；南方玉米根蟲(southern corn rootworm)(SCR)，南方玉米根蟲黃瓜十一星葉甲食根亞種 (*D. undecimpunctata howardi* Barber)；巴西玉米根蟲(*D.balteata* LeConte)；黃瓜十一星葉甲球蟲(*D. undecimpunctata tenella*)；南美葉甲(*D. speciosa* Germar)；以及黃瓜十一星葉甲甘薯猿葉甲蟲 (*D.u.undecimpunctata* Mannerheim)。美國農業部估計玉米根蟲每年造成10億美元歲入的損失，包括8億美元的產量損失以及2億美元的處理費用。

【0004】 WCR與NCR兩者的卵於夏季期間皆沈積在土壤中。該等昆蟲在整個冬季依舊處於卵的階段。這些卵係為橢圓形、白色，且長度小於0.004英吋(0.010 cm)。幼蟲在五月底或六月初孵化，卵孵化的精確時程由於溫度差異與位置而每一年有所不同。初孵化的幼蟲為長度小於0.125英吋(0.3175 cm)的白色蠕蟲。一旦孵化，幼蟲開始取食玉米的根。玉米根蟲歷經3個幼蟲齡期。在取食數周之後，幼蟲蛻皮進入蛹的階段。它們在土壤中成蛹，然後

其等在七月與八月時以成蟲從土壤中出现。成蟲根蟲長度為大約0.25英吋(0.635 cm)。

【0005】玉米根蟲幼蟲在玉米與其他數種禾草物種上完成發育。在黃色狐尾草上飼養的幼蟲出現的較晚，且比起在玉米上飼養的幼蟲，成蟲的頭殼尺寸較小(Ellsbury等人之(2005) *Environ. Entomol.* 34 : 627-634)。WCR成蟲取食玉米鬚(corn silk)、花粉及位於暴露的穗尖(ear tips)上的玉米粒。假若WCR成蟲在玉米生殖組織存在前出現，它們可能會取食葉組織，因而減緩植物的生長，且偶爾會殺死宿主植物。然而，當可以得到偏好的鬚與花粉時，成蟲將會迅速搬移到鬚與花粉。NCR成蟲亦會取食玉米植株的生殖組織，但是相反地，很少取食玉米葉。

【0006】玉米大部分的根蟲損害由幼蟲取食造成。剛孵化的根蟲最初取食纖細的玉米根毛並鑽入根尖內。當幼蟲長得更大時，它們取食主根並且鑽入主根之內。當玉米根蟲的量大量時，幼蟲取食常常會引致根的削減，一直到玉米莖的基部。嚴重的根傷害干擾了根部輸送水分與養分到植物的能力，降低植物的生長，並且引致穀粒生產降低，因而常常使整體產量大大地降低。嚴重的根傷害亦常常引致玉米植物的倒伏，這使得收割更為困難，並且使產量進一步減低。再者，成蟲在玉米生殖組織上的取食可以引致穗尖的鬚消滅。假若在散粉期間此種“鬚修剪(silk clipping)”足夠嚴重，則可能會使授粉中斷。

【0007】可以透過作物輪作、化學殺蟲劑、生物農藥

(例如，形成孢子的革蘭氏陽性細菌，蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*) (*Bt*)))、表現*Bt*毒素的基因轉殖植物，或其等之組合，來嘗試控制玉米根蟲。在耕地使用上作物輪作會遭受到不必要的安置限定的缺點。再者，一些根蟲物種的產卵可能會在玉米或延長滯育以外的作物田間發生，導致卵在多年期間孵化，因而使玉米及大豆實行輪作的有效性減輕。

【0008】實現玉米根蟲控制依賴得最嚴重的策略係化學殺蟲劑。儘管如此，化學殺蟲劑的使用不是完美的玉米根蟲控制策略；儘管使用了殺蟲劑，可是當將化學殺蟲劑的成本添加至可能發生的玉米根蟲損害費用時，美國每年因玉米根蟲的損失可能超過10億美元。高族群的幼蟲、暴雨及殺蟲劑的不當施用全部都可能會引致玉米根蟲的控制不夠充分。再者，殺蟲劑之持續使用可能會挑選出抗殺蟲劑的根蟲品系，以及因為許多殺蟲劑對非標靶物種有毒性，所以提高顯著的环境關注。

【0009】臭蟲及其他的半翅目昆蟲(異翅亞目(*heteroptera*))為另一重要的農業害蟲綜合體。已知在世界各地有超過50種密切相關的臭蟲會造成作物損傷(McPherson & McPherson, R.M. (2000) *Stink bugs of economic importance in America north of Mexico* CRC Press)。此等半翅目昆蟲存在於大量的重要作物中，包括玉蜀黍(*maize*)、大豆、水果、蔬菜，以及穀類。

【0010】臭蟲於達到成蟲階段之前，經歷多個若蟲的

階段。從卵發育至成蟲的時間是大約30-40天。若蟲和成蟲二者均取食軟組織的汁液，其等亦注入消化酵素至軟組織之內，引致口外組織消化及壞死。繼而攝入消化的植物材料和營養物。植物的維管束系耗盡水及營養物導致植物組織損傷。發育的穀物和種子損傷為最顯著的，因產量及發芽顯著地下降。於溫暖的氣候下出現多個世代，導致重大的昆蟲壓力。現在的臭蟲管理倚賴在個別田野之殺蟲劑處理。因而，迫切地需要替代的管理策略來使不間斷的作物損失達到最小。

【0011】RNA干擾(RNAi)係為一種利用內源性細胞途徑之方法，憑此，對一靶定基因序列之適當大小的全部或任何部分有特異性的干擾RNA(iRNA)分子(例如，一種dsRNA分子)，會引致由此編碼的mRNA之降解。近年來，RNAi在許多物種與實驗系統中已被使用於執行基因"減量(knockdown)"；舉例而言，秀麗隱桿線蟲(*Caenorhabditis elegans*)、植物、昆蟲胚胎及組織培養中的細胞。參閱，例如，Fire等人之(1998) *Nature* 391：806-811；Martinez等人之(2002) *Cell* 110：563-574；McManus及Sharp之(2002) *Nature Rev. Genetics* 3：737-747。

【0012】RNAi透過內源性途徑，包括DICER蛋白複合體，來達到mRNA降解。DICER將長的dsRNA分子切割成為大約20個核苷酸的短片段，命名為小干擾RNA(siRNA)。siRNA解開成兩個單股RNA：過客股

(passenger strand)及引導股(guide strand)。過客股被降解，而引導股係併入RNA誘導的靜默複合體(RISC)內。當引導股特異地結合至mRNA分子之互補序列且誘導藉由阿革蛋白家族(Argonaute)之切割時—阿革蛋白家族(Argonaute)為RISC複合體的催化劑組份—會發生轉錄後基因靜默作用。儘管初始限制的siRNA及/或miRNA濃度，但是此過程已知係系統性散布遍及一些真核生物體中，諸如植物、線蟲及一些昆蟲。

【0013】美國專利第7,612,194號及美國專利公開案第 2007/0050860 號、第 2010/0192265 號與第 2011/0154545號，揭露了從玉米根螢葉甲(*D. v. virgifera* LeConte)的蛹所單離出的9112個表現序列標籤(EST)的序列庫。在美國專利第7,612,194號及美國專利公開案第 2007/0050860號中，建議可操縱地鏈接一個啟動子至一種核酸分子，該核酸分子係與該處揭露的玉米根螢葉甲(*D. v. virgifera*)液泡型H⁺-ATP酶(V-ATP酶)的數個特定的部分序列之一者互補，用於在植物細胞中表現反義RNA。美國專利公開案第2010/0192265號建議可操縱地鏈接一啟動子至一種核酸分子，該核酸分子係互補於玉米根螢葉甲(*D. v. virgifera*)未知且未揭露功能基因之特定的部分序列(該部分序列係聲明為與秀麗隱桿線蟲(*C. elegans*)中C56C10.3的基因產物有58%的同一性)，用於在植物細胞中表現反義RNA。美國專利公開案第2011/0154545號建議可操縱地鏈接一啟動子至一種核酸分子，該核酸分子係

互補於玉米根螢葉甲(*D. v. virgifera*)外被體 β 次單元基因之二個特定的部分序列，用於在植物細胞中表現反義RNA。再者，美國專利第7,943,819號揭露了從玉米根螢葉甲(*D. v. virgifera* LeConte)之幼蟲、蛹及切開的中腸單離出的906個表現序列標籤(EST)的序列庫，以及建議可操縱地鏈接一啟動子至一種核酸分子，該核酸分子係互補於玉米根螢葉甲(*D. v. virgifera*)帶電荷的多胞體蛋白4b基因之特定的部分序列，用於在植物細胞中表現雙股RNA。

【0014】在美國專利第7,612,194號，以及美國專利公開案第2007/0050860號、第2010/0192265號與第2011/0154545號中，除了V-ATP酶之數個特定的部分序列及未知功能之基因的特定部分序列之外，關於使用在其中列出超過9000個序列之任何特定序列用於RNA干擾，沒有提供進一步的建議。更進一步地，美國專利第7,612,194號與美國專利公開案2007/0050860號及第2010/0192265號，以及第2011/0154545號中無一者，對於所提供超過9000個序列在玉米根蟲物種中使用做為dsRNA或siRNA時，何者將為致命的或甚至是有用的，提供任何引導。美國專利第7,943,819號除了帶電荷的多胞體蛋白4b基因之特定的部分序列之外，對於使用在其中列出超過900個序列之任何特定序列用於RNA干擾，沒有提供任何的建議。再者，美國專利第7,943,819號，對於所提供超過900個序列在玉米根蟲物種中使用做為dsRNA或siRNA時，何者將

為致命的或甚至是有用的，沒有提供任何引導。美國專利公開案U.S.第2013/040173號及PCT專利公開案第WO 2013/169923號中，說明使用由玉米根螢葉甲(*Diabrotica virgifera*)Snf7基因衍生的序列用於玉蜀黍(maize)之RNA干擾。(於Bolognesi等人之(2012) PLoS ONE 7(10): e47534. doi:10.1371/ journal.pone. 0047534中亦有揭示)。

【0015】於使用做為dsRNA或siRNA時，互補於玉米根蟲DNAs(例如前述)的序列中壓倒性的多數，於玉米根蟲物種內不是致命的。舉例而言，Baum等人(2007, Nature Biotechnology 25:1322-1326)，描述藉由RNAi來抑制數個WCR基因的標靶的效果。這些作者記錄26個他們測試的靶定基因中，有8者在超過520 ng/cm²之非常高的iRNA(例如，dsRNA)濃度時，無法提供實驗上顯著的鞘翅目害蟲死亡率。

【0016】美國專利第7,612,194號以及美國專利公開案第2007/0050860號的作者首先報導於玉米植物中靶定西方玉米根蟲之植物界RNAi(Baum等人(2007) Nat. Biotechnol. 25(11):1322-6)。這些作者描述一種高輸出量活體內飲食RNAi系統，用來篩選可能的靶定基因供開發基因轉殖的RNAi玉蜀黍(maize)。在起始的290個標靶基因池(gene pool)中，只有14者展現出幼蟲控制的潛力。最有效的雙股RNA(dsRNA)中之一者係靶定一種編碼液泡型ATP酶次單元A(V-ATP酶)，以低濃度的dsRNA導致

快速抑制對應的內源性mRNA且觸發特異性RNAi反應。因而，這些作者首次用充分的證據證明植物界RNAi作為可能的害蟲管理工具之潛力，而同時證明有效的標靶不能正確地先驗(*a priori*)鑑定，即使是來自相對小的候選基因組。

【發明內容】

【0017】發明概要

本文揭露的為核酸分子(例如，靶定基因、DNAs、dsRNAs、siRNAs、shRNAs、miRNAs及hpRNAs)及其等之使用方法，用於控制鞘翅目害蟲，包括舉例而言，玉米根螢葉甲(*D. v. virgifera* LeConte)(西方玉米根蟲，"WCR")；北方玉米根蟲(*D. barberi* Smith and Lawrence)(北方玉米根蟲，"NCR")；黃瓜十一星葉甲食根亞種(*D. u. howardi* Barber)(南方玉米根蟲，"SCR")；墨西哥玉米根葉甲(*D. v. zea* Krysan and Smith)(墨西哥玉米根蟲，"MCR")；巴西玉米根蟲(*D. balteata* LeConte)；黃瓜十一星葉甲球蟲(*D. u. tenella*)；南美葉甲(*D. speciosa* Germar)；及黃瓜十一星葉甲甘薯猿葉甲蟲(*D. u. undecimpunctata* Mannerheim)，以及半翅目害蟲，包括舉例而言英雄美洲蟪(*Euschistus heros* (Fabr.)) (新熱帶區褐臭蟲(Neotropical Brown Stink Bug)，"BSB")，南方綠蟪象(*Nezara viridula* (L.)) (南方綠臭蟲(Southern Green Stink Bug))，蓋德擬壁蟪(*Piezodorus guildinii*(Westwood))(紅帶臭蟲(Red-banded Stink

Bug))，褐翅蟥(*Halyomorpha halys* (Stål))(褐紋臭蟲(Brown Marmorated Stink Bug))，綠色蟥(*Chinavia hilare* (Say)) (綠臭蟲(Green Stink Bug))，褐美洲蟥(*Euschistus servus* (Say)) (褐臭蟲(Brown Stink Bug))，*Dichelops melacanthus*(Dallas)，*Dichelops furcatus* (F.)，*Edessa meditabunda*(F.)，肩蟥(*Thyanta perditor*(F.)) (新熱帶區紅肩臭蟲(Neotropical Red Shouldered Stink Bug)，*Chinavia marginatum* (Palisot de Beauvois)，植物臭蟲(*Horcias nobilellus*) (Berg) (棉花臭蟲(Cotton Bug))，*Taedia stigmosa*(Berg)，秘魯棉紅蟥(*Dysdercus peruvianus*) (Guérin-Méneville)，*Neomegalotomus parvus*(Westwood)，喙綠蟥(*Leptoglossus zonatus* (Dallas))，*Niesthrea sidae* (F.)，豆莢草盲蟥(*Lygus hesperus*(Knight)) (西部牧草盲蟥(Western Tarnished Plant Bug))，以及美國牧草盲蟥(*Lygus lineolaris*) (Palisot de Beauvois)。在特定例子中，揭露了示範性的核酸分子，其等可能同源於在一種鞘翅目及/或半翅目害蟲中的一個或多個天然的核酸序列之至少一部分。

【0018】在此等及進一步的實例中，天然的核酸序列可以為一種靶定基因，該靶定基因可以為，舉例而言但不限於：涉及代謝過程或涉及幼蟲/若蟲發育之產物。在一些例子中，藉由一種包含同源於其等之序列的核酸分子，予以轉譯後抑制一種靶定基因的表現，在鞘翅目及/或半翅目

害蟲可能為致命的，或是引致生長及/或發育降低。在特定實例中，可以選擇一基因作為用於轉錄後靜默之靶定基因，該基因編碼一融合蛋白質，其轉譯後切割成核糖體蛋白質RPL40及單泛素(全體於此稱為*rpL40*)。在特定實例中，一種有用於轉錄後抑制之靶定基因係新穎的基因，於此稱為*rpL40*。本文因而揭露一種經單離的核酸分子，其包含*rpL40*的核苷酸序列(序列辨識編號：1、3、5和89)；*rpL40*(序列辨識編號：1、3、5和89)之互補物；以及前述之任何片段。

【0019】亦揭露了核酸分子，其包含編碼一種多肽之核苷酸序列，該多肽係至少大約85%同一於一種靶定基因產物(舉例而言，一種稱為核糖體蛋白質RPL40及/或單泛素的基因產物，全體於此稱為RPL40)之內的胺基酸序列。舉例而言，一種核酸分子可以包含編碼一種多肽之核苷酸序列，該多肽係至少85%同一於序列辨識編號：2、4、6、7、8，及90之胺基酸序列(RPL40蛋白)。在特定實例中，一種核酸分子包含編碼一種多肽之核苷酸序列，該多肽係至少85%同一於RPL40產物之內的胺基酸序列。進一步揭露包含一種核苷酸序列之核酸分子，其中該核苷酸序列係為編碼一種多肽之核苷酸序列的反向互補物，其中該多肽係至少85%同一於一種靶定基因產物內的胺基酸序列。

【0020】亦揭露可以使用於生產iRNA(例如，dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA以及hpRNA)分子的cDNA序列，該iRNA係互補於一種鞘翅目及/或半翅目害

蟲靶定基因的全部或部分，舉例而言 $rpL40$ 。在特定具體
 例中，dsRNAs、siRNAs、shRNA、miRNAs及/或hpRNAs
 可以藉由一種基因改造生物體，諸如植物或細菌，在活體
 外或活體內生產。在特定實例中，揭露了可以使用來生產
 iRNA分子之cDNA分子，該等iRNA分子係互補於 $rpL40$
 基因之全部或部分(例如，序列辨識編號：1、3、5，以及
 89)。

【0021】進一步揭露用於抑制鞘翅目及/或半翅目害
 蟲中一種必要基因表現的構件，以及用於用於防護植物不
 受鞘翅目及/或半翅目害蟲傷害的構件。一種用於抑制鞘翅
 目及/或半翅目害蟲中的一種必要基因表現的構件為一種
 單股或雙股RNA分子，其係由下列中至少一者所組成：序
 列辨識編號：9(葉甲(*Diabrotica*) $rpL40-1$ 區域1，於此有
 時稱為 $rpL40-1$ reg1)，或序列辨識編號：10(葉甲 $rpL40-3$
 區域3，於此有時稱為 $rpL40-3$ reg3)，或序列辨識編號：
 11(葉甲 $rpL40-1$ 版本1，於此有時稱為 $rpL40-1$ v1)，或序
 列辨識編號：12(葉甲 $rpL40-1$ 版本2，於此有時稱為
 $rpL40-1$ v2)，或序列辨識編號：13(葉甲 $rpL40-1$ 版本3，
 於此有時稱為 $rpL40-1$ v3)，或序列辨識編號：14(葉甲
 $rpL40-1$ 版本4，於此有時稱為 $rpL40-1$ v4)，或序列辨識
 編號：15(葉甲 $rpL40-1$ 版本5，於此有時稱為 $rpL40-1$
 v5)，或序列辨識編號：91(英雄美洲蟥(*Euschistus heros*)
 $rpL40$ 區域1，於此有時稱為BSB_ $rpL40$ reg1)，或序列辨
 識編號：92(英雄美洲蟥 $rpL40$ 版本1，於此有時稱為

BSB_*rpL40* v1)；或是其之互補物。用於抑制鞘翅目及/或半翅目害蟲中一種必要的基因表現的構件之功能均等物包括單股或雙股RNA分子，其實質上同源於一種WCR或BSB基因之全部或部分，其包含序列辨識編號：1、3、5或89。一種用於防護植物不受鞘翅目及/或半翅目害蟲傷害的構件係一種DNA分子，該DNA分子包含可操縱地鏈接至一啟動子之一種核酸序列，該核酸序列編碼用於抑制在一種鞘翅目及/或半翅目害蟲中必要的基因表現的構件，其中該DNA分子係能夠整合到植物之基因組中。

【0022】揭露用於控制一種昆蟲害蟲(例如，鞘翅目或半翅目害蟲)族群之方法，其包含提供一種iRNA(例如dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA以及hpRNA)分子至一種昆蟲害蟲(例如，鞘翅目或半翅目害蟲)，該iRNA一旦被該害蟲攝取時，即起作用以抑制該害蟲內的生物功能。

【0023】在一些具體例中，用於控制一種鞘翅目害蟲族群之方法包含提供一種iRNA分子至該鞘翅目害蟲，該iRNA分子包含選自於下列所構成的群組之多核苷酸的全部或部分：序列辨識編號：98；序列辨識編號：98之互補物；序列辨識編號：99；序列辨識編號：99之互補物；序列辨識編號：100；序列辨識編號：100之互補物；序列辨識編號：101；序列辨識編號：101之互補物；序列辨識編號：102；序列辨識編號：102之互補物；序列辨識編號：103；序列辨識編號：103之互補物；序列辨識編號：104；序列辨識編號：104之互補物；序列辨識編號：105；序列

辨識編號：105之互補物；序列辨識編號：106；序列辨識編號：106之互補物；序列辨識編號：107；序列辨識編號：107之互補物；一種與鞘翅目害蟲(例如WCR)之天然 $rpL40$ 多核苷酸雜交之多核苷酸；一種與鞘翅目害蟲之天然 $rpL40$ 多核苷酸雜交之多核苷酸的互補物；一種與葉甲(*Diabrotica*)生物體(例如WCR)之天然編碼多核苷酸雜交之多核苷酸，該天然編碼多核苷酸包含下列任一者的全部或部分：序列辨識編號：1、3、5及9-15；以及一種與葉甲生物體之天然編碼多核苷酸雜交之多核苷酸的互補物，該天然編碼多核苷酸包含下列任一者的全部或部分：序列辨識編號：1、3、5及9-15。

【0024】在一些具體例中，一種用於控制一種半翅目害蟲族群之方法包含提供一種iRNA分子至該半翅目害蟲，該iRNA分子包含選自於下列所構成的群組之多核苷酸的全部或部分：序列辨識編號：108；序列辨識編號：108之互補物；序列辨識編號：109；序列辨識編號：109之互補物；序列辨識編號：110；序列辨識編號：110之互補物；一種與半翅目害蟲(例如BSB)之天然 $rpL40$ 多核苷酸雜交之多核苷酸；一種與半翅目害蟲之天然 $rpL40$ 多核苷酸雜交之多核苷酸的互補物；一種與半翅目生物體(例如BSB)之天然編碼多核苷酸雜交之多核苷酸，該天然編碼多核苷酸包含下列任一者的全部或部分：序列辨識編號：76、78及80-82；以及一種與半翅目生物體之天然編碼多核苷酸雜交之多核苷酸的互補物，該天然編碼多核苷酸包

含下列任一者的全部或部分：序列辨識編號：76、78及80-82。

【0025】在特定的具體例中，一種被該昆蟲害蟲攝取時即起作用以抑制該害蟲內的生物功能之iRNA分子係從DNA轉錄，該DNA包含選自於下列所構成的群組之多核苷酸的全部或部分：序列辨識編號：1、3、5、9-15、89及91-92；下列之互補物：序列辨識編號：1、3、5、9-15、89及91-92；一種葉甲(*Diabrotica*)生物體(例如WCR)或半翅目生物體(例如BSB)之天然編碼序列，該天然編碼序列包含下列任一者的全部或部分：序列辨識編號：1、3、5、9-15、89及91-92；一種葉甲生物體或半翅目生物體之天然編碼序列的互補物，該天然編碼序列包含下列任一者的全部或部分：序列辨識編號：1、3、5、9-15、89及91-92；一種葉甲生物體或半翅目生物體之天然非編碼序列，該天然非編碼序列轉錄成天然RNA分子，該天然RNA分子包含下列任一者的全部或部分：序列辨識編號：1、3、5、9-15、89及91-92；以及一種葉甲生物體或半翅目生物體之天然非編碼序列之互補物，該天然非編碼序列轉錄成天然RNA分子，該天然RNA分子包含下列任一者的全部或部分：序列辨識編號：1、3、5、9-15、89及91-92。

【0026】於此亦揭露的方法係為在其中可在一種飲食為基礎的分析中，或在表現dsRNAs、siRNAs、shRNAs、miRNAs及/或hpRNAs的基因改造植物細胞中，提供dsRNAs、siRNAs、shRNAs、miRNAs及/或

hpRNAs至一種鞘翅目及/或半翅目害蟲。在這些及進一步實例中，該dsRNAs、siRNAs、shRNAs、miRNAs及/或hpRNAs可以由鞘翅目害蟲幼蟲及/或半翅目害蟲若蟲攝入。攝入本發明的dsRNAs、siRNAs、shRNAs、miRNAs及/或hpRNAs可能繼而引致幼蟲或若蟲中的RNAi，該者轉而可能引致對鞘翅目及/或半翅目害蟲生存力(viability)必要的基因之靜默作用，並最終導致幼蟲/若蟲死亡。因此，揭露了方法，其中包含對鞘翅目及/或半翅目害蟲控制有用之示範性核酸序列的核酸分子，係被提供至一種鞘翅目及/或半翅目害蟲。在特定實例中，藉由使用本發明之核酸分子而控制的鞘翅目及/或半翅目害蟲可以為WCR、NCR、SCR、MCR、巴西玉米根蟲(*D. balteata*)、黃瓜十一星葉甲球蟲(*D. u. tenella*)、南美葉甲(*D. speciosa*)、黃瓜十一星葉甲甘薯猿葉甲蟲(*D. u. undecimpunctata*)、英雄美洲蟥(*Euschistus heros*)、褐美洲蟥(*E. servus*)、蓋德擬壁蟥(*Piezodorus guildinii*)、褐翅蟥(*Halyomorpha halys*)、南方綠蟥象(*Nezara viridula*)、綠色蟥(*Chinavia hilare*)、*C. marginatum*、*Dichelops melacanthus*、*D. furcatus*、*Edessa meditabunda*、肩蟥(*Thyanta perditor*)、植物臭蟲(*Horcias nobilellus*)、*Taedia stigmosa*、秘魯棉紅蟥(*Dysdercus peruvianus*)、*Neomegalotomus parvus*、喙綠蟥(*Leptoglossus zonatus*)、*Niesthrea sidae*、豆莢草盲蟥(*Lygus hesperus*)，及/或美國牧草盲蟥(*Lygus*

lineolaris)。

【0027】從下列參照附隨的圖1及2進行的數個具體例之詳細說明，前述特徵及其它特徵將變得更為明顯。

【圖式簡單說明】

【0028】圖1包括從單一轉錄模板以單一對引子來提供dsRNA所使用的策略之描述。

【0029】圖2包括從二個轉錄模板來提供dsRNA所使用的策略之描述。

【實施方式】

【0030】較佳實施例之詳細說明

序列表

在附隨的序列表中所鑑定的核酸序列係使用核苷酸鹼基的標準字母縮寫來表示，如在37 C.F.R. § 1.822中所界定者。所列之核酸及胺基酸序列係界定具有以所述方式配置的核苷酸及胺基酸單體之分子(亦即，分別為多核苷酸及多肽)。所列之核酸及胺基酸序列亦各自界定一類的多核苷酸或多肽，其包含以所述方式配置的核苷酸及胺基酸單體。鑑於遺傳密碼的冗餘性(redundancy)，會瞭解到含括編碼序列之核苷酸序列亦描述該類的多核苷酸，其編碼如參考序列所組成的多核苷酸同樣的多肽。進一步會瞭解到一胺基酸序列係描述編碼該多肽之該類的多核苷酸 ORFs。

【0031】每一核酸序列僅有顯示一股，但是會瞭解互補股係藉由參照至展現股而含括。由於初級核酸序列之互

補物及反向互補物必需由該初級序列予以揭露，所以一核酸序列之互補序列與反向互補序列係藉由參照至該核酸序列而含括，除非其係另有明確聲明(或其從序列出現之上下文中係清楚的)。再者，因本技藝瞭解一RNA股之核苷酸序列係由轉錄成該RNA之DNA的序列所決定(但是尿嘧啶(U)核鹼基取代胸腺嘧啶(T))，所以一RNA序列係藉由參照編碼該RNA之DNA序列而含括。在附隨的序列表中：

【0032】序列辨識編號：1顯示一種包含來自玉米根螢葉甲(*Diabrotica virgifera*)之 $rpL40-1$ 的DNA序列。

【0033】序列辨識編號：2顯示一種來自玉米根螢葉甲之RPL40-1蛋白質的胺基酸序列。

【0034】序列辨識編號：3顯示一種包含來自玉米根螢葉甲之 $rpL40-2$ 的DNA序列。

【0035】序列辨識編號：4顯示一種來自玉米根螢葉甲之RPL40-2蛋白質的胺基酸序列。

【0036】序列辨識編號：5顯示一種包含來自玉米根螢葉甲之 $rpL40-3$ 的DNA序列。

【0037】序列辨識編號：6顯示一種來自玉米根螢葉甲之RPL40-3蛋白質的胺基酸序列。

【0038】序列辨識編號：7顯示一種來自玉米根螢葉甲序列辨識編號：5之假想蛋白質蛋白質的胺基酸序列。

【0039】序列辨識編號：8顯示一種來自玉米根螢葉甲序列辨識編號：5之假想蛋白質蛋白質的胺基酸序列。

【0040】序列辨識編號：9顯示一種來自玉米根螢葉

甲之 $rpL40-1$ $reg1$ (區域1)的DNA序列，其係用於活體外dsRNA合成(於5'及3'端之T7啟動子序列未顯示)。

【0041】序列辨識編號：10顯示一種來自玉米根螢葉甲之 $rpL40-3$ $reg3$ (區域3)的DNA序列，其係用於活體外dsRNA合成(於5'及3'端之T7啟動子序列未顯示)。

【0042】序列辨識編號：11顯示一種來自玉米根螢葉甲之 $rpL40-1$ $v1$ (版本1)的DNA反相互補序列，其係用於活體外dsRNA合成(於5'及3'端之T7啟動子序列未顯示)。

【0043】序列辨識編號：12顯示一種來自玉米根螢葉甲之 $rpL40-1$ $v2$ (版本2)的DNA序列，其係用於活體外dsRNA合成(於5'及3'端之T7啟動子序列未顯示)。

【0044】序列辨識編號：13顯示一種來自玉米根螢葉甲之 $rpL40-1$ $v3$ (版本3)的DNA序列，其係用於活體外dsRNA合成(於5'及3'端之T7啟動子序列未顯示)。

【0045】序列辨識編號：14顯示一種來自玉米根螢葉甲之 $rpL40-1$ $v4$ (版本4)的DNA序列，其係用於活體外dsRNA合成(於5'及3'端之T7啟動子序列未顯示)。

【0046】序列辨識編號：15顯示一種來自玉米根螢葉甲之 $rpL40-1$ $v5$ (版本5)的DNA序列，其係用於活體外dsRNA合成(於5'及3'端之T7啟動子序列未顯示)。

【0047】序列辨識編號：16顯示一種T7噬菌體啟動子之DNA序列。

【0048】序列辨識編號：17顯示一種YFP編碼區域區段之DNA序列，其係用於活體外dsRNA合成(位於5'及3'

端之T7啟動子序列未顯示)。

【0049】序列辨識編號：18至31顯示使用來擴增來自玉米根螢葉甲之 $rpL40$ 次單元序列部分之引子，該 $rpL40$ 次單元序列含有 $rpL40$ reg1及 $rpL40$ reg3。

【0050】序列辨識編號：32顯示一種YFP蛋白質編碼序列。

【0051】序列辨識編號：33顯示一種膜聯蛋白(Annexin)區域1之DNA序列。

【0052】序列辨識編號：34顯示一種膜聯蛋白區域2之DNA序列。

【0053】序列辨識編號：35顯示一種 β 紅血球膜骨架蛋白質(spectrin)2區域1之DNA序列。

【0054】序列辨識編號：36顯示一種 β 紅血球膜骨架蛋白質2區域2之DNA序列。

【0055】序列辨識編號：37顯示一種mtRP-L4區域1之DNA序列。

【0056】序列辨識編號：38顯示一種mtRP-L4區域2之DNA序列。

【0057】序列辨識編號：29至66顯示引子，其等使用來擴增YFP、膜聯蛋白、 β 紅血球膜骨架蛋白質2，以及mtRP-L4之基因區域用於dsRNA合成。

【0058】序列辨識編號：67顯示一種玉蜀黍(maize)DNA序列，其編碼一種類TIP41蛋白質。

【0059】序列辨識編號：68顯示寡核苷酸T20NV之

DNA序列。

【0060】序列辨識編號：69至73顯示引子及探針序列，其等使用來測量玉蜀黍(maize)之轉錄本位準。

【0061】序列辨識編號：74顯示一種SpecR編碼區域的部分之DNA序列，其係用於二元載體主幹偵測。

【0062】序列辨識編號：75顯示一種AAD1編碼區域的部分之DNA序列，其係用於基因複本數(genomic copy number)分析。

【0063】序列辨識編號：76顯示一種玉蜀黍(maize)轉化酶基因之DNA序列。

【0064】序列辨識編號：77至85顯示引子及探針序列，其等使用於基因複本數分析。

【0065】序列辨識編號：86至88顯示引子及探針序列，其等使用於玉蜀黍(maize)表現分析。

【0066】序列辨識編號：89顯示一種來自新熱帶區褐臭蟲 (Neotropical Brown Stink Bug)(英雄美洲蟬 (*Euschistus heros*))之BSB *rpL40*轉錄本的示範性DNA序列。

【0067】序列辨識編號：90顯示一種來自英雄美洲蟬RPL40蛋白質之胺基酸序列。

【0068】序列辨識編號：91顯示一種來自英雄美洲蟬之BSB_*rpL40* reg1(區域1)的DNA序列，其係用於活體外dsRNA合成(於5'及3'端之T7啟動子序列未顯示)。

【0069】序列辨識編號：92顯示一種來自英雄美洲蟬

之BSB_*rpL40* v1(版本1)的DNA序列，其係用於活體外dsRNA合成(於5'及3'端之T7啟動子序列未顯示)。

【0070】序列辨識編號：93-94顯示引子，使用來擴增來自英雄美洲蟥*rpL40*序列的部分，該序列包含BSB_*rpL40* reg1。

【0071】序列辨識編號：95為YFP-標靶dsRNA之意義股：YFPv2。

【0072】序列辨識編號：96-97顯示引子，其等使用來擴增YFP-標靶dsRNA的部分：YFPv2。

【0073】序列辨識編號：98-110顯示從核酸轉錄之示範性RNAs，該等核酸包含示範性*rpL40*多核苷酸及其等之片段。

【0074】序列辨識編號：111顯示一種IDT Custom Oligo探針*rpl40* PRB Set1，用FAM予以標記且用Zen及Iowa Black淬滅劑予以雙重淬滅。

【0075】序列辨識編號：112顯示一種示範性鏈接子多核苷酸，當其轉錄成RNA轉錄本會形成一“環”，而形成髮夾結構。

詳細說明

I. 數個具體例概述

【0076】吾人發展RNA干擾(RNAi)作為昆蟲害蟲管理的工具，其係使用表現dsRNA之基因轉殖植物之最可能靶定的害蟲物種之一者；西方玉米根蟲。到現在為止，提議作為根蟲幼蟲內RNAi標靶的多數基因實際上並沒有實

現其等之目的。於此，吾人描述於例示性昆蟲害蟲：西方玉米根蟲以及新熱帶區褐臭蟲(*Neotropical brown stink bug*)中，RNAi媒介的核糖體蛋白質*L40(rpL40)*之減量(knockdown)，舉例而言，經由攝入或注入*rpL40* dsRNA來遞送iRNA分子時，顯示出致命的表型。於此之具體例中，藉由餵食而遞送*rpL40* dsRNA至昆蟲的能力，賦予對於昆蟲(例如鞘翅目或半翅目)害蟲管理非常有用的RNAi效應。透過組合*rpL40*-媒介的RNAi與其他有用的RNAi標靶(譬如，*ROP*(美國專利申請公開案第14/577811號)、*RNAPII*(美國專利申請公開案第14/577854號)、*RNA聚合酶II* RNAi標靶(美國專利申請案第62/133,214號)、*RNA聚合酶II215* RNAi標靶(美國專利申請案第62/133,202號)、*RNA聚合酶II33* RNAi標靶(美國專利申請案第62/133,210號)、*ncm* RNAi標靶(美國專利申請案第62/095487號)、*snap25* RNAi標靶(美國專利申請案第62/193502號)、*轉錄延長因子spt5* RNAi標靶(美國專利申請案第62/168,613號)、*轉錄延長因子spt6* RNAi標靶(美國專利申請案第62/168,606號)、*COPI α*(美國專利申請案第62/063199號)、*COPI γ*(美國專利申請案第62/063192號)、*COPI δ*(美國專利申請案第62/063216號)、*COPI β*(美國專利申請案第62/063203號)、*sec23*(美國專利申請案第61/989170號)、*sec24*(美國專利申請案第62/061608號)以及*dre4*(美國專利申請案第61/989843))，於舉例而言幼蟲根蟲內影響多重標靶序列的潛力，可以使發展出涉及

RNAi技術的昆蟲害蟲管理永續性方法的機會增高。

【0077】於此揭露的為用於基因控制鞘翅目及/或半翅目害蟲侵擾的方法與組成物。亦提供用於辨識對鞘翅目及/或半翅目害蟲生命週期必要之一種或多種基因的方法，以使用做為RNAi媒介的鞘翅目及/或半翅目害蟲族群控制之靶定基因。可以設計編碼一種或多種dsRNA分子的DNA質體載體，以箝制對生長、存活(survival)、發育，及/或生殖必要的一種或多種靶定基因。在一些具體例中，提供用於一種靶定基因的轉錄後表現的壓制或抑制方法，該者係經由互補於在一種鞘翅目及/或半翅目害蟲中之靶定基因的編碼或非編碼序列之核酸分子。在這些及進一步具體例中，一種鞘翅目及/或半翅目害蟲可能攝入一種或多種dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA及/或hpRNA分子，該者係從互補於一靶定基因之編碼或非編碼序列的核酸分子之全部或部分而轉錄，從而提供植物防護的效果。

【0078】因而，一些具體例涉及靶定基因產物表現的序列特異性抑制，其使用互補於該靶定基因之編碼及/或非編碼序列的dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA及/或hpRNA，以實現鞘翅目及/或半翅目害蟲至少部分的控制。揭露的是一組經單離及純化的核酸分子，其包含一種核苷酸序列，舉例而言如在下列中任一者所陳述者：序列辨識編號：1、3、5、9-15、89、91-92，以及其等之片段。在一些具體例中，可以從此序列、其之片段，或包括這些序列中一者的基因來表現一種穩定的dsRNA分子，用於一

種靶定基因的轉錄後靜默或抑制。在某些具體例中，經單離及純化的核酸分子包含序列辨識編號：1之全部或部分。在其他的具體例中，經單離及純化的核酸分子包含序列辨識編號：3之全部或部分。在再另外的具體例中，經單離及純化的核酸分子包含序列辨識編號：5之全部或部分。在其他的具體例中，經單離及純化的核酸分子包含序列辨識編號：9之全部或是部分。在又其他的具體例中，經單離及純化的核酸分子包含序列辨識編號：10-15、序列辨識編號：89，或序列辨識編號：91-92之全部或是部分。

【0079】 一些具體例涉及一種重組宿主細胞(例如一植物細胞)，該者在其基因組中具有至少一個重組DNA序列，其編碼至少一個iRNA(例如dsRNA)分子者。在特定的具體例中，當由一種鞘翅目及/或半翅目害蟲攝入時，可生產該dsRNA分子，以轉錄後靜默或抑制一靶定基因在該鞘翅目及/或半翅目害蟲中之表現。該重組DNA序列可以包含，舉例而言，下列任一者之一者或多者：序列辨識編號：1、3、5、9-15、89或91-92；下列任一者之片段：序列辨識編號：1、3、5、9-15、89或91-92；或是一種基因的部分序列，該基因包含下列之一者或多者：序列辨識編號：1、3、5、9-15、89或91-92；或其等之互補物。

【0080】 一些具體例涉及一種重組宿主細胞，該者在其基因組中具有一重組DNA序列，其編碼至少一個iRNA(例如dsRNA)分子者，該者包含下列之全部或部

分：序列辨識編號：98、序列辨識編號：99、序列辨識編號：100及/或序列辨識編號：108(例如，選自於包含序列辨識編號：101-107以及109-110的群組之至少一種多核苷酸)，或是其等之互補物。當由一種鞘翅目及/或半翅目害蟲攝入時，該iRNA分子可靜默或是抑制一種靶定基因，其包含序列辨識編號：1、3、5、9-15、89及/或91-92，在該鞘翅目及/或半翅目害蟲中的表現，並且從而引致該鞘翅目及/或半翅目害蟲之生長、發育、生殖及/或取食的停止。

【0081】在一些具體例中，一種重組宿主細胞可以為一種經轉形的植物細胞，該重組宿主細胞在其基因組中具有編碼至少一個dsRNA分子之至少一重組DNA序列。一些具體例涉及基因轉殖植物，其包含此種轉形植物細胞。除了此種基因轉殖植物，還提供任何基因轉殖植物世代的後代植株、基因轉殖種子及基因轉殖植物之產物全體，其中每一者均包含重組DNA序列。在特定的具體例中，一種本發明的dsRNA分子可以在一種基因轉殖植物細胞中表現。所以，在這些及其他具體例中，一種本發明的dsRNA分子可以從一基因轉殖植物細胞單離出。在特定具體例中，該基因轉殖植物為選自於包含玉米(玉蜀黍(*Zea mays*))、大豆(大豆(*Glycine max*))及禾本科(*Poaceae*)植物之群組的植物。

【0082】一些具體例涉及一種用於調控靶定基因在一種鞘翅目及/或半翅目害蟲細胞中表現的方法。在這些及

其他具體例中，可提供一種核酸分子，其中該核酸分子包含一種編碼dsRNA分子之核苷酸序列。在特定的具體例中，一種編碼dsRNA分子之核苷酸序列，可以可操縱地鏈接至一啟動子，且亦可以可操縱地鏈接至一轉錄終止序列。在特定具體例中，一種用於調控靶定基因在鞘翅目及/或半翅目害蟲細胞中表現的方法可以包含：(a)以一載體轉形一植物細胞，該載體包含一種編碼dsRNA分子之核苷酸序列；(b)在足以允許包含數個轉形植物細胞之植物細胞培養物發展的條件下，培養該經轉形植物細胞；(c)選擇已經將該載體整合至其基因組內的轉形植物細胞；及(d)確定該選擇的轉形植物細胞包含由該載體的核苷酸序列所編碼之dsRNA分子。一植物可能從一植物細胞再生，該植物細胞在其基因組中具有整合的載體且包含由該載體的核苷酸序列所編碼的該dsRNA分子。

【0083】因而，亦揭露一種基因轉殖植物，其包含整合至其基因組內之載體，該載體具有一種編碼dsRNA分子之核苷酸序列，其中該基因轉殖植物包含由該載體的核苷酸序列所編碼之該dsRNA分子。在特定的具體例中，在植物中表現dsRNA分子，係足以調控接觸該轉形植物或植物細胞的鞘翅目及/或半翅目害蟲之細胞中靶定基因的表現，舉例而言，藉由取食該轉形的植物、該植物的一部分(例如根)或植物細胞來進行。本文所揭露的基因轉殖植物可展現對鞘翅目及/或半翅目害蟲侵擾的抗性及/或增強的耐受性。特定的基因轉殖植物可能會展現對選自於以下所組成

之群組的一種或多種鞘翅目及/或半翅目害蟲之抗性及/或增強的耐受性：WCR、NCR、SCR、MCR、巴西玉米根蟲(*D. balteata*)、黃瓜十一星葉甲球蟲(*D. u. tenella*)、南美葉甲(*D. speciosa*)、黃瓜十一星葉甲甘薯猿葉甲蟲(*D. u. undecimpunctata*)、英雄美洲蝽(*Euschistus heros*)、褐美洲蝽(*E. servus*)、蓋德擬壁蝽(*Piezodorus guildinii*)、褐翅蝽(*Halyomorpha halys*)、南方綠蝽象(*Nezara viridula*)、綠色蝽(*Chinavia hilare*)、*C. marginatum*、*Dichelops melacanthus*、*D. furcatus*、*Edessa meditabunda*、肩蝽(*Thyanta perditor*)、植物臭蟲(*Horcias nobilellus*)、*Taedia stigmosa*、秘魯棉紅蝽(*Dysdercus peruvianus*)、*Neomegalotomus parvus*、喙綠蝽(*Leptoglossus zonatus*)、*Niesthrea sidae*、豆莢草盲蝽(*Lygus hesperus*)，及/或美國牧草盲蝽(*Lygus lineolaris*)。

【0084】本文亦揭露的是遞送控制劑，諸如一種iRNA分子，至一種鞘翅目及/或半翅目害蟲的方法。此種控制劑可能直接或間接地造成鞘翅目及/或半翅目害蟲取食、生長能力的毀損，或以其它方式造成宿主損害。在一些具體例中，提供一種方法，該方法包含遞送一穩定的dsRNA分子至一種鞘翅目及/或半翅目害蟲，以在該鞘翅目及/或半翅目害蟲中箝制至少一靶定基因，從而降低或消除鞘翅目及/或半翅目害蟲的植物損害。在一些具體例中，一種抑制一靶定基因在鞘翅目及/或半翅目害蟲中表現的

方法可能會引致該鞘翅目及/或半翅目害蟲之生長、發育、生殖及/或取食的停止。在一些具體例中，該方法可能最終會引致該鞘翅目及/或半翅目害蟲之死亡。

【0085】 在一些具體例中，提供組成物(例如一種局部組成物)，該者包含一種本發明的iRNA(例如dsRNA)分子，用於在植物、動物及/或植物或動物的環境中使用，以實現一種鞘翅目及/或半翅目害蟲侵擾的消除或降低。在特定的具體例中，該組成物可能為餵食該鞘翅目及/或半翅目害蟲之營養組成物或食物來源。一些具體例包含製成該鞘翅目及/或半翅目害蟲可用的營養組成物或食物來源。攝入包含iRNA分子之組成物可能引致該分子被該鞘翅目及/或半翅目害蟲之一個或多個細胞攝取，該者轉而可能引致抑制至少一靶定基因在該鞘翅目及/或半翅目害蟲的細胞中的表現。透過在該鞘翅目及/或半翅目害蟲之宿主中提供一個或多個包含本發明的iRNA分子的組成物，可以限制或消除該鞘翅目及/或半翅目害蟲存在的任何宿主組織或環境中或附近，被鞘翅目及/或半翅目害蟲的植物或植物細胞之攝入或損害。

【0086】 當dsRNA與食物或引誘劑或二者混合時，形成RNAi誘餌。當害蟲吃下誘餌時，它們亦會吃掉dsRNA。誘餌可以採取顆粒、凝膠、流動性粉末、液體或固體的形式。在另一個具體例中，*rab5*可以併入至一種誘餌調配物之內，例如於美國專利案第8,530,440號中所述，其係在此併入以作為參考資料。一般而言，由誘餌，誘餌放置在

昆蟲害蟲的環境中或附近，舉例而言，WCR會接觸到誘餌及/或被誘餌吸引。

【0087】本文揭露之組成物及方法可以與其它用於控制鞘翅目及/或半翅目害蟲損害的方法與組成物一起組合使用。舉例而言，一種如於此所描述用於防護植物不受鞘翅目及/或半翅目害蟲傷害的iRNA分子可能在一方法中使用，該方法包含以下的額外使用：一種或多種對鞘翅目及/或半翅目害蟲有效的化學藥劑、對鞘翅目及/或半翅目害蟲有效的生物農藥、作物輪作，或是重組基因技術，其展示特徵不同於本發明的RNAi-媒介的方法及RNAi組成物之特徵者(例如在植物中重組製造對鞘翅目及/或半翅目害蟲有害的蛋白質(例如*Bt*毒素)。

【0088】 **II. 縮寫**

【0089】 dsRNA	雙股核糖核酸
【0090】 GI	生長抑制
【0091】 NCBI	國家生物技術資訊中心
【0092】 gDNA	基因組去氧核糖核酸
【0093】 iRNA	抑制性核糖核酸
【0094】 ORF	開放讀取框架
【0095】 RNAi	核糖核酸干擾
【0096】 miRNA	微核糖核酸
【0097】 shRNA	小髮夾核糖核酸
【0098】 siRNA	小抑制性核糖核酸
【0099】 hpRNA	髮夾核糖核酸

- 【0100】 UTR 非轉譯區域
- 【0101】 WCR 西方玉米根蟲(玉米根螢葉甲
(*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte))
- 【0102】 NCR 北方玉米根蟲(北方玉米根蟲
(*Diabrotica barberi* Smith and Lawrence))
- 【0103】 MCR 墨西哥玉米根蟲(墨西哥玉米根
葉甲(*Diabrotica virgifera zea* Krysan and Smith))
- 【0104】 PCR 聚合酶連鎖反應
- 【0105】 RISC RNA誘導的靜默複合體
- 【0106】 SCR 南方玉米根蟲(黃瓜十一星葉甲
食根亞種 (*Diabrotica undecimpunctata howardi*
Barber))
- 【0107】 BSB 新熱帶區褐臭蟲(Neotropical
Brown Stink Bug)(英雄美洲蟥(*Euschistus heros*
Fabricius))
- 【0108】 YFP 黃色螢光蛋白
- 【0109】 SEM 平均值標準誤差
- 【0110】 **III. 術語**

【0111】 在下列之說明與圖表中，使用許多術語。為了提供本說明書與請求項，包括此等術語給定的範圍，清楚且一貫的理解，所以提供下面的定義：

【0112】 鞘翅目害蟲：如於此所使用，術語"鞘翅目害蟲"意指葉甲屬(genus *Diabrotica*)的昆蟲，該等昆蟲取食玉米及其他真草。在特定實例中，一種鞘翅目害蟲係選

自包含以下之名單：玉米根螢葉甲 (*D. v. virgifera* LeConte) (WCR)；北方玉米根蟲 (*D. barberi* Smith and Lawrence) (NCR)；黃瓜十一星葉甲食根亞種 (*D. u. howardi*) (SCR)；墨西哥玉米根葉甲 (*D. v. zea*) (MCR)；巴西玉米根蟲 (*D. balteata* LeConte)；黃瓜十一星葉甲球蟲 (*D. u. tenella*)；南美葉甲 (*D. speciosa* Germar)；及黃瓜十一星葉甲甘薯猿葉甲蟲 (*D. u. undecimpunctata* Mannerheim)。

【0113】半翅目害蟲：如於此所使用，術語"半翅目害蟲"意指半翅目 (order hemipteran) 的昆蟲，含括舉例而言但不限於：蟪科 (families Pentatomidae)、盲椿象科 (Miridae)、星椿象科 (Pyrrhocoridae)、緣蟪象科 (Coreidae)、蛛緣蟪象科 (Alydidae)，以及姬緣蟪象科 (Rhopalidae)，其等取食廣大範圍的宿主植物，以及具有銳利及吸吮的口器。在特定實例中，一種半翅目害蟲係選自包含以下之名單：英雄美洲蟪 (*Euschistus heros*) (Fabr.) (新熱帶區褐臭蟲 (Neotropical Brown Stink Bug))、南方綠椿象 (*Nezara viridula*) (L.) (南方綠臭蟲 (Southern Green Stink Bug))、蓋德擬壁蟪 (*Piezodorus guildinii*) (Westwood) (紅帶臭蟲 (Red-banded Stink Bug))、褐翅蟪 (*Halyomorpha halys*) (Stål) (褐紋臭蟲 (Brown Marmorated Stink Bug))、綠色蟪 (*Chinavia hilare*) (Say) (綠臭蟲 (Green Stink Bug))、褐美洲蟪 (*Euschistus servus*) (Say) (褐臭蟲 (Brown Stink

Bug))、*Dichelops melacanthus* (Dallas)、*Dichelops furcatus* (F.)、*Edessa meditabunda* (F.)、肩蟪(*Thyanta perditor*)(F.)(新熱帶區紅肩臭蟲(Neotropical Red Shouldered Stink Bug)、*Chinavia marginatum* (Palisot de Beauvois)、植物臭蟲(*Horcias nobilellus*) (Berg) (棉花臭蟲(Cotton Bug))、*Taedia stigmosa* (Berg)、秘魯棉紅蟪(*Dysdercus peruvianus*) (Guérin-Méneville)、*Neomegalotomus parvus* (Westwood)、喙綠蟪(*Leptoglossus zonatus*)(Dallas)、*Niesthrea sidae* (F.)、豆莢草盲蟪(*Lygus hesperus*)(Knight)(西部牧草盲蟪(Western Tarnished Plant Bug))，以及美國牧草盲蟪(*Lygus lineolaris*) (Palisot de Beauvois)。

【0114】接觸(一生物體)：如於此所使用，術語"接觸"一生物體(例如一種鞘翅目及/或半翅目害蟲)或由一生物體"攝取"，當就一核酸分子而言時，包括將該核酸分子內化(internalization)至該生物體內，舉例而言但不限於：由該生物體攝入該分子(例如藉由取食)；使該生物體與包含該核酸分子之組成物接觸；及將該生物體浸泡於包含該核酸分子之溶液。

【0115】片段重疊群(Contig)：當使用於本文中，術語"片段重疊群"意指一DNA序列其係由一組重疊的DNA區段重建，該重疊的DNA區段係衍生自一單一遺傳來源。

【0116】玉米植物：如於此所使用，術語"玉米植物"意指物種玉蜀黍(*Zea mays*) (玉蜀黍(maize))之植物。

【0117】編碼一dsRNA：如於此所使用，術語"編碼一dsRNA"包括一基因，其之RNA轉錄產物能夠形成分子內dsRNA結構(例如髮夾)，或分子間dsRNA結構(例如，透過雜交一靶定RNA分子)。

【0118】表現：如於此所使用，一編碼序列(舉例而言，一基因或轉基因)之"表現"意指一過程，在該過程中一核酸轉錄單元(包括，例如基因組DNA或cDNA)的編碼資訊係被轉換成細胞的操作、非操作、或結構部分，通常包括蛋白質的合成。外部訊號可以影響基因表現；舉例而言，將細胞、組織或生物體曝露至提高或減少基因表現之一藥劑。基因表現亦可以在從DNA至RNA至蛋白質的途徑中的任意處調節。基因表現的調節發生於下列情況，舉例而言，透過在轉錄、轉譯、RNA運輸及加工、中間分子諸如mRNA之降解上的控制作用，或是透過特定蛋白質分子在它們被製造之後的活化、去活化、分室作用(compartmentalization)或降解，或是藉由其等之組合。基因表現可以藉由本技藝已知的任何方法，在RNA位準或蛋白質位準進行測量，包括但不限於，北方(RNA)墨漬法、RT-PCR、西方(免疫-)墨漬法，或活體外、原位或是活體內蛋白質活性分析。

【0119】遺傳物質：如於此所使用，術語"遺傳物質"包括所有的基因及核酸分子，諸如DNA與RNA。

【0120】抑制：如於此所使用，當使用以描述在一編碼序列(舉例而言，一基因)上的效果時，術語"抑制"意指

轉錄自該編碼序列之mRNA，及/或該編碼序列的胜肽、多肽或蛋白質產物，於細胞位準上可測量的下降。在一些實例中，一編碼序列的表現可以被抑制，藉此近似消除該表現。"特異性抑制"意指一靶定編碼序列之抑制，而不必然地影響其他編碼序列(例如基因)在該細胞中的表現，其中在該細胞中達到特異性抑制。

【0121】經單離的：一種"經單離的"的生物成分(諸如核酸或蛋白質)實質上已與生物體細胞中，該成份天然發生區域中的其他生物成分(亦即，其他染色體及染色體外的DNA及RNA，及蛋白質)分隔、分開製造或純化而離開。業已"經單離的"核酸分子與蛋白質包括藉由標準純化方法來純化的核酸分子及蛋白質。該術語亦含括藉由在一宿主細胞中重組表現而製備的核酸及蛋白質，以及化學合成的核酸分子、蛋白質及胜肽。

【0122】核酸分子：如於此所使用，術語"核酸分子"可以意指核苷酸的聚合物形式，該者可包括RNA之意義股與反義股兩者、cDNA、基因組DNA，以及上述的合成形式與混合聚合物。一種核苷酸可以意指一核糖核苷酸(ribonucleotide)、去氧核糖核苷酸、或任一類型核苷酸的修飾形式。一種"核酸分子"如於此所使用，係同義於"核酸"及"多核苷酸"。除非另有指明，一種核酸分子的長度通常為至少10個鹼基。按照慣例，一種核酸分子的核苷酸序列係從該分子的5'端讀取到3'端。一種核苷酸序列的"互補物"意指核鹼基的序列，從5'到3'，其與該核苷酸序列的核鹼

基形成鹼基對(意即，A-T/U，及G-C)。一種核酸序列的“反相互補物”意指核鹼基的序列，從3'到5'，其與該核苷酸序列的核鹼基形成鹼基對。

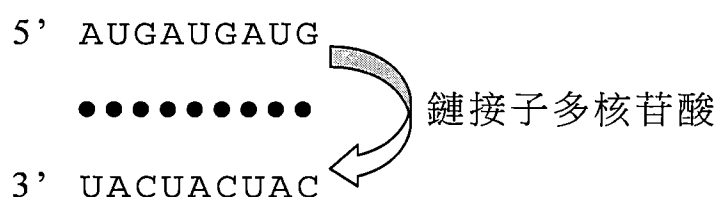
【0123】一些具體例包括含有一模板DNA之核酸，該模板DNA轉錄成一種RNA分子，該RNA分子為一種mRNA分子的互補物。在這些具體例中，轉錄成mRNA分子的該核酸的互補物係以5'至3'的定向呈現，藉由此RNA聚合酶(該者以5'至3'方向轉錄DNA)將從該互補物轉錄一核酸，其可以雜交至該mRNA分子。除非另有明確聲明，或從該上下文係為清楚的，術語"互補物"因而意指一種具有核鹼基的多核苷酸，從5'至3'，其可與一參考核酸之核鹼基形成鹼基對。同樣地，除非另有明確聲明(或其從上下文係為清楚的)，否則一核酸之"反向互補物"意指以反向定向之互補物。前述情況係於下列圖解中演繹：

ATGATGATG	多核苷酸
TACTACTAC	多核苷酸之“互補物”
CATCATCAT	多核苷酸之“反向互補物”

【0124】本發明之一些具體例可以包括髮夾RNA形成RNAi分子。在這些RNAi分子中，由RNA干擾靶定之核酸的互補物及反向互補物兩者，皆可能在相同的分子中發現，藉此該單股RNA分子可以"折疊(fold over)"並雜交至本身包含該互補與反向互補多核苷酸的區域上，如同下列圖解中演繹：

5'AUGAUGAUG-鏈接子多核苷酸-CAUCAUCAU 3'，

其雜交而形成：



【0125】"核酸分子"包括單股及雙股形式的DNA；單股形式的RNA；及雙股形式的RNA(dsRNA)。術語"核苷酸序列"或"核酸序列"意指一核酸之意義股與反義股兩者，以個別單股或在雙聯體中任一。術語"核糖核酸"(RNA)係包括 iRNA(抑制性RNA)、dsRNA(雙股RNA)、siRNA(小干擾RNA)、mRNA(信使RNA)、shRNA(小髮夾RNA)、miRNA(微RNA)、hpRNA(髮夾RNA)、tRNA(轉移RNA，不論裝載或未裝載相應的醯化胺基酸)，以及cRNA(互補的RNA)。術語"去氧核糖核酸"(DNA)係包括cDNA、基因組DNA，及DNA-RNA雜交體。術語"多核苷酸"及"核酸"及其"片段"，或更普遍為"區段"，對本技藝之一般人士將理解為一功能性術語，其包括二種基因組序列；核糖體RNA序列；轉移RNA序列；信使RNA序列；操縱子序列；以及較小的遺傳工程核苷酸序列，其編碼或可能適於編碼胜肽、多肽或是蛋白質者。

【0126】寡核苷酸：一種寡核苷酸為一種短的核酸聚合物。寡核苷酸可以藉由切割較長的核酸區段而形成，或是藉由聚合個別的核苷酸前驅體而形成。自動合成器允許長度高達數百個鹼基的寡核苷酸之合成。因為寡核苷酸可以結合至一種互補的核苷酸序列，所以它們可以使用做為

偵測DNA或RNA的探針。由DNA構成的寡核苷酸(寡去氧核糖核苷酸)可以使用於PCR中，PCR為用於擴增DNA及RNA(反向轉錄成cDNA)序列的技術。在PCR方面，寡核苷酸典型地稱為一"引子"，該引子允許DNA聚合酶延展該寡核苷酸並且複製互補股。

【0127】一核酸分子可以包括天然存在及由天然發生及/或非天然發生核苷酸鏈結而鏈接在一起的修飾的核苷酸任一者或兩者。核酸分子可以予以化學或生物化學修飾，或是可以含有非天然或衍生的核苷酸鹼基，如熟習該項技藝者將容易體會的。此種修飾包括，舉例而言，標示、甲基化、以一類似物取代一個或多個天然存在的核苷酸、核苷酸間修飾(例如不帶電荷的鏈結：舉例而言，磷酸甲酯、磷酸三酯、胺基磷酸酯(phosphoramidates)、胺基甲酸酯等等；帶電鏈結：舉例而言，硫代磷酸酯(phosphorothioates)、二硫代磷酸酯等等；懸垂(pendent)部分：舉例而言，胜肽；插入劑(intercalator)：舉例而言，吡啶、補骨脂素(psoralen)等等；螯合劑；烷化劑(alkylators)；及修飾鏈結：舉例而言， α -變旋異構體(alpha anomeric)核酸等等)。術語"核酸分子"亦包括任何拓撲構形，包括單股、雙股、部分雙聯體(duplexed)、三聯體、髮夾形、圓形以及扣鎖式(padlocked)構形。

【0128】如於此所使用，就DNA而言，術語"編碼序列"、"結構性核苷酸序列"或"結構性核酸分子"意指當置於適當的調節序列控制下時，一種核苷酸序列經由轉錄最終

轉譯成一種多肽，與mRNA。就RNA而言，術語"編碼多核苷酸"意指一種多核苷酸，其轉譯成一胜肽、多肽或蛋白質。一編碼序列的邊界係由5'-末端之一轉譯起始密碼子及3'-末端之一轉譯終止密碼子來確定。編碼多核苷酸包括，但不限於：基因組DNA；cDNA；EST；以及重組核苷酸序列。

【0129】如於此所使用，"轉錄的非編碼多核苷酸"意指mRNA分子的區段，例如5'UTR、3'UTR及內含子區段，其未被轉譯成一胜肽、多肽或蛋白質。再者，"轉錄的非編碼多核苷酸"意指一種核酸，其轉錄成細胞內有作用的RNA，舉例而言結構性RNAs(諸如核糖體RNA(rRNA)舉例來說5S rRNA、5.8S rRNA、16S rRNA、18S rRNA、23S rRNA及28S rRNA及類似物)；轉移RNA(tRNA)；以及snRNAs諸如U4、U5、U6及類似物。轉錄的非編碼多核苷酸亦包括，舉例而言但不限於，小RNAs(sRNA)，該術語通常用來描述小的細菌非編碼RNAs；小核仁RNAs(snoRNA)；微RNA；小干擾RNAs(siRNA)；Piwi-交互作用RNAs(piRNA)；以及長的非編碼RNA。還進一步，"轉錄的非編碼多核苷酸"意指一種多核苷酸其可能原生地存在於一核酸中做為基因內的"鏈接子"，且該者係轉錄成一種RNA分子。

【0130】基因組：如於此所使用，術語"基因組"意指在一細胞之細胞核內發現的染色體DNA，且還意指在該細胞之次細胞組份內發現的胞器DNA。在本發明之一些具體

例中，一種DNA分子可能被引入到一植物細胞內，藉由此，該DNA分子係整合至該植物細胞的基因組中。在這些及進一步具體例中，該DNA分子可能整合至該植物細胞的細胞核DNA，或是整合至該植物細胞的葉綠體或粒線體DNA。術語"基因組"，當它應用於細菌時，意指該細菌細胞之內的染色體與質體兩者。在本發明之一些具體例中，一種DNA分子可能引入至一細菌中，藉由此，該DNA分子係整合至細菌的基因組中。在這些及進一步具體例中，該DNA分子可能是整合至染色體，或是坐落如一穩定質體或位於一穩定的質體中。

【0131】序列同一性(Sequence identity)：術語兩個核酸或多肽序列之"序列同一性"或"同一性"，如於此上下文中所使用，意指當跨越一特定的比較窗口針對最大對應來排列比對時，在該兩個序列中相同的殘基。

【0132】如於此所使用，術語"序列同一性百分比"可能意指藉由跨越一比較窗口上比較兩個最佳排列比對序列(例如核酸序列或多肽序列)而決定的值，其中在該比較窗口中的該部分序列針對該兩序列的最佳排列比對，可能包含添加或缺失(意即，間隙)，當相較於參考序列時(參考序列不包含添加或缺失)。百分比之計算係藉由確定在該兩者序列中同一的核苷酸或胺基酸殘基發生的位置數目，以產生匹配位置的數目，將匹配位置的數目除以該比較窗口中的位置總數，並將該結果乘以100，以產生序列同一性的百分比。一序列與一參考序列在每一位置比較之下係同一

的，稱為100%同一於該參考序列，反之亦然。

【0133】用於排列比對序列以比較的方法在本技藝中係眾所周知的。各種程式及比對演算法係描述於，舉例而言：Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482；Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443；Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444；Higgins and Sharp (1988) Gene 73:237-244；Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5:151-153；Corpet等人之(1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-10890；Huang等人之(1992) Comp. Appl. Biosci. 8:155-165；Pearson等人之(1994) Methods Mol. Biol. 24:307-331；Tatiana等人之(1999) FEMS Microbiol. Lett. 174:247-250。序列比對方法及同源性計算之詳細的考慮因素可以於，例如，Altschul等人之(1990) J. Mol. Biol. 215：403-410中找到。

【0134】國家生物技術資訊中心(NCBI)基本局部比對搜尋工具(BLASTTM；Altschul等人(1990))可從數個來源獲得，包括國家生物技術資訊中心(Bethesda,MD)，及在網際網路上，用於與數個序列分析程式聯合使用。使用此程式如何決定序列同一性之說明可從網際網路上在BLASTTM"協助(help)"一節上獲得。對於核酸序列之比較，可以利用BLASTTM(Blastn)程式的"Blast 2序列"功能，該者使用預設的BLOSUM62模式設為預設參數。當藉由此方法評估時，對參考序列具更大相似性的核酸序列將

顯示提高的同一性百分比。

【0135】特異性雜交/特異性互補：如於此所使用，術語"特異性雜交"以及"特異性互補"係為術語，其指出充分程度的互補度，藉由此，在核酸分子與一靶定核酸分子之間發生穩定且特異性結合。兩個核酸分子之間的雜交涉及在該兩個核酸分子之核酸序列之間形成反平行排列比對。該兩分子然後能夠與相反股上相應的鹼基形成氫鍵，以形成一種雙聯體分子，假若其足夠穩定，則該雙聯體分子可以使用本技藝中眾所周知的方法偵測。一種核酸分子不需要100%的互補於其特異性雜交的靶定序列。然而，必須存在使得雜交為特異性序列互補度的數量為所使用的雜交條件的函數。

【0136】引致特定程度嚴格度的雜交條件將取決於所抉擇的雜交方法的本性及雜交核酸序列之組成與長度，而有所不同。一般而言，雜交溫度及雜交的離子強度(尤其是 Na^+ 及/或 Mg^{++} 濃度)將決定雜交的嚴格度。清洗緩衝液的離子強度及清洗溫度亦會影響嚴格度。考慮要求的雜交條件、用於得到特定程度嚴格度的計算，對於該技藝中一般技藝人士係為知悉的，且係討論於，舉例而言 Sambrook等人(ed.)之Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989，第9及第11章和更新；以及Hames and Higgins (eds.) Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, 1985。關於核

酸雜交進一步詳細的教學與引導可能於以下找到，舉例而言於Tijssen，"Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*，第I部，第2章，Elsevier, NY, 1993；以及Ausubel等人，Eds., *Current Protocols in Molecular Biology*，第2章，Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, 1995和更新。

【0137】如於此所使用，"嚴格條件"含括條件，在該條件下雜交將只發生於如果該雜交分子與該靶定核酸分子內的同源序列之間有大於80%的序列匹配時。"嚴格條件"包括進一步特定位準的嚴格度。因此，如於此所使用，"中嚴格度"條件係為具有超過80%的序列匹配(亦即具有低於20%失配)的分子將會雜交的那些條件；"高嚴格度"的條件係具有超過90%的匹配(亦即具有低於10%失配)的序列將會雜交的那些條件；以及"非常高嚴格度"的條件係具有超過95%的匹配(亦即具有低於5%失配)的序列將會雜交的那些條件。

【0138】下列為代表性、非限制性雜交條件。

【0139】高嚴格度條件(偵測到共享至少90%的序列同一性之序列)：5× SSC緩衝液中於65 °C下雜交16小時；以2× SSC緩衝液中於室溫下清洗兩次，每次15分鐘；及在0.5× SSC緩衝液中於65 °C下清洗兩次，每次20分鐘。

【0140】中嚴格度條件(偵測到共享至少80%序列同

一性之序列)：5x-6x SSC緩衝液中，於65-70 °C 雜交16-20 小時；以2x SSC緩衝液中於室溫下洗滌兩次，每次5-20 分鐘；以及以1x SSC緩衝液於55-70 °C 下洗滌兩次，每次 30分鐘。

【0141】非嚴格的控制條件(共享至少50%序列同一性之序列將雜交)：以6x SSC緩衝液於室溫至55 °C 雜交 16-20小時；以2x-3x SSC緩衝液於室溫至55 °C 至少洗滌兩次，每次20-30分鐘。

【0142】如於此所使用，當就一連續核酸序列而言時，術語"實質上同源的"或"實質同源性"意指核酸分子擁有的連續核苷酸序列，該者在嚴格條件之下雜交到具有參考核酸序列之核酸分子。舉例而言，具有實質上同源於序列辨識編號：1之參考核酸序列的核酸分子，係為在嚴格條件下(例如，前文陳述之中嚴格度條件)雜交至具有序列辨識編號：1之參考核酸序列的核酸分子之該等核酸分子者。實質上同源的序列可能具有至少80%的序列同一性。舉例而言，實質上同源的序列可能具有從大約80%至100%之序列同一性，諸如約81%；約82%；約83%；約84%；約85%；約86%；約87%；約88%；約89%；約90%；約91%；約92%；約93%；約94%；約95%；約96%；約97%；約98%；約98.5%；約99%；約99.5%；及約100%。實質同源性之性質係密切相關於特異性雜交。舉例而言，當有足夠程度的互補度，一核酸分子係特異性地雜交，以避免核酸與非靶定序列在希望特異性結合的條件下，舉例而言

在嚴格的雜交條件下，進行非特異性結合。

【0143】如於此所使用，術語"異種同源物(ortholog)"意指在兩種或更多物種中，一基因已經從一共同的祖先核苷酸序列演變，並可能在該兩種或更多物種中保留相同的功能。

【0144】如於此所使用，當在5'至3'方向讀取之序列的每一核苷酸係互補於另一序列在3'至5'方向中讀取的每一核苷酸時，兩個核酸序列分子被認為展示出"完整的互補度"。一種互補於參考核苷酸序列的核苷酸序列將展示出與該參考核苷酸序列的反向互補序列為同一的一序列。這些術語與說明在本技藝中係定義良好的，且本技藝之一般技藝人士將很容易理解。

【0145】可操縱地鏈接：當第一核酸序列與第二核酸序列係在一功能關係中時，第一核苷酸序列與第二核酸序列為可操縱地鏈接。當重組製造時，可操縱地鏈接的核酸序列一般來說是連續的，且在必要時，兩個蛋白質編碼區域可以連結在相同的讀取框架內(例如在一轉譯融合ORF中)。然而，核酸不必要被連續地操縱鏈接。

【0146】術語"可操縱地鏈接"，當參照一調節序列及一編碼序列使用時，意味著該調節序列影響該鏈接的編碼序列的表現。"調節序列"或"控制元素"意指核苷酸序列，其影響該關聯的編碼序列之轉錄的時間及位準/數量、RNA加工或穩定性、或轉譯。調節序列可以包括啟動子；轉譯前導子序列；內含子；增強子；莖環結構；抑制子結

合序列；終止序列；聚腺苷酸識別序列等等。特定的調節序列可能位於可操縱地鏈接於此之編碼序列的上游及/或下游。還有，可操縱地鏈接於一編碼序列的特定調節序列，可能位於雙股核酸分子之關聯互補股上。

【0147】啟動子：如於此所使用，術語"啟動子"意指一種DNA區域，該區域可能在轉錄起始的上游，並可能涉及識別及結合RNA聚合酶與其它蛋白質以引發轉錄。一啟動子可能可操縱地鏈接至一編碼序列用於在細胞中表現，或者一啟動子可能可操縱地鏈接到編碼一訊號序列的核苷酸序列，其中該訊號序列可能可操縱地鏈接到一編碼序列，用於在一細胞中表現。一種"植物啟動子"可以為能夠在植物細胞中引發轉錄的啟動子。在發育控制下的啟動子之例子包括啟動子其優先在某些組織中引發轉錄者，諸如葉、根、種子、纖維、木質部導管、管胞、或是厚壁組織。此種啟動子係稱為"組織優先的"。僅在某些組織中引發轉錄的啟動子被稱為"組織特異性"。一種"細胞類型特異性"啟動子主要在一種或多種器官中的某些細胞類型中驅動表現，舉例而言，在根或葉中的維管束細胞。一種"誘導型"啟動子可以為在環境控制之下的一種啟動子。可藉由誘導型啟動子引發轉錄之環境條件的例子包括厭氧條件及光的存在。組織特異性、組織優先的、細胞類型特異性及誘導型啟動子構成"非持續表現"型的啟動子。一種"持續表現型"啟動子為在大多數環境條件下，或在大多數組織或細胞類型中活躍的啟動子。

【0148】本發明之一些具體例中可以使用任何誘導型啟動子。參閱Ward等人之(1993) *Plant Mol. Biol.* 22 : 361-366。藉由一種可誘導的啟動子，轉錄速率對一誘導劑的回應係提高的。示範性的誘導型啟動子包括，但不限於：源自於ACEI系統對銅回應的啟動子；源自於玉米、對苯磺醯胺除草劑安全劑回應的*In2*基因；源自於Tn10之Tet抑制子；以及源自於類固醇激素基因的可誘導啟動子，該者之轉錄活性可以藉由一種糖皮質類固醇激素(glucocorticosteroid hormone)來誘導(Schena等人之(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10421-10425)。

【0149】示範性的持續表現型啟動子包括，但不限於：來自植物病毒之啟動子，諸如來自花椰菜嵌紋病毒(Cauliflower Mosaic Virus)(CaMV)的35S啟動子；來自水稻肌動蛋白基因的啟動子；泛素啟動子；pEMU；MAS；玉蜀黍(maize)H3組織蛋白啟動子；及ALS啟動子，*Xba1/NcoI*片段5'至大油菜(*Brassica napus*)*ALS3*結構基因(或是類似於*Xba1/NcoI*片段之一種核苷酸序列)(美國專利第5,659,026號)。

【0150】此外，在本發明之一些具體例中可以利用任何組織特異性或組織優先的啟動子。以包含可操縱地鏈接至一種組織特異性啟動子之編碼序列的核酸分子予以轉形之植物，可在特定組織中專有地，或優先地製造該編碼序列的產物。示範性的組織特異性或組織優先性的啟動子包括，但不限於：一種子優先啟動子，諸如源自菜豆蛋白

(phaseolin)基因之該者；一葉片特異性及光誘導的啟動子，諸如源自*cab*或核酮糖雙磷酸羧化酶(*rubisco*)之該者；一花藥特異性啟動子，諸如源自*LAT52*之該者；一花粉特異性啟動子，諸如源自*Zm13*之該者；及一孢子優先性啟動子，諸如源自*apg*之該者。

【0151】大豆植物：如於此所使用，術語"大豆植物"意指一種大豆屬(*Glycine*)物種植物；舉例而言大豆(*Glycine max*)。

【0152】轉形：如於此所使用，術語"轉形"或"轉導"意指一種或多種核酸分子進入一細胞之轉移作用。藉由一核酸分子轉導至該細胞，無論是藉由將該核酸分子併入該細胞基因組中，或藉由游離基因體複製，而使該核酸分子變成穩定而由細胞複製時，則一細胞係"轉形"的。如於此所使用的，術語"轉形"含括可以將一核酸分子引入至此一細胞中的所有技術。例子包括但是不限於：以病毒載體轉染；以質體載體轉形；電穿孔(Fromm等人之(1986) *Nature* 319 : 791-793)；脂質體轉染法(lipofection) (Felgner等人之(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 7413-7417)；顯微注射(Mueller等人之(1978) *Cell* 15 : 579-585)；農桿菌(*Agrobacterium*)媒介的轉移(Fraley等人之(1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 : 4803-4807)；直接DNA攝取；以及基因槍法(microprojectile bombardment)(Klein等人之(1987) *Nature* 327 : 70)。

【0153】轉基因：一種外源性核酸序列。在一些例子中，一種轉基因可以為一序列，該者編碼dsRNA分子之一股或兩股RNA，該者包含一核苷酸序列其互補於在鞘翅目及/或半翅目害蟲中找到的一核酸分子。在進一步的例子中，一轉基因可能為反義核酸序列，其中該反義核酸序列之表現會抑制一靶定核酸序列之表現。在再進一步的例子中，一轉基因可能為一基因序列(例如一除草劑抗性基因)、一基因其編碼在工業上或藥學上有用的化合物、或一基因其編碼一所欲的農業性狀。在這些及其他例子中，一轉基因可能含有調節序列其可操縱地鏈接該轉基因的編碼序列(例如一啟動子)。

【0154】載體：一種核酸分子，當其引入至一細胞時，舉例而言，會產生一轉形細胞。一種載體可能包括容許其在該宿主細胞中複製的核酸序列，諸如複製起點。載體的例子包括，但不限於：一質體；黏質體；噬菌體；或病毒，其攜帶外源DNA進入一細胞中。一載體還可為一RNA分子。一載體還可能包括一種或多種基因、反義序列，及/或可選擇的標記基因以及在本技藝中所知悉的其他遺傳元素。一載體可能轉導、轉形、或感染一細胞，從而造成該細胞表現由該載體所編碼的核酸分子及/或蛋白質。一載體選擇性地包括協助實現該核酸分子進入細胞的物質(例如脂質體、蛋白質塗層.....等等)。

【0155】產量：大約100%或更大的穩定產量，相對於在相同生長位置，於相同時間及相同條件下生長之檢查

品種(check variety)。在特定具體例中，"改良產量"或"改善產量"意味具有105%至115%或更大的穩定產量之一栽培種，相對於在相同時間且在相同條件下生長、於相同生長位置含有顯著密度會傷害該作物之鞘翅目及/或半翅目害蟲之檢查品種的產量。

【0156】除非具體地指出或暗示，否則術語"一(a)"、"一(an)"及"該"表示"至少一個"，如於此所使用。

【0157】除非另有具體解釋，否則於此所使用的所有技術與科學術語具有相同的含義，如同此揭露內容所屬之技藝的一般技藝人士所普遍理解者。分子生物學常用術語的定義可見於，舉例而言，如Lewin的Genes X, Jones & Bartlett Publishers, 2009 (ISBN 10 0763766321); Krebs 等人(eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 及 Meyers R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)。所有的百分數皆以重量計，且所有溶劑混合物之比例皆以體積計，除非另有指出。所有的溫度均為攝氏度。

【0158】IV. 包含鞘翅目及/或半翅目害蟲序列之核酸分子

【0159】A. 概述

【0160】於此所描述係為對控制鞘翅目及/或半翅目害蟲有用的核酸分子。所描述的核酸分子包括靶定的序列

(例如，天然基因及非編碼序列)、dsRNAs、siRNAs、hpRNAs、shRNA及miRNAs。舉例而言，dsRNAs、siRNA、shRNA、miRNA及/或hpRNA分子係描述於一些具體例中，該等者可能特異性地互補於鞘翅目及/或半翅目害蟲中一種或多種天然核酸序列之全部或部分。在這些及進一步具體例中，該天然核酸序列可能為一種或多種靶定基因，該者之產物可能，舉例而言但不限於：涉及代謝過程；涉及生殖過程；或涉及幼蟲/若蟲發育。於此所描述之核酸分子，當引入至包含與該核酸分子特異性地互補的至少一個天然核酸序列之細胞時，可能引發該細胞中的RNAi，且因此降低或是消除該天然核酸序列的表現。在一些例子中，藉由一種包含特異性地互補於靶定基因之序列的核酸分子而降低或消除靶定基因的表現，於鞘翅目及/或半翅目害蟲內可能為致命的，或是引致降低的生長及/或生殖。

【0161】在一些具體例中，可以選擇一種鞘翅目及/或半翅目害蟲的至少一種靶定基因，其中該靶定基因包含一種核苷酸序列，該核苷酸序列包含 $rpL40$ (序列辨識編號：1、3、5，或89)。在一些例子之中，選擇一種鞘翅目及/或半翅目害蟲的一種靶定基因，其中該靶定基因包含新穎的核苷酸序列，該核苷酸序列包含 $rpL40$ (序列辨識編號：1、3、5，或89)。

【0162】在一些具體例中，一靶定基因可為包含一種核苷酸序列之核酸分子，該核苷酸序列編碼一種多肽，該

多肽含有的連續胺基酸序列係至少85%同一於(例如約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%、或100%同一於)一種 $rpL40$ (序列辨識編號：1、3、5，或89)的蛋白質產物之胺基酸序列。一種靶定基因可能為鞘翅目及/或半翅目害蟲中任何的核酸序列，該者之轉錄後抑制對於該鞘翅目及/或半翅目害蟲有不利的效果，或是提供植物防護的益處來對抗鞘翅目及/或半翅目害蟲。在特定的例子中，一種靶定基因為一種包含一核苷酸序列之核酸分子，該核苷酸序列編碼一種多肽，該多肽含有的連續胺基酸序列係至少85%同一於、大約90%同一於、大約95%同一於、大約96%同一於、大約97%同一於、大約98%同一於、大約99%同一於、大約100%同一於、或是100%同一於新穎的核苷酸序列序列辨識編號：1、3、5，或89的蛋白質產物之胺基酸序列。

【0163】提供了如本發明之核苷酸序列，該者的表現將引致一種包含一核苷酸序列的RNA分子，該核苷酸序列特異性地互補於一種鞘翅目及/或半翅目害蟲中的一編碼序列所編碼的天然RNA分子之全部或部分。在一些具體例中，在一種鞘翅目及/或半翅目害蟲攝入該表現的RNA分子之後，可得到編碼序列在該鞘翅目及/或半翅目害蟲細胞中的向下調節。在特定具體例中，在該鞘翅目及/或半翅目害蟲細胞中編碼序列的向下調節可能在鞘翅目及/或半翅目害蟲的生長、生存力、繁殖及/或生殖上引致不利的效果。

【0164】在一些具體例中，靶定的序列包括轉錄的非

編碼RNA序列，諸如5'UTRs；3'UTRs；剪接前導子序列；內含子序列；末端內含子(outron)序列(例如隨後在反式剪接中修飾的5'UTR RNA)；供體子(donatron)序列(例如提供供體序列用於反式剪接所要求的非編碼RNA)；及靶定鞘翅目及/或半翅目害蟲基因的其他非編碼轉錄RNA。此種序列可能衍自於單順反子(mono-cistronic)與聚-順反子基因兩者。

【0165】因而，於此亦聯合一些具體例描述iRNA分子(例如 dsRNAs、siRNAs、shRNA、miRNAs 及 hpRNAs)，該者包含特異性互補於在鞘翅目及/或半翅目害蟲中一靶定序列之全部或部分的至少一種核苷酸序列。在一些具體例中，一種iRNA分子可能包含核苷酸序列，其等互補於數個靶定序列之全部或部分；舉例而言，2、3、4、5、6、7、8、9、10個、或更多個靶定序列。在特定具體例中，一種iRNA分子可能在活體外製造，或藉由一基因改造生物體在活體內製造，諸如一植物或一細菌。亦揭露的是cDNA序列，其可能使用於dsRNA分子、siRNA分子、shRNA分子、miRNA分子及/或hpRNA分子之製造，該等係特異性地互補於鞘翅目及/或半翅目害蟲中一靶定序列的全部或部分。進一步描述的為重組DNA建構物，供實現特定宿主標靶之穩定轉形使用。經轉形的宿主標靶可能從該重組DNA建構物表現有效位準的dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA及/或hpRNA分子。所以，亦描述一種植物轉形載體，其包含可操縱地鏈接至植物細胞中有作用的

異源性啟動子的至少一種核苷酸序列，其中該核苷酸序列的表現引致一種包含核苷酸序列之RNA分子，該核苷酸序列係特異性互補於一種鞘翅目及/或半翅目害蟲中一靶定序列的全部或部分。

【0166】 在一些具體例中，對控制鞘翅目及/或半翅目害蟲有用的核酸分子可能包括：從葉甲屬(*Diabrotica*)或半翅目所單離的天然核酸序列之全部或部分，其包含 *rpL40*(序列辨識編號：1、3、5，或89)；核苷酸序列，當表現時引致一種包含一核苷酸序列之RNA分子，該核苷酸序列特異性互補於 *rpL40*(序列辨識編號：1、3、5，或89)所編碼之天然RNA分子的全部或部分；iRNA分子(例如 dsRNAs、siRNAs、shRNA、miRNAs及hpRNAs)，其包含至少一核苷酸序列，該者係特異性互補於 *rpL40*(序列辨識編號：1、3、5，或89)的全部或部分；cDNA序列，其可以使用於生產dsRNA分子、siRNA分子、shRNA分子、miRNA及/或hpRNA分子，該等分子特異性互補於 *rpL40*(S序列辨識編號：1、3、5，或89)之全部或部分；以及重組DNA建構物，用於實現特定宿主標靶之穩定轉形，其中一經轉形宿主標靶包含一個或多個前述的核酸分子。

【0167】 B.核酸分子

【0168】 本發明提供，在其他事物之外，iRNA(例如 dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA及hpRNA)分子，該者抑制靶定基因在一種鞘翅目及/或半翅目害蟲之細胞、組

織或器官中的表現；以及DNA分子，該者能夠在一細胞或微生物中表現為iRNA分子，以抑制靶定基因在鞘翅目及/或半翅目害蟲之細胞、組織或器官中的表現。

【0169】本發明之一些具體例提供一種經單離的核酸分子，該者包含選自於下列所構成的群組之至少一個(例如，一個、二個、三個、或更多個)核苷酸序列：序列辨識編號：1；序列辨識編號：1之互補物；序列辨識編號：3；序列辨識編號：3之互補物；序列辨識編號：5；序列辨識編號：5之互補物；序列辨識編號：89；序列辨識編號：89之互補物；序列辨識編號：1、3、5及89之任一者的至少15個連續核苷酸(例如15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或是更多個連續核苷酸)的片段；序列辨識編號：1、3、5及89之任一者的至少15個連續核苷酸的片段之互補物；一種鞘翅目或半翅目生物體(例如WCR及BSB)之天然的編碼序列，其包含序列辨識編號：1、3、5及89之任一者之全部或部分；一種鞘翅目或半翅目生物體之天然的編碼序列之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：1、3、5及89之任一者之全部或部分；一種鞘翅目或半翅目生物體之天然非編碼序列，該天然非編碼序列轉錄成一天然RNA分子，其包含序列辨識編號：1、3、5及89之任一者之全部或部分；一種鞘翅目或半翅目生物體之天然非編碼序列之互補物，該天然非編碼序列轉錄成一天然RNA分子，其包含序列辨識編號：1、3、5及89之任一者之全部或部分；一種鞘翅目或

半翅目生物體之天然非編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段，該天然非編碼序列轉錄成一天然RNA分子，其包含序列辨識編號：1、3、5及89之任一者之全部或部分；一種鞘翅目或半翅目生物體之天然非編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段之互補物，該天然非編碼序列轉錄成一天然RNA分子，其包含序列辨識編號：1、3、5及89之任一者之全部或部分；一種鞘翅目或半翅目生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段，該天然編碼序列轉錄成一天然RNA分子，其包含序列辨識編號：1、3、5及89；一種鞘翅目或半翅目生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段之互補物，該天然編碼序列轉錄成一天然RNA分子，其包含序列辨識編號：1、3、5及89。在特定具體例中，一種鞘翅目及/或半翅目害蟲接觸或攝取該經單離的核酸序列，抑制了該鞘翅目及/或半翅目害蟲的生長、發育、生殖及/或取食。

【0170】於一些具體例中，本發明的核酸分子可包含至少一(例如一、二、三或更多)DNA序列，該者能夠在一細胞或微生物中表現為iRNA分子，以抑制靶定基因在鞘翅目及/或半翅目害蟲之細胞、組織或器官中的表現。此DNA序列可以可操縱地鏈接到在包含該DNA分子之細胞中作用的啟動子序列，以引發或增強能夠形成dsRNA分子之編碼的RNA之轉錄作用。在一個具體例中，該至少一(例如一、二、三、或更多)DNA序列可衍生自選自於下列所構成的群組之多核苷酸：序列辨識編號：1、3、5及89。

序列辨識編號：1、3、5，或89之衍生物包括序列辨識編號：1、3、5，或89之片段。在一些具體例中，此種片段可以包含，舉例而言序列辨識編號：1、3、5，或89之至少大約15個連續核苷酸，或其之互補物。因此，此種片段可以包含，舉例而言序列辨識編號：1、3、5，或89之15，16，17，18，19，20，21，22，23，24，25，26，27，28，29，30，40，50，60，70，80，90，100，110，120，130，140，150，160，170，180，190，200或更多個連續的核苷酸，或是其之互補物。在這些及進一步具體例中，此種片段可以包含，舉例而言，序列辨識編號：1、3、5，或89之超過大約15個連續核苷酸，或是其之互補物。因此，序列辨識編號：1、3、5，或89之片段可以包含，舉例而言，序列辨識編號：1、3、5，或89之15，16，17，18，19，20，21，大約25(例如22，23，24，25，26，27，28及29)，大約30，大約40(例如35，36，37，38，39，40，41，42，43，44及45)，大約50，大約60，大約70，大約80，大約90，大約100，大約110，大約120，大約130，大約140，大約150，大約160，大約170，大約180，大約190，大約200或更多個連續的核苷酸，或是其之互補物。

【0171】 一些具體例包含引入部分或完全穩定的dsRNA分子到一種鞘翅目及/或半翅目害蟲中，以抑制一靶定基因在該鞘翅目及/或半翅目害蟲之細胞、組織或器官中的表現。含有序列辨識編號：1、3、5，或89的一個或

多個片段之核酸序列，當表現為一種iRNA分子(例如dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA及hpRNA)，並由一種鞘翅目及/或半翅目害蟲攝取時，可能造成鞘翅目及/或半翅目害蟲死亡、生長抑制、性別比例變化、窩卵數(brood size)的縮小、停止感染及/或停止取食之一者或是多者。舉例而言，在一些具體例中，提供一種dsRNA分子，該者包含一核苷酸序列，其包括約15個至約300個或是大約19個至大約300個核苷酸，該核苷酸序列實質上同源於一種鞘翅目及/或半翅目害蟲靶定基因序列，且包含核苷酸序列的一個或多個片段，其含有序列辨識編號：1、3、5，或89。此種dsRNA分子的表現可能，舉例而言，導致攝取該dsRNA分子之鞘翅目及/或半翅目害蟲的死亡及/或生長抑制。

【0172】在某些具體例中，本發明所提供的dsRNA分子包含核苷酸序列，該核苷酸序列互補於包含序列辨識編號：1、3、5，或89之靶定基因，及/或互補於序列辨識編號：1、3、5，或89的片段之核苷酸序列，該靶定基因在一種鞘翅目及/或半翅目害蟲中的抑制作用引致對該鞘翅目及/或半翅目害蟲之生長、發育、或其他生物功能必要的蛋白質或核苷酸序列劑的降低或移除。一選擇的核苷酸序列可以對下列展現出從約80%至約100%的序列同一性：序列辨識編號：1、3、5，或89；序列辨識編號：1、3、5，或89所陳述之核苷酸序列的連續片段，或前述任一者之互補物。舉例而言，一選定的核苷酸序列對下列可展現出約

81%；約82%；約83%；約84%；約85%；約86%；約87%；約88%；約89%；約90%；約91%；約92%；約93%；約94%；約95%；約96%；約97%；約98%；約98.5%；約99%；約99.5%；或約100%的序列同一性：序列辨識編號：1、3、5，或89；序列辨識編號：1、3、5，或89所陳述之核苷酸序列的連續片段，或前述任一者之互補物。

【0173】於一些具體例中，本發明之經單離的核酸分子可以包含選自於下列所構成的群組之至少一個(例如，一個、二個、三個、或更多個)多核苷酸：序列辨識編號：98；序列辨識編號：98之互補物；序列辨識編號：99；序列辨識編號：99之互補物；序列辨識編號：100；序列辨識編號：100之互補物；序列辨識編號：98-100之至少15個連續核苷酸的片段(例如，序列辨識編號：101-107)；序列辨識編號：98-100之至少15個連續核苷酸的片段之互補物；一種葉甲生物體之天然編碼多核苷酸，該天然編碼多核苷酸包含序列辨識編號：101-107中任一者；一種葉甲生物體之天然編碼多核苷酸之互補物，該天然編碼多核苷酸包含序列辨識編號：101-107中任一者；一種葉甲生物體之天然編碼多核苷酸之至少15個連續核苷酸的片段，該天然編碼多核苷酸包含序列辨識編號：101-107中任一者；以及一種葉甲生物體之天然編碼多核苷酸之至少15個連續核苷酸的片段之互補物，該天然編碼多核苷酸包含序列辨識編號：101-107中任一者。

【0174】於其他的具體例中，本發明之經單離的核酸

分子可以包含選自於下列所構成的群組之至少一個(例如，一個、二個、三個、或更多個)多核苷酸：序列辨識編號：108；序列辨識編號：108之互補物；序列辨識編號：108之至少15個連續核苷酸的片段(例如，序列辨識編號：109-110)；序列辨識編號：108之至少15個連續核苷酸的片段之互補物；一種半翅目(例如BSB)生物體之天然編碼多核苷酸，該天然編碼多核苷酸包含序列辨識編號：109-110中任一者；一種半翅目生物體之天然編碼多核苷酸之互補物，該天然編碼多核苷酸包含序列辨識編號：109-110中任一者；一種半翅目生物體之天然編碼多核苷酸之至少15個連續核苷酸的片段，該天然編碼多核苷酸包含序列辨識編號：109-110中任一者；以及一種半翅目生物體之天然編碼多核苷酸之至少15個連續核苷酸的片段之互補物，該天然編碼多核苷酸包含序列辨識編號：109-110中任一者。

【0175】 在一些具體例中，一種能夠在細胞或微生物中表現如一種iRNA分子以抑制靶定基因表現的DNA分子，可以包含一單一核苷酸序列，其係特異性地互補於一種或多種靶定鞘翅目及/或半翅目害蟲物種中發現之一種天然核酸序列的全部或部分，或是該DNA分子可以從數個這種特異性地互補的序列而建構為一種嵌合體。

【0176】 在一些具體例中，一核酸分子可以包含由一種"間隙子序列"分隔的第一及第二核苷酸序列。一間隙子序列可以為一區域，當所欲時其在該第一及第二核苷酸序

列之間包含促進二級結構形成的任何核苷酸序列。在一具體例中，該間隙子序列係為mRNA之意義或反義編碼序列的一部分。該間隙子序列可以任擇地包含能夠共價鏈接至一核酸分子的核苷酸或其等之同源的任何組合。

【0177】舉例而言，在一些具體例中，該DNA分子可能包含一種編碼一種或多種不同的RNA分子之核苷酸序列，其中不同的RNA分子每一者包含一第一核苷酸序列及一第二核苷酸序列，其中該第一及第二核苷酸序列係彼此互補的。該第一及第二核苷酸序列可藉由一間隙子序列而在一種RNA分子內連接。該間隙子序列可能構成該第一核苷酸序列或該第二核苷酸序列的一部分。包含該第一及第二核苷酸序列之RNA分子的表現可能導致本發明之dsRNA分子的形成，其係藉由該第一及第二核苷酸序列之特異性鹼基配對。該第一核苷酸序列或該第二核苷酸序列可能為實質上同一於一種鞘翅目及/或半翅目害蟲天然的核酸序列(例如一靶定基因，或轉錄的非編碼序列)、其等之衍生物，或互補於此的序列。

【0178】dsRNA核酸分子包含雙股的聚合核糖核苷酸序列，且可能包括對磷酸糖主幹或核苷任一的修飾。可以打造RNA結構中的修飾以允許特定的抑制作用。在一具體例中，dsRNA分子可以透過無處不在的酶促過程予以修飾，以便可以生成siRNA分子。此酶促過程可能利用一種核糖核酸酶III酵素，諸如真核生物中之DICER，在活體外或活體內進行。參閱Elbashir等人之(2001) Nature

411:494-498；及Hamilton與Baulcombe (1999) Science 286(5441):950-952。DICER或功能均等的核糖核酸酶III酵素會將較大的dsRNA股及/或hpRNA分子切割成為較小的寡核苷酸(例如siRNA)，其中每一者的長度係為約19-25個核苷酸。由這些酵素所產生之siRNA分子具有2至3個核苷酸之3'突出端，及5'磷酸酯末端與3'羥基末端。藉由核糖核酸酶III酵素生成之siRNA分子在細胞中解開並分開為單股RNA。然後該siRNA分子與一靶定基因轉錄的RNA序列進行特異性地雜交，而兩個RNA分子隨後係藉由一種固有的細胞RNA降解機制而降解。此過程可能引致該靶定基因編碼之RNA序列在該靶定生物體中的有效降解或移除。結果係該靶定基因的轉錄後靜默。在一些具體例中，從異源性核酸分子透過內源性核糖核酸酶III酵素所產生的siRNA分子可以有效地媒介鞘翅目及/或半翅目害蟲中靶定基因的向下調節。

【0179】在一些具體例中，本發明之一種核酸分子可以包括至少一非天然存在的核苷酸序列，該者可以轉錄成能夠透過分子間雜交而在活體內形成dsRNA分子的一單股RNA分子。此種dsRNA序列典型地自組裝，且可以在一種鞘翅目及/或半翅目害蟲營養源中提供，以實現一靶定基因的轉錄後抑制。在這些及進一步具體例中，本發明之核酸分子可以包含兩種不同的非天然存在的核苷酸序列，其中每一者係特異性地互補於在一種鞘翅目及/或半翅目害蟲中不同的靶定基因。當此一核酸分子係以一種dsRNA分

子提供至一鞘翅目及/或半翅目害蟲時，該dsRNA分子抑制鞘翅目及/或半翅目害蟲中至少兩種不同的靶定基因之表現。

【0180】C.獲得核酸分子

【0181】可以使用鞘翅目及/或半翅目害蟲中的各種天然序列做為用於設計本發明之核酸分子的標靶序列，諸如iRNAs及編碼iRNA之DNA分子。然而，天然序列之選擇係並非直截了當的過程。在鞘翅目及/或半翅目害蟲中僅有很小數目的天然序列會是有有效的標靶。舉例而言，無法確實的預測一特定的天然序列是否可以藉由本發明之核酸分子有效地向下調節，或者一特定天然序列的向下調節是否會對於鞘翅目及/或半翅目害蟲之生長、生存力、繁殖及/或生殖有不利的效果。絕大多數的天然鞘翅目及/或半翅目害蟲序列，諸如由此分離的EST(舉例而言，於美國專利第7,612,194號及美國專利第7,943,819號中所列出者)，對於下列鞘翅目及/或半翅目害蟲的生長、生存力、繁殖及/或生殖上不具有不利的效果，例如：WCR、NCR、SCR、BSB、南方綠椿象(*Nezara viridula*)、蓋德擬壁蝨(*Piezodorus guildinii*)、褐翅蝨(*Halyomorpha halys*)、綠色蝨(*Chinavia hilare*)、褐美洲蝨(*Euschistus servus*)、*Dichelops melacanthus*、*Dichelops furcatus*、*Edessa meditabunda*、肩蝨(*Thyanta perditor*)、*Chinavia marginatum*、植物臭蟲(*Horcias nobilellus*)、*Taedia stigmosa*、秘魯棉紅蝨(*Dysdercus peruvianus*)、

Neomegalotomus parvus、喙綠蝽 (*Leptoglossus zonatus*)、*Niesthrea sidae*、豆莢草盲蝽 (*Lygus hesperus*)，以及美國牧草盲蝽 (*Lygus lineolaris*)。

【0182】該等天然序列何者可能對於鞘翅目及/或半翅目害蟲具有不利的效果，能夠在重組技術中使用用於在宿主植物中表現互補於此種天然序列的核酸分子，並且依靠取食在鞘翅目及/或半翅目害蟲上提供不利的效果而不會對宿主植物造成危害，兩者皆為不可預測的。

【0183】在一些具體例中，本發明之核酸分子(例如在鞘翅目及/或半翅目害蟲之宿主植物中提供的dsRNA分子)係被選擇以靶定cDNA序列，其編碼對鞘翅目及/或半翅目害蟲存活必要之蛋白質或部分的蛋白質，諸如涉及代謝或分解生化途徑、細胞分裂、生殖、能量代謝、消化、宿主植物識別等等的胺基酸序列。如於此所描述，一種靶定生物體攝入含有一個或多個dsRNA的組成物，其中該一個或多個dsRNA中至少一區段係特異性地互補於該靶定害蟲生物體細胞中製造的至少實質上同一的RNA區段，可以引致該標靶的死亡或其他抑制作用。一種衍生自鞘翅目及/或半翅目害蟲之核苷酸序列，DNA或RNA任一，可以使用來建構抗鞘翅目及/或半翅目害蟲侵擾的植物細胞。該鞘翅目及/或半翅目害蟲的宿主植物(例如玉蜀黍(*Z. mays*)或是大豆(*G. max*))，舉例而言，可以經轉形以含有如於此所提供、衍生自鞘翅目及/或半翅目害蟲的一個或多個核苷酸序列。轉形到宿主的核苷酸序列可以編碼一個或多個RNA，

其在該轉形宿主之內的細胞或生物液中形成一種dsRNA序列，因此假若/當該鞘翅目及/或半翅目害蟲與該基因轉殖宿主形成一種營養關係時，可獲得該dsRNA。此可能會引致該鞘翅目及/或半翅目害蟲細胞中一個或多個基因表現的箝制，以及最終死亡或是抑制其之生長或發育。

【0184】因此，在一些具體例中，一種本質上涉及一種鞘翅目及/或半翅目害蟲的生長、發育及生殖之基因係為靶定的。其他在本發明中使用的靶定基因可能包括，舉例而言，那些在鞘翅目及/或半翅目害蟲之生存力、運動、移動、遷移、生長、發育、感染性、建立取食部位，以及生殖方面扮演重要角色者。一種靶定基因因而可能為一種管家基因(housekeeping gene)或一種轉錄因子。此外，在本發明中使用之天然鞘翅目及/或半翅目害蟲核苷酸序列亦可能衍自於一植物、病毒、細菌或昆蟲基因的同源物(例如異種同源物(ortholog))，該者之功能對熟習該項技藝者係為知悉的，且該者之核苷酸序列與靶定鞘翅目及/或半翅目害蟲之基因組中的靶定基因係特異性地雜交的。藉由雜交來辨識具有已知的核苷酸序列之基因同源物的方法，對熟習該項技藝人士係知悉的。

【0185】在一些具體例中，本發明提供用於獲得一核酸分子的方法，該核酸分子包含用於製造iRNA(例如dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA及hpRNA)分子之核苷酸序列。一個這樣的具體例包含：(a)依靠dsRNA-媒介基因箝制，分析一個或多個靶定基因在鞘翅目及/或半翅目

害蟲中的表現、功能及表型；(b)以一探針探測cDNA或gDNA庫，其中該探針包含源自靶定鞘翅目及/或半翅目害蟲之核苷酸序列的全部或部分或其等之同源物，該核苷酸序列的全部或部分或其等之同源物在dsRNA-媒介的篩制分析中展現出改變(例如降低)的生長或發育表型；(c)辨識與該探針特異性雜交之DNA選殖體；(d)單離在步驟(b)中辨識之該DNA選殖體；(e)定序包含在步驟(d)中單離之該選殖體的cDNA或gDNA片段，其中該經定序的核酸分子包含全部或大部分的RNA序列或其等的同源物；以及(f)化學合成一基因序列或siRNA或miRNA或shRNA或hpRNA或mRNA或dsRNA之全部或大部分。

【0186】在進一步具體例中，一種用於獲得一核酸片段的方法，該核酸片段包含用於製造大部分的iRNA(例如dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA及hpRNA)分子的核苷酸序列，該方法包括：(a)合成第一及第二寡核苷酸引子，其特異性地互補於源自一種靶定鞘翅目及/或半翅目害蟲的天然核苷酸序列之一部分；以及(b)使用步驟(a)之該第一及第二寡核苷酸引子來擴增一種選殖載體中存在的cDNA或是gDNA插入子，其中該經擴增的核酸分子包含大部分的siRNA或shRNA或miRNA或hpRNA或mRNA或是dsRNA分子。

【0187】本發明之核酸可以藉由許多方法予以單離、擴增或產生。舉例而言，一種iRNA(例如dsRNA、siRNA、shRNA、miRNA及hpRNA)分子可以藉由PCR擴

增一種衍生自gDNA或cDNA庫的靶定核苷酸序列(例如一靶定基因或一靶定轉錄的非編碼序列),或其等之部分而獲得。DNA或RNA可以從一靶定生物體萃取,且核酸庫可以使用該技藝一般技藝人士所知悉的方法由此而製備。從一靶定生物體生成之gDNA或cDNA庫可以使用於PCR擴增及靶定基因之定序。已確認的PCR產物可以使用做為一模板,用於以最小啟動子(minimal promoter)在活體外轉錄以生成意義及反義RNA。或者,核酸分子可能藉由許多技術的任一者予以合成(參閱,例如Ozaki等人之(1992) *Nucleic Acids Research*, 20: 5205-5214; 及Agrawal等人之(1990) *Nucleic Acids Research*, 18: 5419-5423),包括使用一種自動DNA合成儀(舉例而言,P.E.Biosystems公司(加州福斯特城)之392或394型DNA/RNA合成儀),使用標準化學品,諸如亞磷醯胺(phosphoramidite)化學品。參閱,例如,Beaucage等人之(1992) *Tetrahedron*, 48: 2223-2311; 美國專利第4,415,732號、第4,458,066號、第4,725,677號、第4,973,679號以及第4,980,460號。亦可以採用引致非天然主幹基團之任擇的化學品,諸如硫代磷酸酯(phosphorothioate)、胺基磷酸酯(phosphoramidate)及之類。

【0188】本發明之RNA、dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA或hpRNA分子可以由熟習該項技藝者透過手動或自動反應予以化學或酶促製造,或在活體內於包含一種核

酸分子的細胞中製造，該核酸分子包含編碼該RNA、dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA或hpRNA分子之序列。RNA亦可以藉由部分或總有機合成予以製造-任何修飾的核糖核苷酸可以藉由活體外酶促或是有機合成來引入。一種RNA分子可以藉由一細胞RNA聚合酶或一噬菌體RNA聚合酶(例如T3 RNA聚合酶、T7 RNA聚合酶及SP6 RNA聚合酶)予以合成。對核苷酸序列之選殖及表現有用的表現建構物在本技藝中係已知的。參閱，例如美國專利第5,593,874號、第5,693,512號、第5,698,425號、第5,712,135號、第5,789,214號以及第5,804,693號。化學合成或藉由活體外酶促合成的RNA分子可能在引入到一細胞之前純化。舉例而言，RNA分子可以藉由以一溶劑或樹脂予以提取、沈澱、電泳法、色層分析法，或其等之一組合，而從一混合物中純化。或者，化學合成或藉由活體外酶促合成的RNA分子可能沒有純化或最小純化而使用，舉例而言，以避免因為樣品處理的損失。該RNA分子可以乾燥用於儲存，或是溶解在水溶液中。該溶液可以含有緩衝液或鹽類以促進dsRNA分子雙聯體股的黏合，及/或穩定。

【0189】在具體例中，一種dsRNA分子可以由一種單一的自我互補RNA股或從兩個互補的RNA股予以形成。dsRNA分子可以在活體內或在活體外合成。一種細胞內源性RNA聚合酶可以媒介一種或兩種RNA股在活體內的轉錄，或是可使用選殖的RNA聚合酶以媒介活體內或活體外

的轉錄。在一種鞘翅目及/或半翅目害蟲中靶定基因的轉錄後抑制可以為宿主靶定的，其係藉由在該宿主之一器官、組織或細胞類型中的特異性轉錄(例如藉由使用一種組織特異性啟動子)；該宿主中環境條件的刺激(例如藉由使用對感染、壓力、溫度及/或化學誘導劑回應的一種誘導型啟動子)；及/或於該宿主之發育階段或年齡的遺傳工程轉錄(例如藉由使用發育階段特異性啟動子)。無論在活體外或活體內轉錄，形成dsRNA分子的RNA股可以或可以不被多腺苷酸化，且可以或可以不藉由細胞的轉譯裝置予以轉譯成多肽。

【0190】 D.重組載體及宿主細胞轉形

【0191】 在一些具體例中，本發明亦提供一種DNA分子，用於引入至一細胞中(例如一細菌細胞、酵母細胞或植物細胞)，其中該DNA分子包含一種核苷酸序列，該核苷酸序列一旦表現成RNA且由鞘翅目及/或半翅目害蟲攝入，便在該鞘翅目及/或半翅目害蟲之細胞、組織或器官中實現靶定基因的箝制。因此，一些具體例提供一種重組核酸分子，其包含能夠在一植物細胞中表現為一種iRNA(例如dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA及hpRNA)分子的核酸序列，以抑制靶定基因在鞘翅目及/或半翅目害蟲中的表現。為了引發或增強表現，此種重組的核酸分子可以包含一種或多種調節序列，該調節序列可以可操縱地鏈接到能夠表現為iRNA之核酸序列。在植物中表現一種基因箝制分子的方法係為已知的，且可以使用來表現本發明之一

種核苷酸序列。參閱，例如國際PCT公開案第WO06/073727號；以及美國專利公開案第2006/0200878 A1號)。

【0192】在特定具體例中，本發明之一種重組DNA分子可以包含一種編碼一種dsRNA分子之核酸序列。此種重組DNA分子可以編碼dsRNA分子，該者一旦攝入，能夠抑制鞘翅目及/或半翅目害蟲細胞中內源性靶定基因之表現。在許多具體例中，一種轉錄的RNA可以形成一種dsRNA分子，其可以穩定形式來提供；例如像是一髮夾及莖環結構。

【0193】在這些及進一步具體例中，一種dsRNA分子之一股可以藉由從一種核苷酸序列之轉錄而形成，該核苷酸序列實質上係同源於下列所組成的核苷酸序列：序列辨識編號：1；序列辨識編號：1之互補物；序列辨識編號：3；序列辨識編號：3之互補物；序列辨識編號：5；序列辨識編號：5之互補物；序列辨識編號：1、3或5之至少19個連續核苷酸的片段；序列辨識編號：1、3或5之至少19個連續核苷酸的片段之互補物；一種葉甲(*Diabrotica*)生物體(例如WCR)之天然編碼序列，其包含序列辨識編號：1、3或5；一種葉甲生物體之天然編碼序列之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：1、3或5；一種葉甲生物體之天然非編碼序列，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：1、3或5之天然RNA分子；一種葉甲生物體之天然非編碼序列之互補物，該天然非編碼序列轉錄成包

含序列辨識編號：1、3或5之天然RNA分子；一種葉甲生物體(例如WCR)之天然編碼序列之至少19個連續核苷酸的片段，該天然編碼序列包含序列辨識編號：1、3或5；一種葉甲生物體之天然編碼序列之至少19個連續核苷酸的片段之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：1、3或5；一種葉甲生物體之天然非編碼序列之至少19個連續核苷酸的片段，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：1、3或5之天然RNA分子；以及一種葉甲生物體之天然非編碼序列之至少19個連續核苷酸的片段之互補物，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：1、3或5之天然RNA分子。

【0194】在其他的具體例中，一種dsRNA分子之一股可以藉由從一種核苷酸序列之轉錄而形成，該核苷酸序列實質上係同源於下列所組成的核苷酸序列：序列辨識編號：89；序列辨識編號：89之互補物；序列辨識編號：89之至少15個連續核苷酸的片段；序列辨識編號：89之至少15個連續核苷酸的片段之互補物；一種半翅目生物體之天然編碼序列，其包含序列辨識編號：89；一種半翅目生物體之天然編碼序列之互補物，其包含序列辨識編號：89；一半翅目生物體之天然非編碼序列，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：89之天然RNA分子；一半翅目生物體之天然非編碼序列之互補物，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：89之天然RNA分子；一半翅目生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段，該天然

編碼序列包含序列辨識編號：89；一半翅目生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：89；一半翅目生物體之天然非編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：89之天然RNA分子；以及一半翅目生物體之天然非編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段之互補物，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：89之天然RNA分子。

【0195】在特定具體例中，一種編碼dsRNA分子之重組DNA分子可以包含至少二種核苷酸序列區段於一轉錄序列之內，此等序列係配置成為藉此，相對於至少一啟動子，該轉錄序列包含一種處於意義定向(sense orientation)之第一核苷酸序列區段，及一種處於反義定向之第二核苷酸序列區段(包含該第一核苷酸序列區段之互補物)，其中該意義核苷酸序列區段與該反義核苷酸序列區段係藉由，從約五(~5)至約一千(~1000)個核苷酸的間隙子序列區段予以鏈接或連接。該間隙子序列區段可以在該意義及反義序列區段之間形成一個環。該意義核苷酸序列區段或該反義核苷酸序列區段可能實質上同源於一靶定基因之核苷酸序列(例如一種基因，其含有序列辨識編號：1、3、5或89)，或其等之片段。然而，在一些具體例中，一種重組DNA分子可以編碼一種dsRNA分子但不具間隙子序列。在具體例中，一意義編碼序列及一反義編碼序列的長度可能不同。

【0196】辨識為在鞘翅目及/或半翅目害蟲上具有不利影響，或就鞘翅目及/或半翅目害蟲而言具有植物防護效果者之序列，可以透過在本發明的重組核酸分子中創造適當的表現卡匣(expression cassette)而輕易地併入被表現的dsRNA分子內。舉例而言，此種序列可以表現為具有莖環結構之髮夾，其係藉由取得第一區段，其係相應於一靶定基因序列(例如序列辨識編號：1、3、5、89，及其之片段)；將此序列鏈接至不同源或不互補於該第一區段的第二區段間隙子區域；以及將此鏈接至第三區段，其中該第三區段的至少一部分係實質上互補於該第一區段。此一建構物藉由該第一區段與該第三區段的分子內鹼基配對而形成一種莖環結構，其中該環結構形成且包含該第二區段。參閱，例如美國專利公開案第2002/0048814號及第2003/0018993號；以及國際PCT專利公開案第WO94/01550號及第WO98/05770號。一種dsRNA分子可能生成為，舉例而言雙股結構形式，諸如莖環結構(例如髮夾)，從而由於靶定基因的片段之共同表現於譬如額外的植物表現卡匣上，而使靶定天然鞘翅目及/或半翅目害蟲序列的siRNA之製造提升，該者導致增強的siRNA生產，或降低甲基化，以防止該dsRNA髮夾啟動子的轉錄基因靜默作用。

【0197】本發明之具體例包括引入本發明之一種重組核酸分子到一植物內(亦即轉形)，以實現一種或多種iRNA分子表現之鞘翅目及/或半翅目害蟲抑制性的位準。

一種重組DNA分子可以為，舉例而言，一載體，諸如一線形或一環狀閉合質體。載體系統可以為一種單一載體或質體，或二個或多個一起含有要引入宿主基因組內之總DNA的載體或質體。此外，載體可以為一表現載體。本發明之核酸序列可以，舉例而言，適當地插入到在一種於合適啟動子控制下的載體之內，其中該啟動子係在一種或多種宿主中即起作用以驅動鏈接的編碼序列或其它DNA序列的表現。許多載體可用於此目的，而適當載體之選擇主要將取決於要插入到該載體的核酸大小，及該載體要轉形的特定宿主細胞。每一載體取決其功能(例如擴增DNA或表現DNA)及其相容的特定宿主細胞，而含有各種組份。

【0198】為了傳遞鞘翅目及/或半翅目害蟲抗性至一基因轉殖植物，一種重組DNA可以在重組植物的組織或流體內，舉例而言，轉錄成一種iRNA分子(例如會形成一種dsRNA分子的RNA分子)。一種iRNA分子可以包含一種核苷酸序列，該核苷酸序列實質上同源且特異性地雜交至可能會造成宿主植物物種損害之鞘翅目及/或半翅目害蟲內相應的轉錄核苷酸序列。該鞘翅目及/或半翅目害蟲可以舉例而言，藉由攝入包含該iRNA分子之基因轉殖宿主植物的細胞或流體，而接觸在該基因轉殖宿主植物細胞中轉錄的iRNA分子。因此，侵擾該基因轉殖宿主植物之鞘翅目及/或半翅目害蟲內的靶定基因表現係由iRNA分子予以箝制。在一些具體例中，靶定基因在該靶定鞘翅目及/或半翅目害蟲中表現的箝制作用可能引致該植物能對抗該害蟲的

攻擊。

【0199】為了能夠遞送iRNA分子到與本發明重組核酸分子業已轉形之植物細胞為營養關係之一種鞘翅目及/或半翅目害蟲，必須能在該植物細胞中表現(亦即，轉錄)iRNA分子。因此，一種重組核酸分子可以包含本發明的核苷酸序列，其可操縱地鏈接到在宿主細胞，諸如細菌細胞內作用之一個或多個調節序列，諸如異源性啟動子序列，其中該核酸分子係予以擴增，及其中該核酸分子係被表現於一植物細胞中。

【0200】適合在本發明之核酸分子中使用的啟動子包括那些誘導型、病毒、合成，或持續表現型，在本技藝中全部係為眾所周知的。說明此種啟動子之非限制性例子包括美國專利第6,437,217號(玉蜀黍(maize)RS81啟動子)；第5,641,876號(水稻肌動蛋白啟動子)；第6,426,446號(玉蜀黍(maize)RS324啟動子)；第6,429,362號(玉蜀黍(maize)PR-1啟動子)；第6,232,526號(玉蜀黍(maize)A3啟動子)；第6,177,611號(持續表現型玉蜀黍(maize)啟動子)；第5,322,938號、第5,352,605號、第5,359,142號及第5,530,196號(CaMV 35S啟動子)；第6,433,252號(玉蜀黍(maize)L3油膜蛋白(oleosin)啟動子)；第6,429,357號(水稻肌動蛋白2啟動子及水稻肌動蛋白2內含子)；第6,294,714號(光誘導型啟動子)；第6,140,078號(鹽誘導型啟動子)；第6,252,138號(病原誘導型啟動子)；第6,175,060號(缺磷誘導型啟動子)；第6,388,170號(雙向啟

動子)；第6,635,806號(γ -醇溶蛋白(coixin)啟動子)；及美國專利公開案第2009/757,089號(玉蜀黍(maize)葉綠體醛醇縮酶啟動子)。額外的啟動子包括胭脂鹼(nopaline)合成酶(NOS)啟動子(Ebert等人之(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(16)：5745-5749)及章魚鹼合成酶(OCS)啟動子(該等係於農桿腫瘤菌(*Agrobacterium tumefaciens*)之腫瘤誘導質體上實行)；花椰菜嵌紋病毒(caulimovirus)啟動子，諸如花椰菜嵌紋病毒(cauliflower mosaic virus)(CaMV)19S啟動子(Lawton等人之(1987) Plant Mol. Biol. 9：315-324)；CaMV 35S啟動子(Odell等人之(1985) Nature 313：810-812)；玄參花嵌紋病毒(figwort mosaic virus)35S-啟動子(Walker等人之(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(19)：6624-6628)；蔗糖合成酶啟動子(Yang及Russell之(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87：4144-4148)；R基因複合體啟動子(Chandler等人之(1989) Plant Cell 1：1175-1183)；葉綠素a/b結合蛋白基因啟動子；CaMV 35S(美國專利第5,322,938號、第5,352,605號、第5,359,142號及第5,530,196號)；FMV 35S(美國專利第5,378,619號及第6,051,753號)；PC1SV啟動子(美國專利第5,850,019號)；SCP1啟動子(美國專利第6,677,503號)；及AGRtu.nos啟動子(GenBank™登錄號V00087；Depicker等人之(1982) J. Mol. Appl. Genet. 1：561-573；Bevan等人之(1983) Nature 304：184-187)。

【0201】在特定具體例中，本發明之核酸分子包含一種組織特異性啟動子，諸如一種根特異性啟動子。根特異性啟動子專門或優先地驅動操縱鏈接編碼序列在根組織中表現。根特異性啟動子的例子在本技藝中為已知的。參閱，例如美國專利第5,110,732號；第5,459,252號及第5,837,848號；及Opperman等人之(1994) *Science* 263：221-3；及Hirel等人之(1992) *Plant Mol. Biol.* 20：207-18。在一些具體例中，根據本發明用於鞘翅目及/或半翅目害蟲害蟲控制之核苷酸序列或片段可以選殖在兩個根特異性啟動子之間，其中該兩啟動子相對於該核苷酸序列或片段係定向在相反的轉錄方向，且該核苷酸序列或片段在基因轉殖植物細胞中為可操縱的並在其中表現，以在該基因轉殖植物細胞中製造RNA分子其隨後可形成dsRNA分子，如前文所描述。在植物組織中表現之iRNA分子可以由一種鞘翅目及/或半翅目害蟲攝入，藉由此，實現靶定基因表現之箝制。

【0202】可以選擇性地操縱鏈接至一種感興趣的核酸分子之額外的調節序列包括5'UTRs，其作用為一種轉譯前導子序列，位於一啟動子序列及一編碼序列之間。該轉譯前導子序列係存在於完全加工的mRNA中，且其可能影響初級轉錄本的加工，及/或RNA的穩定性。轉譯前導子序列的例子包括玉蜀黍(maize)及矮牽牛(petunia)熱休克蛋白質前導子(美國專利第5,362,865號)、植物病毒外殼蛋白質前導子、植物核酮糖雙磷酸羧化酶前導子，以及其他。

參閱，例如Turner及Foster之(1995) *Molecular Biotech.* 3(3)：225-36。5'UTRs之非限制性例子包括GmHsp(美國專利第5,659,122號)；PhDnaK(美國專利第5,362,865號)；AtAnt1；TEV(Carrington及Freed之(1990) *J. Virol.* 64：1590-7)；及AGRtunos(GenBank™登錄號V00087；以及Beva等人之(1983) *Nature* 304：184-7)。

【0203】可能選擇性地操縱鏈接至一種感興趣的核酸分子之額外的調節序列還包括3'非轉譯序列、3'轉錄終止區域，或多腺苷酸化區域。這些係位於一種核苷酸序列下游的遺傳元素，且包括提供多腺苷酸化訊號之多核苷酸，及/或其他能夠影響轉錄或mRNA加工的調節訊號。多腺苷酸化訊號在植物中即起作用以造成該mRNA前驅體3'端聚腺苷酸核苷酸的添加。該多腺苷酸化序列可以衍生自各種植物基因，或是衍生自T-DNA基因。3'轉錄終止區域之非限制性例子為胭脂鹼合成酶3'區域(nos 3'；Fraley等人之(1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80：4803-7)。使用不同的3'非轉譯區域之一個例子係提供於Ingelbrecht等人之(1989) *Plant Cell* 1：671-80中。多腺苷酸化訊號的非限制性例子包括一者，其源自豌豆(*Pisum sativum*)RbcS2基因(Ps.RbcS2-E9；Coruzz等人之(1984) *EMBO J.* 3：1671-9)以及AGRtu.nos (GenBank™登錄號E01312)。

【0204】一些具體例可以包括一種植物轉形載體，其包含經單離及純化之DNA分子，該DNA分子包含至少一

個上文描述、可操縱地鏈接到本發明之一種或多種核苷酸序列的調節序列。當表現時，該一種或多種核苷酸序列引致一種或多種RNA分子，其包含特異性地互補於鞘翅目及/或半翅目害蟲中的天然RNA分子之全部或部分的核苷酸序列。因此，該核苷酸序列可以包含一區段，其編碼存在於一靶定鞘翅目及/或半翅目害蟲RNA轉錄本中之一核糖核苷酸序列之全部或一部分，且可以包含一靶定鞘翅目及/或半翅目害蟲轉錄本之全部或一部分的反向重複。一種植物轉形載體可能含有特異性地互補於超過一種靶定序列的序列，從而允許製造超過一種的dsRNA，用於抑制靶定鞘翅目及/或半翅目害蟲之一種或多種族群或物種之細胞中二種或多種基因的表現。特異性地互補於存在不同基因中之核苷酸序列的核苷酸序列區段，可以組合成一單一複合核酸分子，用於在一基因轉殖植物中表現。此等區段可能為連續的或是由間隙子序列分隔開。

【0205】 在一些具體例中，一種已經含有本發明至少一種核苷酸序列的本發明質體，可以藉由在相同質體中依序插入額外的核苷酸序列而修飾，其中該額外的核苷酸序列係如初始的至少一種核苷酸序列予以可操縱地鏈接到相同的調節元素。在一些具體例中，一核酸分子可能設計用於抑制多重靶定基因。在一些具體例中，被抑制的多重基因可以從相同的鞘翅目及/或半翅目害蟲物種獲得，該者可能增強該核酸分子的有效性。在其他的具體例中，該基因可以衍生自不同的鞘翅目及/或半翅目害蟲，該者可能擴大

該(等)藥劑有效的鞘翅目及/或半翅目害蟲之範圍。當多重基因係靶定用於箝制或表現及箝制之組合時，可以製造一種多順反子DNA元素。

【0206】本發明之重組核酸分子或載體可以包含一種可選擇的標記，該者賦予轉形細胞，諸如一植物細胞，一種可選擇的表型。可選擇的標記亦可以使用以選擇包含本發明重組核酸分子的植物或植物細胞。該標記可以編碼殺生物劑抗性、抗生素抗性(例如卡那黴素(kanamycin)、建他黴素(Geneticin)(G418)、博來黴素(bleomycin)、潮黴素(hygromycin)等等)，或是除草劑耐受性(例如嘉磷塞(glyphosate)等等)。可選擇標記之例子包括，但不限於：*neo*基因，該者編碼卡那黴素抗性且可以使用卡那黴素、G418等等予以選擇；*bar*基因，該者編碼雙丙氨磷(bialaphos)抗性；一種突變的EPSP合成酶基因，該者編碼嘉磷塞(glyphosate)抗性；一種腈合成酶(nitrilase)基因，該者賦予對溴苯腈(bromoxynil)的抗性；一種突變乙醯乳酸合成酶(*ALS*)基因，該者賦予咪唑啉酮(imidazolinone)或磺醯脲素耐受性；及一種抗胺甲基葉酸(methotrexate)DHFR基因。多重可選擇的標記係為可用的，該者賦予對以下之抗性：胺苄青黴素(ampicillin)、博萊黴素(bleomycin)、氯黴素、建他黴素(gentamycin)、潮黴素(hygromycin)、卡那黴素(kanamycin)、林可黴素(lincomycin)、胺甲基葉酸、草胺磷(phosphinothricin)、嘌呤黴素(puromycin)、觀黴素(spectinomycin)、利福平

(rifampicin)、鏈黴素及四環黴素及之類。此種可選擇標記之例子係例示於，例如美國專利第5,550,318號；第5,633,435號；第5,780,708號以及第6,118,047號。

【0207】本發明之重組核酸分子或載體亦可包括一種可篩選標記。可篩選標記可以使用以監控表現。示範性的可篩選標記包括 β -葡萄糖醛酸苷酶或 *uidA* 基因 (GUS)，該者編碼各種顯色基質係為已知的一種酶 (Jefferson 等人之 (1987) *Plant Mol. Biol. Rep.* 5 : 387-405)；R-基因座基因，該者編碼一產物其調節植物組織中花青素 (anthocyanin) 色素 (紅色) 的製造 (Dellaporta 等人之 (1988) "Molecular cloning of the maize *R-nj* allele by transposon tagging with *Ac*." In 18th Stadler Genetics Symposium, P. Gustafson and R. Appels, eds. (New York: Plenum), pp. 263-82)； β -內醯胺酶基因 (Sutcliffe 等人之 (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3737-41)；一種編碼一種酶的基因，該酶的各種顯色基質係為已知的 (例如 PADAC，一種顯色頭孢菌素 (cephalosporin))；一種螢光素酶基因 (Ow 等人之 (1986) *Science* 234 : 856-9)；一種 *xylE* 基因，其編碼可以轉換顯色兒茶酚的兒茶酚雙加氧酶 (Zukowski 等人之 (1983) *Gene* 46(2-3) : 247-55)；一種澱粉酶基因 (Ikata 等人之 (1990) *Bio/Technol.* 8 : 241-2)；一種酪胺酸酶基因，該者編碼能夠氧化酪胺酸成為 DOPA 及多巴醌 (dopaquinone) 之酶，後者轉而縮合成黑色素 (Katz 等人之

(1983) J. Gen. Microbiol. 129 : 2703-14)；以及 α -半乳糖苷酶。

【0208】在一些具體例中，重組核酸分子，如前文所描述，可以使用於創造基因轉殖植物及在植物中表現異源性核酸的方法中，以製備對鞘翅目及/或半翅目害蟲展示降低的感受性之基因轉殖植物。植物轉形載體可以，舉例而言，藉由將編碼iRNA分子的核酸分子插入到植物轉形載體內並將它們引入到植物內來製備。

【0209】適合用於轉形宿主細胞的方法包括可以引入DNA到一種細胞內的任何方法，諸如藉由原生質體(protoplast)的轉形(參閱，例如美國專利第5,508,184號)，藉由乾燥/抑制(desiccation/inhibition)媒介的DNA攝入(參閱，例如Potrykus等人之(1985) Mol. Gen. Genet. 199 : 183-8)，藉由電穿孔(參閱，例如美國專利第5,384,253號)，藉由以碳化矽纖維攪拌(參閱，例如美國專利第5,302,523號及第5,464,765號)，藉由農桿菌媒介轉形(參閱，例如美國專利第5,563,055號；第5,591,616號；第5,693,512號；第5,824,877號；第5,981,840號；及第6,384,301號)以及藉由加速的DNA包覆顆粒(參閱，例如美國專利第5,015,580號、第5,550,318號、第5,538,880號、第6,160,208號、第6,399,861號，及第6,403,865號)等等。對轉形玉米特別有用的技術係描述於，舉例而言，美國專利第5,591,616號、第7,060,876號以及第7,939,3281號中。透過諸如這些技術的應用，幾乎可以穩

定地轉形任何物種的細胞。在一些具體例中，轉形的DNA係整合至宿主細胞的基因組中。在多細胞物種的情況下，基因轉殖細胞可以再生成一基因轉殖生物體。這些技術任一者可以使用來製造基因轉殖植物，舉例而言，其包含編碼一種或多種iRNA分子的一種或多種核酸序列在該基因轉殖植物之基因組中。

【0210】用於引入一表現載體至植物內最廣泛利用的方法係奠基於各種農桿菌物種的天然轉形系統。農桿腫瘤菌(*A. tumefaciens*)及農桿根毛菌(*A. rhizogenes*)係為植物病原土壤細菌，其等會使植物細胞基因轉形。農桿腫瘤菌(*A. tumefaciens*)及農桿根毛菌(*A. rhizogenes*)的Ti及Ri質體係分別攜帶負責植物基因轉形的基因。Ti(腫瘤誘導)-質體含有被稱為T-DNA的一大區段，該者係轉移到經轉形的植物中。Ti質體之另一區段，Vir區域，係負責T-DNA的轉移。該T-DNA區域係藉由末端重複接壤的。在修飾的雙元載體中，腫瘤誘導基因業已被刪除，而利用Vir區域之功能以轉移由T-DNA交界序列接壤的外來DNA。T-區域亦可含有用於有效地回收基因轉殖細胞及植物之可選擇的標記，以及一個多重選殖位點用於插入轉移的序列，諸如編碼核酸的dsRNA。

【0211】因而，於一些具體例中，一種植物轉形載體係衍生自農桿腫瘤菌的Ti質體(參閱，例如美國專利第4,536,475號、第4,693,977號、第4,886,937號及第5,501,967號；及歐洲專利第EP 0 122 791號)，或衍生自

農桿根毛菌的Ri質體。額外的植物轉形載體包括，舉例而言但不限於，以下所描述的那些：Herrera-Estrella等人之(1983) Nature 303 : 209-13 ; Bevan等人之(1983) Nature 304 : 184-7 ; Klee等人之(1985) Bio/Technol. 3 : 637-42 ; 及歐洲專利第EP 0 120 516號，及那些衍生自於前述任一者。其他與植物自然交互作用的細菌，諸如中華根瘤菌(*Sinorhizobium*)、根瘤菌(*Rhizobium*)及中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium*)，可以予以修飾以媒介許多歧異植物的基因轉移。這些植物關聯的共生細菌可以藉由取得無害的Ti質體及一種合適的雙元載體兩者而勝任基因轉移。

【0212】在提供外源DNA至接受細胞(recipient cell)之後，轉形細胞通常予以鑑定用於進一步培養以及植物再生。為了改良鑑定轉形細胞的能力，可能希望採用一種可選擇或可篩選的標記基因，如先前所陳述，加上用來產生轉形體之轉形載體。在使用一種可選擇標記的情況下，潛在轉形細胞族群內之轉形細胞係藉由使該細胞曝露於一種選擇性藥劑或藥劑等予以鑑定。在使用一種可篩選標記的情況下，可以針對該所欲的標記基因性狀來篩選細胞。

【0213】在暴露於選擇劑之後仍然存活的細胞，或是於篩選分析中已經評分為陽性的細胞，可以培養於支持植物的再生之培養基內。於一些具體例中，任何適合的植物組織培養基(舉例而言，MS和N6培養基)可以透過包括另外的物質而改良，例如生長調節劑。組織可以維持於帶有

生長調節劑的基礎培養基上，直到可得到足夠的組織來開始植物再生工作，或是繼之重複循環的手工選擇，直到組織的形態適合再生為止(舉例而言，典型為大約2週)，接而轉移至有助於莖(shoot)形成的培養基。週期性地轉移培養物直到足夠的莖形成已出現為止。一旦莖形成，將其等轉移至有助於根形成的培養基。一旦足夠的根形成，植物可以轉移至土壤用於進一步的生長和成熟。

【0214】為了確認再生的植物內存在一種感興趣核酸分子(舉例而言一種DNA序列，其編碼抑制靶定基因在鞘翅目及/或半翅目害蟲中表現之一種或多種iRNA分子)，可以執行各種各樣的分析。此等分析包括，舉例而言：分子生物分析，例如南方墨點和北方墨點、PCR以及核酸定序；生化分析，例如舉例而言，透過免疫學的手段(ELISA及/或免疫墨點)或是透過酵素功能來偵測蛋白質產物的存在；植物部分的分析，例如葉片或是根分析；以及全株再生植物之表型的分析。

【0215】整合品件(Integration events)可以，舉例而言，藉由PCR擴增來分析，例如使用對感興趣核酸分子特異性的寡核苷酸引子。PCR基因分型係理解為包括，但不限於，衍生自經單離的宿主植物癒傷組織的基因組DNA之聚合酶連鎖反應(PCR)擴增，其中該癒傷組織係預測含有整合至該基因組中之一感興趣核酸分子，繼之標準選殖及定序分析PCR擴增產物。PCR基因分型方法已清楚描述(舉例而言，Rios,G等人之(2002) Plant J. 32：243-53)，且

可能應用到衍生自任何植物物種(例如玉蜀黍(*Z. mays*)或大豆(*G. max*))或組織類型的基因組DNA，包括細胞培養物。

【0216】一種使用依賴農桿菌轉形方法形成的基因轉殖植物典型地含有插入到一染色體內的單一重組DNA序列。該單一重組DNA序列係稱為一種"基因轉殖品件"或是"整合品件"。此種基因轉殖植物對於插入的外源性序列為半合子的(hemizygous)。在一些具體例中，一種就轉基因而言為同型接合之基因轉殖植物，可以藉由有性交配(自交)含有一種單一外源性基因序列之獨立分離體基因轉殖植物到自身而獲得的，舉例而言一種T₀植物，以產生T₁種子。所產生的四分之一種T₁種子就該轉基因而言為同型接合的。發芽的T₁種子產生植物，其可以用於異型合子歧異度測試者，典型地使用允許區別異型合子與同型合子之間(意即，接合子(zygosity)分析)的SNP分析或是熱放大分析。

【0217】在特定具體例中，具有鞘翅目及/或半翅目害蟲防護效果的至少2、3、4、5、6、7、8、9或是10個或更多個不同的iRNA分子，係於植物細胞中產生。該iRNA分子(例如dsRNA分子)可能從不同轉形品件中引入之多重核酸序列來表現，或從一單一轉形品件中引入之單一核酸序列來表現的。在一些具體例中，數個iRNA分子係於一單一啟動子的控制下表現。在其他具體例中，數個iRNA分子係於多重啟動子控制下表現。可以表現包含多重核酸

序列之單一iRNA分子，該多重多核苷酸每一者係同源於一種或多種鞘翅目及/或半翅目害蟲之內的不同基因座(舉例而言，由序列辨識編號：1、3、5或89所界定的基因座)，二者均於相同的鞘翅目及/或半翅目害蟲物種中的不同族群，或是在不同物種的鞘翅目及/或半翅目害蟲中。

【0218】除了以重組核酸分子直接轉形一種植物之外，基因轉殖植物還可以藉由將具有至少一種基因轉殖品件的第一種植物與缺乏此種品件的第二種植物雜交而製備。舉例而言，一種包含編碼一種iRNA分子之核苷酸序列的重組核酸分子，可以引入至第一植物品系，其順應於轉形以產生一種基因轉殖植物，該基因轉殖植物可能與第二植物品系雜交以使編碼該iRNA分子之核苷酸序列基因滲入(introgress)到該第二植物品系內。

【0219】本發明亦包括含有本發明之一種或多種序列的商品產物。特定具體例包括商品產物其產自於含有本發明之一種或多種核苷酸序列的重組植物或種子。含有本發明之一種或多種序列的一種商品產物係意欲包括，但不僅於，一植物之膳食、油、粉碎或全穀物或種子，或是任何食品或動物飼料產品，其包含一重組植物或種子的任何膳食、油或粉碎或全穀物，其中該重組植物或種子含有本發明之一個或多個序列。本文預期於一種或多種商品或商品產物中本發明之一種或多種序列之偵測為事實上的證據，該者表明該商品或商品產物係產自於一種為了達到使用dsRNA媒介的基因箝制方法來控制鞘翅目及/或半翅目

植物害蟲的目的，而設計來表現本發明之一種或多種核苷酸序列的基因轉殖植物。

【0220】在一些態樣中，包括衍生自轉形植物細胞的基因轉殖植物所生產的種子及商品產物，其中該種子或商品產物包含可檢測數量的本發明之核酸序列。在一些具體例中，此種商品產物可能舉例而言，藉由獲得基因轉殖植物並從該者製備食物或飼料來製造。包含本發明之一種或多種核酸序列之商品產物包括，舉例而言但不限於：一植物之膳食、油、粉碎或全穀物或種子，及包含一重組植物或種子的任何膳食、油或粉碎或全穀物的任何食品產物，其中該重組植物或種子含有本發明之一種或多種核酸序列。在一種或多種商品或商品產物中偵測本發明之一種或多種序列係為一事實上的證據，該者表明該商品或商品產物係產自於設計來表現本發明之一種或多種iRNA分子的基因轉殖植物，為了達到控制鞘翅目及/或半翅目害蟲的目的。

【0221】在一些具體例中，一種包含本發明之核酸分子的基因轉殖植物或種子亦可能在其基因組中包含至少一種其他的基因轉殖品件，包括但不限於：一基因轉殖品件，該者轉錄一種iRNA分子，該iRNA分子在鞘翅目及/或半翅目害蟲中靶定序列辨識編號：1、3、5或89所界定之基因座以外的基因座，例如舉例而言選自於下列所構成的群組之一種或是多種基因座：Caf1-180(美國專利公開案第2012/0174258號)、VatpaseC(美國專利公開案第

2012/0174259 號) 、 Rho1(美國專利公開案第 2012/0174260 號) 、 VatpaseH(美國專利公開案第 2012/0198586 號) 、 PPI-87B(美國專利公開案第 2013/0091600 號) 、 RPA70(美國專利公開案第 2013/0091601 號) 、 RPS6(美國專利公開案第 2013/0097730 號) 、 *ROP*(美國專利公開案第 14/577,811 號) 、 *RNA* 聚合酶 *II*(美國專利公開案第 62/133,214 號) 、 *RNA* 聚合酶 *III* 140(美國專利公開案第 14/577,854 號) 、 *RNA* 聚合酶 *II* 215(美國專利公開案第 62/133,202 號) 、 *RNA* 聚合酶 *II* 33(美國專利公開案第 62/133,210 號) 、 *ncm*(美國專利公開案第 62/095487 號) 、 *Dre4*(美國專利公開案第 14/705,807 號) 、 *COPI* α (美國專利公開案第 62/063,199 號) 、 *COPI* β (美國專利公開案第 62/063,203 號) 、 *COPI* γ (美國專利公開案第 62/063,192 號) 、 *COPI* δ (美國專利公開案第 62/063,216 號) ； 一基因轉殖品件，該者轉錄一種 iRNA 分子，該 iRNA 分子靶定非鞘翅目及/或半翅目害蟲之生物體(例如一種植物寄生線蟲)內的基因；一種編碼殺蟲蛋白質之基因(例如蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*)殺蟲蛋白質，諸如舉例而言，Cry34Ab1(美國專利第 6,127,180 號、第 6,340,593 號、及第 6,624,145 號)、Cry35Ab1(美國專利第 6,083,499 號、第 6,340,593 號、及第 6,548,291 號)、 “Cry34/35Ab1” 組合於單一品件(例如，玉蜀黍(maize)品件 DAS-59122-7；美國專利第 7,323,556 號)、Cry3A(例如，美國專利第 7,230,167 號)、Cry3B(例如，美國專利第

8,101,826號)、Cry6A(例如,美國專利第6,831,062號),以及其等之組合(例如,美國專利申請案第2013/0167268號、第2013/0167269號及第2013/0180016號);產鹼桿菌屬物種(*Alcaligenes* spp.)(例如美國專利公開案第2014/0033361號)或假單胞菌屬物種(*Pseudomonas* spp.)(例如PCT專利公開案第WO2015038734號)殺蟲蛋白質);除草劑耐受性基因(例如一種提供對嘉磷塞(glyphosate)、草銨膦(glufosinate)、汰克草(dicamba)或是2,4-D之耐受性的基因(例如,美國專利第7,838,733號));以及一基因,其促成該基因轉殖植物所欲的表型,諸如提高的產量、改變的脂肪酸代謝、或是細胞質雄性不育的修復。在特定的具體例中,本發明編碼iRNA分子的序列可以與在一植物中的其他昆蟲控制或是疾病抗性性狀組合,以實現所欲的性狀,用於增強昆蟲損害及植物疾病之控制。組合採用區別的作用模式之昆蟲控制性狀,可以提供受防護的基因轉殖植物優越的耐久力,舉例而言,超越懷有一單一的控制性狀的植物,因為在田間發展對抗該(等)性狀之機率將會降低。

【0222】V. 鞘翅目及/或半翅目害蟲中靶定基因的箝制

【0223】A. 概述

【0224】 在本發明之一些具體例中,可以提供至少一個對鞘翅目及/或半翅目害蟲控制有用的核酸分子給一鞘翅目及/或半翅目害蟲,其中該核酸分子在該鞘翅目及/或

半翅目害蟲中導致RNAi媒介的基因靜默。在特定的具體例中，可以提供一種iRNA分子(例如dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA及hpRNA)給該鞘翅目及/或半翅目害蟲。在一些具體例中，對鞘翅目及/或半翅目害蟲控制有用之一種核酸分子可藉由使該核酸分子與一鞘翅目及/或半翅目害蟲接觸而提供至該鞘翅目及/或半翅目害蟲。在這些及進一步具體例中，一種對鞘翅目及/或半翅目害蟲控制有用之核酸分子可以提供在該鞘翅目及/或半翅目害蟲的飼料基質中，舉例而言，一營養組成物。在這些及進一步具體例中，一種對鞘翅目及/或半翅目害蟲控制有用之核酸分子可能透過攝入包含該核酸分子的植物材料而提供，其中該核酸分子係由該鞘翅目及/或半翅目害蟲攝入。在某些具體例中，該核酸分子係透過表現引入到該植物材料內之重組核酸序列而存在於該植物材料中，舉例而言，藉由以包含該重組核酸序列之載體予以轉形一種植物細胞，並從該轉形植物細胞再生一種植物材料或是整個植物。

【0225】B.RNAi-媒介之靶定基因箝制

【0226】在具體例中，本發明提供iRNA分子(例如dsRNA、siRNA、miRNA、shRNA及hpRNA)，其可以設計以靶定在一種鞘翅目及/或半翅目害蟲(例如WCR、NCR、MCR、BSB、南方綠椿象(*Nezara viridula*)、蓋德擬壁蝨(*Piezodorus guildinii*)、褐翅蝨(*Halyomorpha halys*)、綠蝨(*Acrosternum hilare*)，以及褐美洲蝨(*Euschistus servus*))之轉錄體學(transcriptome)中必要

的天然核苷酸序列(例如必要基因)，舉例而言，其係藉由設計一種iRNA分子，該iRNA分子包含至少一股，該股包含特異性地互補於該靶定序列的核苷酸序列。如此設計的iRNA分子序列與該靶定序列之序列可能是同一的，或者可能併入不會妨礙該iRNA分子與其靶定序列之間特異性雜交的失配。

【0227】本發明之iRNA分子可以在一種鞘翅目及/或半翅目害蟲之基因箝制之方法中使用，由此降低該害蟲在一植物(舉例而言，一種包含iRNA分子之受防護轉形植物)上所造成之損害的位準或發病率。如於此所使用，術語“基因箝制”意指用於降低基因轉錄為mRNA及隨後該mRNA轉譯之結果所製造的蛋白質位準之任何眾所周知的方法，包括降低蛋白質從一基因或一編碼序列的表現，包括表現之轉錄後抑制及轉錄箝制。轉錄後抑制係藉由從用於箝制之靶定基因轉錄之mRNA的全部或部分，與使用於箝制的相應iRNA分子之間特異性同源而媒介。此外，轉錄後抑制意指在該細胞中可用於核糖體結合的mRNA數量之大量且可測量的降低。

【0228】在iRNA分子為一種dsRNA分子的具體例中，該dsRNA分子可以由酵素，DICER，切割成短的siRNA分子(長度大約20個核苷酸)。藉由DICER活性而在該dsRNA分子上生成之雙股siRNA分子可以分開成兩個單股的siRNA；“過客股”與“引導股”。過客股可以被降解，而引導股可以併入到RISC中。轉錄後抑制之發生係藉由該

引導股與一種mRNA分子之特異性互補序列的特異性雜交，且隨後由酵素，阿革蛋白家族(Argonaute)(RISC複合體之催化組份)予以切割。

【0229】在本發明的具體例中，可以使用任何形式的iRNA分子。熟習本技藝者將理解的是，在製備期間及在提供該iRNA分子至細胞之步驟期間，dsRNA分子典型係比單股RNA分子更穩定，以及典型地於細胞中也是更穩定的。因此，雖然siRNA及miRNA分子，舉例而言，在一些具體例中可能是同樣有效的，但是因dsRNA分子之穩定性可能會擇取dsRNA分子。

【0230】在特定的具體例中，提供一種包含一核苷酸序列之核酸分子，該核苷酸序列可以在活體外表現以產生一種iRNA分子，該iRNA分子係實質上同源於一種鞘翅目及/或半翅目害蟲之基因組內的核苷酸序列所編碼的核酸分子。在某些具體例中，活體外轉錄的iRNA分子可以為包含一種莖環結構的穩定dsRNA分子。在一種鞘翅目及/或半翅目害蟲接觸活體外轉錄的iRNA分子之後，可以在該鞘翅目及/或半翅目害蟲中發生靶定基因(舉例而言，一必要基因)的轉錄後抑制。

【0231】在本發明之一些具體例中，一種核酸分子之表現係使用於轉錄後抑制一種鞘翅目害蟲之一靶定基因的方法中，該核酸分子包含一種核苷酸序列之至少15個連續核苷酸，其中該核苷酸序列係選自於下列所構成的群組：序列辨識編號：1；序列辨識編號：1之互補物；序列辨識

編號：3；序列辨識編號：3之互補物；序列辨識編號：5；
 序列辨識編號：5之互補物；序列辨識編號：1、3或5之至少15個連續核苷酸的片段；序列辨識編號：1、3或5之至少15個連續核苷酸的片段之互補物；一種葉甲(*Diabrotica*)生物體(例如WCR)之天然編碼序列，其包含序列辨識編號：1、3或5；一種葉甲生物體之天然編碼序列之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：1、3或5；一葉甲生物體之天然非編碼序列，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：1、3或5之天然RNA分子；一葉甲生物體之天然非編碼序列之互補物，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：1、3或5之天然RNA分子；一葉甲生物體之天然非編碼序列之互補物，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：1、3或5之天然RNA分子；一葉甲生物體(例如WCR)之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段，該天然編碼序列包含序列辨識編號：1、3或5；一葉甲生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：1、3或5；一葉甲生物體之天然非編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：1、3或5之天然RNA分子；以及一葉甲生物體之天然非編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段之互補物，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：1、3或5之天然RNA分子。在某些具體例中，一種核酸分子之表現與前述任一者有至少約80%同一性(例如80%、約81%、約

82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%及100%)者可以被使用。在這些及進一步具體例中，可以表現一種核酸分子，其特異性地雜交到存在於一種鞘翅目害蟲的至少一細胞中之RNA分子。

【0232】在本發明之某些具體例中，一種核酸分子之表現係使用於轉錄後抑制一種半翅目害蟲之一靶定基因的方法中，該核酸分子包含一種核苷酸序列之至少15個連續核苷酸，其中該核苷酸序列係選自於下列所構成的群組：序列辨識編號：89；序列辨識編號：89之互補物；序列辨識編號：89之至少15個連續核苷酸的片段；序列辨識編號：89之至少15個連續核苷酸的片段之互補物；一種半翅目生物體之天然編碼序列序列辨識編號：89；一種半翅目生物體之天然編碼序列之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：89；一半翅目生物體之天然非編碼序列，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：89之天然RNA分子；一半翅目生物體之天然非編碼序列之互補物，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：89之天然RNA分子；一半翅目生物體之天然非編碼序列之互補物，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：89之天然RNA分子；一半翅目生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段，該天然編碼序列包含序列辨識編號：89；一半翅目生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片

段之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：89；一半翅目生物體之天然非編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：89之天然RNA分子；以及一半翅目生物體之天然非編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段之互補物，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：89之天然RNA分子。在某些具體例中，一種核酸分子之表現與前述任一者有至少約80%同一性(例如80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%及100%)者可以被使用。在這些及進一步具體例中，可以表現一種核酸分子，其特異性地雜交到存在於一種半翅目害蟲的至少一細胞中之RNA分子。

【0233】 在一些具體例中，至少一種核酸分子之表現可以使用於轉錄後抑制一種鞘翅目害蟲之一靶定基因的方法中，該核酸分子包含一種核苷酸序列之至少15個連續核苷酸，其中該核苷酸序列係選自於下列所構成的群組：序列辨識編號：1；序列辨識編號：1之互補物；序列辨識編號：3；序列辨識編號：3之互補物；序列辨識編號：5；序列辨識編號：5之互補物；序列辨識編號：1、3或5之至少15個連續核苷酸的片段；序列辨識編號：1、3或5之至少15個連續核苷酸的片段之互補物；一葉甲生物體(例如WCR)之天然編碼序列，該天然編碼序列包含序列辨識編

號：1、3或5；一葉甲生物體(例如WCR)之天然編碼序列之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：1、3或5；一葉甲生物體之天然非編碼序列，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：1、3或5之天然RNA分子；一葉甲生物體之天然非編碼序列之互補物，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：1、3或5之天然RNA分子；一葉甲生物體(例如WCR)之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段，該天然編碼序列包含序列辨識編號：1、3或5；一葉甲生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：1、3或5；一葉甲生物體之天然非編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：1、3或5之天然RNA分子；以及一葉甲生物體之天然非編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段之互補物，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：1、3或5之天然RNA分子。在某些具體例中，一種核酸分子之表現與前述任一者有至少約80%同一性(例如80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%及100%)者可以被使用。在這些及進一步具體例中，可以表現一種核酸分子，其特異性地雜交到存在於一種鞘翅目害蟲的至少一細胞中之RNA分子。在特定實例中，此一核酸分子可以包含含有序列辨識編號：1、3或5之核苷酸序列。

【0234】在本發明之特定具體例中，一種核酸分子之表現係使用於轉錄後抑制一種半翅目害蟲之一靶定基因的方法中，該核酸分子包含一種核苷酸序列之至少15個連續核苷酸，其中該核苷酸序列係選自於下列所構成的群組：序列辨識編號：89；序列辨識編號：89之互補物；序列辨識編號：89之至少15個連續核苷酸的片段；序列辨識編號：89之至少15個連續核苷酸的片段之互補物；一種半翅目生物體之天然編碼序列序列辨識編號：89；一種半翅目生物體之天然編碼序列之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：89；一半翅目生物體之天然非編碼序列，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：89之天然RNA分子；一半翅目生物體之天然非編碼序列之互補物，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：89之天然RNA分子；一半翅目生物體之天然非編碼序列之互補物，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：89之天然RNA分子；一半翅目生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段，該天然編碼序列包含序列辨識編號：89；一半翅目生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：89；一半翅目生物體之天然非編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：89之天然RNA分子；以及一半翅目生物體之天然非編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段之互補物，該天然非編碼序列轉錄成包含序列辨識編號：89之天然RNA分子。在某些

具體例中，一種核酸分子之表現與前述任一者有至少約80%同一性(例如80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%及100%)者可以被使用。在這些及進一步具體例中，可以表現一種核酸分子，其特異性地雜交到存在於一種半翅目害蟲的至少一細胞中之RNA分子。在特定實例中，此一核酸分子可以包含含有序列辨識編號：89之核苷酸序列。

【0235】本發明一些具體例之一重要特徵為，該RNAi轉錄後抑制系統能夠容忍靶定基因中的序列變化，該者歸因於基因突變、品種多型性(strain polymorphism)或是演化分歧係為可預期的。所引入的核酸分子可能不需要絕對同源於一種靶定基因之初級轉錄產物或完全加工的mRNA任一者，只要該引入的核酸分子係特異性地雜交至該靶定基因之初級轉錄產物或完全加工的mRNA任一者。再者，該引入的核酸分子可能不需要為全長，相對於該靶定基因之初級轉錄產物或完全加工的mRNA任一者而言。

【0236】使用本發明之iRNA技術之一靶定基因之抑制係序列特異性的；亦即實質上同源於該iRNA分子之核苷酸序列係被靶定用於基因抑制。在一些具體例中，一種包含核苷酸序列之RNA分子可以使用於抑制，該核苷酸序列與部分的靶定基因序列有同一性。在這些及進一步具體

例中，可以使用一種包含一種核苷酸序列之RNA分子，該多核苷酸序列相對於一靶定基因序列具有一個或多個插入、缺失及/或點突變。在特定的具體例中，一種iRNA分子與一靶定基因之一部分可能共享，舉例而言，至少從大約80%、至少從約81%、至少從約82%、至少從約83%、至少從約84%、至少從約85%、至少從約86%、至少從約87%、至少從約88%、至少從約89%、至少從約90%、至少從約91%、至少從約92%、至少從約93%、至少從約94%、至少從約95%、至少從約96%、至少從約97%、至少從約98%、至少從約99%、至少從大約100%、及100%的序列同一性。任擇地，一種dsRNA分子之雙聯體區域可以與一靶定基因轉錄本的一部分特異性地雜交。在特異性雜交的分子中，一種展示出較大同源性之比全長小的序列會補償一種較長、較不同源的序列。一種與一靶定基因轉錄本的一部分有同一性之dsRNA分子雙聯體區域的核苷酸序列長度，可以為至少大約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、100、200、300、400、500、或是至少大約1000個鹼基。在一些具體例中，可以使用大於15至100個核苷酸之序列。在特定具體例中，可以使用大於約200至300個核苷酸之序列。在特定的具體例中，取決於該靶定基因的大小，可以使用大於約500至1000個核苷酸之序列。

【0237】在某些具體例中，一種靶定基因在鞘翅目及

/或半翅目害蟲中的表現可以在該鞘翅目及/或半翅目害蟲的細胞內抑制達至少10%；至少33%；至少50%；或是至少80%，藉由此，發生顯著的抑制。顯著的抑制意指抑制超過一閾值，該閾值引致一種可偵測的表型(例如停止生長、停止取食、停止發育、引發死亡等等)，或是相應於該被抑制的靶定基因，在RNA及/或基因產物方面有可偵測的下降。雖然在本發明之某些具體例中，抑制發生在鞘翅目及/或半翅目害蟲實質所有的細胞中，但是在其他具體例中，抑制只發生在表現該靶定基因之子集細胞內。

【0238】在一些具體例中，細胞內之轉錄箝制係藉由出現一種dsRNA分子而媒介，該dsRNA分子對一啟動子DNA序列或其等之互補物展示實質的序列同一性，以招致稱為"啟動子反向箝制(promoter trans suppression)"。基因箝制對可能攝入或接觸此種dsRNA分子之一種鞘翅目及/或半翅目害蟲的靶定基因可能為有效的，舉例而言，藉由攝入或接觸含有該dsRNA分子的植物材料。在啟動子反向箝制中使用的dsRNA分子可以特異性地設計，以抑制或箝制該鞘翅目及/或半翅目害蟲細胞中一種或多種同源或互補的序列之表現。藉由反義或意義定向之RNA的轉錄後基因箝制以調節植物細胞中的基因表現，係揭露於美國專利第5,107,065號、第5,231,020號、第5,283,184號，以及第5,759,829號內。

【0239】C.提供給鞘翅目及/或半翅目害蟲的iRNA分子之表現

【0240】表現iRNA分子用於在一種鞘翅目及/或半翅目害蟲中RNAi媒介的基因抑制，可以在許多活體外或活體內形式之任一者中實行。該iRNA分子繼而可以提供給一種鞘翅目及/或半翅目害蟲，舉例而言，藉由使該iRNA分子與該害蟲接觸，或是藉由使該害蟲攝入或以其他方式內化該iRNA分子。本發明之一些具體例包括鞘翅目及/或半翅目害蟲轉形之宿主植物、經轉形植物細胞、及轉形植物的後代。轉形植物細胞及轉形植物可以舉例而言，在一異源性啟動子控制下，予以遺傳工程以表現一種或多種iRNA分子，以提供害蟲防護效果。因此，當一種鞘翅目及/或半翅目害蟲在取食期間消耗一基因轉殖植物或植物細胞時，該害蟲可能攝入該基因轉殖植物或細胞中表現的iRNA分子。本發明之核苷酸序列亦可引入至廣泛種類的原核及真核微生物宿主，以生產iRNA分子。術語"微生物"包括原核及真核物種，諸如細菌及真菌。

【0241】基因表現之調控可以包括此種表現的部分或完全箝制。在另一具體例中，一種用於箝制一種鞘翅目及/或半翅目害蟲中基因表現的方法包含：在該害蟲宿主之組織中提供基因箝制數量的至少一種dsRNA分子，該dsRNA分子係在本文中所描述的核苷酸序列轉錄之後形成者，且該核苷酸序列的至少一區段係互補於該鞘翅目及/或半翅目害蟲細胞內的一種mRNA序列。依據本發明之由鞘翅目及/或半翅目害蟲攝入的dsRNA分子，包括其修飾形式，諸如siRNA、miRNA、shRNA、或hpRNA分子，

可以為至少從大約80%、大約81%、大約82%、大約83%、大約84%、大約85%、大約86%、大約87%、大約88%、大約89%、大約90%、大約91%、大約92%、大約93%、大約94%、大約95%、大約96%、大約97%、大約98%、大約99%、大約100%，或是約100%同一於從一種核酸分子轉錄的RNA分子，該分子包含一種含有序列辨識編號：1、3、5或89之核苷酸序列。因而提供經單離且實質純化的核酸分子，包括但不限於，非天然存在的核苷酸序列及重組DNA建構物用於提供本發明之dsRNA分子，該者當引入其中時，會箝制或抑制鞘翅目及/或半翅目害蟲中內源性編碼序列或是靶定編碼序列的表現。

【0242】特定的具體例提供一種遞送系統，供遞送iRNA分子用於轉錄後抑制一種鞘翅目及/或半翅目害蟲中之一種或多種靶定基因，並控制該鞘翅目及/或半翅目植物害蟲的族群。在一些具體例中，該遞送系統包含攝入一宿主基因轉殖植物細胞或攝入該宿主細胞內含物，該內含物含有在該宿主細胞中轉錄之RNA分子。在這些及進一步具體例中，一基因轉殖植物細胞或一基因轉殖植物係被創造，該者含有提供本發明之穩定dsRNA分子的一重組DNA建構物。包含編碼一特定iRNA分子的核酸序列之基因轉殖植物細胞及基因轉殖植物，可以藉由採用重組DNA技術(該者之基本技術在本技藝中為眾所周知的)來產生，以建構一種包含一核苷酸序列的植物轉形載體，該核苷酸序列編碼本發明之一種iRNA分子(例如一種穩定的dsRNA分

子)；轉形一植物細胞或植物；以及產生含有轉錄iRNA分子的基因轉殖植物細胞或是基因轉殖植物。

【0243】為了傳遞鞘翅目及/或半翅目害蟲抗性至一基因轉殖植物，一種重組DNA分子可以，舉例而言，轉錄成一種iRNA分子，諸如dsRNA分子、siRNA分子、miRNA分子、shRNA分子或hpRNA分子。在一些具體例中，從一種重組DNA分子轉錄的RNA分子可以在該重組植物之組織或流體內形成dsRNA分子。此一種dsRNA分子可以包含在一種核苷酸序列的一部分內，該核苷酸序列與一種相應的核苷酸序列為同一性的，該相應的多核苷酸係從可能侵擾宿主植物之鞘翅目及/或半翅目害蟲類型內的DNA序列所轉錄的。一種靶定基因在該鞘翅目及/或半翅目害蟲內的表現係由該攝入的dsRNA分子予以箝制，且該靶定基因在鞘翅目及/或半翅目害蟲中表現之箝制引致舉例而言，鞘翅目及/或半翅目害蟲停止取食，且最終的結果為舉例而言，防護基因轉殖植物不受鞘翅目及/或半翅目害蟲之進一步損傷。dsRNA分子的調控效果業已顯示為適用於在害蟲中表現的各種基因，包括舉例而言，負責細胞代謝或細胞轉形之內源性基因，包括管家基因；轉錄因子；蛻皮相關基因；及其他編碼涉及細胞代謝或正常生長及發育的多肽之基因。

【0244】為了從活體內或是一種表現建構物之轉基因進行轉錄，在一些具體例中可以使用一調節區域(例如啟動子、增強子、靜默子及多腺苷酸化訊號)以轉錄該RNA

股(或股等)。所以，在一些具體例中，如前文所陳述，一種供用於生產iRNA分子的核苷酸序列可能可操縱地鏈接到一個或多個在植物宿主細胞中作用的啟動子序列。該啟動子可能為一種內源性啟動子，通常駐留在宿主基因組中。本發明之核苷酸序列，在操縱鏈接之啟動子序列的控制下，可能進一步側接額外的序列，其有利地影響其轉錄及/或所得轉錄本之穩定性。此種序列可以位於該操縱鏈接啟動子的上游，該表現建構物3'端的下游，且可能發生於該啟動子上游與該表現建構物3'端下游兩處。

【0245】一些具體例提供用於降低由一種取食植物之鞘翅目及/或半翅目害蟲所造成的宿主植物(例如玉米植物)損害之方法，其中該方法包含在該宿主植物中提供一種表現本發明的至少一種核酸分子之轉形植物細胞，其中該核酸分子一旦由該鞘翅目及/或半翅目害蟲取用，即起作用以抑制一靶定序列在該鞘翅目及/或半翅目害蟲內的表現，此表現抑制引致該鞘翅目及/或半翅目害蟲的死亡率、降低的生長及/或降低的的生殖，從而降低該鞘翅目及/或半翅目害蟲對該宿主植物造成的損害。在一些具體例中，該核酸分子包含dsRNA分子。在這些及進一步具體例中，該核酸分子包含dsRNA分子，其中該dsRNA分子每一者包含超過一種核苷酸序列，其特異性地雜交到鞘翅目及/或半翅目害蟲細胞中表現之核酸分子。在一些具體例中，該核酸分子係由一種核苷酸序列組成，該核苷酸序列係特異性地雜交至一種鞘翅目及/或半翅目害蟲細胞中表現的核酸

分子。

【0246】在其他的具體例中，提供一種用於提高玉米作物產量之方法，其中該方法包含引入本發明之至少一種核酸分子到玉米植物內；培育該玉米植物以允許一種包含該核酸序列的iRNA分子表現，其中包含該核酸序列的iRNA分子之表現抑制了鞘翅目及/或半翅目害蟲的生長及/或鞘翅目及/或半翅目害蟲的損害，從而降低或消除歸因於鞘翅目及/或半翅目害蟲侵擾的產量損失。在一些具體例中，該iRNA分子為一種dsRNA分子。在這些及進一步具體例中，該核酸分子包含dsRNA分子，該dsRNA分子每一者包含超過一種核苷酸序列，其特異性地雜交到鞘翅目及/或半翅目害蟲細胞中表現之核酸分子。在一些具體例中，該核酸分子係由一種核苷酸序列組成，其中該核苷酸序列係特異性地雜交至一種鞘翅目及/或半翅目害蟲細胞中表現的核酸分子。

【0247】在一些具體例中，提供一種用於調控一靶定基因在一種鞘翅目及/或半翅目害蟲中之表現的方法，該方法包含：以包含一種核酸序列的一載體來轉形植物細胞，其中該核酸序列編碼本發明至少一種核酸分子，其中該核苷酸序列係可操縱地鏈接至一啟動子及一轉錄終止序列；在足以允許包含數個轉形植物細胞之植物細胞培養物發展的條件下培養該轉形的植物細胞；選擇已經將該核酸分子整合至其等之基因組的轉形植物細胞；篩選表現該整合核酸分子所編碼之iRNA分子的該轉形植物細胞；選擇表現

該iRNA分子之基因轉殖植物細胞；及餵食該經選擇的基因轉殖植物細胞給該鞘翅目及/或半翅目害蟲。植物亦可以從表現該整合核酸分子所編碼之iRNA分子的轉形植物細胞予以再生。在一些具體例中，該iRNA為一種dsRNA分子。在這些及進一步具體例中，該核酸分子包含dsRNA分子，該dsRNA分子每一者包含超過一種核苷酸序列，其特異性地雜交到鞘翅目及/或半翅目害蟲細胞中表現的核酸分子。在一些具體例中，該核酸分子係由一種核苷酸序列組成，其中該核苷酸序列係特異性地雜交至一種鞘翅目及/或半翅目害蟲細胞中表現的核酸分子。

【0248】本發明之iRNA分子可以併入於一種植物物種(例如玉米)之種子內，無論是做為源自併入植物細胞基因組中之一種重組基因表現的產物，或是併入至種植之前施加到種子的塗料或種子處理。一種包含重組基因之植物細胞係視為一種基因轉殖品件。本發明的具體例中亦包括用於遞送iRNA分子到鞘翅目及/或半翅目害蟲的遞送系統。舉例而言，本發明之iRNA分子可以直接引入一種鞘翅目及/或半翅目害蟲的細胞內。引入的方法可以包括將iRNA直接與源自鞘翅目及/或半翅目害蟲宿主的植物組織混合，以及施用包含本發明iRNA分子的組成物至宿主植物組織。舉例而言，iRNA分子可以噴灑到植物表面上。或者，一種iRNA分子可能由微生物表現，且該微生物可以施用到該植物表面上，或藉由諸如注射之物理手段引入到根或莖中。如前文所討論，一種基因轉殖植物亦可以遺

傳工程處理，以表現足以殺死已知侵擾該植物的鞘翅目及/或半翅目害蟲的數量之至少一種iRNA分子。藉由化學或酶促合成所製造的iRNA分子亦可以以一致於普遍農業作業的方式予以調配，並使用做為噴霧產品用於控制鞘翅目及/或半翅目害蟲造成的植物損害。該調配物可以包括針對有效葉面覆蓋 (foliar coverage) 所需的適當展著劑 (stickers) 及增濕劑，以及UV防護劑以防護iRNA分子(例如，dsRNA分子)免受紫外線損害。此種添加劑在生物殺蟲劑工業係普遍的，且對熟習該項技藝者為眾所周知的。此種應用可以與其他噴霧殺蟲劑應用(基於生物學或是其他方式)組合，以增強植物防護不受對鞘翅目及/或半翅目害蟲傷害。

【0249】於此引用之所有的參考文獻，包括公開案、專利以及專利申請案，皆在此併入本案以作為參考資料，其內容與本揭示之明確細節並無不一致之處，因此每一單獨與特定指出之文獻皆完整併入本案以作為參考資料。於此所討論之參考文獻僅提供本申請案申請日之前的揭示。於此揭示之內容不應該被解釋為本發明人無權憑藉先前之發明揭示本發明。

【0250】下列實施例提供某些特定特徵及/或態樣之說明。這些實施例不應解釋為將本揭示限制於所描述之特定特徵或態樣。

實施例

實施例1

昆蟲飲食生物分析

【0251】樣品製備及生物分析 許多dsRNA分子(包括那些相應於*rpL40-1 reg1*(序列辨識編號：9)、*rpL40-3 reg3*(序列辨識編號：10)、*rpL40-1 ver1*(序列辨識編號：11)、*rpL40-1 ver2*(序列辨識編號：12)、*rpL40-1 ver3*(序列辨識編號：13)、*rpL40-1 ver4*(序列辨識編號：14)，及*rpL40-1 ver5*(序列辨識編號：15))係使用MEGASCRIPT® RNAi套組或是HiScribe® T7活體外轉錄套組予以合成及純化。純化的dsRNA分子係於TE緩衝液中製備，且所有生物分析均含有由此緩衝液組成之對照處理，該者擔任WCR(玉米根螢葉甲(*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte))死亡率或生長抑制的背景檢查。dsRNA分子在該生物分析緩衝液中之濃度係使用一種NANODROP™ 8000分光光度計予以測量(THERMO SCIENTIFIC，Wilmington，DE)。

【0252】在生物分析中測試樣品的昆蟲活性，該生物分析係以新生的昆蟲幼蟲在人工昆蟲飲食上進行。WCR的卵係得自於CROP CHARACTERISTICS，INC.(Farmington，MN)。

【0253】生物分析係於特別針對昆蟲生物分析設計的128孔塑膠盤中進行(C-D INTERNATIONAL，Pitman，NJ)。每孔含有大約1.0 mL針對鞘翅目昆蟲生長設計的人工飲食。60 μ L等分試樣的dsRNA樣品係藉由移液管來遞送至每一孔的飲食表面上(40 μ L/cm²)。dsRNA

樣品濃度係計算為該孔中每平方公分表面積(1.5 cm²)dsRNA的數量(ng/cm²)。經處理的孔盤係維持在通風櫥中，直到該飲食表面上的液體蒸發或吸收到飲食內。

【0254】在羽化幾個小時之內，個別幼蟲係以沾濕的駝毛刷挑起並放置在經處理的飲食上(每孔一隻或二隻幼蟲)。然後以透明塑膠黏接片來密封該128孔塑膠盤之受侵擾孔，並且開孔以讓氣體交換。生物分析盤係維持在受控的環境條件下(28 °C，~40%相對濕度，16：8(光：暗))達9天，在那之後，記錄曝露到每個樣品的昆蟲總數、死亡的昆蟲數、及存活昆蟲的重量。計算每一處理之死亡率平均百分比及平均生長抑制。生長抑制(GI)係如以下來計算：

$$GI = [1 - (TWIT/TNIT) / (TWIBC/TNIBC)]$$

其中TWIT係為該處理中活蟲的總重量；

TNIT係為該處理中昆蟲的總數；

TWIBC係為在背景檢查(緩衝液對照)中活蟲的總重量；及

TNIBC係為在背景檢查(緩衝液對照)中昆蟲的總數。

【0255】統計分析係使用JMPTM軟體(SAS，Cary，NC)進行。

【0256】LC₅₀(致死濃度)係定義為50%的測試昆蟲被殺死時的劑量。GI₅₀(生長抑制)定義為測試昆蟲的平均生長(例如，活的重量)，是背景檢查樣品所見之平均值的50%的劑量。

【0257】重複的生物分析證明，攝入特定樣品引致令人驚訝且非預期的玉米根蟲幼蟲之死亡率及生長抑制。

實施例2

候選的靶定基因之鑑定

【0258】多階段發育的WCR(玉米根螢葉甲(*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte))係選定用於匯集的轉錄體學分析，以提供候選的靶定基因序列用於RNAi基因轉殖植物昆蟲抗性技術之控制。

【0259】於一範例中，總RNA係從約0.9克整隻的一齡WCR幼蟲；(孵化後4至5天，維持在16°C)予以單離，並使用下列苯酚/TRIREAGENT[®]為基礎的方法(MOLECULAR RESEARCH CENTER, Cincinnati, OH)予以純化：

【0260】幼蟲係於室溫下在15 mL的均質機中以10 mL TRI REAGENT[®]均質化，直至獲得均勻的懸浮液為止。繼5分鐘室溫中培育之後，均質物係分配至1.5 mL微量離心管中(每管1 mL)，加入200 μ L的氯仿，並將混合物劇烈震盪15秒。在允許萃取物於室溫靜置10分鐘之後，該等相係藉由12,000x g於4°C下離心而分開。上層相(包含約0.6 mL)係小心地轉移到另一個滅菌的1.5 mL管子中，且加入等體積的室溫異丙醇。在室溫中培育5至10分鐘之後，混合物係於12,000x g離心8分鐘(4°C或25°C下)。

【0261】上清液係小心地移除並丟棄，而RNA沈澱物係藉由以75%乙醇渦漩洗滌兩次，且在每次洗滌之後藉由

7,500 x g 離心5分鐘(4°C 或25°C)回收。小心地移除乙醇，允許沈澱物空氣乾燥計3至5分鐘，然後溶解於無核酸酶的滅菌水中。RNA濃度係藉由測量260 nm及280 nm處的吸光度(A)而確定。典型的萃取係從大約0.9 gm的幼蟲產出高於1 mg的總RNA，且 A_{260}/A_{280} 比值為1.9。由此萃取的RNA係儲存於-80°C，直到進一步加工。

【0262】RNA品質係藉由將等分試樣通過1%瓊脂糖凝膠展開而確定。瓊脂糖凝膠溶液係使用高壓蒸氣滅菌的10x TAE緩衝液(Tris-乙酸EDTA；1x濃度為0.04 M Tris-乙酸、1mM的EDTA(乙二胺四乙酸鈉鹽)，pH為8.0)、以DEPC(焦碳酸二乙酯)-處理的水在高壓蒸氣滅菌的容器中稀釋製成。使用1x TAE做為展開緩衝液。在使用之前，電泳槽及孔形成梳係以RNaseAway™(INVITROGEN INC., Carlsbad, CA)來清洗。2 μ L的RNA樣品係與8 μ L的TE緩衝液(10 mM的Tris HCl, pH為7.0; 1 mM EDTA)及10 μ L的RNA樣品緩衝液(NOVAGEN® 目錄號70606; EMD4 Bioscience, Gibbstown, NJ)混合。該樣品係於70°C加熱3分鐘，冷卻至室溫，且每孔係加載5 μ L(含1 μ g至2 μ g的RNA)。市售的RNA分子量標記係同時在分隔的孔中展開，用於分子大小比較。該凝膠係以60伏特展開2小時。

【0263】一種標準化的cDNA庫係由商業服務提供商(EUROFINS MWG Operon, Huntsville, AL)而從幼蟲總RNA製備，使用隨機引動(priming)。標準化的幼蟲

cDNA庫係以1/2底片尺度(plate scale)，藉由GS FLX 454 Titanium™系列化學於EUROFINS MWG Operon定序，該者產生超過600,000個讀取及348 bp之平均讀取長度。350,000個讀取係組裝成高於50,000個片段重疊群。未組裝讀取及片段重疊群兩者皆使用公開可用的程式，FORMATDB(可從NCBI獲得)轉換成BLASTable數據庫。

【0264】總RNA及標準化cDNA庫係同樣地從來自其他WCR發育階段收穫的材料來製備。一種用於靶定基因篩選的匯集轉錄體學庫係藉由組合代表各種發育階段的cDNA庫成員而建構。

【0265】使用關於特定基因在其他昆蟲，諸如果蠅(*Drosophila*)及穀蛀蟲(*Tribolium*)，的致命RNAi效果的資訊來選擇RNAi靶定的候選基因。這些基因係假設為對鞘翅目昆蟲之存活與生長為必要的。選定的靶定基因同源物係如下文所描述般在該轉錄體學序列數據庫中辨識。該等靶定基因之全長或部分序列係藉由PCR擴增，以製備用於雙股RNA(dsRNA)製造的模板。

【0266】使用候選蛋白質編碼序列的TBLASTN搜尋，係對含有未組裝的葉甲(*Diabrotica*)序列讀取或經組裝重疊群的BLASTable數據庫展開。對葉甲序列之顯著命中(對片段重疊群同源物界定為比 e^{-20} 更好，且對未組裝的序列讀取同源物為比 e^{-10} 更好)係使用BLASTX對NCBI非冗餘數據庫(non-redundant database)確認。此BLASTX搜尋的結果確認的是，在TBLASTN搜尋中辨識的葉甲同

源物候選基因序列的確包含葉甲基因，或是為葉甲序列對非葉甲候選基因序列可獲得之最佳命中(best hit)。在大多數情況下，穀蛀蟲(*Tribolium*)候選基因註解為一種編碼一蛋白質、對葉甲轉錄體學序列中的一序列或是序列等給予明白的序列同源性。在少數情況下，明顯的是，藉由與一種非葉甲候選基因同源而選定的一些葉甲類片段重疊群或未組裝序列讀取係重疊的，而該片段重疊群之總成無法與這些重疊結合。在該等情況下，使用 Sequencher™ v4.9(GENE CODES CORPORATION, Ann Arbor, MI)以組裝該等序列成為較長的片段重疊群。

【0267】一種編碼葉甲(*Diabrotica*)*rpL40*(序列辨識編號：1、3及5)之候選靶定基因係辨識為可能在WCR導致鞘翅目害蟲之死亡率、生長抑制、發育抑制，或生殖抑制的基因。

【0268】序列辨識編號：1、3及5的序列是新穎的。公共資料庫中沒有提供該序列，以及WO/2011/025860；美國專利申請案第20070124836號；美國專利申請案第20090306189號；美國專利申請案第US20070050860號；美國專利申請案第20100192265號；或是美國專利7,612,194中均未揭露。葉甲(*Diabrotica*)*rpL40-1*序列(序列辨識編號：1)與源自埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)(GENBANK登錄號AF418984.1)之片段序列有些相關。葉甲RPL40-1胺基酸序列(序列辨識編號：2)最接近的同源物為一種黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)

蛋白質，其具有GENBANK登錄號NP_476776.1(於同源區域為100%相似；100%同一的)。葉甲*rpL40-2*序列(序列辨識編號：3)與源自山松甲蟲(*Dendroctonus ponderosae*)(GENBANK登錄號APGK01027402.1)之片段序列有些相關。葉甲RPL40-2胺基酸序列(序列辨識編號：4)最接近的同源物為一種囊舌蟲(*Saccoglossus kowalevskii*)蛋白質，其具有GENBANK登錄號XP_006817704.1(於同源區域為99%相似；98%同一的)。葉甲*rpL40-3*序列(序列辨識編號：5)與源自毛竹(*Phyllostachys edulis*)(GENBANK登錄號FP093773.1)之短片段序列有些相關。葉甲RPL40-3胺基酸序列(序列辨識編號：6)最接近的同源物為一種簇蟲(*Gregarina niphandrodes*)蛋白質，其具有GENBANK登錄號XP_011128524.1(於同源區域為96%相似；88%同一的)。葉甲RPL40-3胺基酸序列(序列辨識編號：7)最接近的同源物為一種簇蟲(*Gregarina niphandrodes*)蛋白質，其具有GENBANK登錄號XP_011128522.1(於同源區域為51%相似；35%同一的)。葉甲RPL40-3胺基酸序列(序列辨識編號：8)最接近的同源物為一種簇蟲(*Gregarina niphandrodes*)蛋白質，其具有GENBANK登錄號XDR24359.1(於同源區域為62%相似；44%同一的)。

【0269】*rpL40* dsRNA轉基因可以與其他dsRNA分子組合，以提供冗餘的RNAi靶定以及協同RNAi效應。表現靶定*rpL40*的dsRNA之基因轉殖玉米品件對於預防玉米

根蟲之根取食損害是有用的。*rpL40* dsRNA轉基因代表新的作用模式，供用於組合蘇力菌 (*Bacillus thuringiensis*)、產鹼桿菌屬物種(*Alcaligenes* spp.)或假單胞菌屬物種(*Pseudomonas* spp.)的殺蟲蛋白質技術害蟲抗性管治基因錐體(Insect Resistance Management gene pyramids)，以減輕對此等根蟲控制技術有抗性之根蟲族群的發育。

【0270】葉甲(*Diabrotica*)候選基因序列，於此稱為 *rpL40*，之全長或部分選殖體係用來產生PCR擴增物用於 dsRNA合成。

【0271】序列辨識編號：1顯示葉甲*rpL40-1*之574 bp DNA序列。

【0272】序列辨識編號：3顯示葉甲*rpL40-2*之652 bp DNA序列。

【0273】序列辨識編號：5顯示葉甲*rpL40-3*之4065 bp DNA序列。

【0274】序列辨識編號：9顯示葉甲*rpL40-1 reg1*之306 bp DNA序列。

【0275】序列辨識編號：10顯示葉甲*rpL40-3 reg3*之361 bp DNA序列。

【0276】序列辨識編號：11顯示葉甲*rpL40-1 v1*之117 bp DNA序列。

【0277】序列辨識編號：12顯示葉甲*rpL40-1 v2*之143 bp DNA序列。

【0278】序列辨識編號：13顯示葉甲*rpL40-1* v3之141 bp DNA序列。

【0279】序列辨識編號：14顯示葉甲*rpL40-1* v4之130 bp DNA序列。

【0280】序列辨識編號：15顯示葉甲*rpL40-1* v5之165 bp DNA序列。

實施例3

靶定基因之擴增以生產dsRNA

【0281】引子係設計以藉由PCR來擴增每一靶定基因之部分的編碼區域。參閱表1。如果適當的話，將一種T7噬菌體啟動子序列(TTAATACGACTCACTATAGGGAGA；序列辨識編號：16))併入擴增的意義或反義股的5'端。參閱表1。總RNA係從WCR萃取，且第一股cDNA係使用作為PCR反應的模板，該者使用相反定位引子以擴增天然靶定基因序列的全部或部分。dsRNA亦從DNA選殖體予以擴增，該DNA選殖體包含黃色螢光蛋白(YFP)之編碼區域(序列辨識編號：17；Shagin等人之(2004) Mol. Biol. Evol. 21(5):841-50)。

表1. 用來擴增例示性*rpL40*靶定基因及YFP陰性對照基因的編碼區域的一部分之引子及引子對。

	基因ID	引子ID	序列辨識編號：	序列
第1對	<i>rpL40-1</i> reg1	<i>rpL40-1</i> _F	18	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAAAATGTC AAGGCGAAAATCCAAG
		<i>rpL40-</i>	19	TTAATACGACTCACTAT

		1_R		AGGGAGACTTCTTTGGG CGCAAATTGTTG
第2對	<i>rpL40</i> -3 reg1	<i>rpL40</i> - 3_F	20	TTAATACGACTCACTAT AGGGAGAGTCGAGAAG GTCAAGGACTCG
		<i>rpL40</i> - 3_R	21	TTAATACGACTCACTAT AGGGAGAAGCTTCACCA TCGCGCCGAGGTTCTTC
第3對	<i>rpL40</i> -1 v1	<i>rpL40</i> - 1_v1_F	22	TTAATACGACTCACTATA GGGAGACCACCAGATCA GCAACGTCTAATTTTTG
		<i>rpL40</i> - 1_v1_ R	23	TTAATACGACTCACTAT AGGGAGAACCACGTAG ACGTAACACCAAATG
第4對	<i>rpL40</i> -1 v2	<i>rpL40</i> - 1_v2_F	24	TTAATACGACTCACTAT AGGGAGATCGAACCATC ATTGCGTATTTTGG
		<i>rpL40</i> - 1_v2_ R	25	TTAATACGACTCACTAT AGGGAGACTTCTTTGGG CGCAAATTGTTGGTG
第5對	<i>rpL40</i> -1 v3	<i>rpL40</i> - 1_v3_F	26	TTAATACGACTCACTAT AGGGAGACAAGAGAGG CAAAAAACCAACG
		<i>rpL40</i> - 1_v3_ R	27	TTAATACGACTCACTAT AGGGAGACTGGTGGAAAT ACCCTCTTTGTC
第6對	<i>rpL40</i> -1 v4	<i>rpL40</i> - 1_v4_F	28	TTAATACGACTCACTAT AGGGAGAGCCGTAAGT GCTATGCTCGTTTG
		<i>rpL40</i> - 1_v4_ R	29	TTAATACGACTCACTAT AGGGAGACCAGACATA CAGCACAAAAATAC
第7對	<i>rpL40</i> -1 v5	<i>rpL40</i> - 1_v5_F	30	TTAATACGACTCACTAT AGGGAGACAGCAACGT CTAATTTTTTGCTG
		<i>rpL40</i> - 1_v5_ R	31	TTAATACGACTCACTAT AGGGAGACATTTTGTGCG CAATTGTACTTTTG
第8對	YFP	YFP-F _T7	39	TTAATACGACTCACTAT AGGGAGACACCATGGG CTCCAGCGGCGCCC

		YFP-R -T7	42	TTAATACGACTCACTAT AGGGAGAAGATCTTGAA GGCGCTCTTCAGG
--	--	--------------	----	---

實施例4

RNAi建構物

【0282】藉由PCR製備模板及dsRNA合成。

【0283】圖1中顯示使用以提供用於*rpL40*及YFP dsRNA製造之特異性模板的策略。意欲在*rpL40* dsRNA合成中使用的模板DNA係藉由PCR、使用在表1中的引子對來製備，而(做為PCR模板)第一股cDNA係從WCR第一齡幼蟲單離之總RNA予以製備。對於每一選定的*rpL40*及YFP靶定基因區域，PCR擴增在擴增的意義股及反義股的5'端引入一個T7啟動子序列(YFP區段係從YFP編碼區域之DNA選殖體予以擴增)。於意義股及反義股二者的5'端均具有T7啟動子序列之PCR產物，係使用作為dsRNA生產的模板。見圖1。以該特定引子對擴增的dsRNA模板之序列為：序列辨識編號：9(*rpL40-1 reg1*)、序列辨識編號：10(*rpL40-3 reg3*)、序列辨識編號：11(*rpL40-1 v1*)、序列辨識編號：12(*rpL40-1 v2*)、序列辨識編號：13(*rpL40-1 v3*)、序列辨識編號：14(*rpL40-1 v4*)、序列辨識編號：15(*rpL40-1 v5*)，以及YFP(序列辨識編號：17)。雙股RNA係使用AMBION® MEGASCRIP T® RNAi套組、遵照製造商(INVITROGEN)的操作指南，或是HiScribe™ T7快速高產率RNA合成套組、遵照製造商(New England Biolabs)的操作指南，予以合成及純化。dsRNA濃度係使

用 NANODROP™ 8000 分光光度計 (THERMO SCIENTIFIC, Wilmington; DE)來測量。

【0284】植物轉形載體之建構

【0285】輸入載體係使用化學合成片段(DNA2.0, Menlo Park, CA)及標準分子選殖方法之組合來組裝，該輸入載體含有包含 $rpL40$ (序列辨識編號：1、3或5)區段之髮夾形成的靶定基因建構物。RNA初級轉錄本之分子內髮夾形成係藉由(在一單一轉錄單元內)將兩個複本的 $rpL40$ 靶定基因序列區段配置成彼此相反之定向而促進，該兩個區段係由鏈接子多核苷酸(例如一環(如序列辨識編號：112)，或ST-LS1內含子分隔開；Vancanneyt等人之(1990) Mol. Gen. Genet. 220(2)：245-50)。因此，該初級mRNA轉錄本含有兩個 $rpL40$ 基因區段序列，由該鏈接子序列分隔，做為彼此大的反向重複。初級mRNA髮夾轉錄本之製造係藉由一種啟動子(例如玉蜀黍(maize)泛素1，美國專利第5,510,474號；來自花椰菜嵌紋病毒(Cauliflower Mosaic Virus)(CaMV)的35S；甘蔗桿狀病毒(sugarcane bacilliform badnavirus) (ScBV)啟動子；來自水稻肌動蛋白基因的啟動子；泛素啟動子；pEMU；MAS；玉蜀黍(maize)H3組織蛋白啟動子；ALS啟動子；菜豆蛋白(phaseolin)基因啟動子； cab ；核酮糖雙磷酸羧化酶($rubisco$)； $LAT52$ ； $Zm13$ ；及/或 apg)之複本所驅動，以及包含3'非轉譯區域之一片段(舉例而言玉蜀黍(maize)過氧化酶5基因(ZmPer5 3'UTR v2；美國專利第6,699,984

號)、AtUbi10、AtEfl，或StPinII，係使用以終止髮夾-RNA-表現基因的轉錄。

【0286】雙元目標載體包含一種除草劑耐受性基因(芳亞基鏈烷酸酯雙加氧酶(aryloxyalkanoate dioxygenase)；AAD-1 v3)(美國專利7838733(B2)，及Wright等人之(2010) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107:20240-5)，在一種植物可操縱的啟動子(例如甘蔗桿狀病毒(sugarcane bacilliform badnavirus) (ScBV)啟動子(Schenk等人之(1999) Plant Mol. Biol. 39:1221-30，或ZmUbi1(美國專利5,510,474))的調節下。一種5'UTR序列及鏈接子係放置於該啟動子區段的3'端和AAD-1編碼區域的起始密碼子之間。一種包含源自玉蜀黍(maize)脂酶基因的3'非轉譯區域之一片段(ZmLip 3'UTR；美國專利7,179,902)，係使用來終止AAD-1 mRNA的轉錄。

【0287】一種陰性對照雙元載體，其包含表現YFP蛋白質的基因，係用典型的雙元目標載體及輸入載體，藉由標準GATEWAY®重組反應來建構。雙元目標載體包含一種除草劑耐受性基因(芳亞基鏈烷酸酯雙加氧酶(aryloxyalkanoate dioxygenase)；AAD-1 v3)(如上所述)，其係在玉蜀黍(maize)泛素1啟動子(如上所述)及源自玉蜀黍(maize)脂酶基因的3'非轉譯區域之一片段(ZmLip 3'UTR；如上所述)的表現調節下。輸入載體包含一種YFP編碼區域，該YFP編碼區域係在玉蜀黍(maize)泛素1啟動子(如上所述)及源自玉蜀黍(maize)過氧化酶5基因的3'非

轉譯區域之一片段(如上所述)的表現控制下。

實施例5

候選靶定基因之篩選

【0288】合成dsRNA設計成會抑制實施例2中辨識的靶定基因序列，當在以飲食為基礎的分析中投藥至WCR時，會造成死亡率及生長抑制。觀察到*rpL40 reg1*、*rpL40 v2*、*rpL40 v3*，及*rpL40 v4*在此分析中，展現出超越其他篩選的dsRNAs，大大提高的有效性。

【0289】重複的生物分析證明，攝入衍生自*rpL40 reg1*、*rpL40 v1*、*rpL40 v2*、*rpL40 v3*、*rpL40 v4*，及*rpL40 v5*的dsRNA製備物，各者引致西方玉米根蟲幼蟲的死亡率及/或生長抑制。表2及表3顯示WCR幼蟲繼9天曝露至此等dsRNA之後，飲食為基礎的取食生物分析的結果，及從黃色螢光蛋白(YFP)編碼區域(序列辨識編號：17)製備的陰性對照dsRNA樣品，所得到的結果。

表2.由取食9天後的西方玉米根蟲得到的*rpL40* dsRNA飲食為基礎的取食生物分析的結果。ANOVA分析發現平均死亡率%及平均生長抑制(GI)%有顯著差異。平均值係用塔基-克拉莫檢定(Tukey-Kramer test)分離出。

基因名	劑量 (ng/cm ²)	列的 數量	平均死亡率% ± SEM*	平均 GI ± SEM
<i>rpL40-1 reg1</i>	500	12	91.60±1.97 (CD)	0.98±0.01 (A)
<i>rpL40-1 v1</i>	500	18	11.83±2.32 (DEF)	0.44±0.04 (B)
<i>rpL40-1 v2</i>	500	4	34.56±6.62 (A)	0.58±0.10 (B)
<i>rpL40-1 v3</i>	500	2	36.40±1.11 (B)	0.63±0.14 (AB)
<i>rpL40-1 v4</i>	500	2	61.77±14.70 (BC)	0.84±0.10 (AB)
<i>rpL40-1 v5</i>	500	4	65.20±2.45 (CDE)	0.62±0.10 (B)

TE**	0	36	18.13±1.99 (EF)	0.08±0.03 (C)
水	500	28	13.84±2.04 (EF)	-0.14±0.04 (C)
YFP***	0	28	14.26±1.72 (F)	0.05±0.04 (D)

*SEM =平均值標準誤差。圓括號中的字母表明統計位準。非由相同字母連接的位準為有顯著差異的(P<0.05)。

**TE = Tris HCl (1 mM)加上EDTA(1 mM)緩衝液，pH 7.2。

***YFP =黃色螢光蛋白

表 3. *rpL40* dsRNA 對於 WCR 幼蟲之口服效價摘要 (ng/cm²)。

基因名	LC ₅₀ (ng/cm ²)	範圍	GI ₅₀ (ng/cm ²)	範圍
<i>rpL40-1 reg1</i>	12.91	9.88-16.71	4.06	3.28-5.02

【0290】先前已有人建議，葉甲物種(*Diabrotica* spp.)的某些基因可以用於RNAi媒介的昆蟲控制。參閱美國專利公開案第2007/0124836號，該者揭露了906個序列，以及美國專利第7,612,194號，該者揭露了9,112個序列。然而，確定的是，對RNAi-媒介的昆蟲控制具有用途的許多提議的基因在控制葉甲(*Diabrotica*)方面不是有效的。亦確定的是，相較於其他建議對RNAi-媒介的昆蟲控制具有用途的基因而言，序列*rpL40 reg1*、*rpL40 v1*、*rpL40 v2*、*rpL40 v3*、*rpL40 v4*，及*rpL40 v5*各者提供了令人驚訝且非預期的葉甲優越控制。

【0291】舉例而言，於美國專利7,612,194中建議膜聯蛋白、β紅血球膜骨架蛋白質2，以及mtRP-L4每一者

在RNAi媒介的昆蟲控制方面是有效的。序列辨識編號：33為膜聯蛋白區域1(Reg 1)的DNA序列，而序列辨識編號：34為膜聯蛋白區域2(Reg 2)的DNA序列。序列辨識編號：35為 β 紅血球膜骨架蛋白質2區域1(Reg 1)的DNA序列，而序列辨識編號：36為 β 紅血球膜骨架蛋白質2區域2(Reg 2)的DNA序列。序列辨識編號：37為mtRP-L4區域1(Reg 1)的DNA序列，而序列辨識編號：38為mtRP-L4區域2(Reg 2)的DNA序列。一種YFP序列(序列辨識編號：17)亦使用來生成做為陰性對照組的dsRNA。

【0292】前述提及的各個序列係經由實施例3之方法、使用來生產dsRNA。圖2中顯示使用以提供用於dsRNA製造之特異性模板的策略。意欲在dsRNA合成中使用的模板DNA係藉由PCR、使用在表4中的引子對來製備，而(做為PCR模板)第一股cDNA係從WCR第一齡幼蟲單離之總RNA予以製備。(YFP係從DNA選殖體予以擴增。)對於每一選定的靶定基因區域，執行兩個獨立的PCR擴增。第一個PCR擴增在擴增的意義股的5'端引入了一個T7啟動子序列。第二個反應在反義股的5'端併入該T7啟動子序列。靶定基因의各個區域之兩個PCR擴增的片段繼而以大約相等的數量混合，且混合物係使用作為dsRNA生產的轉錄模板。見圖2。雙股RNA係使用AMBION® MEGAscript® RNAi套組、遵照製造商的說明(INVITROGEN)予以合成及純化。dsRNA濃度係使用NANODROP™ 8000分光光度計(THERMO SCIENTIFIC，Wilmington；DE)來測

量，以及dsRNAs各自用以上所述同樣的飲食為基礎的生物分析方法予以測試。表4列出使用以製造YFP、膜聯蛋白Reg 1、膜聯蛋白Reg 2、 β 紅血球膜骨架蛋白質2 Reg 1、 β 紅血球膜骨架蛋白質2 Reg 2、mtRP-L4 Reg 1，及mtRP-L4 Reg 2 dsRNA分子的引子序列。表4亦列出圖2中描繪的方法使用的YFP引子序列。表5呈現WCR幼蟲繼9天曝露至這些dsRNA之後，飲食為基礎的取食生物分析的結果。重複的生物分析證明，這些dsRNA之攝入引致的西方玉米根蟲幼蟲死亡率或生長抑制，不超過以TE緩衝液、水或YFP蛋白質之對照樣品上看到的西方玉米根蟲幼蟲死亡率或生長抑制。

表4. 用來擴增基因之編碼區域的一部分之引子及引子對。

	基因 ID	引子 ID	序列辨識編號：	序列
第9對	YFP	YFP-F_T7	39	TTAATACGACTCACTATA GGGAGACACCATGGGCT CCAGCGGCGCCC
		YFP-R	40	AGATCTTGAAGGCGCTCT TCAGG
第10對	YFP	YFP-F	41	CACCATGGGCTCCAGCG GCGCCC
		YFP-R_T7	42	TTAATACGACTCACTATA GGGAGAAGATCTTGAAG GCGCTCTTCAGG
第11對	膜聯蛋白 (Reg 1)	Ann-F1_T7	43	TTAATACGACTCACTATA GGGAGAGCTCCAACAGT GGTTCCTTATC
	膜聯蛋白 (Reg 1)	Ann-R1	44	CTAATAATTCTTTTTTAA TGTTTCCTGAGG
第12對	膜聯蛋白 (Reg 1)	Ann-F1	45	GCTCCAACAGTGGTTCCT TATC
	膜聯蛋白 (Reg 1)	Ann-R1_T7	46	TTAATACGACTCACTATA GGGAGACTAATAATTCTT TTTAAATGTTTCCTGAGG

第13對	膜聯蛋白 (Reg 2)	Ann-F2_7	47	TTAATACGACTCACTATA GGGAGATTGTTACAAGC TGGAGA ACTTCTC
	膜聯蛋白 (Reg 2)	Ann-R2	48	CTTAACCAACAACGGCT AATAAGG
第14對	膜聯蛋白 (Reg 2)	Ann-F2	49	TTGTTACAAGCTGGAGA ACTTCTC
	膜聯蛋白 (Reg 2)	Ann-R2T7	50	TTAATACGACTCACTATA GGGAGACTTAACCAACA ACGGCTAATAAGG
第15對	β -spect2 (Reg 1)	Betas p2-F1_7	51	TTAATACGACTCACTATA GGGAGAAGATGTTGGCT GCATCTAGAGAA
	β -spect2 (Reg 1)	Betas p2-R1	52	GTCCATTCTGTCATCCAC TGCA
第16對	β -spect2 (Reg 1)	Betas p2-F1	53	AGATGTTGGCTGCATCTA GAGAA
	β -spect2 (Reg 1)	Beta sp2-R1_7	54	TTAATACGACTCACTATA GGGAGAGTCCATTCTGTC ATCCACTGCA
第17對	β -spect2 (Reg 2)	Betas p2-F2_7	55	TTAATACGACTCACTATA GGGAGAGCAGATGAACA CCAGCGAGAAA
	β -spect2 (Reg 2)	Betas p2-R2	56	CTGGGCAGCTTCTTGTTT CCTC
第18對	β -spect2 (Reg 2)	Betas p2-F2	57	GCAGATGAACACCAGCG AGAAA
	β -spect2 (Reg 2)	Beta sp2-R2_7	58	TTAATACGACTCACTATA GGGAGACTGGGCAGCTT CTTGTTTCCTC
第19對	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-F1_7	59	TTAATACGACTCACTATA GGGAGAAGTGAAATGTT AGCAAATATAACATCC
	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-R1	60	ACCTCTCACTTCAAATCT TGA CTTTG
第20對	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-F1	61	AGTGAAATGTTAGCAAA TATAACATCC
	mtRP-L4 (Reg 1)	L4-R1_7	62	TTAATACGACTCACTATA GGGAGAACCTCTCACTTC AAATCTTGACTTTG
第	mtRP-L4	L4-F	63	TTAATACGACTCACTATA

21對	(Reg 2)	2_T7		GGGAGACAAAGTCAAGA TTTGAAGTGAGAGGT
	<i>mtRP-L4</i> (Reg 2)	L4-R 2	64	CTACAAATAAAACAAGA AGGACCCC
第22對	<i>mtRP-L4</i> (Reg 2)	L4-F 2	65	CAAAGTCAAGATTTGAA GTGAGAGGT
	<i>mtRP-L4</i> (Reg 2)	L4-R 2_T7	66	TTAATACGACTCACTATA GGGAGACTACAAATAAA ACAAGAAGGACCCC

表5.西方玉米根蟲幼蟲於9天之後得到的飲食取食分析結果。

基因名	劑量 (ng/c m ²)	平均活的 幼蟲重量 (mg)	平均 死亡率%	平均 生長 抑制
膜聯蛋白-Reg 1	1000	0.545	0	-0.262
膜聯蛋白-Reg 2	1000	0.565	0	-0.301
β 紅血球膜骨架蛋白質 2 Reg 1	1000	0.340	12	-0.014
β 紅血球膜骨架蛋白質 2 Reg 2	1000	0.465	18	-0.367
mtRP-L4 Reg 1	1000	0.305	4	-0.168
mtRP-L4 Reg 2	1000	0.305	7	-0.180
TE 緩衝液*	0	0.430	13	0.000
水	0	0.535	12	0.000
YFP**	1000	0.480	9	-0.386

*TE = Tris HCl (10 mM)加上EDTA(1 mM)緩衝液，pH 8。

**YFP =黃色螢光蛋白

實施例6

生產包含殺蟲性dsRNA之基因轉殖玉蜀黍(maize)組織

【0293】農桿菌媒介的轉形。於農桿菌媒介的轉形之後，透過穩定整合至植物基因組的嵌合基因之表現而產生

出基因轉殖玉蜀黍(*maize*)細胞、組織及植物，該基因轉殖玉米細胞、組織及植物會生產一種或多種殺蟲性dsRNA分子(舉例而言，至少一種dsRNA分子，其包括一種靶定一種基因的dsRNA分子，該基因包含：*rpL40-1*(序列辨識編號：1)；*rpL40-2*(序列辨識編號：3)；*rpL40-3*(序列辨識編號：5)；*rpL40-1 reg1*(序列辨識編號：9)；*rpL40-3 reg3*(序列辨識編號：10)；*rpL40-1 v1*(序列辨識編號：11)；*rpL40-1 v2*(序列辨識編號：12)；*rpL40-1 v3*(序列辨識編號：13)；*rpL40-1 v4*(序列辨識編號：14)；*rpL40-1 v5*(序列辨識編號：15)；BSB_*rpL40*(序列辨識編號：89)；BSB_*rpL40 reg1*(序列辨識編號：91)；或BSB_*rpL40 v1*(序列辨識編號：92)。採用超級雙元(superbinary)或雙元轉形載體之玉蜀黍轉形方法在本技藝中係為知悉的，舉例而言，如描述於美國專利第8,304,604號，其全體係在此併入以作為參考資料。轉形組織係藉由其在含合氯氟(Haloxypop)培養基上生長的能力而選擇，且適當地針對dsRNA製造而篩選。此種轉形組織培養的一部分可以呈現給新生的玉米根蟲幼蟲用於生物分析，本質上如同在實施例1中所描述。

【0294】農桿菌培養引發。含有如上所述(實施例4)之雙元轉形載體之農桿菌菌株 DAt13192 細胞(WO 2012/016222A2)的甘油保存種(stocks)係劃線於含有適當抗生素的AB基本培養基平盤上(Watson等人之(1975) J. Bacteriol. 123：255-264)，並於20 °C 中生長達3天。

繼而將培養物劃線於含相同抗生素的YEP平盤(gm/L：酵母萃取物，10；蛋白腴，10；NaCl，5)，且該平盤係於20 °C 中培育1天。

【0295】農桿菌培養。在實驗當天，於實驗中製備合適建構物數量的體積之接種培養基的儲備溶液及乙醯丁香酮(acetosyringone)，以及予以移液至無菌、拋棄式250 mL燒瓶內。接種培養基(Frame等人之(2011) *Genetic Transformation Using Maize Immature Zygotic Embryos*. IN Plant Embryo Culture Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. T. A. Thorpe and E. C. Yeung, (Eds), Springer Science and Business Media, LLC. pp 327-341)含有：2.2 gm/L MS鹽類；1X ISU修飾的MS維生素(Frame等人，出處同上) 68.4 gm/L 蔗糖；36 gm/L葡萄糖；115 mg/L L-脯胺酸；以及100 mg/L 肌肌醇(myo-inositol)；於pH 5.4)。將配於100%二甲亞砷之1 M儲備溶液的乙醯丁香酮添加至含有接種培養基的燒瓶內成為最終濃度200 μ M，以及充分混和該溶液。

【0296】關於各個建構物方面，將來自YEP平盤之滿滿1或2個接種環的農桿菌懸浮在無菌、拋棄式50 mL離心管中的15 mL接種培養基/乙醯丁香酮儲備溶液中，且用分光光度計來測量溶液於550 nm處的光密度(OD₅₅₀)。懸浮液繼而使用額外的接種培養基/乙醯丁香酮混合物，而稀釋至OD₅₅₀為0.3至0.4。繼而將農桿菌懸浮液的管子水平地放置在一平台搖動器上、設定在室溫下大約75 rpm，以及

搖動歷時1至4小時同時執行胚胎剝離。

【0297】穗滅菌及胚胎單離。玉蜀黍(Maize)未成熟胚胎係從在溫室中生長、且自花或近緣授粉(sib-pollinated)以產生穗的玉蜀黍(*Zea mays*)植物自交品系 B104(Hallauer 等人之 (1997) Crop Science 37:1405-1406)來獲得。在授粉後大概10至12天收穫穗。於實驗那天，去外皮的穗之表面滅菌係藉由浸漬在20%的商業性的次氯酸鈉溶液(ULTRA CLOROX® Germicidal Bleach，6.15%次氯酸鈉；加上二滴TWEEN 20)，並震盪20至30分鐘，繼之在通風櫥中用無菌去離子水沖洗三次。未成熟合子胚(1.8至2.2 mm長)係從每個穗無菌地剝離，且隨機地分配到微量離心管中，該微量離心管含有配於液體接種培養基及200 μ M乙醯丁香酮之2.0 mL合適的農桿菌細胞懸浮液，添加2 μ L的10% BREAK-THRU® S233界面活性劑(EVONIK INDUSTRIES；Essen，Germany)。在一套特定之實驗中，將源自匯集的穗之胚使用於每一轉形。

【0298】農桿菌共培養。接種後，將胚胎放置在一盪動平台上歷時5分鐘。接而將管的內含物傾注至共培養培養基上，共培養培養基中含有4.33 gm/L之MS鹽類；1X ISU修飾的MS維生素；30 gm/L蔗糖；700 mg/L之L-脯氨酸；在KOH中之3.3 mg/L的汰克草(Dicamba) (3,6-二氯-鄰-大茴香酸或3,6-二氯-2-甲氧基苯甲酸)；100 mg/L之肌肌醇；100 mg/L之酪蛋白酵素水解產物；15 mg/L的

AgNO_3 ；在DMSO中之200 μM 的乙醯丁香酮；及3 gm/L之GELZANTM；於pH 5.8。用無菌、拋棄式移液吸管來移動液體農桿菌懸浮液。胚胎繼而使用無菌鑷子及顯微鏡的協助而將子葉盤(scutellum)面向上來定向。蓋上平盤，用3MTM MICROPORETM醫療膠帶來密封，以及放置於大概60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 之光合有效輻射(PAR)的持續光、在25°C孵化器內。

【0299】基因轉殖品件之癒合組織篩選與再生。在共培養的期間之後，將胚芽轉移至休眠培養基，其含有4.33 gm/L之MS鹽類；1X ISU修飾的MS維生素；30 gm/L之蔗糖；700 mg/L的L-脯氨酸；在KOH中之3.3 mg/L的汰克草(Dicamba)；100 mg/L之肌肌醇；100 mg/L之酪蛋白酵素水解產物；15 mg/L的 AgNO_3 ；0.5 gm/L的MES (2-(N-嗎啉)乙磺酸單水合物；PHYTOTECNOLOGIES LABR.；Lenexa，KS)；250 mg/L之卡本西林(Carbenicillin)；及2.3 gm/L之GELZANTM；pH為5.8。將不超過36個胚胎移動到各個平盤。將平盤放置在一透明的塑膠箱子中，且於大概50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR的持續光、在27°C下孵育歷時7至10天。癒合的組織胚胎接而轉移至選擇培養基I(<18個/平盤)上，選擇培養基I係由休息培養基(上文)與100 nM的R-合氯氟酸(0.0362 mg/L；用於選擇含AAD-1基因之癒合組織)組成。將平盤放回透明的箱子中，且用大概50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR的持續光、在27°C下孵育歷時7天。癒合的組織胚胎接而轉移至選擇培養基

II(<12個/平盤)上，選擇培養基II係由休息培養基(上文)與500 nM的R-合氯氟酸(0.181 mg/L)組成。將平盤放回透明的箱子中，且用大概 $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR的持續光、在27°C下孵育歷時14天。此選擇步驟允許基因轉殖癒合組織進一步增殖及分化。

【0300】 增殖的胚性癒合組織係轉移至預再生培養基上(<9個/平盤)。預再生培養基中含有4.33 gm/L之MS鹽類；1X ISU修飾的MS維生素；45 gm/L之蔗糖；350 mg/L的L-脯氨酸；100 mg/L之肌肌醇；50 mg/L之酪蛋白酵素水解產物；1.0 mg/L的 AgNO_3 ；0.25 gm/L的MES；在NaOH中0.5 mg/L之萘乙酸；在乙醇中2.5 mg/L之離層酸 (abscisic acid) ； 1 mg/L 之 6- 苄 基 腺 嘌呤 (6-benzylaminopurine) ； 250 mg/L 之 卡 本 西 林 (Carbenicillin) ； 2.5 gm/L之GELZANTM；及0.181 mg/L的合氯氟酸；pH為5.8。將平盤儲存於透明的塑膠箱子中，且於大概 $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR的持續光、在27°C下孵育歷時7天。再生的癒合組織繼而轉移(<6個/平盤)至PHYTATRAYSTM(SIGMA-ALDRICH)之再生培養基上，並於28°C下、及每日16小時光亮/8小時黑暗(在大概 $160 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR下)予以孵育歷時14天，或是直到莖和根發育出。再生培養基含有4.33 gm/L之MS鹽類；1X ISU修飾的MS維生素；60 gm/L之蔗糖；100 mg/L之肌肌醇；125 mg/L之卡本西林(Carbenicillin)；3 gm/L的GELZANTM膠；以及0.181 mg/L的R-合氯氟酸；pH為

5.8。具初生根之小芽繼而予以單離並不經選擇而轉移至伸長培養基。伸長培養基含有4.33 gm/L之MS鹽類；1X ISU修飾的MS維生素；30 gm/L之蔗糖；以及3.5 gm/L之GELZANTM；pH為5.8。

【0301】將藉由其等在含有合氯氟的培養基上生長的能力而選擇的轉形植物芽，從PHYTATRAYSTM移植至填充生長培養基(PROMIX BX；PREMIER TECH HORTICULTURE)之小盆，以杯子或HUMI-DOMES(ARCO PLASTICS)覆蓋，然後在CONVIRON生長室中使幼苗健化(hardened-off)(白天27℃/夜間24℃，16小時光照期，50-70% RH，200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR)。於一些例子中，推定的基因轉殖小苗係藉由即時定量PCR分析、使用設計以偵測整合至玉蜀黍基因組之AAD1除草劑耐受性基因的引子，針對轉基因相對複本數予以分析。再者，使用qPCR分析以偵測推定的轉形體中鏈接子及/或靶定序列的存在。選出的轉形小苗接而移至溫室內供進一步生長及測試。

【0302】在溫室中轉移並建立T₀植物，用於生物分析及種子生產。當植物達到V3-V4階段時，將其等移植至IE CUSTOM BLEND (PROFILE/METRO MIX 160)土壤混合物並在溫室中生長至開花(光暴露類型：光或同化作用(Photo or Assimilation)；強光限制(High Light Limit)：1200 PAR；16小時日長；白天27℃/夜間24℃)。

【0303】要用於昆蟲生物分析的植物係從小花盆移

植 到 TINUS™ 350-4 ROOTRAINERS® (PENCER-LEMAIRE INDUSTRIES , Acheson , Alberta , Canada)(每一ROOTRAINERS®一個植物一個品件)。移植到ROOTRAINERS®大約四天後，植物係被侵擾用於生物分析。

【0304】T₁世代的植物係藉由用從非基因轉殖原種(elite)自交品系B104植物或其他適當的花粉供體，所收集的花粉進行授粉T₀基因轉殖植物之鬚，並種植所得到的種子而獲得。於可能時可執行回交。

實施例7

基因轉殖玉蜀黍組織之分子分析

【0305】玉蜀黍組織之分子分析(例如，RT-qPCR)係於源自葉子的樣品上執行，葉子樣品係於評估根取食損害的同一天從溫室生長的植物採集。

【0306】使用Per5 3'UTR之RT-qPCR分析的結果來確認轉基因的表現。鏈接子序列(其係形成dsRNA髮夾分子不可缺少的)於表現的RNAs中之RT-qPCR分析結果係用來確認髮夾轉錄本的存在。測量轉基因RNA的表現位準，相較於一內源性玉蜀黍基因之RNA位準。

【0307】偵測基因組DNA中AAD1編碼區域的一部分之DNA qPCR分析，係使用來估計轉基因的插入複本數。此等分析的樣品係從環境室生長的植物採集。結果係與設計用來偵測單一複本天然基因的一部分之DNA qPCR的分析結果比較，以及簡單的品件(有一個或二個複

本的*rpl40*轉基因)繼續用於進一步的溫室研究。

【0308】此外，設計用來偵測觀黴素(spectinomycin)抗性基因(SpecR；存在於T-DNA外部的雙元載體質體上)的一部分之qPCR的分析，係使用來判定基因轉殖植物是否含有外來整合的質體主幹序列。

【0309】RNA轉錄本表現位準：靶定qPCR。癒合細胞品件或基因轉殖植物係藉由靶定序列之即時定量PCR(qPCR)來分析，以確定全長髮夾轉錄本的相對表現位準，相較於一種內部玉蜀黍基因(序列辨識編號：67；GENBANK登錄號BT069734)的轉錄位準，後者編碼一種類TIP41蛋白質(亦即，GENBANK登錄號AT4G34270之玉蜀黍同源物；具有74%同一性之tBLASTX分數)。RNA係使用Norgen BioTek總RNA單離套組(Norgen，Thorold，ON)予以單離。總RNA根據套組建議的協定而經歷On Column DNaseI處理。RNA繼而於NANODROP 8000分光光度計(THERMO SCIENTIFIC)上定量，以及將濃度標準化成50 ng/ μ L。第一股cDNA係使用高容量cDNA合成套組(INVITROGEN)、實質上根據製造商推薦的實驗協定、在10 μ L反應體積中以5 μ L的變性RNA予以製備。該協定係稍微修改成包括添加10 μ L的100 μ M T20VN寡核苷酸(IDT)(序列辨識編號：68；TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN，其中V為A、C或G，以及N為A、C、G或T/U)到隨機引子存料混合物的1 mL管子中，俾以製備組合的隨機引子與寡dT之工作存料。

【0310】 cDNA合成之後，樣品係以無核酸酶的水予以1：3稀釋，並儲存在-20℃，直到分析。

【0311】 靶定基因及類TIP41轉錄本之獨立即時PCR分析係於 LIGHTCYCLER™ 480(ROCHE DIAGNOSTICS，Indianapolis，IN)上，在10 μL反應體積中執行。在靶定基因分析方面，反應之進行係用引子 *rpl40*(F)(序列辨識編號：69)及*rpl40*(R)(序列辨識編號：70)，以及IDT Custom Oligo探針*rab5* PRB Set1，用FAM予以標記且用Zen及Iowa Black淬滅劑予以雙重淬滅(序列辨識編號：111)。在類TIP41參考基因分析方面，使用引子TIPmxF(序列辨識編號：71)及TIPmxR(序列辨識編號：72)，以及用HEX(六氯螢光素)標記的探針HXTIP(序列辨識編號：73)。

【0312】 所有分析均含括無模板(僅混合)的陰性對照組。對於標準曲線，一空白試樣(在源孔(source well)中的水)亦包括在源盤上，以檢查樣品交叉污染。表6中列舉引子及探針序列。偵測各種轉錄本的反應組分配方係揭示於表7中，以及PCR反應條件係摘要於表8中。FAM(6-羧基螢光素醯胺(6-Carboxy Fluorescein Amidite))螢光部分係以465 nm來激發，以及測量510 nm的螢光；HEX(六氯螢光素)螢光部分對應的值為533 nm及580 nm。

表6.基因轉殖玉蜀黍中轉錄本位準的分子分析之寡核苷酸序列.

標靶	寡核苷酸	序列辨識編號	序列
<i>rpl40</i>	<i>rpl40</i> (F)	58	CACCAGATCAGCAAC

			GTCTAA
<i>rpl40</i>	<i>rpl40</i> (R)	59	CCAAATGGAGTGTCG ATTCCT
<i>rpl40</i>	<i>rpl40</i> (FAM-探針)	111	CGTCCATCTTCCAAT TGTTTGCCAGC
TIP41	TIP _{mx} F	60	TGAGGGTAATGCCAA CTGGTT
TIP41	TIP _{mx} R	61	GCAATGTAACCGAGT GTCTCTCAA
TIP41	HXTIP (HEX-探針)	62	TTTTTGGCTTAGAGTT GATGGTGTACTGATGA

*類TIP41蛋白質。

表7.轉錄本偵測的PCR反應配方.

	標靶基因	類TIP基因
組分	最終濃度	
Roche緩衝液	1 X	1X
<i>rpl40</i> (F)	0.4 μM	0
<i>rpl40</i> (R)	0.4 μM	0
<i>rpl40</i> (FAM)	0.2 μM	0
HEXtipZM F	0	0.4 μM
HEXtipZM R	0	0.4 μM
HEXtipZMP (HEX)	0	0.2 μM
cDNA (2.0 μL)	NA	NA
水	至10 μL	至10 μL

表8. RNA qPCR之熱循環儀條件.

標靶基因及類TIP41基因偵測			
方法	溫度	時間	循環數
標靶活化	95 °C	10分鐘	1
變性	95 °C	10秒	40
延伸	60 °C	40秒	
獲得FAM或HEX	72 °C	1秒	
冷卻	40 °C	10秒	1

【0313】數據係根據供應商的建議，使用 LIGHTCYCLER™ 軟體 v1.5、藉由相對定量法，該者係使用一種二階導數的最大演算法用於計算 Cq 值。對於表現分析，表現值係使用 $\Delta\Delta C_t$ 方法(亦即， $2^{-(C_q \text{ 標靶} - C_q \text{ REF})}$)計算，該者依賴於兩個標靶 Cq 值與在對最佳化 PCR 反應、該產物每一週期加倍之假設之下，而選定的基準值 2 之間差異的比較。

【0314】轉錄本大小及完整性：北方墨漬法分析。於一些例子中，該基因轉殖植物之額外的分子表徵係藉由使用北方墨漬法(RNA 墨漬法)分析而獲得，以確定在表現 *rpL40* 髮夾 dsRNA 的基因轉殖植物中該 *rpL40* 髮夾 RNA 的分子大小。

【0315】所有的材料及設備在使用之前係以 RNAZAP(AMBION/INVITROGEN)予以處理。組織樣品(100 mg 至 500 mg)係收集於 2 ml SAFELOCK EPPENDORF 管子中，以 KLECKO™ 組織粉碎機(GARCIA MANUFACTURING, Visalia, CA)藉由三個鎢珠、在 1 ml TRIZOL(INVITROGEN)中破壞達 5 分鐘，繼而於室溫(RT)培育達 10 分鐘。選擇性地，該等樣品係於 4°C 下以 11,000 rpm 離心歷時 10 分鐘，且將上清液轉移至新的 2 ml SAFELOCK EPPENDORF 管子中。在添加 200 μ L 的氯仿至均質物之後，該管子係藉由反轉達 2 至 5 分鐘而混合，於 RT 培育達 10 分鐘，以及於 4°C 以 12,000 x g 離心歷時 15 分鐘。將頂部相轉移到滅菌的 1.5 mL

EPPENDORF管子中，添加600 μ L之100%異丙醇，繼之在RT下培育歷時10分鐘至2小時，然後在4°至25℃下、以12,000 x g離心歷時10分鐘。丟棄上清液，且RNA沈澱物係以1 ml的70%乙醇洗滌兩次，伴隨洗滌之間於4°至25℃、以7,500 x g離心歷時10分鐘。丟棄乙醇，且將沈澱物短暫地風乾3至5分鐘然後再懸浮於50 μ L的無核酸酶水中。

【0316】總 RNA 係使用 NANODROP8000® (THERMO-FISHER)來定量，且樣品係予以標準化至5 μ g/10 μ L。然後添加10 μ L的乙二醛 (AMBION/INVITROGEN)到每個樣品。分配5至14 ng的DIG RNA 標準標記混合物 (ROCHE APPLIED SCIENCE, Indianapolis, IN)，並且加入等體積的乙二醛。樣品及標記RNA係於50 °C下變性歷時45分鐘，並且儲存在冰上，直至加載在NORTHERNMAX 10X乙二醛展開緩衝液 (AMBION/INVITROGEN) 中的 1.25% SEAKEM GOLD瓊脂糖(LONZA, Allendale, NJ)凝膠中為止。RNAs係藉由於65伏特/30 mA進行電泳歷時2小時15分鐘予以分開。

【0317】電泳之後，凝膠係於2X SSC中沖洗5分鐘並於GEL DOC工作站(BIORAD, Hercules, CA)上成像，然後RNA係於RT下過夜以被動轉移至一尼龍膜 (MILLIPORE)上，使用10X SSC做為轉移緩衝液(20X SSC係由3 M的氯化鈉及300 mM的檸檬酸三鈉組成，pH

7.0)。繼轉移之後，該膜係於2X SSC中沖洗5分鐘，該RNA係UV交聯至該膜(AGILENT/STRATAGENE)，並且允許該膜在RT下乾燥高達2天。

【0318】該膜係於ULTRAHYB緩衝液(AMBION/INVITROGEN)中預雜交歷時1至2小時。該探針係由含有感興趣序列的PCR擴增產物組成，其係藉助於ROCHE APPLIED SCIENCE DIG程序、以地高新素(digoxigenin)予以標示。在推薦的緩衝液中，於60℃的溫度下、在一雜交管中執行雜交過夜。繼雜交之後，該墨漬係經受DIG洗滌、包裹、暴露於軟片歷時1分鐘至30分鐘，然後該軟片係予以顯影，全部均使用DIG套組供應商所推薦的方法。

【0319】轉基因複本數判定。將大約等於2個葉沖孔(leaf punches)的玉蜀黍葉片碎片收集於96孔收集平盤(QIAGEN)之內。用一種KLECKO™組織粉碎機(GARCIA MANUFACTURING, Visalia, CA)加上一個不鏽鋼珠、在BIOSPRINT96 AP1溶解緩衝液(提供自BIOSPRINT96 PLANT KIT; QIAGEN)中執行組織瓦解。於組織離解之後，基因組DNA(gDNA)係使用一種BIOSPRINT96 PLANT KIT及BIOSPRINT96萃取自動儀、以高輸出量格式予以單離。將基因組DNA稀釋1:3 DNA：水，然後設定qPCR反應。

【0320】qPCR分析。轉基因偵測係使用一種LIGHTCYCLER®480系統、藉由即時PCR、透過水解探

針分析來執行。使用LIGHTCYCLER®探針設計軟體2.0來設計水解探針分析使用的寡核苷酸，來偵測靶定基因、鏈接子序列(例如該環)，或來偵測SpecR基因的一部分(亦即，觀黴素(spectinomycin)抗性基因，存在雙元載體質體上；序列辨識編號：74；表9中的SPC1寡核苷酸)。再者，使用PRIMER EXPRESS軟體(APPLIED BIOSYSTEMS)來設計水解探針分析所使用的寡核苷酸，來偵測AAD-1除草劑耐受性基因區段(序列辨識編號：75；表9中的GAAD1寡核苷酸)。表9顯示引子以及探針的序列。用內源性玉蜀黍染色體基因多重與試劑進行分析法(轉化酶(序列辨識編號：76；GENBANK登錄號U16123，於此稱為IVR1)，其擔任內部參考序列以確保各分析法中gDNA的存在。在擴增方面，LIGHTCYCLER®480 PROBES MASTER混合物(ROCHE APPLIED SCIENCE)係製備為1x最終濃度在10 μ L體積多重反應中，該者含有0.4 μ M的每種引子以及0.2 μ M的每種探針(表10)。兩步驟的擴增反應係如同表11中概述者來執行。FAM-及HEX-標示的探針之螢光活化及放射係如上所述；CY5綴合物最大以650 nm來激發，以及螢光最大於670 nm。

【0321】Cp分數(螢光訊號與背景閾值交叉之處)係從即時PCR資料、使用配適點演算法(fit points algorithm) (LIGHTCYCLER® SOFTWARE發行1.5)及相對定量模組(根據 $\Delta\Delta C_t$ 方法)來判定。數據係如前所述予以處理(如上；RNA qPCR)。

表9.基因複本數判定及雙元載體質體主幹偵測之引子及探針序列(有螢光綴合物).

名稱	序列辨識編號：	序列
環-F	86	GGAACGAGCTGCTTGCGTAT
環-R	87	CACGGTGCAGCTGATTGATG
環-P(FAM)	88	TCCCTTCCGTAGTCAGAG
GAAD1-F	77	TGTTTCGGTTCCCTCTACCAA
GAAD1-R	78	CAACATCCATCACCTTGACTGA
GAAD1-P(FAM)	79	CACAGAACCGTCGCTTCAG CAACA
IVR1-F	80	TGGCGGACGACGACTTGT
IVR1-R	81	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT
IVR1-P(HEX)	82	CGAGCAGACCGCCGTGTAC TTCTACC
SPC1A	83	CTTAGCTGGATAACGCCAC
SPC1S	84	GACCGTAAGGCTTGATGAA
TQSPEC (CY5*)	85	CGAGATTCTCCGCGCTGTAGA

CY5 =花青(Cyanine)-5

表10. 基因複本數分析及質體主幹偵測之反應組分.

組分	Amt. (μL)	存料	最終濃度
2x 緩衝液	5.0	2x	1x
適合的順向引子	0.4	10 μM	0.4
適合的反向引子	0.4	10 μM	0.4
適合的探針	0.4	5 μM	0.2
IVR1-順向引子	0.4	10 μM	0.4
IVR1-反向引子	0.4	10 μM	0.4
IVR1-探針	0.4	5 μM	0.2
H ₂ O	0.6	NA*	NA
gDNA	2.0	ND**	ND
總計	10.0		

*NA=不適用

**ND =未確定

表11. DNA qPCR之熱循環儀條件

基因複本數分析			
方法	溫度	時間	循環數
標靶活化	95℃	10 分鐘	1
變性	95℃	10 秒	40
延伸&獲得 FAM、HEX 或 CY5	60℃	40 秒	
冷卻	40℃	10 秒	1

實施例8

基因轉殖玉蜀黍的生物分析

【0322】活體外昆蟲生物分析。本主體發明在植物細胞中產生的dsRNA之生物活性係藉由生物分析方法證明。參閱，例如Baum等人之(2007) Nat. Biotechnol. 25(11)：1322-1326。舉例而言，能夠藉由在受控制的取食環境中餵食各種植物組織或組織塊給靶定昆蟲來證明有效性，該植物組織或組織塊係衍生自一種生產殺蟲性dsRNA的植物。或者，萃取物係從一種生產殺蟲性dsRNA的植物所衍生的各種植物組織來製備，及經萃取的核酸係如於此先前所描述般分配到用於生物分析的人工飲食的頂部。此種取食分析的結果係與採用源自不生產殺蟲性dsRNA的宿主植物的適當對照組織，或是與其他對照樣品以類似方式進行的生物分析的結果，作比較。

【0323】基因轉殖玉蜀黍品件之昆蟲生物分析。選擇從清洗過的卵孵出的二隻西方玉米根蟲幼蟲(1至3天大)，以及放置於生物分析盤的各個孔中。繼而用"PULL N' PEEL"標籤蓋(BIO-CV-16，BIO-SERV)來覆蓋孔且放置

於28 °C 及18小時/6小時的光/暗週期之孵化器內。於初始侵擾九天之後，評估幼蟲的死亡率，死亡率係計算為從各個處理的昆蟲總數裡死亡的昆蟲百分比。昆蟲樣本冷凍於-20 °C 歷時二天，然後匯集各個處理的昆蟲幼蟲並稱重。生長抑制百分比係計算為實驗處理的平均重量除以二個對照孔處理的平均重量。數據表達為(陰性對照的)生長抑制百分比。超過對照平均重量之平均重量係標準化至零。

【0324】溫室中的昆蟲生物分析。從源自CROP CHARACTERISTICS(Farmington, MN)的土壤得到西方玉米根蟲(WCR，玉米根螢葉甲(*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte))的卵。WCR的卵係於28 °C 下培養歷時10至11天。卵係從土壤洗滌出，放進0.15%之瓊脂溶液內，且濃度係調整為每0.25 mL等分試樣大概75個至100個卵。一孵化平盤係在具一等分試樣卵懸浮液的培養皿中建立，以監測孵化率。

【0325】於ROOTRAINERS®中成長的玉蜀黍植物周圍的土壤係以150至200個WCR的卵予以侵擾。允許該昆蟲取食達2週，在該時間之後，對每一植物給予"根等級(Root Rating)"。實質上係根據Oleson等人(2005，J. Econ. Entomol. 98:1-8)，利用節點損害量表來分級。通過這種生物分析的植物係移植至5加侖的花盆用於種子生產。用殺蟲劑來處理移植體以預防於溫室中進一步的根蟲損傷以及昆蟲釋放。以手工方式授粉植物用於種子生產。這些植物生產的種子係保存用於評估T₁及植物後續世代。

【0326】基因轉殖陰性對照植物係由懷有設計用來生產黃色螢光蛋白(YFP)之基因的載體予以轉形來產生。進行生物分析，且各組植物材料含括有陰性對照。

【0327】表12. 根據表現*rpl40*的玉蜀黍植物及YFP對照植物之溫室生物分析及相對轉錄表現位準的結果之根損傷等級.

樣品 ID	感興趣的基因	ssRNA	dsRNA	根等級
<i>rpl40</i> 品件				
126164[1]-002	<i>rpl40</i>	0.291	0.096	1
126164[1]-003	<i>rpl40</i>		0.063	1
126164[1]-005	<i>rpl40</i>	0.178	4.317	1
126164[1]-007	<i>rpl40</i>	0.261	3.945	1
126164[1]-008	<i>rpl40</i>	0.232	3.227	1
126164[1]-010	<i>rpl40</i>	0.136	0.818	1
126164[1]-011	<i>rpl40</i>	0.202	3.387	1
126164[1]-012	<i>rpl40</i>	0.356	4.408	1
126164[1]-013	<i>rpl40</i>	0.346	4.228	1
126164[1]-014	<i>rpl40</i>	0.221	1.945	1
126164[1]-015	<i>rpl40</i>	0.325	2.770	1
126164[1]-018	<i>rpl40</i>	0.31	3.864	1
126164[1]-023	<i>rpl40</i>	0.295	3.204	1
126164[1]-028	<i>rpl40</i>	0.281	4.258	1
126164[1]-030	<i>rpl40</i>	0.295	5.205	1
YFP 品件				
126944[5]-026	YFPv2			1
126944[6]-031	YFPv2			1
126944[7]-038	YFPv2			
126944[7]-051	YFPv2			1
126944[7]-052	YFPv2			1

相對於內源性參考基因(類TIP41蛋白質)，dsRNA量

度範圍落在0.063至5.205。根等級與YFP對照沒有顯著不同。此等建構物之相對表現位準對於提供根防護可能是不夠的。

實施例9

包含鞘翅目害蟲序列的基因轉殖玉蜀黍(*Zea mays*)

【0328】 10-20株基因轉殖T₀玉蜀黍植物係如實施例6中所描述般生成的。獲得另外的10-20株表現RNAi建構物的髮夾dsRNA之T₁玉蜀黍獨立品系，用於玉米根蟲的考驗。髮夾dsRNA可以衍生包含序列辨識編號：1、3，及5的全部或部分。額外的髮夾dsRNA可以衍生自，舉例來說鞘翅目害蟲序列，諸如舉例而言，Caf1-180(美國專利公開案第2012/0174258號)、VatpaseC(美國專利公開案第2012/0174259號)、Rho1(美國專利公開案第2012/0174260號)、VatpaseH(美國專利公開案第2012/0198586號)、PPI-87B(美國專利公開案第2013/0091600號)、RPA70(美國專利公開案第2013/0091601號)、RPS6(美國專利公開案第2013/0097730號)、ROP(美國專利申請案第14/577,811號)、RNA聚合酶III140(美國專利公開案第14/577,854號)、RNA聚合酶II(美國專利公開案第62/133,214號)、RNA聚合酶II215(美國專利公開案第62/133,202號)、RNA聚合酶II33(美國專利公開案第62/133,210號)、ncm(美國專利公開案第62/095487號)、Dre4(美國專利申請案第14/705,807號)、COPI α (美國專利申請案第62/063,199

號)、*COPI β*(美國專利申請案第62/063,203號)、*COPI γ*(美國專利申請案第62/063,192號),或是*COPI δ*(美國專利申請案第62/063,216號)、*spt5*(美國專利申請案第62/168,613號),及*spt6*(美國專利申請案第62/168,606號)。這些係透過RT-PCR或是其他分子分析方法予以證實。

【0329】源自選定的獨立T₁品系的總RNA製備物係選擇性地使用於RT-PCR,加上設計以結合在每一RNAi建構物中之髮夾表現卡匣的鏈接子的引子。此外,在RNAi建構物中每一靶定基因的特定引子係選擇性地使用來擴增,並確認生產植物界之siRNA所要求之加工前mRNA之生成。每一靶定基因所欲的電泳帶(band)的擴增證實了髮夾RNA在每一基因轉殖玉蜀黍植物中的表現。隨後選擇性地於獨立的基因轉殖品系中使用RNA墨漬法雜交,而證實該等靶定基因之dsRNA髮夾加工成為siRNA。

【0330】再者,具有對靶定基因失配的序列及超過80%序列同一性之RNAi分子,與具有對靶定基因100%序列同一性之RNAi分子,影響玉米根蟲的方式是相似的。失配的序列與天然序列的配對而於相同的RNAi建構物中形成髮夾dsRNA,遞送了經植物加工的siRNAs,其能夠影響取食的鞘翅目害蟲之生長、發育及生存力。

【0331】在植物界遞送相應於靶定基因的dsRNA、siRNA或miRNA,且隨後由鞘翅目害蟲透過取食攝取引致該靶定基因透過RNA媒介基因靜默而向下調節鞘翅目害

蟲的靶定基因。當一靶定基因之功能於一個或多個發育階段為重要時，該鞘翅目害蟲的生長、發育及生殖受影響，且在WCR、NCR、SCR、MCR、巴西玉米根蟲(*D. balteata* LeConte)、黃瓜十一星葉甲球蟲(*D. u. tenella*)，及黃瓜十一星葉甲甘薯猿葉甲蟲(*D. u. undecimpunctata* Mannerheim)中至少一者的情況下，導致無法成功侵擾、取食、發育及/或生殖，或導致該鞘翅目害蟲的死亡。抉擇靶定基因並繼而成功的應用RNAi係使用來控制鞘翅目害蟲。

【0332】基因轉殖RNAi品系及未轉形玉蜀黍的表型比較。選定用於創造髮夾dsRNA的靶定鞘翅目害蟲基因或序列，對任何已知的植物基因序列不具有相似度。因此，因靶定這些鞘翅目害蟲基因或序列的建構物而製造或活化的(系統性)RNAi，對基因轉殖植物預期是不會發生任何不利影響。然而，基因轉殖品系的發育與形態特徵係與未轉形植物進行比較，以及與那些以沒有髮夾表現基因之"空"的載體所轉形的基因轉殖品系進行比較。比較植物的根、芽、葉羣及生殖特徵。記錄植物的芽特徵，諸如高度、葉片數及大小，開花時間，花的大小及外觀。一般而言，當在活體外及在溫室土壤中培養時，在基因轉殖品系及那些沒有表現靶定iRNA分子者之間沒有觀察到形態差異。

實施例10

包含鞘翅目害蟲序列及額外的RNAi建構物之基因轉殖玉蜀黍

【0333】一種在其基因組包含一異源性編碼序列之基因轉殖玉蜀黍植物，該異源性編碼序列轉錄成靶定鞘翅目害蟲以外的生物體的iRNA分子，係經由農桿菌或WHISKERSTM方法學(見Petolino and Arnold (2009) Methods Mol. Biol. 526:59-67)予以二次轉形，以產生一種或多種殺蟲的dsRNA分子(舉例而言，至少一種dsRNA分子，其包括靶定包含下列基因的一種dsRNA分子：序列辨識編號：1、3，或5)。實質上係如實施例4所描述般製備的植物轉形質體載體，係經由農桿菌或WHISKERSTM-媒介轉形方法而遞送至從一基因轉殖Hi II或B104玉蜀黍植物獲得的玉蜀黍懸浮液細胞或是未成熟的玉蜀黍胚胎中，其中該玉蜀黍植物在其基因組包含一異源性編碼序列，該者轉錄成靶定鞘翅目害蟲以外之生物體的一種iRNA分子。

實施例11

包含RNAi建構物及額外的鞘翅目害蟲對照序列之基因轉殖玉蜀黍

【0334】一種在其基因組包含一異源性編碼序列之基因轉殖玉蜀黍植物，該異源性編碼序列轉錄成靶定鞘翅目害蟲生物體的iRNA分子(舉例而言，至少一種dsRNA分子，其包括靶定包含下列的基因之dsRNA分子：序列辨識編號：1、3，或5)，經由農桿菌或WHISKERSTM方法學予以二次轉形(見Petolino and Arnold (2009) Methods Mol. Biol. 526:59-67)，以產生一種或多種殺蟲的蛋白質

分子，舉例而言，Cry3或Cry34/Cry35Ab1殺蟲的蛋白質。實質上如實施例4所描述般製備的植物轉形質體載體，係經由農桿菌或WHISKERSTM-媒介轉形方法遞送至從一種基因轉殖B104玉蜀黍植物獲得的玉蜀黍懸浮液細胞或是未成熟的玉蜀黍胚胎中，其中該基因轉殖B104玉蜀黍植物在其基因組包含一異源性編碼序列，該者轉錄成靶定鞘翅目害蟲生物體的一種iRNA分子。獲得雙重轉形的植物，其會生產iRNA分子及殺蟲的蛋白質用於控制鞘翅目害蟲。

實施例12

rpL40 RNAi注入後新熱帶區褐臭蟲(Neotropical Brown Stink Bug) (英雄美洲蟬(*Euschistus heros*))的死亡率

【0335】新熱帶區褐臭蟲(Neotropical Brown Stink Bug)(BSB；英雄美洲蟬(*Euschistus heros*))群體。將BSB飼養於27 °C 孵化器內，於65%相對濕度及16: 8小時之光：暗週期下。2-3天期間收集的一公克的卵播種於底部具有濾紙盤之5L容器中；用#18篩孔覆蓋容器供通風。各個飼養容器產出大概300-400個成體BSB。在所有的階段，昆蟲每週餵食新鮮的四季豆三次，一小袋含有向日葵種子、大豆和花生之種子混合物(3:1:1重量比)每週替換一次飲食。用小瓶子供應水且用棉花塞作為芯。在起始二週之後，每週一次將昆蟲轉移至新的容器上。

【0336】BSB人工飲食。BSB人工飲食製備如下(於製備後二星期內使用)。將冷凍乾燥的四季豆與細粉於一種

MAGIC BULLET® 摻合器中摻合，而於不同的MAGIC BULLET® 摻合器中摻合生(有機)花生。摻合的乾成分係於大型MAGIC BULLET® 摻合器中組合(重量百分比：四季豆，35%；花生，35%；蔗糖，5%；複合維生素(例如，昆蟲之范氏維生素混合液(Vanderzant Vitamin Mixture)，SIGMA-ALDRICH，目錄號V1007)，0.9%)，將該摻合器加蓋且充分震盪以混合該等成分。然後將混合的乾成分添加至攪拌鉢。於不同的容器中，將水和免賴得(benomyl)抗真菌劑(50 ppm；25 µL的20,000 ppm溶液/50 mL飲食溶液)充分混合，然後添加至乾成分混合物。用手混合所有的成分直至完全摻合。將該飲食製作成所欲的形狀，用鋁箔紙鬆鬆地包起，於60 °C加熱歷時4小時，繼而冷卻並儲存於4 °C。

【0337】BSB轉錄體學(transcriptome)之總成。選定六個BSB發育階段用於製備mRNA庫。從冷凍在-70 °C下的昆蟲萃取總RNA，以及於FastPrep®-24 Instrument (MP BIOMEDICALS)上、於10倍體積的溶解/結合緩衝液在Lysing MATRIX A 2 mL管子(MP BIOMEDICALS，Santa Ana，CA)中均質化。使用mirVana™ miRNA單離套組(AMBION；INVITROGEN)、根據製造商的實驗協定來萃取總mRNA。使用一種illumina® HiSeq™系統(San Diego，CA)來進行RNA定序，提供候選靶定基因序列供用於RNAi昆蟲控制技術。HiSeq™於六個樣品生產總共大約3億7千8百萬讀取。使用TRINIT組裝軟體

(Grabherr等人之(2011) Nature Biotech. 29:644-652)來分別地組裝各個樣品的該等讀取。將所組裝的轉錄本組合來產生匯集轉錄體學庫。此BSB匯集轉錄體學庫含有378,457個序列。

【0338】BSB *rpL40* 異種同源物辨識。使用葉甲(*Diabrotica*) *rpL40*蛋白質同功型A及B序列作為詢問序列(query)，來執行BSB匯集轉錄體學庫的tBLASTn搜尋：GENBANK登錄號NP_476776及NP_001260018。BSB *rpL40*(序列辨識編號：89)辨識為英雄美洲蟬(*Euschistus heros*)候選靶定基因產物，該產物具有預測的胜肽序列序列辨識編號：90。

【0339】模版製備及dsRNA合成。cDNA係使用TRIzol® Reagent (LIFE TECHNOLOGIES)、而從單一幼小的成體昆蟲(大約90 mg)萃取出的總BSB RNA來製備。使用一種沈澱物杵(FISHERBRAND，目錄號12-141-363)及杵馬達攪拌機(COLE-PARMER，Vernon Hills，IL)，用200 µL的TRIzol®，於室溫下在1.5 mL微量離心管中將昆蟲均質化。均質化後，加入額外800 µL的TRIzol®，渦漩洗滌均質物，然後於室溫下培育5分鐘。藉由離心來移除碎屑，以及將上清液轉移到一個新的管子中。遵照製造商推薦的1 mL的TRIzol®之TRIzol®萃取實驗協定，RNA沈澱物係於室溫下乾燥，且使用第4型沖洗緩衝液(亦即，10 mM Tris-HCl，pH 8.0)、予以再懸浮於源自GFX PCR DNA AND GEL EXTRACTION KIT

(Illustra™ ; GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES)之200 μ L的Tris緩衝液內。利用NANODROP™ 8000分光光度計 (THERMO SCIENTIFIC , Wilmington , DE)來決定RNA濃度。

【0340】 cDNA擴增。cDNA係使用一種RT-PCR之 SUPERScript III FIRST-STRAND SYNTHESIS SYSTEM™ (INVITROGEN) , 遵照供應商推薦的實驗協定 , 而由5 μ g的BSB總RNA模板及寡dT引子予以反轉錄。用無核酸酶的水使轉錄反應的終體積成為100 μ L。

【0341】 引子BSB_ *rpL40-1*-For(序列辨識編號:93)及BSB_ *rpL40-1*-Rev(序列辨識編號:94)係使用於擴增BSB_ *rpL40*區域1, 亦稱為BSB_ *rpL40* reg1模板。該DNA模板係以1 μ L的cDNA(如上)作為模板, 藉由遞減PCR(touch-down PCR)(黏合溫度以1℃/循環減少從60℃降低至50℃)予以擴增。於35個PCR循環期間產生含有BSB_ *rpL40* reg1之410bp區段的片段(序列辨識編號:91)。以上的程序亦用來擴增301 bp陰性對照模板YFPv2(序列辨識編號:95), 其係利用YFPv2-F(序列辨識編號:96)和YFPv2-R(序列辨識編號:97)引子。BSB_ *rpL40*及YFPv2引子含有一個T7噬菌體啟動子序列(序列辨識編號:16)於其等之5'端, 且因而能夠利用YFPv2、BSB_ *rpL40* DNA片段用於dsRNA轉錄。

【0342】 dsRNA合成。dsRNA係利用2 μ L的PCR產物(如上)作為模板、加上一種MEGAscript™ RNAi套組

(AMBION)、依照製造商的說明來使用而予以合成。(見圖 1)。於一種NANODROP™ 8000分光光度計上以及以無核酸酶的0.1X TE緩衝液(1 mM Tris HCL, 0.1 mM EDTA, pH7.4)予以稀釋成500 ng/μL, 來定量dsRNA。

【0343】注入dsRNA至BSB血腔(hemoceol)。將BSB飼養於四季豆及種子飲食上, 如群體一般, 在27℃孵化器內, 於65%相對濕度及16: 8小時之光: 暗光照期下。用小刷子溫柔地處理二齡若蟲(各者稱重1至1.5 mg)以避免受傷, 以及放置於冰上的培養皿中來使昆蟲感到冷而不移動。各個昆蟲注入55.2 nL的500 ng/μL dsRNA溶液(亦即, 27.6 ng dsRNA; 18.4至27.6 μg/g體重的劑量)。使用一種 NANOJECT™ II 注射器 (DRUMMOND SCIENTIFIC, Broomhall, PA)來執行注入, 其裝備有從Drummond 3.5英吋#3-000-203-G/X玻璃毛細管拔出的注射針。將針尖打破且用輕質礦物油回填毛細管, 繼而充填2至3 μL的dsRNA。將dsRNA注入至若蟲的腹部(每試驗每dsRNA注入10隻昆蟲), 以及於不同的三天重複試驗。將注入的昆蟲(每孔5隻)轉移至32孔的盤(Bio-RT-32飼養盤; BIO-SERV, Frenchtown, NJ)內, 其含有人工BSB飲食之小丸, 以及用Pull-N-Peel™標籤(BIO-CV-4; BIO-SERV)來覆蓋。經由1.5 mL微量離心管中1.25 mL的水加上棉芯來供應水分。該盤係於26.5 °C, 60%濕度及16: 8小時之光: 暗光照期下培育。於注入後第7天量取生存力計數及重量。

【0344】注射辨識的BSB *rpL40*作為致命的dsRNA標靶。靶定*YFP*編碼區域的區段，*YFPv2*，之dsRNA係使用作為BSB注入實驗之陰性對照。如同表13中之摘要，將27.6 ng的BSB_ *rpL40 reg1* dsRNA注入至第二齡BSB若蟲的血腔(hemoceol)，於七天之內招致高的死亡率。由BSB_ *rpL40 reg1* dsRNA所引致的死亡率與注入相同量的*YFPv2* dsRNA(陰性對照)所見的死亡率，有顯著地不同，且 $p=0.00263$ (司徒頓t檢定(Student's *t*-test))。

【0345】表13. BSB_ *rpL40 reg1* dsRNA注入至第二齡褐臭蟲若蟲的血腔(hemoceol)七天之後的結果。

處理*	N 試驗	平均死亡率%	SEM†	P 值 <i>t</i> -檢定
BSB <i>rpL40 reg1</i>	3	100	0	9.89E-05
未注入	3	10	6	1.58E-01
YFP v2 dsRNA	3	0	0	

*各個dsRNA每試驗注射10隻昆蟲。

†SEM-平均值標準誤差

實施例13

包含半翅目害蟲序列之基因轉殖玉蜀黍

【0346】10至20株基因轉殖T₀玉蜀黍植物係如實施例7中所描述般生成，其等懷有包含序列辨識編號：89、91及/或92的核酸之表現載體。獲得另外的10-20株表現RNAi建構物的髮夾dsRNA之T₁玉蜀黍獨立品系，用於BSB的考驗。髮夾dsRNA可以衍生如序列辨識編號：91、

序列辨識編號：92中列舉者，否則便進一步包含序列辨識編號：89。這些係透過RT-PCR或是其他分子分析方法予以證實。源自選定的獨立T₁品系的總RNA製備物係選擇性地使用於RT-PCR，加上設計以結合在每一RNAi建構物中之髮夾表現卡匣的鏈接子的引子。此外，在RNAi建構物中每一靶定基因的特定引子係選擇性地使用來擴增，並確認生產植物界之siRNA所要求之加工前mRNA之生成。每一靶定基因所欲的電泳帶(band)的擴增證實了髮夾RNA在每一基因轉殖玉蜀黍植物中的表現。該等靶定基因之dsRNA髮夾加工成為siRNA係隨後選擇性地，於獨立的基因轉殖品系中使用RNA墨漬法雜交而證實。

【0347】再者，具有對靶定基因失配的序列及超過80%序列同一性之RNAi分子，與具有對靶定基因100%序列同一性之RNAi分子，影響玉米根蟲的方式是相似的。失配的序列與天然序列的配對而於相同的RNAi建構物中形成髮夾dsRNA，遞送了經植物加工的siRNAs，其能夠影響取食的半翅目害蟲之生長、發育及生存力。

【0348】在植物界遞送相應於靶定基因的dsRNA、siRNA、shRNA或miRNA，且隨後由半翅目害蟲透過取食攝取引致該靶定基因透過RNA媒介基因靜默，而向下調節半翅目害蟲的靶定基因。當一靶定基因之功能於一個或多個發育階段為重要時，該半翅目害蟲的生長、發育及生殖受影響，且在英雄美洲蟪(*Euschistus heros*)、蓋德擬壁蟪(*Piezodorus guildinii*)、褐翅蟪(*Halyomorpha*

halys)、南方綠蝽象(*Nezara viridula*)、綠蝽(*Acrosternum hilare*)，以及褐美洲蝽(*Euschistus servus*)中至少一者的情況下，導致無法成功侵擾、取食、發育及/或生殖，或導致該半翅目害蟲的死亡。抉擇靶定基因並成功的應用RNAi繼而係使用來控制半翅目害蟲。

【0349】基因轉殖RNAi品系及未轉形玉蜀黍的表型比較。選定用於創造髮夾dsRNA的靶定半翅目害蟲基因或序列，對任何已知的植物基因序列不具有相似度。因此，因靶定這些半翅目害蟲基因或序列的建構物而製造或活化的(系統性)RNAi，對基因轉殖植物預期是不會發生任何不利影響。然而，基因轉殖品系的發育與形態特徵係與未轉形植物進行比較，以及與那些以沒有髮夾表現基因之"空"的載體所轉形的基因轉殖品系進行比較。比較植物的根、芽、葉羣及生殖特徵。在基因轉殖及未轉形植物之根長度與生長模式中，沒有可觀察到的差異。植物的芽特徵，諸如高度、葉片數及大小，開花時間，花的大小及外觀都是類似的。一般而言，當在活體外及在溫室土壤中培養時，在基因轉殖品系及那些沒有表現靶定iRNA分子者之間沒有觀察到形態差異。

實施例14

包含半翅目害蟲序列之基因轉殖大豆(*Glycine max*)

【0350】10至20株懷有包含序列辨識編號：89、91及/或92的核酸之表現載體之基因轉殖T₀大豆植物，係如本技藝中已知的方式，包括舉例而言藉由農桿菌媒介的轉

形予以生成如下。成熟的大豆(大豆(*Glycine max*))種子係用氯氣滅菌過夜歷時十六小時。用氯氣滅菌後，將種子放置於LAMINAR™通風櫥內開放的容器中以驅散氯氣。接著，滅菌的種子係在24℃下使用黑箱子於黑暗中予以吸收滅菌H₂O歷時十六小時。

【0351】種子裂開的(split-seed)大豆之製備。含有一部份胚軸之裂開的大豆種子的實驗協定，必須製備如下的大豆種子材料，該大豆種子材料使用固定在解剖刀的#10刀片沿著種子的臍縱切，來分離並移除種皮，且將種子分裂成二個子葉段。小心的照顧以部份地移除胚軸，其中大約1/2-1/3的胚軸仍然保持附著於子葉的節端。

【0352】接種。繼而將含有一部份胚軸之裂開的大豆種子浸漬在農桿腫瘤菌(*Agrobacterium tumefaciens*) (例如，菌株EHA 101或EHA 105)的溶液中大約30分鐘，該農桿腫瘤菌溶液含有包含序列辨識編號：89、91及/或92之雙元質體。將該農桿腫瘤菌溶液稀釋至 $\lambda=0.6$ OD₆₅₀的最終濃度，然後浸漬該含有胚軸之子葉。

【0353】共培養。在接種之後，允許裂開的大豆種子與農桿腫瘤菌菌株於覆蓋一張濾紙之培養皿中的共培養培養基(Wang, Kan. *Agrobacterium Protocols*. 2. 1. New Jersey: Humana Press, 2006. Print.)上共培養歷時5天。

【0354】芽誘導。5天的共培養之後，用液體芽誘導(SI)培養基來清洗裂開的大豆種子，該培養基係由以下組成：B5鹽類，B5維生素，28 mg/L鐵，38 mg/L Na₂EDTA，

30 g/L蔗糖，0.6 g/L MES，1.11 mg/L BAP，100 mg/L TIMENTIN™，200 mg/L頭孢泰新(cefotaxime)，以及50 mg/L萬古黴素(vancomycin) (pH 5.7)。裂開的大豆種子繼而於芽誘導I(SI I)培養基上培養，該培養基係由以下組成：B5鹽類，B5維生素，7 g/L諾布爾瓊脂(Noble agar)，28 mg/L鐵，38 mg/L Na₂EDTA，30 g/L蔗糖，0.6 g/L MES，1.11 mg/L BAP，50 mg/L TIMENTIN™，200 mg/L頭孢泰新(cefotaxime)，50 mg/L萬古黴素(vancomycin) (pH 5.7)，且將子葉的平坦面面向上及子葉的節端埋藏於培養基內。培養2週之後，將源自經轉形裂開的大豆種子之外植片體轉移至芽誘導II(SI II)培養基上培養，該培養基含有增補6 mg/L草銨膦(glufosinate)(LIBERTY®)之SI I培養基。

【0355】芽伸長。於SI II培養基上培養2週之後，從外植片體移除子葉，以及含有胚軸之嫩芽墊(flush shoot pad)係透過於子葉的基部切一刀而切除。將源自子葉之經單離的芽墊轉移至芽伸長(SE)培養基上。該SE培養基係由以下組成：MS鹽類，28 mg/L鐵，38 mg/L Na₂EDTA，30 g/L蔗糖及0.6 g/L MES，50 mg/L天冬醯胺酸，100 mg/L L-焦麩胺酸，0.1 mg/L IAA，0.5 mg/L GA3，1 mg/L 玉米素核糖苷(zeatin riboside)，50 mg/L TIMENTIN™，200 mg/L頭孢泰新(cefotaxime)，50 mg/L萬古黴素(vancomycin)，6 mg/L草銨膦(glufosinate)，7 g/L諾布爾瓊脂(Noble agar)，(pH 5.7)。每2週將培養物

轉移至新鮮的SE培養基上。培養物係用 $80-90 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sec}$ 的光密度、以18 h光照期、在 24°C 之CONVIRON™生長室中生長。

【0356】發根。從子葉芽墊發育的伸長的芽係透過於子葉芽墊的基部處切割伸長的芽來單離，以及將伸長的芽浸泡於1 mg/L IBA(吲哚-3-丁酸)歷時1-3分鐘以促進發根。接著，將伸長的芽轉移至植物培養皿(phyta tray)內的發根培養基(MS鹽類，B5維生素，28 mg/L鐵，38 mg/L Na_2EDTA ，20 g/L蔗糖及0.59 g/L MES，50 mg/L天冬醯胺酸，100 mg/L L-焦麩胺酸7 g/L諾布爾瓊脂(Noble agar)，pH 5.6)上。

【0357】培養。在 24°C 之CONVIRON™生長室、18 h光照期培養歷時1-2週後，將已經發展根部的芽轉移至有蓋的聖代杯中的土壤混合物，以及放置於CONVIRON™生長室(型號CMP4030及CMP3244，Controlled Environments Limited，Winnipeg，Manitoba，Canada)中、於長日照條件下(16小時光/8小時黑暗)、以 $120-150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sec}$ 的光密度、於恆溫(22°C)及恆濕(40-50%)下用於植物馴化。生根的小苗於聖代杯中內馴化數週，然後將其等轉移至溫室內進一步馴化並建立強壯的基因轉殖大豆植物。

【0358】獲得另外的10-20株表現RNAi建構物的髮夾dsRNA之 T_1 大豆(*Glycine max*)獨立品系，用於BSB的考驗。髮夾dsRNA可以衍生如序列辨識編號：91-92中列

舉者，否則便進一步包含序列辨識編號：89。這些係透過RT-PCR或是其他分子分析方法予以證實。源自選定的獨立T₁品系的總RNA製備物係選擇性地使用於RT-PCR，加上設計以結合在每一RNAi建構物中之髮夾表現卡匣的鏈接子的引子。此外，在RNAi建構物中每一靶定基因的特定引子係選擇性地使用來擴增，並確認生產植物界之siRNA所要求之加工前mRNA之生成。每一靶定基因所欲的電泳帶(band)的擴增證實了髮夾RNA在每一基因轉殖大豆(*Glycine max*)植物中的表現。隨後選擇性地於獨立的基因轉殖品系中使用RNA墨漬法雜交，而證實該等靶定基因之dsRNA髮夾加工成為siRNA。

【0359】並且，具有對靶定基因失配的序列及超過80%序列同一性之RNAi分子，與具有對靶定基因100%序列同一性之RNAi分子，影響玉米根蟲的方式是相似的。失配的序列與天然序列的配對而於相同的RNAi建構物中形成髮夾dsRNA，遞送了經植物加工的siRNAs，其能夠影響取食的半翅目害蟲之生長、發育及生存力。

【0360】在植物界遞送相應於靶定基因的dsRNA、siRNA、shRNA或miRNA，且隨後由半翅目害蟲透過取食攝取引致該靶定基因透過RNA媒介基因靜默，而向下調節半翅目害蟲的靶定基因。當一靶定基因之功能於一個或多個發育階段為重要時，該半翅目害蟲的生長、發育及生殖受影響，且在英雄美洲蟬(*Euschistus heros*)、蓋德擬壁蟬(*Piezodorus guildinii*)、褐翅蟬(*Halyomorpha*

halys)、南方綠蝽象(*Nezara viridula*)、綠蝽(*Acrosternum hilare*)，以及褐美洲蝽(*Euschistus servus*)中至少一者的情況下，導致無法成功侵擾、取食、發育及/或生殖，或導致該半翅目害蟲的死亡。抉擇靶定基因並成功的應用RNAi繼而係使用來控制半翅目害蟲。

【0361】基因轉殖RNAi品系及未轉形大豆(*Glycine max*)的表型比較 選定用於創造髮夾dsRNA的靶定半翅目害蟲基因或序列，對任何已知的植物基因序列不具有相似度。因此，因靶定這些半翅目害蟲基因或序列的建構物而製造或活化的(系統性)RNAi，對基因轉殖植物預期是不會發生任何不利影響。然而，基因轉殖品系的發育與形態特徵係與未轉形植物進行比較，以及與那些以沒有髮夾表現基因之"空"的載體所轉形的基因轉殖品系進行比較。比較植物的根、芽、葉羣及生殖特徵。在基因轉殖及未轉形植物之根長度與生長模式中，沒有可觀察到的差異。植物的芽特徵，諸如高度、葉片數及大小，開花時間，花的大小及外觀都是類似的。一般而言，當在活體外及在溫室土壤中培養時，在基因轉殖品系及那些沒有表現靶定iRNA分子者之間沒有觀察到形態差異。

實施例15

英雄美洲蝽(*E. heros*)於人工飲食之生物分析

【0362】於人工飲食進行之dsRNA取食分析方面，32孔的盤子準備~18 mg的人工飲食小丸及水，如同注入實驗一般(實施例12)。將濃度為200 ng/ μ l之dsRNA添加至食

物小丸及水樣品，二個孔各100 μ l。各孔內引入五隻第二齡英雄美洲蟪若蟲。使用水樣品及靶定YFP轉錄本之dsRNA作為陰性對照。於不同的三天重複實驗。於處理8天之後，將存活的昆蟲秤重且判定死亡率。

實施例16

包含半翅目害蟲序列之基因轉殖阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*)

【0363】用於髮夾形成的靶定基因建構物之阿拉伯芥(*Arabidopsis*)轉形載體，係使用相似於實施例4之標準的分子分法來產生，該靶定基因建構物含有 $rpL40$ (序列辨識編號：89)的區段。阿拉伯芥轉形係使用標準的農桿菌為基礎的程序來執行。用草銨膦(glufosinate)耐受性篩選標記來選擇 T_1 種子。產生了基因轉殖 T_1 阿拉伯芥植物，以及產生同型接合的簡單複本 T_2 基因轉殖植物供昆蟲研究。生物分析係於成長的開花阿拉伯芥植物上完成。各植物上放置五至十隻昆蟲，且監測14天之內的存活。

【0364】阿拉伯芥轉形載體之建構。以輸入載體為基的輸入選殖體，係使用化學合成片段(DNA2.0，Menlo Park，CA)及標準分子選殖方法之組合來組裝，該輸入載體含有一種用於髮夾形成的靶定基因建構物，該靶定基因建構物含有 $rpL40$ (序列辨識編號：89)的區段。RNA初級轉錄本之分子內髮夾形成係藉由將靶定基因區段之兩個複本配置成(在一單一轉錄單元內)彼此相反之定向而促進，該兩個區段係由鏈接子序列(例如一環(如序列辨識編號：

112)，或ST-LS1內含子分隔開(Vancanneyt等人之(1990) Mol. Gen. Genet. 220(2)：245-50)。因此，該初級mRNA轉錄本含有由該鏈接子序列分隔之兩個 $rpL40$ 基因區段序列，做為彼此大的反向重複。一種阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*) 泛素 10 啟動子 (Callis 等人之 (1990) J. Biological Chem. 265:12486-12493)之複本係使用來驅動初級mRNA髮夾轉錄本之製造，以及包含源自農桿腫瘤菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的開放讀取框架23之3'非轉譯區域之片段(AtuORF23 3' UTR v1；美國專利第5,428,147號)，係使用來終止髮夾-RNA-表現基因的轉錄。

【0365】如上所述之輸入載體內的髮夾選殖體係使用於標準GATEWAY®重組反應，加上一種典型的雙元目標載體，來生產髮夾RNA表現轉形載體供用於農桿菌媒介的阿拉伯芥(*Arabidopsis*)轉形。

【0366】雙元目標載體包含一種除草劑耐受性基因，DSM-2v2(美國專利申請案第2011/0107455號)，其係在木薯葉脈嵌紋病毒(Cassava vein mosaic virus)啟動子(CsVMV啟動子v2，美國專利第7601885號；Verdaguer等人之(1996) Plant Molecular Biology, 31:1129-1139)的調節下。一種包含源自農桿腫瘤菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的開放讀取框架1之3'非轉譯區域之片段(AtuORF1 3' UTR v6；Huang等人之(1990) J. Bacteriol. 172:1814-1822)，係使用來終止DSM2v2 mRNA的轉錄。

【0367】一種陰性對照雙元建構物，其包含表現YFP

髮夾RNA的基因，係用一典型的雙元目標載體及輸入載體，藉由標準GATEWAY®重組反應來建構。輸入建構物包含YFP髮夾序列(hpYFP v2-1，序列辨識編號：89)，該YFP髮夾序列係在阿拉伯芥(*Arabidopsis*)泛素10啟動子(如上所述)及源自農桿腫瘤菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的ORF23 3'非轉譯區域之片段(如上所述)的表現控制下。

【0368】生產包含殺蟲性髮夾RNA之基因轉殖阿拉伯芥：農桿菌媒介的轉形。將包含髮夾序列的雙元質體予以電穿孔至農桿菌菌株GV3101 (pMP90RK)之內。重組的農桿菌選殖體係藉由重組的農桿菌選殖體之質體製備物的限制分析(restriction analysis)來確認。利用一種Qiagen Plasmid Max套組(Qiagen，Cat# 12162)、遵照製造商推薦的實驗協定，來從農桿菌培養物萃取質體。

【0369】阿拉伯芥的轉形及T₁選定。十二至十五株阿拉伯芥植物(c.v. Columbia)生長於溫室內的4"花盆中，加上250 μmol/m²的光密度、25 °C及18：6小時的光：黑暗條件。於轉形之前一週修剪初生的花莖(flower stems)。藉由將10μl重組的農桿菌甘油保存種(stock)培育於100 ml LB肉湯中(Sigma L3022) +100 mg/L 觀黴素(Spectinomycin) + 50 mg/L卡那黴素(Kanamycin)於28 °C且以225 rpm震盪歷時72小時，來製備農桿菌接種體。收穫農桿菌細胞且懸浮於5%蔗糖+ 0.04% Silwet-L77 (Lehle Seeds Cat # VIS-02) +10 μg/L 苯亞甲胺嘌呤

(benzamino purine)(BA)溶液內達OD₆₀₀ 0.8~1.0，然後進行花的浸漬法(floral dipping)。將植物的地上部分浸漬於農桿菌溶液內歷時5-10分鐘，伴隨溫和的攪拌。接而為了正常的生長而將植物轉移至溫室內，伴隨定時的灑水及施肥直至結籽。

實施例17

基因轉殖的阿拉伯芥之生長及生物分析。

【0370】髮夾RNAi建構物轉形的T₁阿拉伯芥之選定。源自各個轉形、高達200 mg的T₁種子係於0.1%瓊脂糖溶液內予以層積。該等種子係種植於具有#5陽光(sunshine)培養基的發芽盤(10.5" x 21" x 1" ; T.O. Plastics Inc. , Clearwater , MN.)內。於種植後6及9天選擇對280 g/ha 的Ignite®(草銨磷)具耐受性的轉形體。將選擇的品件移植至直徑4"的花盆內。於移植一週之內完成插入複本的分析，其係使用Roche LightCycler480、經由水解定量即時PCR(qPCR)來執行。使用LightCycler探針設計軟體2.0(Roche)來設計對抗DSM2v2篩選標記之PCR引子及水解探針。植物維持在24 °C下，加上100-150 mE/m²×s的密度之螢光和白熱燈之16:8小時之光：暗光照期。

【0371】英雄美洲蟬植物取食生物分析。各個建構物選擇至少四個低複本(1-2個插入)、四個中等複本(2-3個插入)，以及四個高複本(≥4個插入)品件。植物生長至開花階段(植物含有花和長角果(siliques))。土壤的表面覆蓋~ 50

ml體積的白沙以容易辨識昆蟲。各植物上引入五至十隻第二齡英雄美洲蟥若蟲。該等植物覆蓋直徑3”、16”高及壁厚0.03”(項號484485，Visipack Fenton MO)的塑膠管；用尼龍篩孔覆蓋管子來隔離昆蟲。植物於生長室(conviron)內維持在正常溫度、光及灑水條件下。於14天內，收集昆蟲並秤重，計算死亡率百分比以及生長抑制(1-重量處理組/重量對照組)。使用YFP髮夾表現植物作為對照。

【0372】 T_2 阿拉伯芥種子之產生及 T_2 生物分析。 T_2 種子係從各個建構物所選擇的低複本(1-2個插入)品件來生產。植物(同型接合及/或異型接合)係如上所述經歷英雄美洲蟥取食生物分析。從同型合子收穫 T_3 種子並儲存供將來的分析。

實施例18

額外作物物種之轉形

【0373】 棉花係以 $rpL40$ (有或是沒有葉綠體轉運肽)予以轉形來提供半翅目害蟲控制，其係藉由利用熟悉此藝者已知的方法，舉例而言，先前於美國專利第7,838,733號的實施例14，或是PCT國際專利公開案第WO2007/053482號的實施例12中所述實質相同的技術。

實施例19

$RpL40$ dsRNA於昆蟲管理

【0374】 $RpL40$ dsRNA轉基因係於基因轉殖植物內與其他的dsRNA分子組合，以提供冗餘的RNAi靶定以及

協同RNAi效應。表現靶定 $rpL40$ 的dsRNA之基因轉殖植物，包括舉例而言且不限於玉米、大豆及棉花，對於預防鞘翅目及半翅目昆蟲之取食損害是有用的。 $RpL40$ dsRNA轉基因亦於植物內組合以蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*)的殺蟲蛋白質技術，以代表害蟲抗性管治基因錐體(Insect Resistance Management gene pyramids)之新的作用模式。當於基因轉殖植物內與靶定昆蟲害蟲及/或蘇力菌殺蟲蛋白質之其他的dsRNA分子組合時，觀察到協同殺蟲效應，其亦緩和抗性昆蟲族群的發育。

【0375】縱然本揭示可以容許各種修飾及任擇的形式，但業已於此經由實例詳細說明特定的具體例。然而，應該瞭解本揭示不希望限制所揭示的特定形式。更確切地，本揭示要涵蓋下列附隨的請求項及其等合法的均等物所界定的範疇之所有修飾、均等物及替代方案。

【符號說明】

(無)

【序列表】

<110> 陶氏農業科學公司
<120> 賦予對鞘翅目及半翅目害蟲之抗性的核糖體蛋白質L40(RPL40)核酸分子

<130> 77896

<160> 112

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1
<211> 574
<212> DNA
<213> 玉米根螢葉甲(Diabrotica virgifera)

<400> 1
aagttgggta taaaccacgt ttcaagagag gcaaaaaacc aacggaaaat gcagatattc 60
gttaaaaactt taaccggtaa gaccatcaca cttgagggtcg agccaagcga cacaatcgaa 120
aatgtcaagg cgaaaatcca agacaaagag ggtattccac cagatcagca acgtctaatt 180
tttgctggca aacaattgga agatggacgt acattgtccg attacaacat ccaaaaggaa 240
tcgacactcc atttggtggt acgtctacgt ggtgggtatca tcgaaccatc attgcggtatt 300
ttggcacaaa agtacaattg cgacaaaatg atttgccgta agtgctatgc tcgtttgcat 360
ccaagagcaa ccaattgccg taagaagaag tgtggccaca ccaacaattt gcgcccagg 420
aagaagttga agtagacgat cgtatTTTTG tgctgtatgt ctggaggaaa acaatgttcg 480
gattcgtcca cagttgttat ctttttgaat aatcgaaatt atgtgaatca ttcattgggt 540
acagcctgaa taaacttcgt tttctgaaac cggc 574

<210> 2
<211> 128
<212> PRT
<213> 玉米根螢葉甲

<400> 2
Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15
Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30
Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys
35 40 45
Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu
50 55 60
Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ile Ile Glu Pro
65 70 75 80
Ser Leu Arg Ile Leu Ala Gln Lys Tyr Asn Cys Asp Lys Met Ile Cys
85 90 95

Arg Lys Cys Tyr Ala Arg Leu His Pro Arg Ala Thr Asn Cys Arg Lys
100 105 110

Lys Lys Cys Gly His Thr Asn Asn Leu Arg Pro Lys Lys Lys Leu Lys
115 120 125

<210> 3
<211> 652
<212> DNA
<213> 玉米根螢葉甲

<400> 3
attaaatatc tgtactttta aattttaccac gcttttttgta acggaaacgt gttcatcaac 60
tgtcacttat caaataaaact agacttcatt tttcacttgt cttttttcatt cggaagtttag 120
cacgttgtgg aataaaacact tccacaatgc aaatttttcgt gaaaactctc actggtaaaa 180
ccatcacctt cgagggttgag ccatccgata caatcgaaaa tgttaaagct aagatccaag 240
acaaagaagg tatcccccca gaccagcaac gtttgatctt cgctggaaaa caactcgaag 300
atggacgtac cttgtcagac tacaacatcc agaaggaatc cacccttcac ttggtgctcc 360
gattgagagg aggtctcatc gagccttccc ttcgtatttt agccatgaag tacaactgcg 420
agaagatgat ctgccgtaaa tgttacgcca ggttacaccc aagggccacc aactgcagaa 480
agaagaagtg tggacacacc aacaacttgc gcccgaagaa gaagctaaag tagactatta 540
cgaggttatt ttttacaatg ttaatatctt acaattccag atgttacttg aacattttatt 600
taactaatta taggaaatga catcaatcct aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 652

<210> 4
<211> 128
<212> PRT
<213> 玉米根螢葉甲

<400> 4
Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15
Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30
Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys
35 40 45
Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu
50 55 60
Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Leu Ile Glu Pro
65 70 75 80
Ser Leu Arg Ile Leu Ala Met Lys Tyr Asn Cys Glu Lys Met Ile Cys
85 90 95
Arg Lys Cys Tyr Ala Arg Leu His Pro Arg Ala Thr Asn Cys Arg Lys
100 105 110

Lys Lys Cys Gly His Thr Asn Asn Leu Arg Pro Lys Lys Lys Leu Lys
115 120 125

<210> 5
<211> 4065
<212> DNA
<213> 玉米根螢葉甲

<400> 5	
cagatttttcg tcaagacatt gacggggaag accattaccc tggaggtcga gcccagtgat	60
tccatcgaga ccgtcaaatc caagattcag gataaggaag ggattcctcc tgaccaacag	120
cgcttgattt ttgctggcaa gcaactcgag gaaggccgat ctttgtcaga ctataacatc	180
caaaaagaga gtaccatcca tctcgtgctt cgactgagag gaggtggtat cgagatcgag	240
ccaacgttgg cgcaattggc tcgcaagcac aatattgaga gactcatttg tcgaaaatgt	300
tacgccagac tacacatcaa agctactaat tgccggaaaa aggctgcgg ccactcatct	360
cagctcagac ccaagaagaa gcctaagagt taataatttt tgaactttct tttttccacg	420
aactagctta tgtgtactcg ctcagttggt tcttctcagc cgccgattct tctggcccga	480
aacccaagtc gtcctctttg tacagaaatg tgtctcgccg cactatgtcg ctaactaagc	540
atgactcgat cgtcgaccac tccagtgggc gctcacgtgc ttgctgttcg gcgaggtaca	600
gcacgcggtt gacgcgattt ttgaatactg cattgagcat cgacaccacc tcgctcgctt	660
cctcccggag tccgagtttc ctgacggact tgatgccgag cggaccaccg tattcatttg	720
acgctcggtc cagtaggcgt tgggtgaacg cccaaccgtc ttctctttga ggctcttggtg	780
ggtggtgcat ccactaccg tagtggtgat tgtagatgc ggccgttggc ggtgtgtcgt	840
cctcagcttc aaagagcatc ctgagactac cctcagtcga cacaggctgg ttgggtgaga	900
gccccaaaaa tgcgctctca gagaatggcc caagcgtgaa gaacgcgcaa tcctccgcgc	960
aactggacac aactggcggc cctgccgaat ttacagtttg ctgagccggc attctccgaa	1020
aagctggttc ctgatcaatc aaaccatgat cctctgaatt gtgttccaaa tgatcagcca	1080
acctttcata catacgccga gccgtatctc gtattgctga atgcgacaaa gcgtccgcgg	1140
gtttatagcc ggcacgtgcc tgccgtagca acgctatgac gaacctcgcc atcgccgtct	1200
tcggcactat gatgttcttg tcgttttagcc aagcgatctg ccgacatgaa tcagaccgcc	1260
ccttcatgaa cgaataatca ggtaccacag ccttcaccgg agcgcgcagg ttattgttca	1320
tcatttgtag ctctgtaga gtcccaggcc gtccaacgag caggggccga gcggcggagt	1380
tcatcaagcc gcgatagggg accagtcggg ggaggccgcg gagcagttcc ggctgcatat	1440
taggtggaga tgagccaacg ccatcgagac tctgcgggcc gccgaatccc ggcatgtcca	1500
tcattccttg ggactgaga cttggcgagt tcatcgaatt cggcgtctgg ctttccatca	1560
tgtgtttcag agatcccgga ggcgccggct gactggtgaa ggtcggactc tgcccgccag	1620
agcccatggt ttggccaggc ggctgcggca tagcgcctcc agcgtgcatc atcatttgct	1680
gttgctgcat catttggtgc tggagcatgt acggcggctg ttgtggaggt ggcacatgc	1740
gttgaggcgc cggctggata ttgccagcgt gcataatcgg cgtcatcgag ttcataccca	1800
tcatcgctact ctgcatcata gggatgatgca ttggcgctga agccatgact tgagggttcg	1860

gcgcgcgcgta catttgaccc tggggcggcg gctgggctcc gggaggtggc tgccagcgct	1920
gttgctgttg ctgagcttgt tgctgtggtg tcggtacata tctattagtt gggggcctcc	1980
atgtattatg catcgtcaga gtggccgtgc gattgagttt tcgagcataa aaagtgcggc	2040
ctcagtgatt gggaatgatc atttcggcag tcggagtctt gtatggcctg agtatcagag	2100
acgtagtcca agagatcttg ctcgtgctgc gaggcagcaa gggaccgtta atcgtaatga	2160
agggtgatg tttgccattg tccgtgctg aagtcaagtc taggactgtg ccgtgacaag	2220
ctatggccgt aaactcaatt tccagttcgt agctaactcc aactcgttca tgtcgggaagg	2280
tagcctctag actggcaggg atgtagagcg gaactatcg aaccagggtc tgcgtaacag	2340
tcgtggaggc ttcacacaca gccacggtgt ccgtcgttat aacaatcagc gttgaatcta	2400
cattcgtcaa cgcgtggtag cttctgaaat ccagccaact caaacgggtc gtggcgttgg	2460
gccggtaccc gaaattttgt ctatgcttgt tccactgaag cgcctcgagc ggagacagtg	2520
gcggctgata agacctcgta gtttgtttca atctaacaca cacttccacc acggccaaag	2580
acgaattagt gaattcggtc ttgacataaa ttgtactacc taggtgcccc tcaagagtgt	2640
atgactcatc aacagtgggt ggtggcgatt tattgcctc gtacactttg gattgcggcg	2700
tcgccaaaca aacgtctgct ggccatata tgacgacttg gatatcggac agatgggaac	2760
cattgatcga aactctgtag acgggggtag tttggggcg cacctgtgca tccgcttcaa	2820
aagatgagac aaaattgcct gcagttcctt tttgactctt agagctgctc atgcacctga	2880
tcgagccgac aatcttatca atctcaaatc catttccgag tctttcgatg agattcacct	2940
catggacagc gcgctgctga attttctgcc tcaataactt caagcattct ccaggctctt	3000
ctaagaattc gttcaaagct gcagcagata ctctgttgc cgtcatatgc ttcgctggcc	3060
gagtttcgct caaagtgcta tgcatatcag cacagggtga actgagccat ctgagatata	3120
agagtccggc atcaaccttt tctttggcga cgagaaaatc attttgtgat tcttgttcat	3180
tgtgtgacca gccagctatc gggagcggaa tgggcagaga gccagaagtg aaagcggctc	3240
cgaaatccca atttaaggcg aggtaggtgg ggggaaggg ccgagctggt agcgggtggat	3300
atataggcgg aggttgtaga atgatagaag cgagctgct gaacttcata aagatgggga	3360
tccattcact taaggggttg atcagaatag gacacgggt aatggttatt gccaaactta	3420
tttgcggcgg gattggcggc cctggagcgc cgtttgttg agtagatatt tcggactcga	3480
tactgtcgag ggtgctggcg cgagctggag ggaggtgcct cacggatgag ccgccgctcg	3540
cgctacgatc attcaaacct accgaccac tattgttgtg tgaaagtaga gttgctccgc	3600
ccgttgggccc aatagtcaca ggcgcgtcat ttctgatagc tagaacgtag tcatagctga	3660
atcgtcctcc tcgtcggatg gacggtggca agctaactgg gatgtagagc tggcatttgt	3720
acctgtccac gtcgcctgtg acctcgagag tattgcttag cgcgaaact cgccctgatt	3780
tcttatttgt ggtggcggag gtggcttgtt gttgatgtcc gggggatggg agcgtagtag	3840
tggaaacgga ttttccaaac tctctgaggg ctctagtac tacctcgtaa ccattttgaa	3900
ctttgtcagt agagaataac gggggggctg atggacagcg atcgggtgtcc aatccgttga	3960
ccagaccata cacgtatatt cgatcaccgg cggatgaagtg ggtgtgacaa aaactgatgg	4020

actggccacc tctaggcatt catttaatct ggcaagtgtt ccgct 4065

<210> 6
<211> 130
<212> PRT
<213> 玉米根螢葉甲

<400> 6

Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val
1 5 10 15
Glu Pro Ser Asp Ser Ile Glu Thr Val Lys Ser Lys Ile Gln Asp Lys
20 25 30
Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln
35 40 45
Leu Glu Glu Gly Arg Ser Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser
50 55 60
Thr Ile His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Gly Ile Glu Ile Glu
65 70 75 80
Pro Thr Leu Ala Gln Leu Ala Arg Lys His Asn Ile Glu Arg Leu Ile
85 90 95
Cys Arg Lys Cys Tyr Ala Arg Leu His Ile Lys Ala Thr Asn Cys Arg
100 105 110
Lys Lys Ala Cys Gly His Ser Ser Gln Leu Arg Pro Lys Lys Lys Pro
115 120 125
Lys Ser
130

<210> 7
<211> 665
<212> PRT
<213> 玉米根螢葉甲

<400> 7

Met Pro Arg Gly Gly Gln Ser Ile Ser Phe Cys His Thr His Phe Thr
1 5 10 15
Ala Gly Asp Arg Ile Tyr Val Tyr Gly Leu Val Asn Gly Leu Asp Thr
20 25 30
Asp Arg Cys Pro Ser Ala Pro Pro Leu Phe Ser Thr Asp Lys Val Gln
35 40 45
Asn Gly Tyr Glu Val Val Thr Arg Ala Leu Arg Glu Phe Gly Lys Ser
50 55 60
Val Ser Thr Thr Thr Leu Pro Ser Pro Gly His Gln Gln Gln Ala Thr
65 70 75 80

Ser	Ala	Thr	Thr	Asn	Lys	Lys	Ser	Gly	Arg	Val	Phe	Ala	Leu	Ser	Asn	
				85					90					95		
Thr	Leu	Glu	Val	Thr	Gly	Asp	Val	Asp	Arg	Tyr	Lys	Cys	Gln	Leu	Tyr	
			100					105					110			
Ile	Pro	Val	Ser	Leu	Pro	Pro	Ser	Ile	Arg	Arg	Gly	Gly	Arg	Phe	Ser	
		115					120					125				
Tyr	Asp	Tyr	Val	Leu	Ala	Ile	Arg	Asn	Asp	Ala	Pro	Val	Thr	Ile	Gly	
	130					135					140					
Pro	Thr	Gly	Gly	Ala	Thr	Leu	Leu	Ser	His	Asn	Asn	Ser	Gly	Ser	Val	
145					150					155					160	
Gly	Leu	Asn	Asp	Arg	Ser	Ala	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Val	Arg	His	Leu	
				165					170					175		
Pro	Pro	Ala	Arg	Ala	Ser	Thr	Leu	Asp	Ser	Ile	Glu	Ser	Glu	Ile	Ser	
			180					185					190			
Thr	Pro	Thr	Asn	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro	Pro	Ile	Pro	Pro	Gln	Ile	Ser	
		195					200					205				
Leu	Ala	Ile	Thr	Ile	Ser	Pro	Cys	Pro	Ile	Leu	Ile	Asn	Pro	Leu	Ser	
	210					215					220					
Glu	Trp	Ile	Pro	Ile	Phe	Met	Lys	Phe	Thr	Gln	Leu	Ala	Ser	Ile	Ile	
225					230					235					240	
Leu	Gln	Pro	Pro	Pro	Ile	Tyr	Pro	Pro	Leu	Pro	Ala	Arg	Pro	Phe	Thr	
				245					250					255		
Pro	Thr	Tyr	Leu	Ala	Leu	Asn	Trp	Asp	Phe	Gly	Ala	Ala	Phe	Thr	Ser	
			260					265					270			
Gly	Ser	Leu	Pro	Ile	Pro	Leu	Pro	Ile	Ala	Gly	Trp	Ser	His	Asn	Glu	
		275					280					285				
Gln	Glu	Ser	Gln	Asn	Asp	Phe	Leu	Val	Ala	Lys	Glu	Lys	Val	Asp	Ala	
	290					295					300					
Gly	Leu	Leu	Tyr	Leu	Arg	Trp	Leu	Ser	Tyr	Thr	Cys	Ala	Asp	Met	His	
305					310					315					320	
Ser	Thr	Leu	Ser	Glu	Thr	Arg	Pro	Ala	Lys	His	Met	Thr	Ala	Thr	Gly	
				325					330					335		
Val	Ser	Ala	Ala	Ala	Leu	Asn	Glu	Phe	Leu	Glu	Glu	Pro	Gly	Glu	Cys	
			340					345					350			
Leu	Lys	Leu	Leu	Arg	Gln	Lys	Ile	Gln	Gln	Arg	Ala	Val	His	Glu	Val	
		355					360					365				

Asn 370	Leu	Ile	Glu	Arg	Leu	Gly 375	Asn	Gly	Phe	Glu	Ile 380	Asp	Lys	Ile	Val
Gly 385	Ser	Ile	Arg	Cys	Met 390	Ser	Ser	Ser	Lys	Ser 395	Gln	Lys	Gly	Thr	Ala 400
Gly	Asn	Phe	Val	Ser 405	Ser	Phe	Glu	Ala	Asp 410	Ala	Gln	Val	Arg	Pro 415	Gln
Thr	Thr	Pro	Val 420	Tyr	Arg	Val	Ser	Ile 425	Asn	Gly	Ser	His	Leu 430	Ser	Asp
Ile	Gln	Val 435	Val	Asn	Ile	Trp	Pro 440	Ala	Asp	Val	Cys	Leu 445	Ala	Thr	Pro
Gln	Ser 450	Lys	Val	Tyr	Glu	Gly 455	Asn	Lys	Ser	Pro	Pro 460	Thr	Thr	Val	Asp
Glu 465	Ser	Tyr	Thr	Leu	Glu 470	Gly	His	Leu	Gly	Ser 475	Thr	Ile	Tyr	Val	Lys 480
Thr	Glu	Phe	Thr	Asn 485	Ser	Ser	Leu	Ala	Val 490	Val	Glu	Val	Cys	Val 495	Arg
Leu	Lys	Gln	Thr 500	Thr	Arg	Ser	Tyr	Gln 505	Pro	Pro	Leu	Ser	Pro 510	Leu	Glu
Ala	Leu	Gln 515	Trp	Asn	Lys	His	Arg 520	Gln	Asn	Phe	Gly	Tyr 525	Arg	Pro	Asn
Ala 530	Thr	Thr	Gly	Leu	Ser	Trp 535	Leu	Asp	Phe	Arg	Ser 540	Tyr	His	Ala	Leu
Thr 545	Asn	Val	Asp	Ser	Thr 550	Leu	Ile	Val	Ile	Thr 555	Thr	Asp	Thr	Val	Ala 560
Val	Cys	Glu	Ala	Ser 565	Thr	Thr	Val	Thr	Gln 570	Thr	Leu	Val	Ala	Ile 575	Val
Pro	Leu	Tyr	Ile 580	Pro	Ala	Ser	Leu	Glu 585	Ala	Thr	Phe	Arg	His 590	Glu	Arg
Val	Gly 595	Val	Ser	Tyr	Glu	Leu	Glu 600	Ile	Glu	Phe	Thr 605	Ala	Ile	Ala	Cys
His 610	Gly	Thr	Val	Leu	Asp	Leu 615	Thr	Ser	Arg	Thr 620	Asp	Asn	Gly	Lys	His
Gln 625	Pro	Phe	Ile	Thr	Ile 630	Asn	Gly	Pro	Leu	Leu 635	Pro	Arg	Ser	Thr	Ser 640
Lys	Ile	Ser	Trp	Thr 645	Thr	Ser	Leu	Ile	Leu 650	Arg	Pro	Tyr	Lys	Thr 655	Pro

Thr Ala Glu Met Ile Ile Pro Asn His
660 665

<210> 8
<211> 537
<212> PRT
<213> 玉米根螢葉甲

<400> 8

Gly Arg Thr Phe Tyr Ala Arg Lys Leu Asn Arg Thr Ala Thr Leu Thr
1 5 10 15

Met His Asn Thr Trp Arg Pro Pro Thr Asn Arg Tyr Val Pro Thr Pro
20 25 30

Gln Gln Gln Ala Gln Gln Gln Gln Gln Arg Trp Gln Pro Pro Pro Gly
35 40 45

Ala Gln Pro Pro Pro Gln Gly Gln Met Tyr Gly Ala Pro Asn Pro Gln
50 55 60

Val Met Ala Ser Ala Pro Met His His Pro Met Met Gln Ser Thr Met
65 70 75 80

Met Gly Met Asn Ser Met Thr Pro Ile Met His Ala Gly Asn Ile Gln
85 90 95

Pro Ala Pro Gln Arg Met Met Pro Pro Pro Gln Gln Pro Pro Tyr Met
100 105 110

Leu Gln Gln Gln Met Met Gln Gln Gln Gln Met Met Met His Ala Gly
115 120 125

Gly Ala Met Pro Gln Pro Pro Gly Gln Asn Met Gly Ser Gly Gly Gln
130 135 140

Ser Pro Thr Phe Thr Ser Gln Pro Ala Pro Pro Gly Ser Leu Asn Ser
145 150 155 160

Met Met Glu Gly Gln Thr Pro Asn Ser Met Asn Ser Pro Ser Leu Ser
165 170 175

Ala Gln Gly Met Met Asp Met Pro Gly Phe Gly Gly Pro Gln Ser Leu
180 185 190

Asp Gly Val Gly Ser Ser Pro Pro Asn Met Gln Pro Glu Leu Leu Arg
195 200 205

Gly Leu Pro Arg Leu Val Pro Tyr Arg Gly Leu Met Asn Ser Ala Ala
210 215 220

Arg Pro Leu Leu Val Gly Arg Pro Gly Thr Leu Gln Glu Leu Gln Met
225 230 235 240

Met	Asn	Asn	Asn	Leu	Arg	Ala	Pro	Val	Lys	Ala	Val	Val	Pro	Asp	Tyr	
				245					250					255		
Ser	Phe	Met	Lys	Gly	Arg	Ser	Asp	Ser	Cys	Arg	Gln	Ile	Ala	Trp	Leu	
			260					265					270			
Asn	Asp	Lys	Asn	Ile	Ile	Val	Pro	Lys	Thr	Ala	Met	Ala	Arg	Phe	Val	
		275					280					285				
Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Gln	Ala	Arg	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Ala	Asp	Ala	
	290					295					300					
Leu	Ser	His	Ser	Ala	Ile	Arg	Asp	Thr	Ala	Arg	Arg	Met	Tyr	Glu	Arg	
305					310					315					320	
Leu	Ala	Asp	His	Leu	Glu	His	Asn	Ser	Glu	Asp	His	Gly	Leu	Ile	Asp	
				325					330					335		
Gln	Glu	Pro	Ala	Phe	Arg	Arg	Met	Pro	Ala	Gln	Gln	Thr	Val	Asn	Ser	
			340					345					350			
Ala	Gly	Pro	Pro	Val	Val	Ser	Ser	Cys	Ala	Glu	Asp	Trp	Ala	Phe	Phe	
		355					360					365				
Thr	Leu	Gly	Pro	Phe	Ser	Glu	Ser	Ala	Phe	Trp	Gly	Leu	Ser	Pro	Asn	
	370					375					380					
Gln	Pro	Val	Ser	Thr	Glu	Gly	Ser	Leu	Arg	Met	Leu	Phe	Glu	Ala	Glu	
385					390					395					400	
Asp	Asp	Thr	Pro	Pro	Thr	Ala	Ala	Ser	Asn	Asn	His	His	Tyr	Gly	Ser	
				405					410					415		
Gly	Met	His	His	Pro	Gln	Glu	Pro	Gln	Arg	Glu	Asp	Gly	Trp	Ala	Phe	
			420					425					430			
Thr	Gln	Arg	Leu	Leu	Asp	Arg	Ala	Ser	Asn	Glu	Tyr	Gly	Gly	Pro	Leu	
		435					440					445				
Gly	Ile	Lys	Ser	Val	Arg	Lys	Leu	Gly	Leu	Arg	Glu	Glu	Ala	Ser	Glu	
	450					455					460					
Val	Val	Ser	Met	Leu	Asn	Ala	Val	Phe	Lys	Asn	Arg	Val	Asn	Arg	Val	
465					470					475					480	
Leu	Tyr	Leu	Ala	Glu	Gln	Gln	Ala	Arg	Glu	Arg	Pro	Leu	Glu	Trp	Ser	
				485					490					495		
Thr	Ile	Glu	Ser	Cys	Leu	Val	Ser	Asp	Ile	Val	Arg	Arg	Asp	Thr	Phe	
			500					505					510			
Leu	Tyr	Lys	Glu	Asp	Asp	Leu	Gly	Phe	Gly	Pro	Glu	Glu	Ser	Ala	Ala	
		515					520					525				

Glu Lys Lys Gln Leu Ser Glu Tyr Thr
530 535

<210>	9		
<211>	306		
<212>	DNA		
<213>	玉米根螢葉甲		
<400>	9		
	gaaaatgtca aggcgaaaat ccaagacaaa gagggatttc caccagatca gcaacgtcta	60	
	atTTTTgctg gcaaacaatt ggaagatgga cgtacattgt ccgattacaa catccaaaag	120	
	gaatcgacac tccatttggt gttacgtcta cgtgggtgga tcatcgaacc atcattgcgt	180	
	atTTTggcac aaaagtacaa ttgcgacaaa atgatttgcc gtaagtgcta tgctcgtttg	240	
	catccaagag caaccaattg ccgtaagaag aagtgtggcc acaccaacaa tttgcgcccc	300	
	aagaag	306	
<210>	10		
<211>	361		
<212>	DNA		
<213>	玉米根螢葉甲		
<400>	10		
	cagatttttcg tcaagacatt gacggggaag accattaccc tggaggtcga gcccagtgat	60	
	tccatcgaga ccgtcaaadc caagattcag gataaggaag ggattcctcc tgaccaacag	120	
	cgcttgattt ttgctggcaa gcaactcgag gaaggccgat ctttgtcaga ctataacatc	180	
	caaaaagaga gtaccatcca tctcgtgctt cgactgagag gaggtgggat cgagatcgag	240	
	ccaacgttgg cgcaattggc tcgcaagcac aatattgaga gactcatttg tcgaaaatgt	300	
	tacgccagac tacacatcaa agctactaat tgccggaaaa aggccctgcgg ccactcatct	360	
	c	361	
<210>	11		
<211>	117		
<212>	DNA		
<213>	玉米根螢葉甲		
<400>	11		
	ccaccagatc agcaacgtct aatttttgct ggcaaacaat tggaagatgg acgtacattg	60	
	tccgattaca acatccaaaa ggaatcgaca ctccatttgg tgttacgtct acgtggt	117	
<210>	12		
<211>	143		
<212>	DNA		
<213>	玉米根螢葉甲		
<400>	12		
	tcgaaccatc attgcgtatt ttggcacaaa agtacaattg cgacaaaatg atttgccgta	60	
	agtgctatgc tcgtttgcat ccaagagcaa ccaattgccg taagaagaag tgtggccaca	120	
	ccaacaattt gcgccccaaag aag	143	
<210>	13		
<211>	141		
<212>	DNA		
<213>	玉米根螢葉甲		

<400>	13	
caagagaggc	aaaaaaccaa	cggaaaatgc agatattcgt taaaacttta accggtaaga 60
ccatcacact	tgaggtcgag	ccaagcgaca caatcgaaaa tgtcaaggcg aaaatccaag 120
acaaagaggg	tattccacca	g 141
<210>	14	
<211>	130	
<212>	DNA	
<213>	玉米根螢葉甲	
<400>	14	
gccgtaagtg	ctatgctcgt	ttgcatccaa gagcaaccaa ttgccgtaag aagaagtgtg 60
gccacaccaa	caatttgcgc	ccaaagaaga agttgaagta gacgatcgta tttttgtgct 120
gtatgtctgg		130
<210>	15	
<211>	165	
<212>	DNA	
<213>	玉米根螢葉甲	
<400>	15	
cagcaacgtc	taatttttgc	tggcaaacaa ttggaagatg gacgtacatt gtccgattac 60
aacatccaaa	aggaatcgac	actccatttg gtgttacgtc tacgtggtgg tatcatcgaa 120
ccatcattgc	gtatttttggc	acaaaagtac aattgcgaca aaatg 165
<210>	16	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引導子寡核苷酸	
<400>	16	
ttaatacgac	tcactatagg	gaga 24
<210>	17	
<211>	503	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的部分編碼區域	
<400>	17	
caccatgggc	tccagcggcg	ccctgctgtt ccacggcaag atcccctacg tggtaggat 60
ggagggcaat	gtggatggcc	acaccttcag catccgcggc aagggtacg gcgatgccag 120
cgtgggcaag	gtggatgccc	agttcatctg caccaccggc gatgtgcccg tgccctggag 180
cacctgggtg	accaccctga	cctacggcgc ccagtgttc gccaaagtacg gccccgagct 240
gaaggatttc	tacaagagct	gcatgcccga tggctacgtg caggagcgca ccatcacctt 300
cgagggcgat	ggcaatttca	agaccgcgc cgaggtgacc ttcgagaatg gcagcgtgta 360
caatcgctg	aagctgaatg	gccagggctt caagaaggat ggccacgtgc tgggcaagaa 420
tctggagttc	aatttcaccc	cccactgcct gtacatctgg ggcgatcagg ccaatcacgg 480

cctgaagagc gccttcaaga tct	503
<210> 18	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 18	
ttaatacgcac tcactatagg gagagaaaat gtcaaggcga aaatccaag	49
<210> 19	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 19	
ttaatacgcac tcactatagg gagacttctt tgggcgcaaa ttgttg	46
<210> 20	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 20	
ttaatacgcac tcactatagg gagacagatt ttcgtcaaga cattgacg	48
<210> 21	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 21	
ttaatacgcac tcactatagg gagagagatg agtggccgca ggcctttttc	50
<210> 22	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 22	
ttaatacgcac tcactatagg gagaccacca gatcagcaac gtctaatttt tg	52
<210> 23	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 23	

ttaatacgac tcactatagg gagaaccacg tagacgtaac accaaatg	48
<210> 24	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 24	
ttaatacgac tcactatagg gagatcgaac catcattgcg tatttttg	48
<210> 25	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 25	
ttaatacgac tcactatagg gagacttctt tgggcgcaaa ttgttggtg	49
<210> 26	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 26	
ttaatacgac tcactatagg gagacaagag aggcaaaaaa ccaacg	46
<210> 27	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 27	
ttaatacgac tcactatagg gagactggtg gaataccctc tttgtc	46
<210> 28	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 28	
ttaatacgac tcactatagg gagagccgta agtgctatgc tcgtttg	47
<210> 29	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 29	

ttaatacgac tcactatagg gagaccagac atacagcaca aaaatac	47
<210> 30	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 30	
ttaatacgac tcactatagg gagacagcaa cgtctaattt ttgctg	46
<210> 31	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 31	
ttaatacgac tcactatagg gagacatttt gtcgcaattg tacttttg	48
<210> 32	
<211> 705	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的蛋白質編碼區域	
<400> 32	
atgtcatctg gagcacttct ctttcatggg aagattcctt acgttgtgga gatggaaggg	60
aatgttgatg gccacacctt tagcatacgt gggaaaggct acggagatgc ctcagtggga	120
aaggttgatg cacagttcat ctgcacaact ggtgatgttc ctgtgccttg gagcacactt	180
gtcaccactc tcacctatgg agcacagtgc tttgccaagt atggtccaga gttgaaggac	240
ttctacaagt cctgtatgcc agatggctat gtgcaagagc gcacaatcac ctttgaagga	300
gatggcaact tcaagactag ggctgaagtc acctttgaga atgggtctgt ctacaatagg	360
gtcaaactca atggtcaagg cttcaagaaa gatggtcatg tgttgggaaa gaacttggag	420
ttcaacttca ctccccactg cctctacatc tggggtgacc aagccaacca cggctctcaag	480
tcagccttca agatctgtca tgagattact ggcagcaaag gcgacttcat agtggctgac	540
cacacccaga tgaacactcc cattgggtgga ggtccagttc atgttccaga gtatcatcac	600
atgtcttacc atgtgaaact ttccaaagat gtgacagacc acagagacaa catgtccttg	660
aaagaaactg tcagagctgt tgactgtcgc aagacctacc tttga	705
<210> 33	
<211> 218	
<212> DNA	
<213> 玉米根螢葉甲	
<400> 33	
tagctctgat gacagagccc atcgagtttc aagccaaaca gttgcataaa gctatcagcg	60
gattgggaac tgatgaaagt acaatmgmtg aaattttaag tgtmcacaac aacgatgaga	120
ttataagaat ttcccaggcc tatgaaggat tgtaccaacg mtcattggaa tctgatatca	180

aaggagatac ctcaggaaca ttaaaaaaga attattag	218
<210> 34	
<211> 424	
<212> DNA	
<213> 玉米根蝥葉甲	
<220>	
<221> 其他特徵	
<222> (393) .. (393)	
<223> n為a、c、g或t	
<220>	
<221> 其他特徵	
<222> (394) .. (394)	
<223> n為a、c、g或t	
<220>	
<221> 其他特徵	
<222> (395) .. (395)	
<223> n為a、c、g或t	
<400> 34	
ttgttacaag ctggagaact tctcttttgct ggaaccgaag agtcagtatt taatgctgta	60
ttctgtcaaa gaaataaacc acaattgaat ttgatattcg acaaatatga agaaattggt	120
gggcatccca ttgaaaaagc cattgaaaac gagttttcag gaaatgctaa acaagccatg	180
ttacacctta tccagagcgt aagagatcaa gttgcatatt tggttaaccag gctgcatgat	240
tcaatggcag gcgtcggtag tgacgataga actttaatca gaattgttgt ttcgagatct	300
gaaatcgatc tagaggaaat caaacaatgc tatgaagaaa tctacagtaa aaccttgggt	360
gataggatag cggatgacac atctggcgac tannnaaaag ccttatttagc cgttgttggt	420
taag	424
<210> 35	
<211> 397	
<212> DNA	
<213> 玉米根蝥葉甲	
<400> 35	
agatgttggc tgcattctaga gaattacaca agttcttcca tgattgcaag gatgtactga	60
gcagaatagt ggaaaaacag gtatccatgt ctgatgaatt gggaagggac gcaggagctg	120
tcaatgccct tcaacgcaaa caccagaact tctccaaga cctacaaaca ctccaatcga	180
acgtccaaca aatccaagaa gaatcagcta aacttcaagc tagctatgcc ggtgatagag	240
ctaaagaaat caccaacagg gagcaggaag tggtagcagc ctgggcagcc ttgcagatcg	300
cttgcgatca gagacacgga aaattgagcg atactggtga tctattcaaa ttctttaact	360
tggtacgaac gttgatgcag tggatggacg aatggac	397
<210> 36	
<211> 490	
<212> DNA	
<213> 玉米根蝥葉甲	
<400> 36	
gcagatgaac accagcgaga aaccaagaga tgttagtggg gttgaattgt tgatgaacaa	60

ccatcagaca ctcaaggctg agatcgaagc cagagaagac aactttacgg cttgtatttc 120
tttaggaaag gaattgttga gccgtaatca ctatgctagt gctgatatta aggataaatt 180
ggtcgcgttg acgaatcaaa ggaatgctgt actacagagg tgggaagaaa gatgggagaa 240
cttgcaactc atcctcgagg tataccaatt cgccagagat gcggccgtcg ccgaagcatg 300
gttgatcgca caagaacctt acttgatgag ccaagaacta ggacacacca ttgacgacgt 360
tgaaaacttg ataaagaaac acgaagcgtt cgaaaaatcg gcagcggcgc aagaagagag 420
attcagtgct ttggagagac tgacgacgtt cgaattgaga gaaataaaga ggaaacaaga 480
agctgcccag 490

<210> 37
<211> 330
<212> DNA
<213> 玉米根螢葉甲

<400> 37
agtgaatgt tagcaaatat aacatccaag tttcgttaatt gtacttgctc agttagaaaa 60
tattctgtag tttcactatc ttcaaccgaa aatagaataa atgtagaacc tcgcgaactt 120
gcctttcctc caaaatatca agaacctcga caagtttggt tggagagttt agatacgata 180
gacgacaaaa aattgggtat tcttgagctg catcctgatg tttttgctac taatccaaga 240
atagatatta tacatcaaaa tgttagatgg caaagtttat atagatatgt aagctatgct 300
catacaaagt caagatttga agtgagaggt 330

<210> 38
<211> 320
<212> DNA
<213> 玉米根螢葉甲

<400> 38
caaagtcaag atttgaagtg agaggtggag gtcgaaaacc gtggccgcaa aagggattgg 60
gacgtgctcg acatggttca attagaagtc cactttggag aggtggagga gttgttcatg 120
gacaaaaatc tccaaccctt cattttttaca tgattccatt ctacaccctg ttgctggggt 180
tgactagcgc actttcagta aaatttgccc aagatgactt gcacgttggtg gatagtctag 240
atctgccaac tgacgaacaa agttatatag aagagctggt caaaagccgc ttttgggggt 300
ccttcttggt ttatttgtag 320

<210> 39
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的引子寡核苷酸

<400> 39
ttaatacgac tcactatagg gagacaccat gggctccagc ggcgccc 47

<210> 40
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	40	
	agatcttgaa ggcgctcttc agg	23
<210>	41	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	41	
	caccatgggc tccagcggcg ccc	23
<210>	42	
<211>	47	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	42	
	ttaatacgac tcactatagg gagaagatct tgaaggcgct cttcagg	47
<210>	43	
<211>	46	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	43	
	ttaatacgac tcactatagg gagagctcca acagtgggttc cttatc	46
<210>	44	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	44	
	ctaataattc tttttttaatg ttcctgagg	29
<210>	45	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	45	
	gctccaacag tgggttcctta tc	22
<210>	46	
<211>	53	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	46	
ttaatacgac	tcactatagg gagactaata attctttttt aatgttcctg agg	53
<210>	47	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	47	
ttaatacgac	tcactatagg gagattgtta caagctggag aacttctc	48
<210>	48	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	48	
cttaaccaac	aacggctaata aagg	24
<210>	49	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	49	
ttgttacaag	ctggagaact tctc	24
<210>	50	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	50	
ttaatacgac	tcactatagg gagacttaac caacaacggc taataagg	48
<210>	51	
<211>	47	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	51	
ttaatacgac	tcactatagg gagaagatgt tggctgcac tagagaa	47
<210>	52	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	52	
	gtccattcgt ccatccactg ca	22
<210>	53	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	53	
	agatggtggc tgcactctaga gaa	23
<210>	54	
<211>	46	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	54	
	ttaatacgac tcactatagg gagagtccat tcgtccatcc actgca	46
<210>	55	
<211>	46	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	55	
	ttaatacgac tcactatagg gagagcagat gaacaccagc gagaaa	46
<210>	56	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	56	
	ctgggcagct tcttgtttcc tc	22
<210>	57	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	57	
	gcagatgaac accagcgaga aa	22
<210>	58	
<211>	46	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	58	
ttaatacgac	tcactatagg	gagactgggc agcttcttgt ttcttc
		46
<210>	59	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	59	
ttaatacgac	tcactatagg	gagaagtgaa atgttagcaa atataacatc c
		51
<210>	60	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	60	
acctctcact	tcaaattcttg	acttttg
		26
<210>	61	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	61	
agtgaatgt	tagcaaatat	aacatcc
		27
<210>	62	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	62	
ttaatacgac	tcactatagg	gagaacctct cacttcaaat cttgactttg
		50
<210>	63	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	63	
ttaatacgac	tcactatagg	gagacaaagt caagatttga agtgagaggt
		50
<210>	64	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	64	
ctacaaataa aacaagaagg acccc		25
<210>	65	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	65	
caaagtcaag atttgaagtg agaggt		26
<210>	66	
<211>	49	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	66	
ttaatacgac tcactatagg gagactacaa ataaaacaag aaggacccc		49
<210>	67	
<211>	1150	
<212>	DNA	
<213>	玉蜀黍	
<400>	67	
caacggggca gcactgcact gcactgcaac tgcgaatttc cgtcagcttg gagcgggtcca		60
agcgccttgc gaagcaaact acgccgatgg cttcggcggc ggcgtgggag ggtccgacgg		120
ccgcggagct gaagacagcg ggggcggagg tgattcccgg cggcgtgcga gtgaaggggt		180
gggtcatcca gtcccacaaa ggccctatcc tcaacgcgc ctctctgcaa cgctttgaag		240
atgaacttca aacaacacat ttacctgaga tggtttttgg agagagtttc ttgtcacttc		300
aacatacaca aactggcatc aaatttcatt ttaatgcgt tgatgcactc aaggcatgga		360
agaaagaggc actgccacct gttgaggttc ctgctgcagc aaaatggaag ttcagaagta		420
agccttctga ccaggttata cttgactacg actatacatt tacgacacca tattgtggga		480
gtgatgctgt ggttgtgaac tctggcactc cacaacaag tttagatgga tgcggcactt		540
tgtgttgga ggatactaat gatcggattg acattgttgc cctttcagca aaagaaccca		600
ttcttttcta cgacgaggtt atcttgtagt aagatgagtt agctgacaat ggtatctcat		660
ttcttactgt gcgagtgagg gtaatgccaa ctggttgggt tctgcttttg cgtttttggc		720
ttagagttga tgggtgtactg atgaggttga gagacactcg gttacattgc ctgtttggaa		780
acggcgacgg agccaagcca gtggtacttc gtgagtgtcg ctggaggga gcaacatttg		840
ctactttgtc tgcgaaagga tacccttcgg actctgcagc gtacgcggac ccgaacctta		900
ttgcccataa gcttcctatt gtgacgcaga agacccaaaa gctgaaaaat cctacctgac		960
tgacacaaag gcgcctacc gcgtgtacat catgactgtc ctgtcctatc gttgcctttt		1020
gtgtttgcca catgttgtgg atgtacgttt ctatgacgaa acaccatagt ccatttcgcc		1080

tgggccgaac agagatagct gattgtcatg tcacgtttga attagaccat tccttagccc	1140
ttttttcccc	1150
<210> 68 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成的引子寡核苷酸	
<220> <221> 其他特徵 <222> (22) .. (22) <223> n為a、c、g或t	
<400> 68 ttttttttttt tttttttttttt vn	22
<210> 69 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 69 ttgtgatggtt ggtggcgtat	20
<210> 70 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 70 tgttaaataa aaccccaaag atcg	24
<210> 71 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 71 tgagggtaat gccaaactggt t	21
<210> 72 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 72 gcaatgtaac cgagtgtctc tcaa	24

<210>	73		
<211>	32		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的探針寡核苷酸		
<400>	73		
tttttggtt	agagttgatg	gtgtactgat	ga
			32
<210>	74		
<211>	151		
<212>	DNA		
<213>	大腸桿菌		
<400>	74		
gaccgtaagg	cttgatgaaa	caacgcggcg	agctttgatc
	aacgaccttt	tggaaacttc	60
ggcttccccct	ggagagagcg	agattctccg	cgctgtagaa
	gtcaccattg	ttgtgcacga	120
cgacatcatt	ccgtggcggtt	atccagctaa	g
			151
<210>	75		
<211>	69		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的部分編碼區域		
<400>	75		
tgttcggttc	cctctaccaa	gcacagaacc	gtcgttcag
	caacacctca	gtcaagggtga	60
tggatgttg			69
<210>	76		
<211>	4233		
<212>	DNA		
<213>	玉蜀黍		
<400>	76		
agcctggtgt	ttccggagga	gacagacatg	atccctgccg
	ttgctgatcc	gacgacgctg	60
gacggcgggg	gcgcgcgcag	gccgttgctc	ccggagacgg
	accctcgggg	gcgtgctgcc	120
gccggcgccg	agcagaagcg	gccgccggct	acgccgaccg
	ttctcacgcg	cgtcgtctcc	180
gccgtgctcc	tgctcgtcct	cgtggcggtc	acagtcctcg
	cgtcgcagca	cgtcgacggg	240
caggctgggg	gcgttccccg	gggcgaagat	gccgtcgtcg
	tcgaggtggc	cgctccccgt	300
ggcgtggctg	agggcggtgc	ggagaagtcc	acggccccgc
	tcctcggctc	cggcgcgctc	360
caggacttct	cctggaccaa	cgcgatgctg	gcgtggcagc
	gcacggcggtt	ccacttccag	420
ccccccaaga	actggatgaa	cggttagttg	gacctcgcg
	catcggtgac	gacgcgcgga	480
tcgttttttt	cttttttccct	ctcgttctgg	ctctaacttg
	gttccgcggtt	tctgtcacgg	540
acgcctcgtg	cacatggcga	tacctgatcc	gccggccgcg
	tatatctatc	tacctcgacc	600
ggcttctcca	gatccgaacg	gtaagttggt	ggctccgata
	cgatcgatca	catgtgagct	660
cggcatgctg	cttttctgcg	cgtgcatgcg	gctcctagca
	ttccacgtcc	acgggtcgtg	720
acatcaatgc	acgatataat	cgtatcggtg	cagagatatt
	gtcccatcag	ctgctagctt	780
tcgcgtattg	atgtcgtgac	attttgcacg	caggtccgct
	gtatcacaag	ggctgggtacc	840

acctcttcta	ccagtggaac	cgggactccg	cggatatgggg	caacatcacc	tggggccacg	900
ccgtctcgcg	cgacctcttc	cactggctgc	acctaccgct	ggccatggtg	cccgatcacc	960
cgtacgacgc	caacggcgtc	tgggtccgggt	cggcgacgcg	cctgcccgcg	ggccggatcg	1020
tcatgtctta	cacgggctcc	acggcggagt	cgtcggcgca	ggtgcagaac	ctcgcggagc	1080
cggccgacgc	gtccgacccg	ctgctgcggg	agtgggtcaa	gtcggacgcc	aaccgcgtgc	1140
tggtgccgcc	gccgggcatc	gggcccgcg	acttccgcga	cccgcgcgcg	gcgtgtcggg	1200
cgccggccgg	caacgacacg	gcgtggcggg	tgcgccatcg	gtccaaggac	cgggaccacg	1260
cggggctggc	gctgggtgtac	cggacggagg	acttcgtgcg	gtacgacccg	gcgccggcgc	1320
tgatgcacgc	cgtgccgggc	accggcatgt	gggagtgcgt	ggacttctac	ccggtggccg	1380
cgggatcagg	cgcgcggcg	ggcagcgggg	acgggctgga	gacgtccgcg	gcgccgggac	1440
ccggggtgaa	gcacgtgctc	aaggctagcc	tgcgcgcgca	caagcacgac	tactacgcga	1500
tcggcaccta	cgacccggcg	acggacacct	ggacccccga	cagcgcggag	gacgacgtcg	1560
ggatcggcct	ccggtacgac	tatggcaagt	actacgcgtc	gaagaccttc	tacgaccccg	1620
tccttcgccg	gcgggtgctc	tgggggtggg	tcggcgagac	cgacagcgag	cgcgcggaca	1680
tcctcaaggg	ctgggcatcc	gtgcaggtac	gtctcagggt	ttgaggctag	catggcttca	1740
atcttgctgg	catcgaatca	ttaatgggca	gatattataa	cttgataatc	tgggttggtt	1800
gtgtgtggtg	gggatggtga	cacacgcgcg	gtaataatgt	agctaagctg	gttaaggatg	1860
agtaatgggg	ttgcgtataa	acgacagctc	tgctaccatt	acttctgaca	cccgattgaa	1920
ggagacaaca	gtaggggtag	ccggtagggg	tcgtcgactt	gccttttctt	ttttcctttg	1980
ttttgttggtg	gatcgtccaa	cacaaggaaa	ataggatcat	ccaacaaaca	tggaaagtaat	2040
cccgtaaaac	attttctcaag	gaaccatcta	gctagacgag	cgtggcatga	tccatgcatg	2100
cacaaacact	agataggtct	ctgcagctgt	gatgttcctt	tacatatacc	accgtccaaa	2160
ctgaatccgg	tctgaaaatt	gttcaagcag	agaggccccg	atcctcacac	ctgtacacgt	2220
ccctgtacgc	gccgtcgtgg	tctcccgtga	tcctgccccg	tcccctccac	gcggccacgc	2280
ctgctgcagc	gctctgtaca	agcgtgcacc	acgtgagaat	ttccgtctac	tcgagcctag	2340
tagttagacg	ggaaaacgag	aggaagcgca	cgggtccaagc	acaacacttt	gcgcggggcc	2400
gtgacttgct	tccggttggc	tgagggcgcg	cgacagagat	gtatggcgcc	gcggcggtgc	2460
ttgtgtcttg	tcttgccctat	acaccgtagt	cagagactgt	gtcaaagccg	tccaacgaca	2520
atgagctagg	aaacggggtg	gagagctggg	ttcttgccct	gcctcctgtg	atgtctttgc	2580
cttgcatagg	gggcgcagta	tgtagctttg	cgttttactt	cacgccaag	gatactgctg	2640
atcgtgaatt	attattatta	tatatatata	gaatatcgat	ttcgtcgctc	tcgtgggggt	2700
ttatttttcca	gactcaaact	tttcaaaagg	cctgtgtttt	agttcttttc	ttccaattga	2760
gtaggcaagg	cgtgtgagtg	tgaccaacgc	atgcatggat	atcgtggtag	actggtagag	2820
ctgtcgttac	cagcgcgatg	cttgatatatg	tttgcaagtat	tttcaaatga	atgtctcagc	2880
tagcgtacag	ttgaccaagt	cgacgtggag	ggcgcacaac	agacctctga	cattattcac	2940
tttttttttta	ccatgccgtg	cacgtgcagt	caatccccag	gacggtcctc	ctggacacga	3000

agacgggcag caacctgctc cagtggcccg tggtggaggt ggagaacctc cggatgagcg 3060
gcaagagctt cgacggcgctc gcgctggacc gcggatccgt cgtgcccctc gacgtcggca 3120
aggcgacgca ggtgacgccg cacgcagcct gctgcagcga acgaactcgc gcgttgccgg 3180
cccgcggcca gctgacttag tttctctggc tgatcgaccg tgtgcctgcg tgcgtgcagt 3240
tggacatcga ggctgtgttc gaggtggacg cgtcggacgc gccggggcgtc acggaggccg 3300
acgtgacgtt caactgcagc accagcgcag gcgcggcggg cgggggcctg ctcggcccg 3360
tcggccttct cgtgctggcg gacgacgact tgtccgagca gaccgccgtg tacttctacc 3420
tgctcaaggg cacggacggc agcctccaaa ctttcttctg ccaagacgag ctacggtatg 3480
tatgttatga cttatgacca tgcattgcag cgcatttctt agctaggctg tgaagcttct 3540
tgttgagttg tttcacagat gcttaccgtc tgctttgttt cgtatttcga ctaggcatcc 3600
aaggcgaacg atctgggtta gagagtatac gggagcttgg tcctctgtgt agatggggag 3660
aatctctcgg tcagaatact ggtaagtttt tacagcgcca gccatgcatg tgttggccag 3720
ccagctgctg gtactttgga cactcgttct tctcgactg ctcatatttg cttctgatct 3780
ggatgcacta caaattgaag gttgaccact ccatcgtgga gagctttgtc caaggcggga 3840
ggacgtgcat cacgtcgcga gtgtacccca cacgagccat ctacgactcc gcccgcgctc 3900
tcctcttcaa caacgccaca catgctcacg tcaaagcaaa atccgtcaag atctggcagc 3960
tcaactccgc ctacatccgg ccatatccgg caacgacgac ttctctatga ctaaattaag 4020
tgacggacag ataggcgata ttgcatactt gcattcatgaa ctcatattgta caacagtgat 4080
tgtttaattt atttgctgcc ttctctatcc ttcttgatgaa actatatggt acacacatgt 4140
atcattaggt ctagtagtgt tggtgcaaag acacttagac accagagggt ccaggagtat 4200
cagagataag gtataagagg gagcaggag cag 4233

<210> 77
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的引子寡核苷酸

<400> 77
tgttcggttc cctctaccaa 20

<210> 78
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的引子寡核苷酸

<400> 78
caacatccat caccttgact ga 22

<210> 79
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>		
<223>	合成的探針寡核苷酸	
<400>	79	
	cacagaaccg tcgcttcagc aaca	24
<210>	80	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	80	
	tggcggacga cgacttgt	18
<210>	81	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	81	
	aaagtttgga ggctgccgt	19
<210>	82	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的探針寡核苷酸	
<400>	82	
	cgagcagacc gccgtgtact tctacc	26
<210>	83	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	83	
	cttagctgga taacgccac	19
<210>	84	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的引子寡核苷酸	
<400>	84	
	gaccgtaagg cttgatgaa	19
<210>	85	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>			
<223>	合成的探針寡核苷酸		
<400>	85		
cgagattctc	cgcgctgtag a		21
<210>	86		
<211>	25		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的引子寡核苷酸		
<400>	86		
gtatgtttct	gcttctacct ttgat		25
<210>	87		
<211>	29		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的引子寡核苷酸		
<400>	87		
ccatgttttg	gtcatatatt agaaaagtt		29
<210>	88		
<211>	34		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的探針寡核苷酸		
<400>	88		
agtaatatag	tatttcaagt atttttttca aaat		34
<210>	89		
<211>	736		
<212>	DNA		
<213>	英雄美洲蟠(Euschistus heros)		
<400>	89		
gtaagtatag	tgcgttaaga ttaattttat ttggattaag ttcttctttc gtgtttttaa		60
tttatagtaa	atctaataga taaaaaaact ctcgatttca gtaatgttta gttattgctc		120
tgcttgatga	aaccttaatg aagtagttgg atcagtacaa tgcaaattctt cgtgaaaacc		180
ctcacgggta	agaccattac cctagagggt gaaccttcgg atacaatcga aaatgtaaa		240
gctaaaattc	aagacaaaga aggaattcct ccagatcagc agaggcttat ttttgctggc		300
aagcagttag	aagatggtag aaccttatct gattataaca ttcaaaaaga gtctaccctt		360
cacttggttc	ttcgtctgag ggggtggtgc attgagccaa ctctgaagat ccttgcacag		420
aaatacaatt	gcgataaaat gatttgccgc aagtgcctatg ctagacttca tccaagagct		480
accaattgcc	gcaagaagaa atgtggtcat actaacaaca tccgccccaa gaagaagctg		540
aagtagatta	tctgcttatt tttcaacctg gatttaaaaa aaaaaaatt caagacataa		600
aacctgttta	aaataaatTT ttaagaaata tatataaaaa aagtaattgt tttttcttaa		660

ttccttttca aatgctatga tttttgtttt tatgtaatct aatttcaaac tgtacaaaaa 720
atatatctgt accaag 736

<210> 90
<211> 128
<212> PRT
<213> 英雄美洲蟾

<400> 90

Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys
35 40 45

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu
50 55 60

Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Val Ile Glu Pro
65 70 75 80

Thr Leu Lys Ile Leu Ala Gln Lys Tyr Asn Cys Asp Lys Met Ile Cys
85 90 95

Arg Lys Cys Tyr Ala Arg Leu His Pro Arg Ala Thr Asn Cys Arg Lys
100 105 110

Lys Lys Cys Gly His Thr Asn Asn Ile Arg Pro Lys Lys Lys Leu Lys
115 120 125

<210> 91
<211> 410
<212> DNA
<213> 英雄美洲蟾

<400> 91

gcaaattcttc gtgaaaaccc tcacgggtaa gaccattacc ctagagggtg aaccttcgga 60
tacaatcgaa aatgtaaaagg ctaaaattca agacaaagaa ggaattcctc cagatcagca 120
gaggcttatt tttgctggca agcagttaga agatggtaga accttatctg attataacat 180
tcaaaaagag tctacccttc acttggttct tcgtctgagg ggtggtgtca ttgagccaac 240
tctgaagatc cttgcacaga aatacaattg cgataaaatg atttgccgca agtgctatgc 300
tagacttcat ccaagagcta ccaattgccg caagaagaaa tgtggtcata ctaacaacat 360
ccgccccaaag aagaagctga agtagattat ctgcttattt ttcaacctgg 410

<210> 92
<211> 132
<212> DNA
<213> 英雄美洲蟾

<400> 92

tgatttgccg caagtgcctat gctagacttc atccaagagc taccaattgc cgcaagaaga 60

aatgtggtca tactaacaac atccgccccca agaagaagct gaagtagatt atctgcttat	120
ttttcaacct gg	132
<210> 93	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 93	
ttaatacgac tcactatagg gagagcaaat cttcgtgaaa accctcac	48
<210> 94	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 94	
ttaatacgac tcactatagg gagaccaggt tgaaaaataa gcagataatc	50
<210> 95	
<211> 301	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的人工序列	
<400> 95	
catctggagc acttctcttt catggaaga ttcttacgt tgtggagatg gaagggaatg	60
ttgatggcca caccttttagc atacgtggga aaggctacgg agatgcctca gtgggaaagg	120
ttgatgcaca gttcatctgc acaactggtg atgttcctgt gccttgagc acacttgtca	180
ccactctcac ctatggagca cagtgccttg ccaagtatgg tccagagttg aaggacttct	240
acaagtcctg tatgccagat ggctatgtgc aagagcgcac aatcaccttt gaaggagatg	300
g	301
<210> 96	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的引子寡核苷酸	
<400> 96	
ttaatacgac tcactatagg gagagcatct ggagcacttc tctttca	47
<210> 97	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的引子寡核苷酸	

<400>	97		
ttaatac	gac	tcactatag	gagaccatct ccttcaaagg tgattg
			46
<210>	98		
<211>	574		
<212>	RNA		
<213>	玉米根螢葉甲		
<400>	98		
aaguugg	gua	uaaaccac	gu uucaagagag gcaaaaaacc aacggaaaau gcagauauuc
			60
guaaaaa	cuu	uaaccgguaa	gaccaucaca cuugaggucg agccaagcga cacaaucgaa
			120
aauguca	agg	cgaaaaucca	agacaaagag gguaauccac cagaucagca acgucuaauu
			180
uuugcug	gca	aacaauugga	agauggacgu acauuguccg auuacaacau ccaaaaggaa
			240
ucgacac	ucc	auuugguguu	acgucua
			300
uuggcaca	aaa	aguacaauug	cgacaaaau
			360
ccaagag	caa	ccaauugccg	uaagaagaag uguggccaca ccaacaauuu gcgccc
			420
aagaagu	uga	aguagacgau	cguaauuuu
			480
gauucgu	cca	caguuguuau	cauuuugaau aaucgaaaau augugaauca uucauugggu
			540
acagccu	gaa	uaaacuucgu	uuucugaaac cggc
			574
<210>	99		
<211>	652		
<212>	RNA		
<213>	玉米根螢葉甲		
<400>	99		
auuaaa	aua	uc	guuacuuuuu aaauuaccac gcuuuuugua acggaaacgu guucaucaac
			60
ugucacu	uuau	caaa	uaaacu agacuucuu uuucacuugu cuuuuucuu cggaagu
			120
cacguug	ugg	aa	uaaacacu uccacaaugc aaauuuucgu gaaaacucuc acugguaaaa
			180
ccaucac	cccu	cgagguugag	ccauccgaua caaucgaaaa uguuaaagcu aagauccaag
			240
acaaaga	agg	ua	ccccccca gaccagcaac guuugaucuu cgcuggaaaa caacucgaag
			300
auggacg	uac	cuugucagac	uacaacaucc agaaggaauc cacccuucac uuggugcucc
			360
gauugag	agg	gucuc	uac gagccuuccc uucguauuuu agccaugaag uacaacugcg
			420
agaaga	ugau	cugccguaaa	uguuacgcca gguuacaccc aagggccacc aacugcagaa
			480
agaaga	agug	uggacacacc	aacaacuugc gccc
			540
cgaggu	uuuu	uuuacaaug	uuauauucuu acaauuccag auguacuug aacauuuauu
			600
uaacua	uuua	uaggaaauga	caucaauccu aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa
			652
<210>	100		
<211>	4065		
<212>	RNA		
<213>	玉米根螢葉甲		
<400>	100		
cagauuu	ucg	ucaagacauu	gacggggaag accauuaccc uggaggucga gcccagugau
			60
uccaucg	aga	ccgucaaauc	caagauucag g
			120
cgcuuga	uuu	uugcuggcaa	gcaacucgag gaaggccgau cuuugucaga cuauaacauc
			180

caaaaagaga	guaccaucca	ucucgugcuu	cgacugagag	gaggugguau	cgagaucgag	240
ccaacguugg	cgcaauuggc	ucgcaagcac	aaauuugaga	gacucauuug	ucgaaaaugu	300
uacgccagac	uacacaucaa	agcuacuaau	ugccggaaaa	aggccugcgg	ccacucaucu	360
cagcucagac	ccaagaagaa	gccuaagagu	uaauaauuuu	ugaacuuucu	uuuuuccacg	420
aacuagcuua	uguguacucg	cucaguuguu	ucuucucagc	cgccgauucu	ucuggcccga	480
aacccaaguc	guccucuuiug	uacagaaaug	ugucucgccg	cacuaugucg	cuaacuaagc	540
augacucgau	cgucgaccac	uccagugggc	gcucacgugc	uugcuguucg	gcgagguaca	600
gcacgcgguu	gacgcgauuu	uugaauacug	cauugagcau	cgacaccacc	ucgcucgccu	660
ccucccgag	uccgaguuiuc	cugacggacu	ugaugccgag	cggaccaccg	uaaucauiug	720
acgcucgguc	caguaggcgu	ugggugaacg	cccaaccguc	uucucuuga	ggcucuugug	780
gguggugcau	cccacuaccg	uaguggugau	uguuagaugc	ggccguuggc	ggugugucgu	840
ccucagcuuc	aaagagcauc	cucagacuac	ccucagucga	cacaggcugg	uugggugaga	900
gccccaaaa	ugcgcucuca	gagaauggcc	caagcgugaa	gaacgcccaa	uccuccgcgc	960
aacuggacac	aacuggcggc	ccugccgaau	uuacaguuiug	cugagccggc	auucuccgaa	1020
aagcugguuc	cugaucaauc	aaaccaugau	ccucugaauu	guguuccaaa	ugaucagcca	1080
accuuucaua	cauacgccga	gccguaucuc	guauugcuga	augcgacaaa	gcguccgcgg	1140
guuuauagcc	ggcacgugcc	ugccguagca	acgcuaugac	gaaccucgcc	aucgccgucu	1200
ucggcacuai	gauguucuiug	ucguuiagcc	aagcgauucg	ccgacaugaa	ucagaccgcc	1260
ccuucaugaa	cgaauaauc	gguaccacag	ccuucaccgg	agcgcgcagg	uuauuguuca	1320
ucauuuguag	cuccuguaga	gucccaggcc	guccaacgag	caggggccga	gcgggcgagu	1380
ucaucaagcc	gcgauagggg	accagucggg	ggaggccgcg	gagcaguucc	ggcugcauai	1440
uagguggaga	ugagccaacg	ccaucgagac	ucugcgggcc	gccgaauccc	ggcaugucca	1500
ucauuccuug	ggcacugaga	cuuggcgagu	ucaucgaauu	cggcgucugg	ccuuccauca	1560
ugcuguucag	agaucccgga	ggcgccggcu	gacuggugaa	ggucggacuc	ugcccgccag	1620
agcccauguu	uuggccaggc	ggcugcggca	uagcgccucc	agcgugcauc	aucauiugcu	1680
guugcugcau	cauiuguiug	uggagcaugu	acggcggcug	uuguggaggu	ggcaucaugc	1740
guugaggcgc	cggcuggaua	uugccagcgu	gcauaaucgg	cgucaucgag	uucauaccca	1800
ucaucguacu	cugcaucaua	gggugaugca	uuggcgucga	agccaugacu	ugaggguiucg	1860
gcgcgccgua	cauiugaccc	uggggcgggc	gcugggcucc	gggagguggc	ugccagcgcu	1920
guugcuguug	cugagcuugu	ugcuguggug	ucgguacaua	ucuauuaguu	gggggcccucc	1980
auguauuau	caucgucaga	guggccgugc	gauugaguui	ucgagcauaa	aaagugcggc	2040
cucagugauu	gggaauauc	auuucggcag	ucggagucuu	guauggccug	aguaucagag	2100
acguagucca	agagaucuiug	cucgucguc	gaggcagcaa	gggaccguua	aucguaauga	2160
agggcugaug	uuugccauiug	uccgugcgug	aagucaaguc	uaggacugug	ccgugacaag	2220
cuauggccgu	aaacucaauu	uccaguucgu	agcuaacucc	aacucguuca	ugucggaagg	2280
uagccucuag	acuggcaggg	auguagagcg	gaacuaucgc	aaccaggguc	ugcguaacag	2340

ucguggagggc	uucacacaca	gccacggugu	ccgucguuau	aacaucagc	guugaaucua	2400
cauucgucaa	cgcgugguag	cuucugaaa	ccagccaacu	caaaccgguc	guggcguugg	2460
gccgguaccc	gaaauuuugu	cuaugcuugu	uccacugaag	cgccucgagc	ggagacagug	2520
gcggcugaua	agaccucgua	guuuguuuca	aucuaacaca	cacuuccacc	acggccaaag	2580
acgaauuagu	gaauucgguc	uugacauaaa	uuguacuacc	uaggugcccc	ucaagagugu	2640
augacucauc	aacagugguu	ggugggcgauu	uauugcccuc	guacacuuug	gauugcggcg	2700
ucgccaaaca	aacgucugcu	ggccauauau	ugacgacuug	gauaucggac	agaugggaac	2760
cauugaucga	aacucuguag	acggggguag	uuugggggcg	caccugugca	uccgcuucaa	2820
aagaugagac	aaaauugccu	gcaguuccuu	uuugacucuu	agagcugcuc	augcaccuga	2880
ucgagccgac	aaucuuauca	aucucaaau	cauuuccgag	ucuuucgaug	agauucaccu	2940
cauggacagc	gcgcugcuga	auuuucugcc	ucaauaacuu	caagcauucu	ccaggcucuu	3000
cuaagaauuc	guucaaagcu	gcagcagaua	cuccuguugc	cgucauaugc	uucgcuggcc	3060
gaguuuucgu	caaagugcua	ugcauauca	cacaggugua	acugagccau	cugagauaua	3120
agaguccggc	aucaaccuuu	ucuuuggcga	cgagaaaau	auuuugugau	ucuuguucau	3180
ugugugacca	gccagcuau	gggagcgga	ugggcagaga	gccagaagug	aaagcggcuc	3240
cgaaauccca	auuuaaaggc	agguaggug	gggugaaggg	ccgagcuggu	agcgguggau	3300
auauaggcgg	agguuguaga	augauagaag	cgagcugcgu	gaacuucua	aagaugggga	3360
uccauucacu	uaagggguug	aucagaauag	gacacgggcu	aaugguuau	gccaaagcuu	3420
uuugcggcgg	gauuggcggc	ccuggagcgc	cguuuguugg	aguagauau	ucggacucga	3480
uacugucgag	ggugcuggcg	cgagcuggag	ggaggugccu	cacggaugag	ccgccgcucg	3540
cgcuacgauc	auucaaaccu	accgaccac	uauuguugug	ugaaaguaga	guugcuccgc	3600
ccguuggccc	aaugucaca	ggcgcgucau	uucugauagc	uagaacguag	ucauagcuga	3660
aucguccucc	ucgucggau	gacgguggca	agcuaacugg	gauguagagc	uggcauuugu	3720
accuguccac	gucgccugug	accucgagag	uauugcuuag	cgcgaaacac	cgcccugauu	3780
ucuuauuggu	gguggcggag	guggcuuguu	guugaugucc	gggggauggg	agcguaguag	3840
uggaaacgga	uuuuccaaac	ucucugaggg	cucuagugac	uaccucguaa	ccauuuugaa	3900
cuuugucagu	agagaauaac	ggggggggcug	auggacagcg	aucggugucc	aauccguuga	3960
ccagaccaua	cacguauauu	cgauccaccg	cgguagaagug	ggugugacaa	aaacugaugg	4020
acuggccacc	ucuaggcauu	cauuuaaucu	ggcaaguguu	ccgcu		4065

<210> 101
<211> 306
<212> RNA
<213> 玉米根螢葉甲

<400> 101						
gaaaauugca	aggcgaaaau	ccaagacaaa	gaggguaau	caccagauca	gcaacgucua	60
auuuuugcug	gcaaacaauu	ggaagaugga	cguaauugu	ccgauuacaa	cauccaaaag	120
gaaucgacac	uccauuuggu	guuacgucua	cgugguggua	ucaucgaacc	aucauugcgu	180
auuuuuggcac	aaaaguacaa	uugcgacaaa	augauuugcc	guaagugcua	ugcucguuug	240

cauccaagag caaccaauug ccguaagaag aaguguggcc acaccaacaa uuugcgccca	300
aagaag	306
<210> 102	
<211> 361	
<212> RNA	
<213> 玉米根螢葉甲	
<400> 102	
cagauuuucg ucaagacauu gacggggaag accauuaccc uggaggucga gcccagugau	60
uccaucgaga ccgucaaauc caagauucag gauaaggaag ggauuccucc ugaccaacag	120
cgcuugauuu uugcuggcaa gcaacucgag gaaggccgau cuuugucaga cuauaacauc	180
caaaaagaga guaccaucca ucucgugcuu cgacugagag gaggugguau cgagaucgag	240
ccaacguugg cgcaauuggc ucgcaagcac aaauuugaga gacucauuug ucgaaaauug	300
uacgccagac uacacaucaa agcuacuaau ugccggaaaa aggccugcgg ccacucaucu	360
c	361
<210> 103	
<211> 117	
<212> RNA	
<213> 玉米根螢葉甲	
<400> 103	
ccaccagauc agcaacgucu aauiuuugcu ggcaaacaau uggaagaugg acguacauug	60
uccgauuaca acauccaaaa ggaaucgaca cuccauiugg uguuacgucu acguggu	117
<210> 104	
<211> 143	
<212> RNA	
<213> 玉米根螢葉甲	
<400> 104	
ucgaaccauc auugcguaui uuggcacaaa aguacauiug cgacaaaauug auuugccgua	60
agugcuauug ucguuugcau ccaagagcaa ccauiugccg uaagaagaag uguggccaca	120
ccaacauiuu gcgcccuaag aag	143
<210> 105	
<211> 141	
<212> RNA	
<213> 玉米根螢葉甲	
<400> 105	
caagagaggc aaaaaaccaa cggaauaugc agauuiucgu uaaaacuuiua accgguaaga	60
ccaucacacu ugaggucgag ccaagcgaca caaucgaaaa ugucaaggcg aaaauccaag	120
acaaagaggg uauuccacca g	141
<210> 106	
<211> 130	
<212> RNA	
<213> 玉米根螢葉甲	
<400> 106	
gccguaagug cuaugcucgu uugcauccaa gagcaacca uugccguaag aagaagugug	60

gccacaccaa caauuugcgc ccaaagaaga aguugaagua gacgaucgua uuuuugugcu	120
guaugucugg	130
<210> 107	
<211> 165	
<212> RNA	
<213> 玉米根螢葉甲	
<400> 107	
cagcaacguc uaauuuuugc uggcaaacia uuggaagaug gacguacauu guccgauuac	60
aacauccaaa aggaaucgac acuccauuug guguuacguc uacguggugg uaucaucgaa	120
ccaucauugc guauuuuggc acaaaaguac aaugcgaca aaug	165
<210> 108	
<211> 736	
<212> RNA	
<213> 英雄美洲蟥	
<400> 108	
guaaguauag ugcguuaaga uuaauuuuau uuggauuaag uucuucuuuc guguuuaaa	60
uuuauaguaa aucuaauaga uaaaaaacu cucguauuca guaauguuaa guuauugcuc	120
ugcuugauga aaccuuauug aaguaguugg aucaguacia ugcaaaucuu cgugaaaacc	180
cucacgggua agaccuuuac ccuagagguu gaaccuucgg auacaauca aaauguaaag	240
gcuaaaauuc aagacaaaaga aggaauuccu ccagaucagc agaggcuuau uuuugcuggc	300
aagcaguuaa aagaugguag aaccuuauuc gauuaaaca uucaaaaaga gucuacccuu	360
cacuugguuc uucgucugag gggugguguc auugagccaa cucugaagau ccuugcacag	420
aaauacaauu gcguaaaaau gauuugccgc aagugcuau cuagacuua uccaagagcu	480
accaauugcc gcaagaagaa auguggucau acuaacaaca uccgccccaa gaagaagcug	540
aaguagauua ucugcuuau uuucaaccug gauuuaaaaa aaaaaaaau caagacauaa	600
aaccauguua aaauaaaauu uuaagaaaua uauauaaaaa aaguaauugu uuuuucuuua	660
uuccuuuua aaugcuaga uuuuuguuuu uauguaaucu aaauucaaac uguacaaaaa	720
auauaucugu accaag	736
<210> 109	
<211> 410	
<212> RNA	
<213> 英雄美洲蟥	
<400> 109	
gcaaaucuuu gugaaaacc ucacggguaa gaccuuuacc cuagagguug aaccuucgga	60
uacaaucaaa aauguaaagg cuaaaauua agacaaagaa ggaauuccuc cagaucagca	120
gaggcuuau uuuugcuggca agcaguuaa agaugguaga accuuauucug auuauaaca	180
ucaaaaagag ucuacccuuc acuuugguuc ucgucugagg ggugguguca uugagccaac	240
ucugaagau cuugcacaga aaucacuuug cguaaaaug auuugccgca agugcuauuc	300
uagacuucuu ccaagagcu ccaauugccg caagaagaaa uguggucau cuaacaacau	360
ccgccccaa aagaagcuga aguagauuau cugcuuauuu uucaaccugg	410

<210>	110	
<211>	132	
<212>	RNA	
<213>	英雄美洲蟥	
<400>	110	
ugauuugccg	caagugcuau gcuagacuuc auccaagagc uaccaauugc cgcaagaaga	60
aaugugguca	uacuaacaac auccgccccca agaagaagcu gaaguagauu aucugcuuau	120
uuuucaaccu	gg	132
<210>	111	
<211>	153	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的探針寡核苷酸	
<400>	111	
agtcatcacg	ctggagcgca catataggcc ctccatcaga aagtcattgt gtatatctct	60
catagggAAC	gagctgcttg cgtattttccc ttccgtagtc agagtcatca atcagctgca	120
ccgtgtcgta	aagcgggacg ttcgcaagct cgt	153
<210>	112	
<211>	153	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	鏈接子寡核苷酸	
<400>	112	
agtcatcacg	ctggagcgca catataggcc ctccatcaga aagtcattgt gtatatctct	60
catagggAAC	gagctgcttg cgtattttccc ttccgtagtc agagtcatca atcagctgca	120
ccgtgtcgta	aagcgggacg ttcgcaagct cgt	153

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種經單離的核酸，其包含可操縱地鏈接至一異源性啟動子之至少一多核苷酸，其中該多核苷酸係選自於下列所構成的群組：

序列辨識編號：1；序列辨識編號：1之互補物；序列辨識編號：1之至少15個連續核苷酸的片段；序列辨識編號：1之至少15個連續核苷酸的片段之互補物；一葉甲 (*Diabrotica*) 生物體之天然編碼序列，其包含序列辨識編號：9或序列辨識編號：11-15之任一者；一葉甲生物體之天然編碼序列之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：9或序列辨識編號：11-15之任一者；一葉甲生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段，該天然編碼序列包含序列辨識編號：9或序列辨識編號：11-15之任一者；一葉甲生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：9或序列辨識編號：11-15之任一者；

序列辨識編號：3；序列辨識編號：3之互補物；序列辨識編號：3之至少15個連續核苷酸的片段；序列辨識編號：3之至少15個連續核苷酸的片段之互補物；

序列辨識編號：5；序列辨識編號：5之互補物；序列辨識編號：5之至少15個連續核苷酸的片段；序列辨識編號：5之至少15個連續核苷酸的片段之互補物；一葉甲生物體之天然編碼序列，其包含序列辨識編號：10之任一者；一葉甲生物體之天然編碼序列之互補物，該天然編碼

序列包含序列辨識編號：10之任一者；一葉甲生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段，該天然編碼序列包含序列辨識編號：10之任一者；一葉甲生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：10之任一者；

序列辨識編號：89；序列辨識編號：89之互補物；序列辨識編號：89之至少15個連續核苷酸的片段；序列辨識編號：89之至少15個連續核苷酸的片段之互補物；一美洲蟪(*Euschistus*)生物體之天然編碼序列，其包含序列辨識編號：91或序列辨識編號：92；一美洲蟪生物體之天然編碼序列之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：91或序列辨識編號：92；一美洲蟪生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段，該天然編碼序列包含序列辨識編號：91或序列辨識編號：92；一美洲蟪生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：91或序列辨識編號：92。

【第2項】 如請求項1之多核苷酸，其中該多核苷酸係選自於下列所構成的群組：序列辨識編號：1；序列辨識編號：1之互補物；序列辨識編號：3；序列辨識編號：3之互補物；序列辨識編號：5；序列辨識編號：5之互補物；序列辨識編號：1之至少15個連續核苷酸的片段；序列辨識編號：1之至少15個連續核苷酸的片段之互補物；序列辨識編號：3之至少15個連續核苷酸的片段；序列辨識編號：3之至少15個連續核苷酸的片段之互補物；序列

辨識編號：5之至少15個連續核苷酸的片段；序列辨識編號：5之至少15個連續核苷酸的片段之互補物；一葉甲生物體之天然編碼序列，其包含序列辨識編號：9-15之任一者；一葉甲生物體之天然編碼序列之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：9-15之任一者；一葉甲生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段，該天然編碼序列包含序列辨識編號：9-15之任一者；以及一葉甲生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：9-15之任一者。

【第3項】 如請求項1之多核苷酸，其中該多核苷酸係選自於下列所構成的群組：序列辨識編號：1、序列辨識編號：3、序列辨識編號：5、序列辨識編號：9、序列辨識編號：10、序列辨識編號：11、序列辨識編號：12、序列辨識編號：13、序列辨識編號：14、序列辨識編號：15，及前述任一者之互補物。

【第4項】 如請求項3之多核苷酸，其中該生物體係選自於下列所構成的群組：玉米根螢葉甲(*D. v. virgifera* LeConte)；北方玉米根蟲(*D. barberi* Smith and Lawrence)；南方玉米根蟲黃瓜十一星葉甲食根亞種(*D. u. howardi*)；墨西哥玉米根葉甲(*D. v. zea*)；巴西玉米根蟲(*D. balteata* LeConte)；黃瓜十一星葉甲球蟲(*D. u. tenella*)；南美葉甲(*D. speciosa* Germar)；黃瓜十一星葉甲甘薯猿葉甲蟲(*D. u. undecimpunctata* Mannerheim)；英雄美洲蟥(*Euschistus heros* (Fabr.))(新熱帶區褐臭蟲

(Neotropical Brown Stink Bug))；南方綠蟪象(*Nezara viridula* (L.))(南方綠臭蟲(Southern Green Stink Bug))；蓋德擬壁蟪(*Piezodorus guildinii* (Westwood))(紅帶臭蟲(Red-banded Stink Bug))；褐翅蟪(*Halyomorpha halys* (Stål))(褐紋臭蟲(Brown Marmorated Stink Bug))；綠色蟪(*Chinavia hilare* (Say))(綠臭蟲(Green Stink Bug))；褐美洲蟪(*Euschistus servus* (Say))(褐臭蟲(Brown Stink Bug))；*Dichelops melacanthus* (Dallas)；*Dichelops furcatus* (F.)；*Edessa meditabunda* (F.)；肩蟪(*Thyanta perditor* (F.))(新熱帶區紅肩臭蟲(Neotropical Red Shouldered Stink Bug)；*Chinavia marginatum* (Palisot de Beauvois)；植物臭蟲(*Horcias nobilellus* (Berg))(棉花臭蟲(Cotton Bug))；*Taedia stigmosa* (Berg)；秘魯棉紅蟪(*Dysdercus peruvianus* (Guérin-Méneville))；*Neomegalotomus parvus* (Westwood)；喙綠蟪(*Leptoglossus zonatus* (Dallas))；*Niesthrea sidae* (F.)；豆莢草盲蟪(*Lygus hesperus* (Knight))(西部牧草盲蟪(Western Tarnished Plant Bug))；以及美國牧草盲蟪(*Lygus lineolaris*(Palisot de Beauvois))。

【第5項】 一種植物轉形載體，其包含如請求項1之多核苷酸。

【第6項】 一種核糖核酸(RNA)分子，其係從如請求項1之多核苷酸所轉錄。

【第7項】 一種雙股核糖核酸分子，其係產自於如請求項1之多核苷酸的表現。

【第8項】 如請求項7之雙股核糖核酸分子，其中使該多核苷酸序列與鞘翅目或半翅目昆蟲接觸，抑制一內源性核苷酸序列的表現，該內源性核苷酸序列特異性地互補於該多核苷酸。

【第9項】 如請求項8之雙股核糖核酸分子，其中使該核糖核苷酸(ribonucleotide)分子與鞘翅目或半翅目昆蟲接觸，殺死或抑制該昆蟲的生長、生存力(viability)及/或取食(feeding)。

【第10項】 如請求項7之雙股RNA，其包含一第一、一第二及一第三RNA區段，其中該第一RNA區段包含該多核苷酸，其中該第三RNA區段係藉由該第二多核苷酸序列而鏈接至該第一RNA區段，以及其中該第三RNA區段實質上係該第一RNA區段的反向互補物，藉此該第一與該第三RNA區段係在轉錄成一核糖核酸時雜交而形成該雙股RNA。

【第11項】 如請求項6之RNA，其係選自於下列所構成的群組：長度介於約15個與約30個核苷酸之間的一雙股核糖核酸分子及一單股核糖核酸分子。

【第12項】 一種植物轉形載體，其包含如請求項1之多核苷酸，其中該異源性啟動子於植物細胞中係有作用的。

【第13項】 一種細胞，其係以如請求項1之多核苷酸予以轉形。

【第14項】如請求項13之細胞，其中該細胞為一原核細胞。

【第15項】如請求項13之細胞，其中該細胞為一真核細胞。

【第16項】如請求項15之細胞，其中該細胞為一植物細胞。

【第17項】一種植物，其係以如請求項1之多核苷酸予以轉形。

【第18項】一種如請求項17之植物的種子，其中該種子包含該多核苷酸。

【第19項】一種商品產品，其產自於如請求項17之植物，其中該商品產品包含可偵測數量之該多核苷酸。

【第20項】如請求項17之植物，其中該至少一多核苷酸係於該植物中表現為一雙股核糖核酸分子。

【第21項】如請求項16之細胞，其中該細胞為玉米細胞、大豆細胞或是棉花細胞。

【第22項】請求項17之植物，其中該植物為玉米植物、大豆植物或是棉花植物。

【第23項】如請求項17之植物，其中該至少一多核苷酸係於該植物中表現為一核糖核酸分子，且當一鞘翅目或半翅目昆蟲攝入該植物的部分時，該核糖核酸分子抑制一內源性多核苷酸的表現，該內源性多核苷酸係特異性地互補於該至少一多核苷酸。

【第24項】如請求項1之多核苷酸，其進一步包含至

少一個額外的多核苷酸，該額外的多核苷酸編碼一抑制一內源性昆蟲基因的表現之RNA分子。

【第25項】一種植物轉形載體，其包含如請求項24之多核苷酸，其中該額外的多核苷酸係各自可操縱地鏈接至一在植物細胞中有作用的異源性啟動子。

【第26項】一種用於控制一鞘翅目或半翅目害蟲族群的方法，該方法包含提供包含一核糖核酸(RNA)分子的製劑，其一旦與該害蟲接觸，即起作用以抑制該害蟲內的生物功能，其中該RNA與選自於下列所構成的群組之多核苷酸特異性地雜交：序列辨識編號：98-110中任一者；序列辨識編號：98-110中任一者的互補物；序列辨識編號：98-110中任一者之至少15個連續核苷酸的片段；序列辨識編號：98-110中任一者之至少15個連續核苷酸的片段之互補物；下列任一者之轉錄本：序列辨識編號：1、3、5、9-15、89及91-92；下列任一者之轉錄本的互補物：序列辨識編號：1、3、5、9-15、89及91-92；下列任一者之轉錄本之至少15個連續核苷酸的片段：序列辨識編號：1、3、5、9-15、89及91-92；以及下列任一者之轉錄本之至少15個連續核苷酸的片段之互補物：序列辨識編號：1、3、5、9-15、89及91-92。

【第27項】如請求項26之方法，其中該製劑的該RNA與選自於下列所構成的群組之多核苷酸特異性地雜交：序列辨識編號：98-100；序列辨識編號：98-100之互補物；序列辨識編號：98-100之至少15個連續核苷酸的片段；序

列辨識編號：98-100之至少15個連續核苷酸的片段之互補物；下列任一者之轉錄本：序列辨識編號：1、3或5；下列任一者之轉錄本的互補物：序列辨識編號：1、3或5；下列任一者之轉錄本之至少15個連續核苷酸的片段：序列辨識編號：1、3或5；以及下列任一者之轉錄本之至少15個連續核苷酸的片段之互補物：序列辨識編號：1、3或5。

【第28項】如請求項26之方法，其中該製劑為一雙股RNA分子。

【第29項】一種用於控制一鞘翅目害蟲族群的方法，該方法包含：

提供包含一第一及一第二多核苷酸序列的製劑，其一旦與該鞘翅目害蟲接觸，即起作用以抑制該鞘翅目害蟲內的生物功能，其中該第一多核苷酸序列包含一區域，該區域與序列辨識編號：98-107中任一者之大約15個至大約30個連續核苷酸展現出從約90%至約100%的序列同一性，且其中該第一多核苷酸序列與該第二多核苷酸序列係特異性地雜交。

【第30項】一種用於控制一半翅目害蟲族群的方法，該方法包含：

提供包含一第一及一第二多核苷酸序列的製劑，其一旦與該半翅目害蟲接觸，即起作用以抑制該半翅目害蟲內的生物功能，其中該第一多核苷酸序列包含一區域，該區域與序列辨識編號：108-110中任一者之大約15個至大約30個連續核苷酸展現出從約90%至約100%的序列同一

性，且其中該第一多核苷酸序列與該第二多核苷酸序列係特異性地雜交。

【第31項】一種用於控制一鞘翅目害蟲族群的方法，該方法包含：

在鞘翅目害蟲之宿主植物中提供一經轉形的植物細胞，該經轉形的植物細胞包含如請求項2之多核苷酸，其中該多核苷酸被表現以生成一核糖核酸分子，其一旦與屬於該族群之鞘翅目害蟲接觸時，即起作用以抑制在該鞘翅目害蟲內一靶定序列的表現，且致使該鞘翅目害蟲或害蟲族群的生長及/或存活(survival)減少，相對於在相同宿主植物物種但不含該多核苷酸之植物上的相同害蟲物種的生殖。

【第32項】如請求項31之方法，其中該核糖核酸分子為一雙股核糖核酸分子。

【第33項】如請求項31之方法，其中相對於侵擾相同宿主植物物種、但缺乏該經轉形的植物細胞的宿主植物之相同的害蟲物種族群，該鞘翅目害蟲族群係降低的。

【第34項】如請求項32之方法，其中相對於侵擾相同宿主植物物種、但缺乏該經轉形植物細胞的鞘翅目害蟲族群，該鞘翅目害蟲族群係降低的。

【第35項】一種控制一植物中鞘翅目害蟲侵擾的方法，該方法包含在鞘翅目害蟲的飲食中提供一核糖核酸(RNA)，該核糖核酸與選自於下列所構成的群組之多核苷酸特異性地雜交：

序列辨識編號：98-107；

序列辨識編號：98-107中任一者的互補物；

序列辨識編號：98-107中任一者之至少15個連續核苷酸的片段；

序列辨識編號：98-107中任一者之至少15個連續核苷酸的片段之互補物；

序列辨識編號：1、序列辨識編號：3，或序列辨識編號：5之轉錄本；

序列辨識編號：1、序列辨識編號：3，或序列辨識編號：5之轉錄本的互補物；

序列辨識編號：1、序列辨識編號：3，或序列辨識編號：5的轉錄本之至少15個連續核苷酸的片段；以及

序列辨識編號：1、序列辨識編號：3，或序列辨識編號：5的轉錄本之至少15個連續核苷酸的片段之互補物。

【第36項】如請求項35之方法，其中該飲食包含一植物細胞，該植物細胞係經轉形以表現該多核苷酸。

【第37項】如請求項35之方法，其中該特異性地雜交的RNA被包含在一雙股RNA分子內。

【第38項】一種控制一植物中半翅目害蟲侵擾的方法，該方法包含使半翅目害蟲與一核糖核酸(RNA)接觸，該核糖核酸與選自於下列所構成的群組之多核苷酸特異性地雜交：

序列辨識編號：108-110；

序列辨識編號：108-110中任一者的互補物；

序列辨識編號：108-110中任一者的至少15個連續核苷酸的片段；

序列辨識編號：108-110中任一者的至少15個連續核苷酸的片段之互補物；

序列辨識編號：89之轉錄本；

序列辨識編號：89之轉錄本的互補物；

序列辨識編號：89的轉錄本之至少15個連續核苷酸的片段；以及

序列辨識編號：89的轉錄本之至少15個連續核苷酸的片段之互補物。

【第39項】如請求項38之方法，其中使該半翅目害蟲與該RNA接觸包含用含有該RNA之組成物來噴灑該植物。

【第40項】如請求項38之方法，其中該特異性地雜交的RNA被包含在一雙股RNA分子內。

【第41項】一種用於改良一作物產量的方法，該方法包含：

將請求項1之核酸引入至一作物植物內，以產生一基因轉殖作物植物；以及

培養該作物植物以允許該至少一多核苷酸的表現；其中該至少一多核苷酸的表現抑制昆蟲害蟲的生殖或生長以及因昆蟲害蟲感染的產量損失，

其中該作物植物為玉米、大豆或是棉花。

【第42項】如請求項41之方法，其中該至少一多核苷酸的表現生產一RNA分子，該RNA分子在已經接觸該作物

植物的一部份之昆蟲害蟲中，箝制至少一第一靶定基因。

【第43項】如請求項41之方法，其中該多核苷酸係選自於下列所構成的群組：序列辨識編號：1、序列辨識編號：3、序列辨識編號：5、序列辨識編號：9、序列辨識編號：10、序列辨識編號：11、序列辨識編號：12、序列辨識編號：13、序列辨識編號：14、序列辨識編號：15，及前述任一者之互補物。

【第44項】如請求項43之方法，其中該至少一多核苷酸的表現生產一RNA分子，該RNA分子在已經接觸該玉米植物的一部份之鞘翅目昆蟲害蟲中，箝制至少一第一靶定基因。

【第45項】一種用於生產一基因轉殖植物細胞的方法，該方法包含：

以一載體轉形一植物細胞，該載體包含請求項1之核酸；

在足以允許一包含數個經轉形的植物細胞之植物細胞培養物發展的條件下，培養該經轉形的植物細胞；

選擇已經將該至少一多核苷酸整合至其等基因組內之經轉形的植物細胞；

篩選表現由該至少一多核苷酸所編碼之核糖核酸(RNA)分子的該經轉形的植物細胞；以及

選擇表現該RNA之植物細胞。

【第46項】如請求項45之方法，其中該載體包含選自於下列所構成的群組之多核苷酸：序列辨識編號：1；序

列辨識編號：1之互補物；序列辨識編號：3；序列辨識編號：3之互補物；序列辨識編號：5；序列辨識編號：5之互補物；序列辨識編號：1、序列辨識編號：3或序列辨識編號：5之至少15個連續核苷酸的片段；序列辨識編號：1、序列辨識編號：3或序列辨識編號：5之至少15個連續核苷酸的片段之互補物；一葉甲生物體之天然編碼序列，其包含序列辨識編號：9-15之任一者；一葉甲生物體之天然編碼序列之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：9-15之任一者；一葉甲生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段，該天然編碼序列包含序列辨識編號：9-15之任一者；以及一葉甲生物體之天然編碼序列之至少15個連續核苷酸的片段之互補物，該天然編碼序列包含序列辨識編號：9-15之任一者。

【第47項】如請求項45之方法，其中該RNA分子為一雙股RNA分子。

【第48項】一種用於生產防護免受鞘翅目害蟲之基因轉殖植物的方法，該方法包含：

提供由如請求項46之方法所生產的基因轉殖植物細胞；以及

從該基因轉殖植物細胞再生基因轉殖植物，其中由該至少一多核苷酸所編碼之核糖核酸分子之表現，係足以調控接觸該經轉形植物的鞘翅目害蟲中一靶定基因的表現。

【第49項】一種用於生產一基因轉殖植物細胞的方法，該方法包含：

以一載體轉形一植物細胞，該載體包含一用於提供鞘翅目害蟲防護性給植物的構件；

在足以允許一包含數個經轉形的植物細胞之植物細胞培養物發展的條件下，培養該經轉形的植物細胞；

選擇已經將用於提供鞘翅目害蟲防護性給植物的該構件整合至其等基因組內的經轉形的植物細胞；

篩選該經轉形的植物細胞，其表現用於抑制鞘翅目害蟲中的一必要基因表現之構件；以及

選擇一植物細胞，其表現用於抑制鞘翅目害蟲中的必要基因表現之該構件。

【第50項】一種用於生產防護免受鞘翅目害蟲之基因轉殖植物的方法，該方法包含：

提供由如請求項49之方法所生產的基因轉殖植物細胞；以及

從該基因轉殖植物細胞再生基因轉殖植物，其中用於抑制鞘翅目害蟲中的一必要基因表現之該構件的表現，係足以調控接觸該經轉形植物的鞘翅目害蟲中之一靶定基因的表現。

【第51項】一種用於生產一基因轉殖植物細胞的方法，該方法包含：

以一載體轉形一植物細胞，該載體包含一用於提供半鞘翅目害蟲防護性給植物的構件；

在足以允許一包含數個經轉形的植物細胞之植物細胞培養物發展的條件下，培養該經轉形的植物細胞；

選擇已經將用於提供半翅目害蟲防護性給植物的該構件整合至其等基因組內之經轉形的植物細胞；

篩選該經轉形的植物細胞，其表現用於抑制半翅目害蟲中的一必要基因表現之構件；以及

選擇一植物細胞，其表現用於抑制半翅目害蟲中的必要基因表現之該構件。

【第52項】一種用於生產防護免受半翅目害蟲之基因轉殖植物的方法，該方法包含：

提供由如請求項51之方法所生產的基因轉殖植物細胞；以及

從該基因轉殖植物細胞再生基因轉殖植物，其中用於抑制半翅目害蟲中的一必要基因表現之該構件的表現，係足以調控接觸該經轉形植物的半翅目害蟲中之一靶定基因的表現。

【第53項】如請求項1之核酸，其進一步包含編碼源自蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*)、產鹼桿菌屬物種(*Alcaligenes* spp.)或假單胞菌屬物種(*Pseudomonas* spp.)的多肽之多核苷酸。

【第54項】如請求項53之核酸，其中該多核苷酸編碼源自蘇力菌(*B. thuringiensis*)的多肽，該多肽係選自於包含下列的群組：Cry1B、Cry1I、Cry2A、Cry3、Cry7A、Cry8、Cry9D、Cry14、Cry18、Cry22、Cry23、Cry34、Cry35、Cry36、Cry37、Cry43、Cry55、Cyt1A以及Cyt2C。

【第55項】如請求項16之細胞，其中該細胞包含編碼

源自蘇力菌、產鹼桿菌屬物種或假單胞菌屬物種的多肽之多核苷酸。

【第56項】如請求項55之細胞，其中該多核苷酸編碼源自蘇力菌的多肽，該多肽係選自於包含下列的群組：Cry1B、Cry1I、Cry2A、Cry3、Cry7A、Cry8、Cry9D、Cry14、Cry18、Cry22、Cry23、Cry34、Cry35、Cry36、Cry37、Cry43、Cry55、Cyt1A以及Cyt2C。

【第57項】如請求項17之植物，其中該植物包含編碼源自蘇力菌、產鹼桿菌屬物種或假單胞菌屬物種的多肽之多核苷酸。

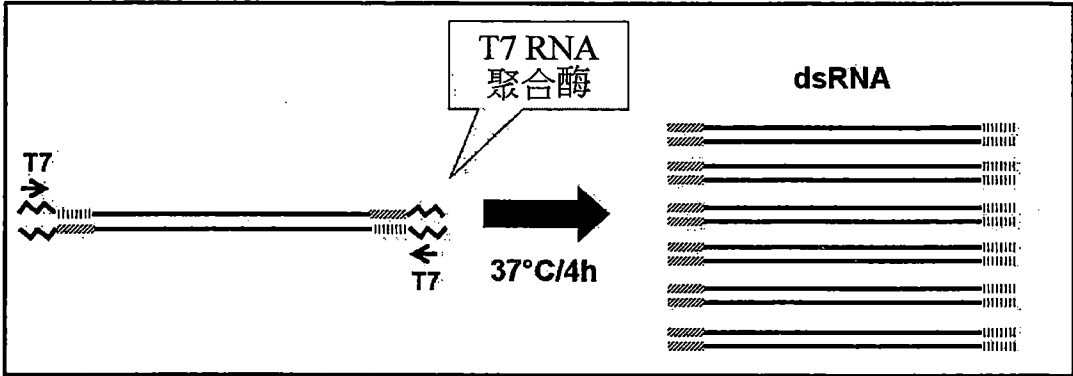
【第58項】如請求項57之植物，其中該多核苷酸編碼源自蘇力菌的多肽，該多肽係選自於包含下列的群組：Cry1B、Cry1I、Cry2A、Cry3、Cry7A、Cry8、Cry9D、Cry14、Cry18、Cry22、Cry23、Cry34、Cry35、Cry36、Cry37、Cry43、Cry55、Cyt1A以及Cyt2C。

【第59項】如請求項45之方法，其中該經轉形的植物細胞包含編碼源自蘇力菌、產鹼桿菌屬物種或假單胞菌屬物種的多肽之多核苷酸。

【第60項】如請求項59之方法，其中該多核苷酸編碼源自蘇力菌的多肽，該多肽係選自於包含下列的群組：Cry1B、Cry1I、Cry2A、Cry3、Cry7A、Cry8、Cry9D、Cry14、Cry18、Cry22、Cry23、Cry34、Cry35、Cry36、Cry37、Cry43、Cry55、Cyt1A以及Cyt2C。

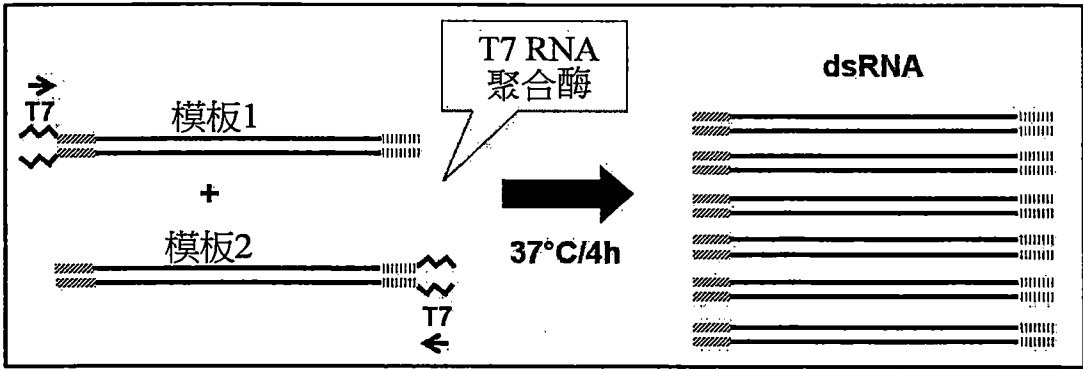
【發明圖式】

用單一對引子從單一轉錄模板產生dsRNA



【圖 1】

從二個轉錄模板產生dsRNA



【圖 2】