



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-152898- -00010-0000

Fecha: 2014-04-01 16:17:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 247

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6



No. 14-069637- -00000-0000

Fecha: 2014-04-01 16:17:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 247

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

**SOLICITUD DIVISIONAL DE
PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL**

21. EXPEDIENTE No. 12.152.898

54. TITULO: METODOS Y COMPOSICIONES HERBICIDAS PARA LA
TRANSFERENCIA DIRECTA DE POLINUCLEOTIDOS AL
INTERIOR DE UNA PLANTA

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL:

71. SOLICITANTE: MONSANTO TECHNOLOGY LLC

DOMICILIO: 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis,
Missouri 63167, ESTADOS UNIDOS DE
AMERICA

74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA, D.C.,

4 ABR. 2014



No. 12-152898- -00010-0000

Fecha: 2014-04-01 16:17:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 247



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-069637- -00000-0000

Fecha: 2014-04-01 16:17:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 247

DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSION, DIVISION Y FUSION DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

- ☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión
- ☒ Patente de Invención
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad
- ☐ Registro de Diseño Industrial
- ☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

MONSANTO TECHNOLOGY LLC

Nombre o Denominación / Nombre social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	800 North Lindbergh Boulevard	St. Louis, Missouri 63167
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del representante o apoderado

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

Apellidos y Nombre

39.779.654 de Bogotá

Documento de Identificación

70.819 de C.S.J.

T.P. No.

Dirección del representante			Ciudad
Calle 94 A No. 7 A - 09			Bogotá
Dirección electrónica		No. Fax	Número telefónico
info@castellanosyco.co		7 550158	7 560770

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo general _____

4. Datos del trámite

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente _____	Expediente <u>12 152898</u>	Expediente _____
De: _____	No. de Divisional <u>UNO (1)</u>	De: _____
A: _____		A: _____

5. Comprobante de Pago No. 14-0034831 , 14-0034833 Fecha Marzo 31 de 2014

6. Anexos

☒ Comprobante de pago de la tasa

☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación

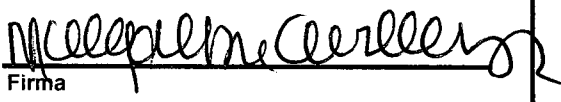
☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división

☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud

☐

7. Firma

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
Nombre y Apellidos


Firma

39.779.654 de Bogotá
C.C.

70.819 C.S.J.
T.P.

P3359- SOLICITUD DIVISIONAL DE LA P2584

1 ABR. 2014

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0034831

Bogotá D.C., Marzo 31 de 2014 - 15:36:33

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO

NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	563807506	31/03/2014	4.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01	SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	464.000.00	464.000.00
				\$464.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SESENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-152898- -00010-0000

Fecha: 2014-04-01 16:17:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 247

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-069637- -00000-0000

Fecha: 2014-04-01 16:17:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 247

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Marzo 31 de 2014 - 15:36:35

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0034833

Bogotá D.C., Marzo 31 de 2014 - 15:36:33

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO

NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	563807506	31/03/2014	4.760.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
31	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	961.000.00
				<u>\$961.000.00</u>

SON: **NOVECIENTOS SESENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-152898- -00010-0000

Fecha: 2014-04-01 16:17:44 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 247

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6



No. 14-069637- -00000-0000

Fecha: 2014-04-01 16:17:45 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 247

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Marzo 31 de 2014 - 15:36:35

COLOMBIA

6067-FAPEX

PODEREl (los) **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**Domiciliados en **800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU**

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94 A No. 7 A-09, Bogotá-Colombia para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso - administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

- Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fábrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
- Para la obtención de registros sanitarios;
- Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy **19 de Diciembre de 2005**en **St. Louis, Missouri, USA**por **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)

(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

POWER OF ATTORNEYI (we) the undersigned **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**Of **800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, EEUU**

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and/or MARGARITA CASTELLANOS A.** attorneys residing at Calle 94 A No. 7 A-09, Bogotá-Colombia, to obtain the protection of my (our) Industrial Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

- Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
- For the obtainment of Sanitary registrations;
- Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact, in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this **19th December, 2005**in **St. Louis, Missouri**

by


Dennis R. Hoerner
(Notary shall execute on the next page)

(Consular legalization or apostille is required)

CERTIFICADO NOTARIAL (Sociedad)**NOTARIAL CERTIFICATION (Corporation)**

COLUMBIA

Hoy 19^{te} Dic. del año 2005
compareció (eron) personalmente
DENNIS R. HOERNER

a quienes conozco como la(s) personas que firma(n) en
representación de la Sociedad (Compañía) denominada
MONSANTO TECHNOLOGY LLC

Certifico:

a) Que MONSANTO TECHNOLOGY LLC

es una sociedad/Compañía legalmente constituida y
existente de acuerdo con las leyes de

b) Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
St. Louis, Missouri

c) Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el
presente poder están comprendidos dentro del objeto
social de la mencionada Sociedad /Compañía.

d) Que el Sr. DENNIS R. HOERNER
esta autorizado para otorgar el presente poder. Lo anterior
esta probado por medio de los siguientes documentos, que
certifico he visto*

(Ciudad) St. Louis

(Estado) Missouri

Hoy 19 del Diciembre de 2005

(Notario Público)

*Los documentos debe identificarse con fecha y origen.

On this 19 day of Dec. of 2005
personally appeared

Dennis R. Hoerner

whom I know to be the person(s) who signed this document as
representative(s) of the Corporation /Company named
Monsanto Technology LLC

I certify:

a) That

Monsanto Technology LLC

is a corporation (Company legally constituted and in
existence in accordance with the laws of

b) That the domicile of said Corporation/Company is
St. Louis, Missouri

c) That the purpose or purposes for which the present
Power of Attorney is granted are comprised within the
object set forth in the charter of the mentioned
Corporation/Company.

d) That Mr. Dennis R. Hoerner
is (are) authorized to grant the present Power of Attorney. The
aforementioned was duly proven through the following
documents and I duly certify having seen them*:

(City) St. Louis

(State) Missouri

this 19 day of Dec of the year 2005

(Notary Public)

Michelle Ludwig

*Documents must be identified with date and origin



MICHELLE LUDWIG
My Commission Expires
July 13, 2009
St. Louis County
Commission #05550747

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document
2. has been signed by MICHELLE LUDWIG
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC
4. bears the seal/stamp of MICHELLE LUDWIG-NOTARY PUBLIC-STATE OF MISSOURI

Certified

5. at Jefferson City, Missouri
6. the 21ST day of DECEMBER, 2005
7. by Robin Carnahan, Secretary of State, State of Missouri
8. No. 142500
9. Seal/Stamp
10. Signature:

Robin Carnahan

-----TRADUCCION OFICIAL No. 06-02-04-----

de un documento escrito en INGLES, el cual para su identificación lleva el sello de la Traductora e Intérprete Oficial, Res. 2755/68 y 01144/97 de Minjusticia, al igual que la presente.-----

(Adjunto a un documento de Poder otorgado por MONSANTO TECHNOLOGY LLC)

Sello Notarial:

MICHELLE LUDWIG

Mi comisión vence Julio 13, 2009

Condado de St. Louis – Comisión #05550747

APOSTILLA

(Convención de La Haya de octubre 5, 1961)

1. País: Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por Michelle Ludwig

3. actuando en su carácter de Notario Público

4. Lleva el sello de Michelle Ludwig – Notario Público – Estado de Missouri

CERTIFICADO

5. En Jefferson City, Missouri

6. El día 21 de Diciembre de 2005

DORA DUQUE DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RES. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA
REP. DE COLOMBIA

7. por Robin Carnahan, Secretario de Estado, Estado de Missouri

8. No. 142500

9. Sello (en dorado)

10. Firma:

(fdo) Robin Carnahan

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, a la cual me remito,

Bogotá, D. C., Febrero 9, 2006.



DORA DUQUE DE BERNAL
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RES. 02755/68 Y 01144/97 - MINJUSTICIA
REP. DE COLOMBIA

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 FEB 13 A 11: 55

Jefe de LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

613662
Dora Duque
COTA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

1

MOLÉCULAS POLINUCLEOTÍDICAS PARA REGULACIÓN GENÉTICA EN PLANTAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS E INCORPORACIÓN DE LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de las solicitudes de patentes provisionales de los Estados Unidos 61/311,762, presentada el 8 de marzo de 2010, 61/349,807, presentada el 28 de mayo de 2010 y 61/381,556, presentada el 10 de septiembre de 2010, las cuales se incorporan a modo de referencia en su totalidad a la presente. El listado de secuencias que figura en el archivo denominado "38-
10 21_56855_D.txt", el cual tiene 133 kilobytes (medidos en el sistema operativo MS-Windows) y se creó el 7 de marzo de 2011, se presenta con la presente y se incorpora a la misma a modo de referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

- 15 En la presente se divulgan moléculas polinucleotídicas para regular genes en plantas y métodos para preparar y utilizar dichas moléculas.

ANTECEDENTES

- La ineficacia de los herbicidas para controlar las malezas resistentes es un problema
20 especialmente cuando dichas malezas crecen en campos de cultivos resistentes a herbicidas que pueden tener una resistencia a herbicidas más baja que la maleza. Las malezas resistentes a los herbicidas se identifican por una variedad de modos de acción. La resistencia que resulta de la selección de múltiples copias de genes que producen proteínas dirigidas al herbicida en amaranto se describe en Gaines et al. (2010) Proc.
25 Natl. Acad. Sci. USA, 107(3):1029-1034. La resistencia que resulta de mutaciones en genes que producen proteínas dirigidas a herbicidas en amor de hortelano, lechuga espinaca y ryegrás se describe en Baerson et al. (2002) Plant Physiol., 129(3):1265-1275; Preston et al. (2006) Pesticide Biochem. Physiol., 84(3):227-235; y Wakelin et al. (2006) Weed Res. (Oxford), 46(5):432-440. El secuestro vacuolar del glifosato es un mecanismo
30 que se observa en la hierba de caballo resistente al glifosato; ver Ge et al. (2010) Pest Management Sci., 66:576-576. La resistencia resultante de la expresión de enzimas que metabolizan herbicidas en una forma química inactiva en garranchuelos se describe en Hidayat et al. (1997) Pesticide Biochem. Physiol., 57(2):137-146. Reddy et al. (2008) J. Agric. Food Chem., 56(6):2125-2130 describieron la acumulación de ácido
35 aminometilfosfónico en especies vegetales tratadas con glifosato.

24

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona moléculas polinucleotídicas y métodos para regular genes en plantas, por ejemplo, proporcionando ARN para la regulación sistémica de genes. Varios aspectos de la invención proporcionan moléculas polinucleotídicas y métodos para regular genes y transgenes endógenos en una célula vegetal y moléculas polinucleotídicas. Los polinucleótidos, composiciones y métodos divulgados en la presente son útiles para regular genes endógenos de una plaga o patógeno vegetal. En un aspecto de la invención, las moléculas polinucleotídicas se proporcionan en composiciones que pueden permear o ser absorbidas en el tejido vegetal vivo para iniciar el silenciamiento génico sistémico de genes o transgenes endógenos o de su ARN transcrito. En algunos aspectos de la invención, las moléculas polinucleotídicas en última instancia proporcionan a una planta o permiten la producción en células de una planta, de ARN que es capaz de hibridar en condiciones fisiológicas en una célula vegetal con ARN transcrito a partir de un gen endógeno objetivo o transgén objetivo en la célula vegetal, produciendo así la regulación del gen objetivo, por ejemplo, el silenciamiento o supresión del gen objetivo. En otros aspectos de la invención, las moléculas polinucleotídicas divulgadas en la presente también son útiles para proporcionar en última instancia a una planta o permitir la producción en células de una planta, de ARN que es capaz de hibridar en condiciones fisiológicas con ARN transcrito a partir de un gen objetivo en una célula de una plaga invertebrada o de un patógeno viral de la planta, produciendo así la regulación del gen objetivo, por ejemplo, el silenciamiento o supresión del gen objetivo. En algunos aspectos, el silenciamiento o supresión del gen objetivo conduce a la sobreexpresión de otro gen que es afectado o regulado por la expresión del gen objetivo.

Se cree que las composiciones y métodos de esta invención operan a través de una o más de las diversas vías celulares naturales implicadas en la supresión génica mediada por ARN, tal como se describe generalmente en reseñas de Brodersen y Voinnet (2006), Trends Genetics, 22:268-280; Tomari y Zamore (2005) Genes & Dev., 19:517-529; Vaucheret (2006) Genes Dev., 20:759-771; Meins et al. (2005) Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 21:297-318; y Jones-Rhoades et al. (2006) Annu. Rev. Plant Biol., 57:19-53. La supresión mediada por ARN generalmente implica un intermediario de ARN bicatenario (ARNbc) que se forma intramolecularmente dentro de una única molécula de ARN o intermolecularmente entre dos moléculas de ARN. Este intermediario de ARNbc más largo se procesa mediante una ribonucleasa de la familia RNasa III (ribonucleasa Dicer o similar a Dicer) en uno o más ARN bicatenarios más cortos, incorporándose una cadena de estos al complejo de silenciamiento inducido por ARN ("RISC"). Por ejemplo, la vía

ARNip implica la escisión de un intermediario de ARN bicatenario más largo en ARN interferentes pequeños ("ARNip"). Se cree que el tamaño de los ARNip varía de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 pares de bases, pero los tipos más comunes de ARNip en plantas incluyen los que contienen 21 pares de bases o 24 pares de bases.

- 5 Ver, Hamilton et al. (2002) EMBO J., 21:4671-4679. Tal como se usa en la presente, "oligonucleótido" significa una molécula polinucleotídica que tiene una longitud de 18-25 nucleótidos, similar al tamaño de moléculas de ARN pequeñas procesadas en mecanismos de silenciamiento génico. Varias realizaciones de esta invención incluyen composiciones que incluyen oligonucleótidos o polinucleótidos o una mezcla de ambos.
- 10 Los aspectos de la invención incluyen composiciones y métodos para: proporcionar moléculas de ARN monocatenarias en una célula vegetal para regulación sistémica de genes; tratamiento herbicida con composiciones que incluyen tensioactivo y un agente letal vegetal que proporciona ARN monocatenario para la supresión de un gen endógeno en una célula vegetal; revestimiento tópico sobre una superficie vegetal que incluye un
- 15 tensioactivo (por ejemplo, un tensioactivo de organosilicona) y una molécula de oligonucleótido o polinucleótido para supresión de un gen endógeno en una célula vegetal; composición de aplicación tópica para inducir el silenciamiento sistémico de un gen objetivo en una planta que incluye (a) un agente para acondicionar una planta para la permeación de polinucleótidos y (b) moléculas polinucleotídicas; y tratamiento herbicida
- 20 con composiciones que incluyen (a) un agente para acondicionar una planta para la permeación de polinucleótidos y (b) moléculas polinucleotídicas. Opcionalmente estas composiciones pueden incluir un herbicida no nucleotídico.
- En otros aspectos, la invención proporciona métodos para: controlar plantas espontáneas resistentes a herbicidas; investigar la genética inversa modulando un gen endógeno en
- 25 una planta mediante la aplicación sobre tejido de una planta en crecimiento de una composición para proporcionar moléculas de ARN monocatenario en una célula vegetal para regulación sistémica de genes; inducir el silenciamiento sistémico de un gen objetivo que incluye aplicación tópica de polinucleótidos en una planta; inducir el silenciamiento sistémico de un gen objetivo en una planta mediante (a) acondicionamiento
- 30 de una planta para la permeación de polinucleótidos y (b) aplicación tópica de polinucleótidos en la planta; investigar la genética inversa modulando un gen endógeno en una planta mediante la aplicación tópica en una planta viva de una composición de aplicación tópica que incluye moléculas polinucleotídicas y un agente para acondicionar una planta para la permeación de dichas moléculas polinucleotídicas.

En otros aspectos, la invención proporciona una planta con ADN o ARN exógeno para suprimir un gen endógeno, donde el ADN exógeno no está integrado en un cromosoma de la planta, el ARN exógeno no se transcribe a partir de ADN integrado en un cromosoma de la planta y el gen endógeno se suprime mediante aplicación tópica de un polinucleótido en una planta. Estos y otros aspectos de la invención se describen en más detalle en las siguientes secciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 presenta la SEQ ID NO:1, una secuencia de nucleótidos que codifica EPSPS de palmera amaranto.

10) La Figura 2 presenta la SEQ ID NO:3 que es una secuencia de nucleótidos de un gen Pol III sintetizado.

11) La Figura 3 ilustra la morbilidad de las plantas de palmera amaranto tratadas con un ARNbc. La Figura 3A muestra a las plantas 7 días después del tratamiento con glifosato. La Figura 3B muestra plantas tratadas con tensioactivo que se trataron con la solución de ARNbc largo y posteriormente con tratamiento con glifosato después de 72 horas. La Figura 3C muestra plantas tratadas con tensioactivo que se trataron con la solución de ARNbc corto y posteriormente con tratamiento con glifosato después de 72 horas.

12) La Figura 4 ilustra el blanqueado en plantas *Nicotiana benthamiana* tratadas con una composición de ARNbc.

13) La Figura 5 presenta la SEQ ID NO:2 que es una secuencia de nucleótidos de una fitoeno desaturasa de *Nicotiana benthamiana*.

14) La Figura 6 ilustra oligonucleótidos de ADNmc antisentido marcado con Alexa Fluor 488 en 5' (SEQ ID NO:15) permeado las hojas de palmera amaranto resistente a glifosato tal como se describe en el Ejemplo 9.

15) La Figura 7 muestra los resultados de ARNm de EPSPS medidos en hojas de palmera amaranto resistente a glifosato tratadas con oligonucleótidos de ADNmc antisentido para EPSPS tal como se describe en el Ejemplo 9. Las barras representan experimentos repetidos para cada uno de los tratamientos No. 1 - No. 4 (indicados por los números dentro de los círculos y en referencia a la Tabla 2) y para testigos (hojas permeadas con oligonucleótidos de ADNmc antisentido para una proteína de semilla de cebada, SEQ ID NO:14, tratadas con y sin glifosato).

16) La Figura 8 muestra los resultados de la proteína EPSPS medidos en hojas de palmera amaranto resistente a glifosato tratadas tópicamente con oligonucleótidos de

ADNmc antisentido para EPSPS, tal como se describe en el Ejemplo 9; los tratamientos se indican mediante los números dentro de los círculos y en referencia a la Tabla 2.

17) La Figura 9 muestra los resultados de la acumulación de shiquimato medida en hojas de palmera amaranto resistente a glifosato tratadas con oligonucleótidos de ADNmc antisentido para EPSPS en dos experimentos, tal como se describe en el Ejemplo 9; los
5 tratamientos se indican mediante los números dentro de los círculos y en referencia a la Tabla 2.

18) La Figura 10 muestra la secuencia de nucleótidos de una fitoeno desaturasa de *Nicotiana benthamiana* (SEQ ID NO:2).

10 19) La Figura 11 representa esquemáticamente la ubicación de las secuencias de los oligonucleótidos y polinucleótidos sometidos a ensayo (ver Tabla 3) en relación con la secuencia de fitoeno sintasa (SEQ ID NO:16) tal como se describe en el Ejemplo 10.

20) La Figura 12A ilustra el blanqueado apical de hoja en plantas *Nicotiana benthamiana* tratadas tópicamente con solución amortiguadora ("Testigo"), un polinucleótido de ARNbc
15 de 200 mer con una secuencia de ARN que corresponde al segmento que consiste en los nucleótidos 914 – 1113 de la SEQ ID NO:2 ("200 nt dsRNA"), y una combinación de oligonucleótidos y polinucleótidos de ADN monocatenario (SEQ ID NOs:16, 17, 20, 21, 24, 25 y 26) ("ssDNA oligos") tal como se describe en el Ejemplo 10. La Figura 12B ilustra los resultados de un análisis de transferencia northern de ARN aislado a partir de plantas
20 *Nicotiana benthamiana* tratadas con solución amortiguadora (testigo), el polinucleótido de ARNbc de 200 mer y los oligonucleótidos de ADNmc. También se muestra el ARN aislado a partir de plantas que fueron estresadas manteniéndolas a 4 grados Celsius y en la oscuridad durante toda la noche antes del tratamiento con los polinucleótidos de ARNbc de 200 mer.

25 21) La Figura 13 ilustra el blanqueado apical de hojas en plantas *Nicotiana benthamiana* tratadas tópicamente por duplicado con varias combinaciones de polinucleótidos u oligonucleótidos (los números se refieren a los tratamiento enumerados en la Tabla 4) tal como se describe en el Ejemplo 10. Las plantas testigo (Tratamiento 13 en la Tabla 4) no se muestran.

30 22) La Figura 14 ilustra el blanqueado aplica en hojas de plantas *Nicotiana benthamiana* tratadas tópicamente con los polinucleótidos indicados en la Tabla 5 tal como se describe en el Ejemplo 10.

23) La Figura 15 ilustra el blanqueado apical de hojas observado en plantas *Nicotiana benthamiana* después del tratamiento tópico con el ADNmc antisentido de 21 mer de PDS
35 (SEQ ID NO:34, "21nt PDS antisentido") o con oligonucleótidos de 22 mer antisentido de

- PDS sometidos a ensayo previamente sin un promotor T7 (SEQ ID NOs:22 y 23) ("PDS antisentido"). No se observó o se observó un blanqueado apical poco visible en hojas después del tratamiento tópico solo con la solución amortiguadora o después del tratamiento tópico con ADNmc sentido de 21 mer de PDS (SEQ ID NO:36, "21nt PDS sentido") tal como se describe en el Ejemplo 10.
- 24) La Figura 16 ilustra una alineación de las secuencias de ADN PDS de palmera amaranto y *Nicotiana benthamiana* que muestra aproximadamente 71% de identidad (1252/1762) tal como se describe en el Ejemplo 11.
- 25) La Figura 17 ilustra el blanqueado apical de hojas observado en plantas de palmera amaranto tratadas tópicamente con ARNbc PDS de Palmer de 678 bp o 198 bp pero no en plantas de palmera amaranto tratadas tópicamente con un ARNbc de gen del gusano de la raíz de maíz de 260 pares de bases, tal como se describe en el Ejemplo 11.
- 26) La Figura 18A ilustra el blanqueado apical en hojas, tallos y flores de plantas *Nicotiana benthamiana* tratadas tópicamente primero con una solución de tensioactivo y luego con un oligonucleótido PDS de ADNmc para inducir el silenciamiento sistémico de la fitoeno desaturasa, tal como se describe en el Ejemplo 12. La Figura 18B ilustra el blanqueado apical en hojas, tallos y flores de plantas *Nicotiana benthamiana* tratadas tópicamente con un oligonucleótido PDS de ADNmc para inducir el silenciamiento sistémico de la fitoeno desaturasa, con o sin acondicionamiento con una solución de tensioactivo, tal como se describe en el Ejemplo 12.
- 27) La Figura 19 ilustra los resultados de los ensayos con diferentes líneas de palmera amaranto resistentes a glifosato (3 plantas por repetición) tratadas con las condiciones indicadas en la Tabla 6, tal como se describe en el Ejemplo 13. Las fotografías fueron sacadas a los 7 días después del tratamiento con glifosato (experimentos 1 – 6) o a los 9 días después del tratamiento con glifosato (experimentos 7 – 9).
- 28) La Figura 20 ilustra la ubicación de dos ARN pequeños identificados como abundantes en las plantas de palmera amaranto tratadas con ARNbc de EPSPS y que se muestran como nucleótidos en cursiva subrayados en las posiciones 564-588 y 743 – 767 del EPSPS de longitud completa (SEQ ID NO:40), tal como se describe en el Ejemplo 14.
- La secuencia de EPSPS también muestra la ubicación de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "cortas" de tamaño de oligonucleótido (texto subrayado, sin cursiva) y los tres polinucleótidos de ARN bicatenario "largos" (texto en negrita, tal como se describe en el Ejemplo 1).
- 29) La Figura 21A ilustra los resultados del tratamiento de las plantas de palmera amaranto con tensioactivo y posteriormente ARNbc en una de tres cantidades de

aplicación y posteriormente con herbicida, tal como se describe en el Ejemplo 17. La Figura 21B ilustra los resultados del ensayo 1 llevado a cabo con semillas recogidas de palmera amaranto resistente a glifosato cultivadas en el campo, tal como se describe en el Ejemplo 17; las plantas se muestran a los 8 días y 30 días después del tratamiento con herbicida.

30) La Figura 22 ilustra los resultados obtenidos con el tratamiento de palmera amaranto con tensioactivo de amina de sebo y sulfato de amonio o con reactivos de transfección, tal como se describe en el Ejemplo 18.

31) La Figura 23 ilustra los resultados de tratar plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato con ARNbc de EPSPS o híbridos de ADN/ARN de EPSPS, tal como se describe en el Ejemplo 19.

32) La Figura 24 ilustra los resultados de tratar plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato con ARNbc de EPSPS o polinucleótidos de ADNmc de EPSPS, tal como se describe en el Ejemplo 20. La fotografía superior se tomó a los 8 días después de la pulverización del herbicida y la gráfica inferior (barras) presenta los resultados como la puntuación de lesión por glifosato (GI) 8 días después de la pulverización del herbicida.

33) La Figura 25A ilustra doce polinucleótidos de ARNbc correspondientes a segmentos de ADN de aproximadamente 250 bp, cubriendo cada uno de forma traslapada la secuencia sentido completa y parte de las regiones en 5' y en 3' sin traducir del gen EPSPS de Palmer, tal como se describe en el Ejemplo 21; las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "cortas" de tamaño de oligonucleótido tales como se describen en el Ejemplo 1 y la Figura 1 están ubicadas en los segmentos de traslape 2, 3, 4 y 8 respectivamente y se muestran como barras gris claro dentro de dichos segmentos. La Figura 25B y la Figura 25C ilustran los resultados del tratamiento de plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato con ARNbc diseñado a partir de estos segmentos de traslape o las cuatro moléculas de ARNbc "cortas" o solución amortiguadora.

34) La Figura 26 ilustra los resultados del tratamiento de plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato con glifosato y posteriormente con pulverización de Silwet L-77 al 1% y posterior aplicación de ARNbc de EPSPS en solución amortiguadora que contenía 2% de sulfato de amonio, tal como se describe en el Ejemplo 22. Las plantas testigo sin tratamiento ("ST") se trataron solamente con pulverización de Silwet L-77 al 1% pero no con herbicida ni ARNbc. Las plantas se fotografiaron y puntuaron a las plantas a los 16 días después del tratamiento.

35) La Figura 27 ilustra los resultados del tratamiento de una población de campo de palmera amaranto resistente a glifosato con gran cantidad de copias con una composición

que contenía una cantidad de 20X o 100X de polinucleótidos de ARNbc de EPSPS, tensioactivo, sulfato de amonio y herbicida o con una composición que contenía tensioactivo, sulfato de amonio y herbicida, tal como se describe en el Ejemplo 23. Para cada tratamiento, se trataron dos parcelas duplicadas de 1 pie por 5 pies.

- 5 36) La Figura 28 representa la evolución del blanqueado y muerte de las plantas de lechuga tratadas con 1 nanomol de ADNmc por planta (de arriba hacia abajo) 37, 46 y 60 días después del tratamiento, tal como se describe en el Ejemplo 24.
- 37) La Figura 29A ilustra el silenciamiento sistémico en plantas de lechuga evidenciado por el blanqueado observado a los 4 o 12 días después del tratamiento tópico con
10 polinucleótidos, tal como se describe en el Ejemplo 24. La Figura 29B muestra el silenciamiento sistémico evidenciado por el blanqueado observado a los 4 días después del tratamiento tópico con los cuatro ADNmc antisentido individuales ("HL287", SEQ ID NO:43; "HL288", SEQ ID NO:44; "HL289", SEQ ID NO:45; y "HL290", SEQ ID NO:46) o con una mezcla de los cuatro.
- 15 38) La Figura 30 ilustra el blanqueado de hojas (panel superior derecho) y flores (panel al medio derecho) de plantas de tomate tratadas con polinucleótidos de fitoeno desaturasa de tomate, tal como se describe en el Ejemplo 25. La Figura 30 también ilustra el enanismo de las plantas de tomate tratadas con polinucleótidos de PDS (panel inferior).
- 39) La Figura 31 ilustra la mejora de la actividad herbicida del glifosato en palmera
20 amaranto con poca cantidad de copias de los polinucleótidos de EPSPS mediante polinucleótidos de TIF y que los polinucleótidos de TIF tienen actividad herbicida propia, tal como se describe en el Ejemplo 26. Los polinucleótidos de EPSPS "1, 3, 4" se refieren a ARNbc "cortos" que tienen una cadena antisentido que es capaz de hibridar con el ARNm transcrito a partir del gen EPSPS de palmera amaranto (SEQ ID NO:1) en las
25 posiciones 14-38 (ARNbc-1 corto), 345-369 (ARNbc-3 corto) y 1105-1129 (ARNbc-4 corto), respectivamente tal como se indica mediante los nucleótidos subrayados en la Figura 1 (ver Ejemplo 1). EPSPS "5" se refiere a IDT [5] (SEQ ID NOS:91-92, tal como se describe en la Tabla 11).
- 40) La Figura 32 ilustra la mejora de la actividad herbicida del glifosato en palmera
30 amaranto con gran cantidad de copias de los polinucleótidos de EPSPS mediante polinucleótidos de TIF y que los polinucleótidos de TIF tienen actividad herbicida propia, tal como se describe en el Ejemplo 26. Los polinucleótidos de EPSPS "1, 3, 4" se refieren a ARNbc "cortos" que tienen una cadena antisentido que es capaz de hibridar con el ARNm transcrito a partir del gen EPSPS de palmera amaranto (SEQ ID NO:1) en las
35 posiciones 14-38 (ARNbc-1 corto), 345-369 (ARNbc-3 corto) y 1105-1129 (ARNbc-4

corto), respectivamente tal como se indica mediante los nucleótidos subrayados en la Figura 1 (ver Ejemplo 1). EPSPS "5" se refiere a IDT [5] (SEQ ID NOS:91-92, tal como se describe en la Tabla 11).

41) La Figura 33 ilustra el efecto herbicida sobre palmera amaranto después del tratamiento con las combinaciones indicadas de herbicidas no polinucleotídicos y polinucleótidos, tal como se describe en el Ejemplo 28.

42) La Figura 34 ilustra una alineación del promotor del locus 1 de PDS en *Nicotiana benthamiana* (SEQ ID NO:319) y el promotor del locus 2 de PDS (SEQ ID NO:320), tal como se describe en el Ejemplo 30.

43) La Figura 35 ilustra esquemáticamente los promotores de locus 1 y locus 2 de PDS en *Nicotiana benthamiana* y las regiones a las que se dirigen las mezclas de polinucleótidos, tal como se describe en el Ejemplo 30.

44) La Figura 36 ilustra el efecto en la altura de la planta en plantas *Nicotiana benthamiana* tratadas con un polinucleótido antisentido de PDS (Figura 36A), polinucleótidos antisentido de EPSPS (Figura 36B) o polinucleótidos antisentido de RuBisCO (Figura 36C), tal como se describe en el Ejemplo 33.

45) La Figura 37 ilustra el efecto en plantas monocotiledóneas *Zea mays* (Gaspe) mediante tratamiento tópico con polinucleótidos de ARNbc ("EPSPS DNA oligo") dirigidos al gen EPSPS endógeno o con solución amortiguadora solo como testigo, tal como se describe en el Ejemplo 34.

46) La Figura 38 ilustra el efecto de la variación de los contraiones de glifosato en la actividad herbicida en plantas de palmera amaranto resistentes al glifosato, tal como se describe en el Ejemplo 35.

47) La Figura 39 ilustra el efecto de poliaminas espermina ("SPM") y espermidina ("SPMD") o sulfato de amonio ("AMS") en palmera amaranto resistente a glifosato que contiene 33, 36 o 57 copias de EPSPS, tal como se describe en el Ejemplo 35. "fb 4X WM" significa "con posterior tratamiento con glifosato (3360 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX®)".

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

48) A menos que se indique lo contrario, las secuencias de ácido nucleico en el texto de esta memoria descriptiva se proporcionan, cuando se leen de izquierda a derecha, en el sentido 5' a 3'. Las secuencias de ácido nucleico pueden proporcionarse como ADN o como ARN, según se especifique; la divulgación de una necesariamente define a la otra, tal como sabe un experto en la técnica. Cuando un término se proporciona en singular,

~~10~~

los inventores también contemplan aspectos de la invención descritos por el plural de dicho término. Polinucleótidos "no transcribibles" significa que los polinucleótidos no comprenden una unidad de transcripción de polimerasa II completa. Tal como se usa en la presente, "solución" se refiere a mezclas homogéneas y mezclas no homogéneas tales como suspensiones, coloides, micelas y emulsiones.

Polinucleótidos

49) Tal como se usa en la presente, "polinucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que contiene múltiples nucleótidos y generalmente se refiere a "oligonucleótidos" (una molécula polinucleotídica de 18-25 nucleótidos de longitud) y polinucleótidos de 26 o más nucleótidos. Las realizaciones de esta invención incluyen composiciones que incluyen oligonucleótidos que tienen una longitud de 18-25 nucleótidos (por ejemplo, 18 mers, 19 mers, 20 mers, 21 mers, 22 mers, 23 mers, 24 mers o 25 mers) o polinucleótidos de longitud media que tienen 26 o más nucleótidos (por ejemplo, polinucleótidos de 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100, aproximadamente 110, aproximadamente 120, aproximadamente 130, aproximadamente 140, aproximadamente 150, aproximadamente 160, aproximadamente 170, aproximadamente 180, aproximadamente 190, aproximadamente 200, aproximadamente 210, aproximadamente 220, aproximadamente 230, aproximadamente 240, aproximadamente 250, aproximadamente 260, aproximadamente 270, aproximadamente 280, aproximadamente 290 o aproximadamente 300 nucleótidos) o polinucleótidos largos que tienen una longitud mayor que aproximadamente 300 nucleótidos (por ejemplo, polinucleótidos de entre aproximadamente 300 a aproximadamente 400 nucleótidos, entre aproximadamente 400 a aproximadamente 500 nucleótidos, entre aproximadamente 500 a aproximadamente 600 nucleótidos, entre aproximadamente 600 a aproximadamente 700 nucleótidos, entre aproximadamente 700 a aproximadamente 800 nucleótidos, entre aproximadamente 800 a aproximadamente 900 nucleótidos, entre aproximadamente 900 a aproximadamente 1000 nucleótidos, entre aproximadamente 300 a aproximadamente 500 nucleótidos, entre aproximadamente 300 a aproximadamente 600 nucleótidos, entre aproximadamente 300 a aproximadamente 700 nucleótidos, entre aproximadamente 300 a aproximadamente 800 nucleótidos, entre aproximadamente 300 a aproximadamente 900 nucleótidos o aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, o incluso mayores que aproximadamente

11

1000 nucleótidos de longitud, por ejemplo hasta la longitud completa de un gen objetivo incluidas las porciones sentido o antisentido o las porciones sentidos y antisentidos del gen objetivo). Cuando un polinucleótido es bicatenario, su longitud puede describirse de forma similar en términos de pares de bases.

- 5 50) Las composiciones de polinucleótidos utilizadas en las diversas realizaciones de esta invención incluyen composiciones que incluyen oligonucleótidos o polinucleótidos o una mezcla de ambos, incluidos híbridos de ARN o ADN o ARN/ADN u oligonucleótidos o polinucleótidos modificados químicamente o una mezcla de estos. En algunas realizaciones, el polinucleótido puede ser una combinación de ribonucleótidos y
- 10 desoxirribonucleótidos, por ejemplo, polinucleótidos sintéticos que consisten principalmente en ribonucleótidos pero con uno o más desoxirribonucleótidos terminales o polinucleótidos sintéticos que consisten principalmente en desoxirribonucleótidos pero con uno o más desoxirribonucleótidos terminales. En algunas realizaciones, el polinucleótido incluye nucleótidos no canónicos tales como inosina, tiouridina o
- 15 pseudouridina. En algunas realizaciones, el polinucleótido incluye nucleótidos modificados químicamente. Los ejemplos de oligonucleótidos o polinucleótidos modificados químicamente se conocen en la técnica; ver, por ejemplo, Verma and Eckstein (1998) Annu. Rev. Biochem., 67:99–134. Por ejemplo, el esqueleto de enlaces fosfodiéster de origen natural de un oligonucleótido o polinucleótido puede modificarse parcialmente o
- 20 totalmente con modificaciones de ligamientos internucleótido de fosforotioato, fosforoditioato o metilfosfonato, pueden utilizarse bases de nucleósido modificadas o azúcares modificados en la síntesis de oligonucleótidos o polinucleótidos y pueden marcarse oligonucleótidos o polinucleótidos con un resto fluorescente (por ejemplo, fluoresceína o rodamina) u otro marcador (por ejemplo, biotina).
- 25
- 51) Los polinucleótidos pueden ser ARN mono o bicatenario o ADN mono o bicatenario o híbridos de ADN/ARN bicatenarios o análogos modificados de los mismos y pueden tener una longitud de oligonucleótido o ser más largos. En realizaciones más específicas de la invención, los polinucleótidos que proporcionan ARN monocatenario en la células vegetal
- 30 se seleccionan del grupo que consiste en (a) un molécula de ARN monocatenaria, (b) una molécula de ARN monocatenaria que se autohíbrida para formar una molécula de ARN bicatenaria, (c) una molécula de ARN bicatenaria, (d) una molécula de ADN monocatenaria, (e) una molécula de ADN monocatenaria que se autohíbrida para formar una molécula de ADN bicatenaria y (f) una molécula de ADN monocatenaria que incluye
- 35 un gen Pol III modificado que se transcribe en una molécula de ARN, (g) una molécula de

- ADN bicatenaria, (h) una molécula de ADN bicatenaria que incluye un gen Pol III modificado que se transcribe en una molécula de ARN, (i) una molécula de ARN/ADN bicatenaria hibridada o combinaciones de estas. En algunas realizaciones estos polinucleótidos incluyen nucleótidos modificados químicamente o nucleótidos no canónicos. En realizaciones del método, los polinucleótidos incluyen ADN bicatenario formado mediante hibridación intramolecular, ADN bicatenario formado mediante hibridación intermolecular, ARN bicatenario formado mediante hibridación intramolecular o ARN bicatenario formado mediante hibridación intermolecular. En una realización, los polinucleótidos incluyen ADN monocatenario o ARN monocatenario que se autohibrida para formar una estructura de horquilla que tiene una estructura al menos parcialmente bicatenaria que incluye al menos un segmento que hibridará en condiciones fisiológicas en la células con ARN transcrito a partir del gen objetivo de la supresión. Sin ánimo de ceñirse a ningún mecanismo, se cree que dichos polinucleótidos son o producirán ARN monocatenario con al menos un segmento que hibridará en condiciones fisiológicas en una célula con ARN transcrito a partir del gen objetivo de la supresión. En ciertas realizaciones distintas, los polinucleótidos además incluyen un promotor, generalmente un promotor funcional en una planta, por ejemplo, un promotor de pol II, un promotor de pol III, un promotor de pol IV o un promotor de pol V.
- 52) En algunas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos se formulan con contraiones u otras moléculas conocidas por asociarse con moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, iones de tetraalquil amonio, iones de trialquil amonio, iones de sulfonio, iones de litio y poliaminas tales como espermina, espermidina o putrescina. En algunas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos se formulan con un herbicida no polinucleotídico (por ejemplo, los herbicidas químicos divulgados en la presente en la sección titulada "Proteínas de tolerancia a herbicidas") o con un agente de transferencia o agente que potencia la permeabilidad (ver la sección titulada "Agentes y Tratamientos para potenciar la permeabilidad").
- 53) Los polinucleótidos se diseñan para inducir la regulación o supresión sistémica de un gen endógeno en una planta y se diseñan para tener una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a la secuencia (que puede ser una secuencia sentido o una secuencia antisentido) de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir de una gen endógeno de una planta. "Esencialmente idéntica" o "esencialmente complementaria" significa que los polinucleótidos (o al menos una cadena de un polinucleótido bicatenario) están diseñados para hibridar en condiciones

13

fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir la regulación o supresión del gen endógeno.

54) **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Las realizaciones de polinucleótidos monocatenarios funcionales en esta invención tienen una complementariedad secuencial que no es necesariamente del 100% pero es al menos suficiente para permitir la hibridación con ARN transcrito a partir del gen objetivo para formar un dúplex en condiciones fisiológicas en una célula vegetal para permitir la escisión mediante un mecanismo de silenciamiento génico. Por consiguiente, en realizaciones el segmento está diseñado para ser esencialmente idéntico o esencialmente complementario a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen objetivo o en el ARN mensajero transcrito a partir de dicho gen objetivo. "Esencialmente idéntica" significa que tiene 100% de identidad secuencial o al menos aproximadamente 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad secuencial cuando se compara con la secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen objetivo o el ARN transcrito a partir del gen objetivo; "esencialmente complementario" significa que tiene 100% de complementariedad secuencial o al menos aproximadamente 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de complementariedad secuencial cuando se compara con la secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen objetivo o el ARN transcrito a partir del gen objetivo. En algunas realizaciones de esta invención, las moléculas polinucleotídicas se diseñan para tener 100% de identidad o complementariedad secuencial con una alelo de un gen objetivo dado (por ejemplo, una secuencia sentido o antisentido de un gen para una proteína de tolerancia a herbicidas, una proteína de desactivación de herbicida, un gen de respuesta a estrés o un gen esencial); en otras realizaciones las de polinucleótido se diseñan para tener 100% de identidad o complementariedad secuencial con múltiples alelos de un gen objetivo dado.

55) En un aspecto de la invención los polinucleótidos son genes de ARN polimerasa III modificados, por ejemplo, genes que transcriben ARN de partícula de reconocimiento de señal 7SL o ARN spliceosomal U6 (genes Pol III) o polinucleótidos que contienen una secuencia promotora de Pol III funcional. En una realización, los polinucleótidos son genes Pol III modificados que contienen ADN sentido y antisentido correspondiente a ARN del gen objetivo identificado para regulación reemplazando a la secuencia de ADN transcrita originalmente por el gen Pol III.

56) Los polinucleótidos útiles en esta invención típicamente producen la regulación o modulación (por ejemplo, supresión) de la expresión génica durante un período durante la vida de la planta tratada de al menos 1 semana o más extenso y típicamente de forma

14

sistémica. Por ejemplo, tras días de tratar a una hoja de planta con una composición de polinucleótidos de esta invención, se pueden detectar ARNip primarios y transitivos en otras hojas laterales y por encima de la hoja tratada y en tejido apical.

- 57) Los métodos para hacer polinucleótidos se conocen en la técnica. La preparación comercial de oligonucleótidos a menudo proporciona 2 desoxirribonucleótidos en el extremo 3' de la cadena sentido. Las moléculas polinucleotídicas largas pueden sintetizarse a partir de kits disponibles en el mercado, por ejemplo, los kits de Ambion tienen ADN ligado en el extremo 5' que codifica un promotor de polimerasa T7 bacteriano que hace cadenas de ARN que pueden ensamblarse en un ARNbc. Alternativamente, se pueden producir moléculas de ADNbc a partir de casetes de expresión en células bacterianas que tienen actividad enzimática de RNasa III regulada o deficiente. Las moléculas polinucleotídicas largas también pueden ensamblarse a partir de múltiples fragmentos de ARN o ADN. En algunas realizaciones, los parámetros de diseño tales como la puntuación Reynolds y las reglas Tuschl se conocen en la técnica y se utilizan para seleccionar secuencias de polinucleótidos eficaces para el silenciamiento génico. En algunas realizaciones, se utiliza el diseño aleatorio o la selección empírica de secuencias de polinucleótidos para seleccionar las secuencias de polinucleótidos eficaces para el silenciamiento génico. En algunas realizaciones la secuencia de un polinucleótido se somete a detección contra el ADN genómico de la planta prevista para minimizar el silenciamiento no intencional de otros genes.
- 58) Las composiciones de polinucleótidos de esta invención son útiles en composiciones, tales como soluciones de moléculas polinucleotídicas, a concentraciones bajas, solas o en combinación con otros componentes (por ejemplo, tensioactivos, sales y herbicidas no polinucleotídicos) en la misma solución o en soluciones aplicadas por separado. Aunque no existe un límite superior en las concentraciones y dosificaciones de moléculas polinucleotídicas que pueden ser útiles en los métodos de esta invención, en general se buscará la eficacia de las concentraciones y dosificaciones eficaces más bajas. Las concentraciones pueden ajustarse teniendo en cuenta el volumen de pulverización aplicado sobre las hojas de las plantas. En una realización, un tratamiento útil para plantas herbáceas que utilizan moléculas de oligonucleótidos de 25 mer es aproximadamente 1 nanomol de moléculas de oligonucleótido por planta, por ejemplo, de aproximadamente 0,05 a 1 nanomol por planta. Otras realizaciones para plantas herbáceas incluyen rangos útiles de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 100 nanomoles o aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 nanomoles o aproximadamente 1 nanomol a aproximadamente 10 nanomoles de polinucleótidos por

15

planta. Las plantas, árboles o viñas muy grandes pueden requerir, en consecuencia, cantidades mayores de polinucleótidos. Cuando se utilizan moléculas de ARNbc largas que pueden procesarse en múltiples oligonucleótidos, se pueden usar concentraciones más bajas. En los ejemplos más adelante para ilustrar realizaciones de la invención, el factor 1X cuando se aplica a moléculas de oligonucleótido se usa arbitrariamente para denotar un tratamiento de 0,8 nanomoles de molécula polinucleotídica por planta; 10X, 8 nanomoles de molécula polinucleotídica por planta; y 100X, 80 nanomoles de molécula de polinucleótido por planta. Por ejemplo, en el ejemplo 23, las plantas se trataron con una solución acuosa que comprende un tratamiento de 100X de ARNbc de EPSPS (264 microgramos u 80 nanomoles) por planta.

Moléculas de ARN monocatenarias

59) Esta invención proporciona moléculas polinucleotídicas para proporcionar ARN monocatenario para regulación sistémica de genes en una célula vegetal. Más específicamente, la invención también proporciona composiciones y métodos para inducir la regulación sistémica (por ejemplo, supresión o silenciamiento sistémico) de un gen objetivo en una planta mediante aplicación tópica en la planta de una molécula polinucleotídica con un segmento en una secuencia de nucleótidos esencialmente idéntica o esencialmente complementaria con una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen objetivo o el ARN transcrito a partir del gen objetivo, por el cual la composición permea al interior de la planta e induce la regulación sistémica del gen objetivo mediante la acción del ARN monocatenario que hibrida con el ARN transcrito, por ejemplo, ARN mensajero. La molécula polinucleotídica puede ser una o más moléculas polinucleotídicas con uno solo de dicho segmento, múltiples de dicho segmento, múltiples de dichos segmentos diferentes o combinaciones de estos.

Agentes de transferencia, agentes y tratamiento para potenciar la permeabilidad

60) Las composiciones y métodos de esta invención pueden comprender agentes de transferencia o agentes y tratamiento para potenciar la permeabilidad para acondicionar la superficie del tejido vegetal, por ejemplo, hojas, tallos, raíces, flores o frutas, para la permeación mediante las moléculas polinucleotídicas en las células vegetales. La transferencia de polinucleótidos en células vegetales puede facilitarse mediante la aplicación previa o simultánea de un agente de transferencia de polinucleótido en el tejido vegetal. En algunas realizaciones el agente de transferencia se aplica posteriormente a la aplicación de la composición de polinucleótido. El agente de transferencia de

polinucleótido posibilita una vía para los polinucleótidos a través de las barreras de cera de la cutícula, estomas y/o membrana celular o barreras membranosas y hacia dentro de las células vegetales. Los agentes adecuados para facilitar la transferencia de la composición a una célula vegetal incluyen agentes que aumentan la permeabilidad del exterior de la planta o que aumentan la permeabilidad de las células vegetales para oligonucleótidos o polinucleótidos. Dichos agentes para facilitar la transferencia de la composición a una célula vegetal incluyen un agente químico o un agente físico o combinaciones de estos. Los agentes químicos para acondicionamiento incluyen (a) tensioactivos, (b) un disolvente orgánico o una solución acuosa o mezclas acuosas de disolventes orgánicos, (c) agentes de oxidación, (e) ácidos, (f) bases, (g) aceites, (h) enzimas o combinaciones de estos. Las realizaciones del método opcionalmente pueden incluir una etapa de incubación, una etapa de neutralización (por ejemplo, para neutralizar un ácido, base o agente de oxidación o para desactivar una enzima), una etapa de enjuague o combinaciones de estas. Las realizaciones de agentes o tratamientos para acondicionar una planta para la permeación de polinucleótidos incluyen emulsiones, emulsiones inversas, liposomas y otras composiciones similares a micelas. Las realizaciones de agentes o tratamientos para acondicionar una planta para la permeación de polinucleótidos incluyen contraiones u otras moléculas que se conocen por asociarse con moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, iones de amonio inorgánico, iones de alquil amonio, iones de litio, poliaminas tales como espermina, espermidina o putrescina y otros cationes. Los disolventes orgánicos útiles para acondicionar una planta para la permeación de polinucleótidos incluyen DMSO, DMF, piridina, N-pirrolidina, hexametilfosforamida, acetonitrilo, dioxano, polipropilenglicol, otros disolventes miscibles con agua o que disolverán fosfonucleótidos en sistemas no acuosos (tales como se utilizan en reacciones sintéticas). Se pueden utilizar aceites de origen natural o sintéticos con o sin tensioactivos o emulsionantes, por ejemplo, aceites de fuentes vegetales, se pueden utilizar aceites de cultivos (tales como los enumerados en el 9o Compendio de Adyuvantes de Herbicidas, disponibles públicamente en línea en www.herbicide.adjuvants.com), por ejemplo, aceites parafínicos, ésteres de ácido graso de polioles o aceites con moléculas de cadena corta modificados con amidas o poliaminas tales como polietilenimina o N-pirrolidina.

61) Dichos agentes para acondicionar una planta para la permeación de polinucleótidos se aplican a la planta mediante cualquier método conveniente, por ejemplo, pulverización o revestimiento con un polvo, emulsión, suspensión o solución; de forma similar, las

moléculas polinucleotídicas se aplican a la planta mediante cualquier método conveniente, por ejemplo, pulverización o frotamiento de una solución, emulsión o suspensión.

- 62) Los ejemplos de tensioactivos útiles incluyen sales de sodio y litio de ácidos grasos (tales como cebo o aminos de cebo o fosfolípidos) y tensioactivos de organosilicona.
- 5 Otros tensioactivos útiles incluyen tensioactivos de organosilicona incluidos tensioactivos de organosilicona no iónicos, por ejemplo, tensioactivos de etoxilato de trisiloxano o un copolímero de poliéster y silicona tal como un copolímero de heptametil trisiloxano modificado con óxido de polialquileño y aliloxipolipropilenglicol metiléter (disponible en el mercado como el tensioactivo Silwet® L-77 que tiene el número CAS 27306-78-1 y el
- 10 número EPA: CAL.REG.NO. 5905-50073-AA, actualmente comercializado por Momentive Performance Materials, Albany, Nueva York). Cuando se usa el tensioactivo Silwet L-77 como tratamiento de prepulverización de las hojas de plantas u otras superficies, las concentraciones en el rango de aproximadamente 0,015 a aproximadamente 2 por ciento en peso (%p) (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035, 0,04,
- 15 0,045, 0,05, 0,055, 0,06, 0,065, 0,07, 0,075, 0,08, 0,085, 0,09, 0,095, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,5%p) son eficaces para preparar una hoja u otra superficie vegetal para la transferencia de moléculas polinucleotídicas en células vegetales a partir de una aplicación tópica en la superficie.
- 20 63) Los agentes físicos útiles pueden incluir (a) abrasivos tales como carburo de silicio, corindón, arena, calcita, piedra pómez, granate y similares, (b) nanopartículas tales como nanotubos de carbono o (c) una fuerza física. Los nanotubos de carbono se divulgan en Kam et al. (2004) J. Am. Chem. Soc., 126 (22):6850–6851, Liu et al. (2009) Nano Lett., 9(3):1007–1010 y Khodakovskaya et al. (2009) ACS Nano, 3(10):3221–3227. Los
- 25 agentes de fuerza física pueden incluir, calentamiento, enfriamiento, la aplicación de presión positiva o tratamiento con ultrasonidos. Las realizaciones del método opcionalmente pueden incluir una etapa de incubación, una etapa de neutralización (por ejemplo, para neutralizar un ácido, base o agente de oxidación o para desactivar una enzima), una etapa de enjuague o combinaciones de las mismas. Los métodos de la
- 30 invención pueden incluir además la aplicación de otros agentes que tendrán un efecto potenciado debido al silenciamiento de ciertos genes. Por ejemplo, cuando se diseña una polinucleótido para regular genes que proporcionan resistencia herbicida, la aplicación posterior del herbicida puede tener un efecto drástico en la eficacia del herbicida.
- 64) Los agentes para el acondicionamiento en laboratorio de una planta para permeación
- 35 de polinucleótidos incluyen, por ejemplo, aplicación de un agente químico, tratamiento

enzimático, calentamiento o enfriamiento, tratamiento con presión negativa o positiva o tratamiento con ultrasonidos. Los agentes para acondicionar plantas en un campo incluyen agentes químicos tales como tensioactivos y sales.

- 5 Genes objetivo y genes esenciales
- 65) Las composiciones y métodos de la invención son útiles para modular la expresión de un gen objetivo endógeno o transgénico en una célula vegetal. En varias realizaciones, un gen objetivo incluye una secuencia sentido (sentido de proteína o traducible), una secuencia antisentido (no traducible) o una secuencia sentido y una antisentido. Las
- 10 composiciones de la invención pueden incluir polinucleótidos y oligonucleótidos diseñados para dirigirse a múltiples genes o múltiples segmentos de uno o más genes. El gen objetivo puede incluir múltiples segmentos consecutivos de un gen objetivo, múltiples segmentos no consecutivos de un gen objetivo, múltiples alelos de un gen objetivo o múltiples genes objetivo de una o más especies. Los ejemplos de genes objetivo incluyen
- 15 genes y transgenes vegetales endógenos expresados en células vegetales. Otros ejemplos de genes objetivo incluyen genes endógenos de patógenos virales vegetales o genes endógenos de plagas vegetales invertebradas.
- 66) Los genes objetivo pueden incluir genes que codifican proteínas de tolerancia a herbicidas, secuencias antisentidos que incluyen ARN reguladores y genes esenciales,
- 20 que son genes necesarios para sustentar la vida celular o para permitir la reproducción de un organismo. Las realizaciones de genes esenciales incluyen genes que participan en la replicación del ADN o ARN, transcripción génica, regulación génica mediada por ARN, síntesis proteica, producción de energía y división celular. Un ejemplo de un compendio de genes esenciales se describe en Zhang et al. (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32:D271-
- 25 D272 y está disponible en tubic.tju.edu.cn/deg/; versión DEG 5.4 enumera 777 genes esenciales para *Arabidopsis thaliana*. Los ejemplos de genes esenciales incluyen el factor de iniciación de traducción (TIF) y la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO). Los genes objetivo pueden incluir genes que codifican factores de transcripción y genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis o catabolismo de
- 30 moléculas en plantas tales como, a modo no taxativo, aminoácidos, ácidos grasos y otros lípidos, azúcares y otros carbohidratos, polímeros biológicos y metabolitos secundarios incluidos alcaloides, terpenoides, poliquétidos, péptidos no ribosómicos y metabolitos secundarios de origen biosintético mixto.
- 35 Composiciones y Métodos

- 67) Las moléculas de ARN monocatenarias de esta invención pueden proporcionarse directamente a la célula vegetal como ARN o pueden proporcionarse indirectamente, por ejemplo, cuando una molécula polinucleotídica en la composición de tratamiento provoca en células de una planta la producción del ARN monocatenario que es capaz de hibridar con el transcrito del gen objetivo. En muchas realizaciones, las composiciones de moléculas polinucleotídicas además incluyen uno o más agentes potenciadores de la permeabilidad para facilitar la transferencia de las moléculas polinucleotídicas a una célula vegetal, tales como agentes para acondicionar una planta para la permeación de polinucleótidos. En aspectos de la invención, los métodos incluyen una o más aplicaciones de la composición de polinucleótido y una o más aplicaciones de un agente potenciador de la permeabilidad para acondicionar una planta para la permeación de polinucleótidos. Cuando el agente de acondicionamiento para la permeación es un tensioactivo de organosilicona, las realizaciones de las moléculas polinucleotídicas son oligonucleótidos de ARN bicatenario, oligonucleótidos de ARN monocatenario, polinucleótidos de ARN bicatenarios, polinucleótidos de ARN monocatenario, oligonucleótidos de ADN bicatenario, oligonucleótidos de ADN monocatenario, polinucleótidos de ADN bicatenarios, polinucleótidos de ADN monocatenario, oligonucleótidos o polinucleótidos de ADN o ARN químicamente modificados o mezclas de estos.
- 68) Un aspecto de la invención proporciona un método para inducir el silenciamiento sistémico de un gen objetivo en una planta que incluye (a) acondicionamiento de una planta para la permeación de polinucleótidos y (b) aplicación tópica de moléculas polinucleotídicas a la planta, donde las moléculas polinucleotídicas incluyen al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos clonados o de otra forma identificados a partir del gen objetivo en sentido sentido o antisentido, por el cual las moléculas polinucleotídicas permean al interior de la planta e inducen el silenciamiento sistémico del gen objetivo. El acondicionamiento y la aplicación de polinucleótidos pueden llevarse a cabo por separado o en una sola etapa. Cuando el acondicionamiento y la aplicación de polinucleótidos se llevan a cabo en etapas separadas, el acondicionamiento puede preceder o puede ser posterior a la aplicación de polinucleótidos en minutos, horas o días. En algunas realizaciones, se pueden llevar a cabo más de una etapa de acondicionamiento o más de una etapa de aplicación de molécula polinucleotídica en la misma planta. En realizaciones del método, el segmento puede clonarse o identificarse a partir de partes (a) sentidos (es decir, sentidos de proteínas), (b) antisentidos o (c) sentidos y antisentidos del gen objetivo. Las partes antisentidos incluyen ADN (o el ARN

20

codificado por el ADN) que codifica secuencias reguladoras de ARN (por ejemplo, promotores, intrones, regiones no traducidas en 5' o 3' y microARN, ARNip trans-activos, ARNip antisentidos naturales y otros ARN pequeños con función reguladora) o que codifica ARN que tienen función estructural o enzimática (por ejemplo, ribozimas, ARN

5 ribosómicos, ARN-t, aptámeros y riboswitches).

69) En varias realizaciones del método para inducir el silenciamiento sistémico de un gen objetivo en una planta, el gen objetivo es (a) un gen endógeno de la planta, (b) un gen endógeno de un patógeno viral de la planta, (c) un gen endógeno de una plaga invertebrada de la planta, (d) un gen endógeno de un simbiote de una plaga invertebrada

10 de la planta o (e) un gen sintético insertado en una planta transgénica. En realizaciones donde el gen objetivo es endógeno de una planta, el gen objetivo (a) es un gen endógeno de la planta que es esencial para mantener el crecimiento o la vida de la planta, (b) codifica una proteína que proporciona resistencia a herbicidas a la planta o (c) se transcribe a una molécula reguladora de ARN. En realizaciones del método para inducir

15 el silenciamiento sistémico de un gen objetivo en una planta, el acondicionamiento incluye la aplicación de un agente químico, abrasión, lesionado, tratamiento enzimático, calentamiento o enfriamiento, tratamiento con presión positiva o negativa, tratamiento con ultrasonidos o combinaciones de estos. En algunas realizaciones, el acondicionamiento incluye la aplicación de un tensioactivo, tales como tensioactivos de organosilicona, por

20 ejemplo, un copolímero de poliéster y silicona tal como un copolímero de heptametil trisiloxano modificado con óxido de polialquileño y aliloxipolipropilenglicol metiléter (disponible en el mercado como el tensioactivo Silwet® L-77). En realizaciones del método, el acondicionamiento incluye la aplicación de (a) un tensioactivo, (b) un disolvente orgánico o una solución acuosa o mezcla acuosa de un disolvente orgánico, (c)

25 un polipropilenglicol o una solución acuosa o una mezcla acuosa de polipropilenglicol, (d) nanopartículas, (e) un agente de oxidación, (f) un ácido o una base o (g) un aceite o de una combinación de estos. Las realizaciones del método opcionalmente pueden incluir una etapa de incubación, una etapa de neutralización (por ejemplo, para neutralizar un ácido, base o agente de oxidación o para desactivar una enzima), una etapa de enjuague

30 o combinaciones de las mismas.

70) La invención proporciona composiciones tópicas para inducir el silenciamiento sistémico de un gen objetivo en una planta que incluyen (a) un agente para el acondicionamiento de una planta para la permeación de polinucleótidos y (b) moléculas polinucleotídicas con al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos

35 esencialmente idénticos o complementario a la secuencia de nucleótidos del gen objetivo

- en sentido antisentido o sentido. Dichas composiciones pueden utilizarse para los diversos métodos divulgados en la presente, incluidos métodos para investigar la genética inversa modulando un gen endógeno en una planta y como composiciones herbicidas para los métodos divulgados de control de malezas y control de plantas espontáneas.
- 5 Otro aspecto de la invención proporciona una planta que incluye ADN o ARN exógeno para suprimir un gen endógeno, donde el ADN exógeno no está integrado en un cromosoma de la planta y el ARN exógeno no se transcribe a partir de ADN integrado en un cromosoma de la planta y en donde el gen endógeno se suprime mediante aplicación tópica de un polinucleótido en la planta. Alternativamente, el ADN o ARN exógeno puede
- 10 diseñarse para suprimir un gen vegetal endógeno que participan en la respuesta a un plaga o patógeno para proporcionar control de plagas o enfermedades vegetales. Dicha planta puede cultivarse a partir de una semilla o producirse mediante un proceso de corte, clonación o uso de injertos (es decir, una planta no cultivada a partir de una semilla). Dicha planta es una planta de cultivo en hileras, una fruta, una verdura, un árbol o una
- 15 planta ornamental. Por ejemplo, en realizaciones de las invenciones divulgadas en la presente, la planta es una planta de cultivo en hileras (por ejemplo, maíz, soja, algodón, colza, remolacha azucarera, alfalfa, caña de azúcar, arroz y trigo) o es una verdura (por ejemplo, tomate, pimiento dulce, pimiento picante, melón, sandía, pepino, berenjena, coliflor, brócoli, lechuga, espinaca, cebolla, guisantes, zanahorias, maíz dulce, col de
- 20 China, puerro, hinojo, calabaza, calabacín o calabaza de San Juan, rábano, coles de Bruselas, tomatillo, porotos, porotos secos u okra) o es una planta culinaria (por ejemplo, albahaca, perejil, café o té) o es una fruta (por ejemplo, manzana, pera, cereza, durazno, ciruela, albaricoque, banana, plátano, uva de mesa, uva de vino, cítricos, aguacate, mango o baya) o es un árbol cultivado para uso comercial u ornamental (por ejemplo, un
- 25 árbol frutal o un nogal o es una planta ornamental (por ejemplo, una planta floral ornamental o arbusto o hierba de césped). Las realizaciones de una planta producida mediante un proceso de corte, clonación o uso de injertos (es decir, una planta no cultivada a partir de una semilla) incluye árboles frutales y plantas incluidos cítricos, manzanas, aguacates, tomates, berenjenas, pepino, melones, sandías y uvas, así como
- 30 también varias plantas ornamentales.

Métodos para investigar la genética inversa

- 71) En otro aspecto, la invención proporciona un método para investigar la genética inversa regulando o modulando un gen objetivo endógeno en una planta; dicho método
- 35 incluye aplicar en un tejido de una planta en crecimiento una composición para

122

proporcionar (directamente o indirectamente) ARN monocatenario de esta invención para regulación sistémica de genes en una célula vegetal. En realizaciones de dicho método, el ARN mensajero que codifica una proteína o gen de ARN regulador es objetivo de un polinucleótido de la invención, produciendo la modulación del gen durante un período de al menos 1 semana durante la vida de la planta, por ejemplo, para identificar rasgos que pueden impartirse mediante aplicación tópica de polinucleótidos. El método además puede incluir etapas adicionales, por ejemplo, exponer a la planta a un conjunto de compuestos para identificar interacciones con herbicidas o exponer a la planta a estrés abiótico (por ejemplo, estrés por déficit hídrico, estrés por déficit de nutrientes, estrés por calor, estrés por frío, estrés por salinidad) o a tratamientos bióticos (por ejemplo, desafío con una plaga de insectos o nematodos o con un patógeno viral, fúngico o bacteriano o exposición a un compuesto químico o tratamiento biológico) para identificar respuestas de la planta al estrés o tratamiento. En otro aspecto de la invención, se someten a detección bibliotecas de plantas con una variedad de genes silenciados transitoriamente para contrastar con bibliotecas de compuestos (por ejemplo, herbicidas, fitohormonas, estimuladores de defensa endógenos o exógenos tales como ácido salicílico o harpins, deficiencias de moléculas que proporciona un nutriente vegetal tal como nitrógeno, fósforos, potasio, azufre, calcio, magnesio, hierro y zinc) para identificar interacciones con dichos compuestos. Los ejemplos de plantas útiles para dichas detecciones incluyen *Amaranthus palmeri* y *Nicotiana benthamiana*.

Métodos para silenciamiento transgénico

72) En otro aspecto adicional de la invención, este método puede utilizarse para silenciar un transgén que se expresa en una planta, proporcionando así un control negativo que es una medición independiente de acontecimientos de una contribución del transgén al rendimiento o efecto de la planta en un rasgo. Impartir un efecto de control negativo puede requerir múltiples tratamientos sucesivos con las moléculas polinucleotídicas de esta invención durante el ciclo de vida de una planta.

Aplicaciones específicas

73) En un aspecto relacionado, las composiciones y métodos de la invención también son útiles para silenciar transitoriamente uno o más genes en una célula vegetal o planta entera en crecimiento para producir un fenotipo deseado en respuesta a condiciones de

cultivo, estrés ambiental o abiótico o biótico o carga en la demanda de mercado durante la estación de crecimiento o en el ambiente poscosecha. Por ejemplo, las composiciones y métodos de la invención son útiles para suprimir transitoriamente un gen biosintético o catabólico para producir una planta o producto vegetal con un fenotipo deseado, tal como una composición nutricional deseada de un producto vegetal de cultivo, por ejemplo, suprimir un gen FAD2 para producir un perfil de ácido graso deseado en soja o colza u otra semilla de aceite o suprimir genes biosintéticos de lignina tales como COMT y CCOMT para proporcionar plantas forrajeras más fáciles de digerir. De forma similar, las composiciones y métodos de la invención son útiles para suprimir transitoriamente una molécula reguladora de ARN tal como un microARN (miARN) o un señuelo de miARN endógeno tal como un miARN endógeno, un precursor de miARN o un señuelo de miARN tal como se divulga en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos 2009/0070898 que se incorpora a la presente a modo de referencia. Las realizaciones de la invención son útiles para suprimir un gen vegetal endógeno que participa en la respuesta a una plaga o patógeno, proporcionando así control de plagas o enfermedades vegetales. Los polinucleótidos, composiciones y métodos de administración divulgados en la presente son útiles además para suprimir un gen objetivo endógeno de una plaga invertebrada de una planta, por ejemplo, plagas de lepidópteros o coleópteros que pueden ingerir ARN de la planta, proporcionando así control de plagas vegetales o enfermedades inducidas por plagas, por ejemplo, mediante el uso de un pulverizador tópico para cultivos, verduras o árboles frutales con moléculas de ADN o ARN dirigidas a un gen esencial invertebrado o un gen de un simbiote de la plaga invertebrada. Los polinucleótidos, composiciones y métodos de administración divulgados en la presente además son útiles para proporcionar control de un patógeno viral, por ejemplo, mediante el uso de un pulverizador antiviral tópico para cultivos, verduras o árboles frutales con moléculas de ADN o ARN dirigidas a un gen viral.

Composiciones herbicidas y métodos

74) Un aspecto de la invención proporciona una composición herbicida líquida que comprende moléculas polinucleotídicas como agente letal para plantas que proporciona al menos una especie de ARN monocatenario que puede hibridar en condiciones fisiológicas en una célula vegetal con ARN transcrito a partir de un gen(es) endógeno(s) en la célula vegetal. En algunas realizaciones, el gen objetivo codifica una proteína que proporciona tolerancia a un herbicida o codifica un gen esencial para mantener el crecimiento o la vida de la planta. La composición herbicida líquida puede incluir adicionalmente agentes

24

- potenciadores de la permeabilidad, herbicidas no nucleotídicos o combinaciones de los mismos y pueden utilizarse en un tratamiento multietapa con el herbicida no nucleotídico y/o los agentes potenciadores de permeabilidad aplicados por separado. Una realización de la composición herbicida líquida es un líquido que incluye un tensioactivo de organosilicona como agente potenciador de la permeabilidad y oligonucleótidos o polinucleótidos como agente letal para plantas que proporcionan a las células de la planta ARN monocatenario capaz de hibridar en condiciones fisiológicas en las células vegetales con ARN transcrito a partir de un gen objetivo en la célula vegetal para producir el silenciamiento del gen objetivo. En una realización, una composición herbicida líquida eficaz contra plantas resistentes a glifosato incluye un tensioactivo de organosilicona tal como el tensioactivo Silwet® L-77 y moléculas polinucleotídicas para proporcionar ARN monocatenario capaz de hibridar en condiciones fisiológicas en las células vegetales con ARN transcrito a partir de un gen EPSPS endógeno o transgénico que codifica una proteína EPSPS que proporciona tolerancia al glifosato. Cuando la molécula polinucleotídica se diseña para hibridar en condiciones fisiológicas en una célula vegetal con ARNm que codifica una proteína o no proteína endógena que codifica ARN que es esencial para mantener el crecimiento o la vida de la planta y para producir el silenciamiento génico y la reducción de la proteína esencial, la molécula polinucleotídica funciona como un agente letal para plantas, es decir, un herbicida nucleotídico. Estas composiciones herbicidas que incluyen moléculas polinucleotídicas pueden adaptarse para revestimiento tópico sobre las hojas de una planta en crecimiento o para aplicación sobre semillas o tallos cortados, por ejemplo, de plantas cultivadas hidropónicamente o en macetas.
- 75) Un aspecto de la invención proporciona una composición adaptada para revestimiento tópico sobre las hojas u otras superficies de una planta viva que incluye un agente potenciador de permeabilidad, por ejemplo, un tensioactivo tal como un tensioactivo de organosilicona y oligonucleótidos o polinucleótidos que proporcionan (directamente o indirectamente) ARN monocatenario que puede hibridar en condiciones fisiológicas en una célula vegetal con ARN transcrito a partir de un gen vegetal endógeno en una célula. En una realización, el gen vegetal endógeno es un gen vegetal endógeno que codifica una proteína que proporciona tolerancia a herbicidas para herbicidas tales como glifosato, dicamba o sulfonilurea. Más adelante, en la sección "Proteínas de tolerancia a herbicidas", se divulgan ejemplos de dichas proteínas que proporcionan tolerancia a herbicidas.

25

76) Otro aspecto de la invención proporciona un método para controlar plantas espontáneas resistentes a herbicidas que crecen en un campo de cultivos resistentes a herbicidas, que incluye aplicar sobre las hojas u otra superficie de las plantas espontáneas una composición que proporciona o posibilita la producción en células de las plantas espontáneas de una molécula de ARN monocatenario es capaz de hibridar en condiciones fisiológicas en células de las plantas espontáneas con ARN transcrito a partir de un gen endógeno en las células, en donde el gen endógeno (i) es un gen esencial para mantener el crecimiento o vida de la planta espontánea, (ii) codifica una proteína que proporciona resistencia a herbicidas a la planta espontánea o (iii) se transcribe en un agente regulador de ARN (por ejemplo, promotores, también precursores de miARN, miARN, ARNip trans-activos y otros ARN antisentidos que tienen una función reguladora tales como aptámeros y riboswitches). La composición que proporciona o posibilita la producción en células de plantas espontáneas de una molécula de ARN monocatenaria es capaz de hibridar en condiciones fisiológicas en células de las plantas espontáneas con ARN transcrito a partir de un gen endógeno en las células incluye al menos una molécula polinucleotídica seleccionada del grupo que consiste en (a) una molécula de ARN monocatenaria, (b) una molécula de ARN monocatenaria que se autohibrida para formar una molécula de ARN bicatenaria, (c) una molécula de ARN bicatenaria, (d) una molécula de ADN monocatenaria, (e) una molécula de ADN monocatenaria que se autohibrida para formar una molécula de ADN bicatenaria y (f) una molécula de ADN monocatenaria que incluye un gen Pol III modificado que se transcribe en una molécula de ARN, (g) una molécula de ADN bicatenaria, (h) una molécula de ADN bicatenaria que incluye un gen Pol III modificado que se transcribe en una molécula de ARN, (i) una molécula de ARN/ADN bicatenaria hibridada. En realizaciones para silenciamiento o supresión de un gen endógeno de una planta espontánea que codifica una proteína que proporciona resistencia a herbicidas a la planta espontánea, el método puede incluir aplica sobre la planta espontánea una cantidad del herbicida para el que la proteína le proporciona resistencia. Las composiciones y métodos de la invención son útiles para controlar malezas tolerantes a herbicidas (resistentes) o plantas transgénicas espontáneas tolerantes a herbicidas (resistentes) que pueden crecer en campos de cultivo, por ejemplo, un campo de cultivos resistentes a herbicidas tales como maíz, soja, algodón, colza, remolacha azucarera, alfalfa, caña de azúcar, arroz, trigo, así como también cultivos de frutas y verduras. En algunas de dichas realizaciones, la maleza o planta espontánea es amaranto (por ejemplo, palmera amaranto) y otras especies de amaranto, cola de yegua (hierba de caballo), amaranto tuberculoso, ambrosía gigante,

ambrosía común, sorgo, amor de hortelano, ryegrás, garranchuelos, lechuga espinaca, yute de china, alfalfa, maíz, soja, colza, algodón, remolacha azucarera, caña de azúcar, arroz o trigo. En algunas realizaciones el gen endógeno codifica una proteína que proporciona tolerancia a herbicidas; en la presente se divulgan ejemplos de dichas proteínas en la sección "Proteínas de tolerancia a herbicidas". En otras de dichas realizaciones el ARN monocatenario suprime selectivamente un gen en una especie vegetal específica pero no en otras, para permitir el control selectivo de dicha especie vegetal. En otra de dichas realizaciones una molécula de ADN monocatenario no selectiva suprime un gen común en múltiples especies vegetales, permitiendo un control más amplio dentro de un grupo o taxón de plantas. En realizaciones más específicas, el método además incluye aplicar sobre la maleza o planta espontánea una cantidad de herbicida no nucleotídico (por ejemplo, glifosato, dicamba, glufosinato o sulfonilurea) para el que la proteína a la que se dirige la molécula de ARN proporciona resistencia, permitiendo modos de acción dobles a través de la reducción de la producción de la proteína objetivo mediante la acción de la molécula de ARN y la inhibición de la función de la proteína que se produce por acción del herbicida no nucleotídico; el herbicida puede aplicarse en una etapa aparte (más temprano o más tarde) o junto con la composición nucleotídica. La aplicación de una composición polinucleotídica concomitantemente con o seguida de la aplicación de un herbicida no nucleotídico convencional en algunos casos proporciona control de malezas o plantas espontáneas con efecto sinérgico (es decir, donde el efecto combinado es mayor que la suma de los efectos de los tratamientos administrados por separado).

Proteínas de tolerancia a herbicidas

77) Las plantas naturales (no transgénicas) y transgénicas que exhiben tolerancia a herbicidas (resistencia) a menudo tienen un gen que codifica una proteína que es responsable por la tolerancia a herbicidas, por ejemplo, un transgén que proporciona la tolerancia, un gen endógeno mutado que proporciona la tolerancia o múltiples copias de un gen endógeno al cual se dirige normalmente un herbicida. Una estrategia de control de dichas plantas es aplicar un agente que suprime o al menos reduce la expresión del gen que codifica la proteína que imparte la tolerancia a herbicidas. Los ejemplos de proteínas que proporcionan tolerancia a un herbicida incluyen, por ejemplo, una 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una glifosato oxidorreductasa (GOX), una glifosato decarboxilasa, una glifosato-N-acetil transferasa (GAT), una dicamba monooxigenasa, una fosfinotricina acetiltransferasa, una ácido 2,2- dicloropropionico

21

dehalogenasa, una ácido acetohidroxi sintasa, una acetolactato sintasa, una haloarilnitrilasa, una acetil-coenzima A carboxilasa, una dihidropteroato sintasa, una fitoeno desaturasa, una protoporfirina IX oxigenasa, una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, una para-aminobenzoato sintasa, una glutamina sintasa, una celulosa sintasa, una beta-tubulina y una serina hidroximetiltransferasa.

78) Los ejemplos de ácidos nucleicos que codifican proteínas que confieren tolerancia a herbicidas incluyen 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasas (EPSPS; ver, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Números 5,627,061, 5,633,435 RE39247, 6,040,497 y 5,094,945 y las Publicaciones de Solicitudes Internacionales PCT WO04074443 y WO04009761), glifosato oxidorreductasa (GOX; Patente de los Estados Unidos Número 5.463.175), glifosato decarboxilasa (Publicación de Solicitud Internacional PCT WO05003362, Patente de los Estados Unidos Número 7.405.347 y publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos 2004/0177399), glifosato-N-acetil transferasa (GAT; Patente de los Estados Unidos Número 7,714,188) que confieren tolerancia al glifosato; dicamba monooxigenasa que confieren resistencia a herbicidas similares a auxina tales como dicamba (Patente de los Estados Unidos Número 7,105,724); fosfinotricina acetiltransferasa (pat o bar) que confiere tolerancia a la fosfinotricina o al glufosinato (Patente de los Estados Unidos Número 5,646,024); ácido 2,2-dicloropropionico dehalogenasa que confiere tolerancia al ácido 2,2-dicloropropionico (Dalapon) (Publicación de Solicitud Internacional PCT WO9927116); ácido acetohidroxi sintasa o acetolactato sintasa que confieren tolerancia a inhibidores de acetolactato sintasa tales como sulfonilurea, imidazolinona, triazolopirimidina, pirimidiloxibenzoatos y ftalida (Patente de los Estados Unidos Número 6,225,105); haloarilnitrilasa (Bxn) para conferir tolerancia a bromoxinilo (Patente de los Estados Unidos Número 4,810,648); acetil-coenzima A carboxilasa modificada para conferir tolerancia a ciclohexanodiona (setoxidim) y ariloxifenoxipropionato (haloxifop) (Patente de los Estados Unidos Número 6,414,222); dihidropteroato sintasa (sul I) para conferir tolerancia a herbicidas de sulfonamida (Patente de los Estados Unidos Número 5.719.046); polipéptido fotosistem II de 32 kDa (psbA) para conferir tolerancia a herbicidas de triazina (Hirschberg et al., 1983, Science, 222:1346-1349); antranilato sintasa para conferir tolerancia a 5-metiltriptófano (Patente de los Estados Unidos Número 4,581,847); ácido dihidrodipicolínico sintasa (dap A) para conferir tolerancia a aminoetil cisteína (Publicación de Solicitud Internacional PCT WO8911789); fitoeno desaturasa (crtl) para conferir tolerancia a herbicidas de piridazinona tales como norflurazón (Patente de Japón JP06343473); hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, una ácido 4-hidroxifenilacético oxidasa y una ácido 4-hidroxifenilacético 1-

hidrolasa (Patente de los Estados Unidos 7,304,209) para conferir tolerancia a herbicidas de ciclopropilisoxazol tales como isoxaflutol (Patente de los Estados Unidos Número 6,268,549); protoporfirinógeno oxidasa I modificada (protox) para conferir tolerancia a inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa (Patente de los Estados Unidos Número 5939602); ariloxialcanoato dioxigenasa (AAD-1) para conferir tolerancia a un herbicida que contiene un resto de ariloxialcanoato (WO05107437); una serina hidroximetiltransferasa (publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos 2008/0155716), una glutamina sintasa tolerante a glufosinato (publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos 2009/0018016). Ejemplos de dichos herbicidas incluyen fenoxi auxinas (tales como 2,4- D y diclorpróp), piridiloxi auxinas (tales como fluroxipir y triclopir), ariloxifenoxipropionatos (AOPP) inhibidores de acetil-coenzima A carboxilasa (ACCasa) (tales como haloxifop, quizalofop y diclofop) e inhibidores de 5- fenoxiacetato protoporfirinógeno oxidasa IX sustituida (tales como piraflufen y flumiclorac). Las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos que codifican proteínas de tolerancia a herbicidas y las secuencias de las proteínas de tolerancia a herbicidas, tales como se divulgan en las patentes y publicaciones de solicitudes de patentes de los Estados Unidos mencionadas en este párrafo se incorporan a la presente a modo de referencia.

79) Aspectos de esta invención proporcionan polinucleótidos y métodos que proporcionan directamente o indirectamente a una célula vegetal, ARN que hibridan con ARN que codifica dichas proteínas de tolerancia a herbicidas a un nivel que es letal para las plantas o al menos a una nivel para reducir la tolerancia al herbicida. Debido a la degeneración secuencial del ADN que codifica proteínas de tolerancia a herbicidas es posible diseñar un polinucleótido para uso en esta invención que es específicamente eficaz en una planta específica. Debido a la conservación de dominios de ADN entre múltiples plantas es posible diseñar un polinucleótido para uso en esta invención que es eficaz en una variedad de plantas.

80) En una realización el polinucleótido se mezcla con el herbicida correspondiente para potenciar la actividad del herbicida proporcionan una actividad herbicida mejorada. En una realización el polinucleótido se utiliza separado del herbicida pero en combinación con una aplicación del herbicida como un pre o postratamiento. En realizaciones, el tensioactivo de organosilicona se combina de forma ventajosa con el herbicida y el polinucleótido o se combina con uno o el otro cuando las composiciones se aplican de forma secuencial. Las plantas en un invernadero pueden tratarse utilizando un pulverizador agrícola o un pulverizador de laboratorio con una boquilla de pulverización 11001XR para administrar la solución de muestra a una tasa determinada (por ejemplo,

28

- 140 L/ha) a 0,25 MPa de presión. En el campo, la solución de tratamiento puede aplicarse con un pulverizador de mochila presurizado con CO₂ calibrado para administrar la tasa apropiada de la composición con una boquilla de pulverización de chorro plano 11015 con un ensamblaje de boquilla simple adaptado (para minimizar el desperdicio) a una presión de pulverización de 0,25 MPa; el pulverizador de boquilla simple proporciona una pulverización eficaz de 60 cm por encima de la copa de 3 a 12 pulgadas de altura de las plantas en crecimiento.
- 81) La descripción precedente y los ejemplos presentados en esta divulgación describen el objeto de esta invención, que incluye, a modo no taxativo, aspectos y realizaciones descritas en estas oraciones enumeradas con números romanos: (I) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo. (II) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo en células vegetales distintas a las revestidas tópicamente. (III) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de

transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo sistémicamente en al menos un órgano vegetal. (IV) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde la composición polinucleotídica induce la supresión del gen endógeno objetivo. (V) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde la composición polinucleotídica produce un fenotipo deseado en la planta u órgano vegetal en crecimiento. (VI) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde la composición polinucleotídica suprime la expresión de una enzima, una proteína estructural o una proteína reguladora vegetal en las plantas u órganos vegetales en crecimiento. (VII) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u

31

órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde la composición polinucleotídica es un agente letal para plantas. (VIII) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde el gen endógeno objetivo codifica una proteína que interactúa con un herbicida. (IX) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde el gen endógeno objetivo se selecciona del grupo que consiste en 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una ácido acetohidroxi sintasa o una acetolactato sintasa (ALS), una acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase), una dihidropteroato sintasa, una fitoeno desaturasa (PDS), una protoporfirina IX oxigenasa (PPO), una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), una para-aminobenzoato sintasa, una glutamina sintasa (GS), una glutamina sintasa tolerante al glufosinato, una 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DOXP) sintasa, una dihidropteroato (DHP) sintasa, una fenilalanina amoníaco liasa (PAL), una glutatión S-transferasa (GST), una proteína D1 de fotosistema II, una mono-oxigenasa, un citocromo P450, una celulosa sintasa, una beta-tubulina y una serina hidroximetiltransferasa. (X) Un método para

132

regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una

5 secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde el gen endógeno objetivo codifica una

10 proteína esencial para mantener el crecimiento de las plantas en crecimiento. (XI) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente

15 complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde el gen endógeno objetivo se

20 selecciona del grupo que consiste en RuBisCO, Factor de iniciación de traducción y fitoeno desaturasa. (XII) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o

25 esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde el gen endógeno

30 objetivo codifica una proteína que proporciona tolerancia a un herbicida. (XIII) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una

35 secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN

138

mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde el gen endógeno objetivo codifica una

5 enzima acetolactato sintasa mutante que confiere resistencia a los herbicidas de sulfonilurea y imidazolinona o una ACCasa mutante que confiere resistencia a herbicidas de ariloxifenoxi propionato. (XIV) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir

10 tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento,

15 con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde la composición polinucleotídica incluye además un segundo polinucleótido, teniendo el segundo polinucleótido una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de un segundo gen endógeno objetivo o ARN mensajero transcrito a partir del segundo gen endógeno

20 objetivo. (XV) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno

25 objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde la composición polinucleotídica incluye además un segundo polinucleótido, teniendo el segundo polinucleótido una

30 secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de un segundo gen endógeno objetivo o ARN mensajero transcrito a partir del segundo gen endógeno objetivo, en donde el al menos un polinucleótido es esencialmente idéntico o esencialmente complementario a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de un gen EPSPS endógeno en las plantas

35 u órganos vegetales en crecimiento y el segundo polinucleótido es esencialmente idéntico

44

o esencialmente complementario a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos del gen de Factor de iniciación de traducción endógeno en las plantas u órganos vegetales en crecimiento. (XVI) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u
5 órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido
10 permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde el gen endógeno objetivo es una secuencia antisentido, una secuencia sentido o una combinación de la secuencia antisentido y la secuencia sentido. (XVII) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir
15 tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para
20 permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde la composición polinucleotídica se aplica sobre un órgano de las plantas en crecimiento. (XVIII) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u
25 órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido
30 permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde la composición polinucleotídica se aplica sobre un hoja, tallo, semilla, fruta o flor de las plantas en crecimiento. (XIX) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en
35 crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un

polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde la composición polinucleotídica incluye además un segundo polinucleótido, teniendo el segundo polinucleótido una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de un segmento diferente del gen endógeno objetivo o ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo diferente del al menos un polinucleótido. (XX) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde las plantas en crecimiento están en un campo abierto o en un invernadero. (XXI) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde los polinucleótidos no están integrados en el cromosoma de las plantas en crecimiento. (XXII) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad

eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo y una sal. (XXIII) Un método para

5 regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN

10 mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y una sal. (XXIV) Un método

15 para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN

20 mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y copolímero de poliéter y

25 silicona y una sal. (XXV) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el

30 gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y

35 copolímero de poliéter y silicona y una sal, en donde el copolímero de poliéster y silicona

es un copolímero de heptametil trisiloxano modificado con óxido de polialquileno y aliloxipolipropilenglicol metiléter. (XXVI) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición

5 polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento,

10 con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo y una sal, en donde la sal es una sal orgánica o una inorgánica. (XXVII) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en

15 crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido

20 permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo, una sal de amonio orgánica y una sal de amonio inorgánica. (XXVIII) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir

25 tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para

30 permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo y sulfato de amonio. (XXIX) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir

35 tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición

- polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo y una sal y además incluye un humectante o un agente quelante. (XXX) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde la composición polinucleotídica se aplica sobre las plantas u órganos vegetales en crecimiento mediante un aparato de pulverización. (XXXI) Un método para regular la expresión de un gen endógeno objetivo en plantas u órganos vegetales en crecimiento que incluye revestir tópicamente plantas u órganos vegetales en crecimiento con una composición polinucleotídica que comprende al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen endógeno objetivo o el ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que el al menos un polinucleótido permee el interior de las plantas en crecimiento, con lo cual el al menos un polinucleótido regula la expresión del gen endógeno objetivo, en donde el polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en ADNmc, ADNbc, ARNmc, ARNbc y híbridos de ARN/ADN. (XXXII) Un método para potenciar la actividad de un herbicida en plantas en crecimiento que incluye (a) revestir tópicamente la superficie de una planta en crecimiento una composición polinucleotídica que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de una esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en un gen endógeno de la planta, en donde el gen endógeno expresa una proteína que interactúa con un herbicida y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para

permitir que los polinucleótidos permeen el interior de las plantas en crecimiento y (b) aplicar el herbicida a las plantas en crecimiento; con lo cual el al menos un polinucleótido permea el interior de las plantas en crecimiento e induce la supresión del gen endógeno, potenciando así la actividad del herbicida en las plantas en crecimiento. (XXXIII) Un

5 método para potenciar la actividad de un herbicida en plantas en crecimiento que incluye (a) revestir tópicamente la superficie de una planta en crecimiento una composición polinucleotídica que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de una

10 esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en un gen endógeno de la planta, en donde el gen endógeno expresa una proteína que interactúa con un herbicida y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que los polinucleótidos permeen el interior de las plantas en crecimiento y (b)

15 aplicar el herbicida a las plantas en crecimiento; con lo cual el al menos un polinucleótido permea el interior de las plantas en crecimiento e induce la supresión del gen endógeno, potenciando así la actividad del herbicida en las plantas en crecimiento, en donde el gen endógeno expresa una proteína que es un gen objetivo de herbicida o un gen de desactivación de herbicida. (XXXIV) Un método para potenciar la actividad de un

20 herbicida en plantas en crecimiento que incluye (a) revestir tópicamente la superficie de una planta en crecimiento una composición polinucleotídica que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de una esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o

25 más nucleótidos contiguos en un gen endógeno de la planta, en donde el gen endógeno expresa una proteína que interactúa con un herbicida y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que los polinucleótidos permeen el interior de las plantas en crecimiento y (b) aplicar el herbicida a las plantas en crecimiento; con lo cual el al menos

30 un polinucleótido permea el interior de las plantas en crecimiento e induce la supresión del gen endógeno, potenciando así la actividad del herbicida en las plantas en crecimiento, en donde el gen endógeno expresa una proteína que es un gen objetivo de herbicida o un gen de desactivación de herbicida seleccionado del grupo que consiste en 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), un ácido acetohidroxi sintasa o una acetolactato sintasa (ALS), una acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase), una dihidropteroato sintasa, una fitoeno desaturasa (PDS), una protoporfirina IX oxigenasa (PPO), una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), una para-aminobenzoato sintasa, una glutamina sintasa (GS), una glutamina sintasa tolerante a glufosinato, una 1-desoxi-

35 D-xilulosa 5-fosfato (DOXP) sintasa, una dihidropteroato (DHP) sintasa, una fenilalanina

40

amoniaco liasa (PAL), una glutatión S-transferasa (GST), una proteína D1 de fotosistema II, una mono-oxigenasa, un citocromo P450, una celulosa sintasa, una beta-tubulina y una serina hidroximetiltransferasa. (XXXV) Un método para potenciar la actividad de un herbicida en plantas en crecimiento que incluye (a) revestir tópicamente la superficie de una planta en crecimiento una composición polinucleotídica que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de una esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en un gen endógeno de la planta, en donde el gen endógeno expresa una proteína que interactúa con un herbicida y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que los polinucleótidos permeen el interior de las plantas en crecimiento y (b) aplicar el herbicida a las plantas en crecimiento; con lo cual el al menos un polinucleótido permea el interior de las plantas en crecimiento e induce la supresión del gen endógeno, potenciando así la actividad del herbicida en las plantas en crecimiento, en donde la composición polinucleotídica y el herbicida se aplican por separado o en la misma solución. (XXXVI) Un método para potenciar la actividad de un herbicida en plantas en crecimiento que incluye (a) revestir tópicamente la superficie de una planta en crecimiento una composición polinucleotídica que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de una esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en un gen endógeno de la planta, en donde el gen endógeno expresa una proteína que interactúa con un herbicida y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que los polinucleótidos permeen el interior de las plantas en crecimiento y (b) aplicar el herbicida a las plantas en crecimiento; con lo cual el al menos un polinucleótido permea el interior de las plantas en crecimiento e induce la supresión del gen endógeno, potenciando así la actividad del herbicida en las plantas en crecimiento, en donde el polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en ADNmc, ADNbc, ARNmc, ARNbc y híbridos de ARN/ADN. (XXXVII) Un método para potenciar la actividad de un herbicida en plantas en crecimiento que incluye (a) revestir tópicamente la superficie de una planta en crecimiento una composición polinucleotídica que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de una esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en un gen endógeno de la planta, en donde el gen endógeno expresa una proteína que interactúa con un herbicida y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que los polinucleótidos permeen el interior de las plantas en crecimiento y (b) aplicar el herbicida a las plantas en crecimiento; con lo cual el al menos

45

un polinucleótido permea el interior de las plantas en crecimiento e induce la supresión del gen endógeno, potenciando así la actividad del herbicida en las plantas en crecimiento, en donde la composición polinucleotídica incluye además un segundo polinucleótido, teniendo el segundo polinucleótido una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de un segmento diferente del gen endógeno objetivo o ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo diferente del al menos un polinucleótido. (XXXVIII) Un método para potenciar la actividad de un herbicida en plantas en crecimiento que incluye (a) revestir tópicamente la superficie de una planta en crecimiento una composición polinucleotídica que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de una esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en un gen endógeno de la planta, en donde el gen endógeno expresa una proteína que interactúa con un herbicida y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que los polinucleótidos permeen el interior de las plantas en crecimiento y (b) aplicar el herbicida a las plantas en crecimiento; con lo cual el al menos un polinucleótido permea el interior de las plantas en crecimiento e induce la supresión del gen endógeno, potenciando así la actividad del herbicida en las plantas en crecimiento, en donde la composición polinucleotídica incluye además una pluralidad de polinucleótidos, teniendo la pluralidad de polinucleótidos cada uno una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de un segmento diferente del gen endógeno objetivo o ARN mensajero transcrito a partir del gen endógeno objetivo diferente del al menos un polinucleótido. (XXXIX) Un método para potenciar la actividad de un herbicida en plantas en crecimiento que incluye (a) revestir tópicamente la superficie de una planta en crecimiento una composición polinucleotídica que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de una esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en un gen endógeno de la planta, en donde el gen endógeno expresa una proteína que interactúa con un herbicida y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que los polinucleótidos permeen el interior de las plantas en crecimiento y (b) aplicar el herbicida a las plantas en crecimiento; con lo cual el al menos un polinucleótido permea el interior de las plantas en crecimiento e induce la supresión del gen endógeno, potenciando así la actividad del herbicida en las plantas en crecimiento, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo y una sal. (XL) Un método para potenciar la actividad de un herbicida en plantas en

42

crecimiento que incluye (a) revestir tópicamente la superficie de una planta en crecimiento una composición polinucleotídica que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de una esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en un gen endógeno de la planta, en donde el gen endógeno expresa una proteína que interactúa con un herbicida y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que los polinucleótidos permeen el interior de las plantas en crecimiento y (b) aplicar el herbicida a las plantas en crecimiento; con lo cual el al menos un polinucleótido permea el interior de las plantas en crecimiento e induce la supresión del gen endógeno, potenciando así la actividad del herbicida en las plantas en crecimiento, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y una sal. (XLI) Un método para potenciar la actividad de un herbicida en plantas en crecimiento que incluye (a) revestir tópicamente la superficie de una planta en crecimiento una composición polinucleotídica que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de una esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en un gen endógeno de la planta, en donde el gen endógeno expresa una proteína que interactúa con un herbicida y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que los polinucleótidos permeen el interior de las plantas en crecimiento y (b) aplicar el herbicida a las plantas en crecimiento; con lo cual el al menos un polinucleótido permea el interior de las plantas en crecimiento e induce la supresión del gen endógeno, potenciando así la actividad del herbicida en las plantas en crecimiento, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y copolímero de poliéter y silicona y una sal. (XLII) Un método para potenciar la actividad de un herbicida en plantas en crecimiento que incluye (a) revestir tópicamente la superficie de una planta en crecimiento una composición polinucleotídica que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de una esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en un gen endógeno de la planta, en donde el gen endógeno expresa una proteína que interactúa con un herbicida y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que los polinucleótidos permeen el interior de las plantas en crecimiento y (b) aplicar el herbicida a las plantas en crecimiento; con lo cual el al menos un polinucleótido permea el interior de las plantas en crecimiento e induce la supresión del gen endógeno, potenciando así la actividad del herbicida en las plantas en crecimiento, en donde el agente de transferencia se

selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y copolímero de poliéter y silicona y una sal, en donde el copolímero de poliéster y silicona es un copolímero de heptametil trisiloxano modificado con óxido de polialquileño y aliloxipolipropilenglicol metiléter. (XLIII) Un método para potenciar la actividad de un herbicida en plantas en crecimiento que incluye (a) revestir tópicamente la superficie de una planta en crecimiento una composición polinucleotídica que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de una esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en un gen endógeno de la planta, en donde el gen endógeno expresa una proteína que interactúa con un herbicida y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que los polinucleótidos permeen el interior de las plantas en crecimiento y (b) aplicar el herbicida a las plantas en crecimiento; con lo cual el al menos un polinucleótido permea el interior de las plantas en crecimiento e induce la supresión del gen endógeno, potenciando así la actividad del herbicida en las plantas en crecimiento, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo y una sal, en donde la sal es una sal orgánica o una inorgánica. (XLIV) Un método para potenciar la actividad de un herbicida en plantas en crecimiento que incluye (a) revestir tópicamente la superficie de una planta en crecimiento una composición polinucleotídica que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de una esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en un gen endógeno de la planta, en donde el gen endógeno expresa una proteína que interactúa con un herbicida y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que los polinucleótidos permeen el interior de las plantas en crecimiento y (b) aplicar el herbicida a las plantas en crecimiento; con lo cual el al menos un polinucleótido permea el interior de las plantas en crecimiento e induce la supresión del gen endógeno, potenciando así la actividad del herbicida en las plantas en crecimiento, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo, una sal de amonio orgánica y una sal de amonio inorgánica. (XLV) Un método para potenciar la actividad de un herbicida en plantas en crecimiento que incluye (a) revestir tópicamente la superficie de una planta en crecimiento una composición polinucleotídica que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de una esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en un gen endógeno de la planta, en donde el gen endógeno expresa una proteína que interactúa con un herbicida y una cantidad eficaz de un agente

de transferencia para permitir que los polinucleótidos permeen el interior de las plantas en crecimiento y (b) aplicar el herbicida a las plantas en crecimiento; con lo cual el al menos un polinucleótido permea el interior de las plantas en crecimiento e induce la supresión del gen endógeno, potenciando así la actividad del herbicida en las plantas en crecimiento, en
5 donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo y sulfato de amonio. (XLVI) Un método para potenciar la actividad de un herbicida en plantas en crecimiento que incluye (a) revestir tópicamente la superficie de una planta en crecimiento una composición polinucleotídica que tiene una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos
10 contiguos de una esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en un gen endógeno de la planta, en donde el gen endógeno expresa una proteína que interactúa con un herbicida y una cantidad eficaz de un agente de transferencia para permitir que los polinucleótidos permeen el interior de las plantas en crecimiento y (b) aplicar el herbicida a las plantas en crecimiento; con lo cual el al menos
15 un polinucleótido permea el interior de las plantas en crecimiento e induce la supresión del gen endógeno, potenciando así la actividad del herbicida en las plantas en crecimiento, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo y una sal, en donde el agente de transferencia incluye además un humectante o un agente quelante. (XLVII) En una composición herbicida líquida adaptada para
20 revestimiento tópico sobre la superficie exterior de plantas en crecimiento que incluye tensioactivo y al menos un agente letal para plantas, la mejora en donde el agente letal para plantas incluye polinucleótidos que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen vegetal o la secuencia del ARN transcrito del gen vegetal, produciendo los polinucleótidos la producción sistémica de ARN pequeños
25 que hibridan con una sonda para el gen vegetal. (XLVIII) En una composición herbicida líquida que incluye un herbicida no polinucleotídico, la mejora en donde la composición incluye además polinucleótidos que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a una secuencia de una planta vegetal o a una secuencia del ARN transcrito del gen vegetal. (XLIX) Una composición que consiste esencialmente en (a)
30 una solución de polinucleótidos de ADN bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen
35 endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de

45

transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos del ADN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta. (L) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos del ADN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo y una sal. (LI) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos del ADN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y una sal inorgánica. (LII) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos del ADN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y copolímero de poliéter y silicona y una sal inorgánica. (LIII) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de

46

ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la

5 transferencia de los polinucleótidos del ADN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y copolímero de poliéter y silicona y una sal inorgánica, en donde el copolímero de poliéster y silicona es un copolímero de heptametil trisiloxano modificado con óxido de polialquileno y aliloxipolipropilenglicol

10 metiléter (disponible como el tensioactivo Silwet® L-77). (LIV) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN bicatenario son capaces de

15 hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos del ADN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, que incluye además una molécula herbicida no polinucleotídica. (LV) Una

20 composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con

25 el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos del ADN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el gen vegetal codifica una proteína que proporciona tolerancia a herbicidas y es una 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa

30 (EPSPS), una ácido acetohidroxi sintasa o una acetolactato sintasa (ALS), una acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase), una dihidropteroato sintasa, una fitoeno desaturasa (PDS), una protoporfirina IX oxigenasa (PPO), una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), una para-aminobenzoato sintasa, una glutamina sintasa (GS), una glutamina sintasa tolerante al glufosinato, una 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DOXP) sintasa, una

35 dihidropteroato (DHP) sintasa, una fenilalanina amoniaco liasa (PAL), una glutatión S-

- transferasa (GST), una proteína D1 de fotosistema II, una mono-oxigenasa, un citocromo P450, una celulosa sintasa, una beta-tubulina y una serina hidroximetiltransferasa. (LVI) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN monocatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos del ADN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta. (LVII) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN monocatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos del ADN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo y una sal. (LVIII) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN monocatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos del ADN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y una sal inorgánica. (LIX) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN monocatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones

fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos del ADN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el

5 agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un copolímero de poliéster y silicona y una sal inorgánica. (LX) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN monocatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la

10 secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos del ADN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células

15 de la planta, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y copolímero de poliéter y silicona y una sal inorgánica, en donde el copolímero de poliéster y silicona es un copolímero de heptametil trisiloxano modificado con óxido de polialquileno y aliloxipolipropilenglicol metiléter (disponible como el tensioactivo Silwet® L-77). (LXI) Una composición que consiste esencialmente en (a)

20 una solución de polinucleótidos de ADN monocatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir

25 del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos del ADN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, que incluye además una molécula herbicida no polinucleotídica. (LXII) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN monocatenario no

30 transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen

35 endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los

polinucleótidos del ADN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el gen vegetal codifica una proteína que proporciona tolerancia a herbicidas y es una 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una ácido acetohidroxi sintasa o una acetolactato sintasa (ALS), una acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase), una dihidropteroato sintasa, una fitoeno desaturasa (PDS), una protoporfirina IX oxigenasa (PPO), una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), una para-aminobenzoato sintasa, una glutamina sintasa (GS), una glutamina sintasa tolerante al glufosinato, una 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DOXP) sintasa, una dihidropteroato (DHP) sintasa, una fenilalanina amoníaco liasa (PAL), una glutatión S-transferasa (GST), una proteína D1 de fotosistema II, una mono-oxigenasa, un citocromo P450, una celulosa sintasa, una beta-tubulina y una serina hidroximetiltransferasa. (LXIII) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ARN desde la superficie de la planta hacia las células de la planta. (LXIV) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ARN desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo y una sal. (LXV) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el

- silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ARN desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y una sal inorgánica. (LXVI) Una
- 5 composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con
- 10 el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ARN desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y copolímero de poliéster y silicona y una
- 15 sal inorgánica. (LXVII) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en
- 20 células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ARN desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y copolímero de poliéster y silicona y una sal inorgánica, en donde el copolímero de poliéster y silicona es un copolímero de heptametil trisiloxano modificado con óxido de polialquileno y aliloxipolipropilenglicol metiléter (disponible como el tensioactivo Silwet® L-77). (LXVIII)
- 25 Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la
- 30 transferencia de los polinucleótidos de ARN desde la superficie de la planta hacia las
- 35

51

células de la planta, que incluye además una molécula herbicida no polinucleotídica.

(LXIX) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ARN desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el gen vegetal codifica una proteína que proporciona tolerancia a herbicidas y es una 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una ácido acetohidroxi sintasa o una acetolactato sintasa (ALS), una acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase), una dihidropteroato sintasa, una fitoeno desaturasa (PDS), una protoporfirina IX oxigenasa (PPO), una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), una para-aminobenzoato sintasa, una glutamina sintasa (GS), una glutamina sintasa: tolerante al glufosinato, una 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DOXP) sintasa, una dihidropteroato (DHP) sintasa, una fenilalanina amoníaco liasa (PAL), una glutatión S-transferasa (GST), una proteína D1 de fotosistema II, una mono-oxigenasa, un citocromo P450, una celulosa sintasa, una beta-tubulina y una serina hidroximetiltransferasa.

(LXX) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN monocatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos del ARN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta.

(LXXI) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN monocatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la

transferencia de los polinucleótidos del ARN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo y una sal. (LXXII) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN monocatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la

5 secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen

10 endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos del ARN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y una sal inorgánica. (LXXIII) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN monocatenario no

15 transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen

20 endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos del ARN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y copolímero de poliéster y silicona y una sal inorgánica. (LXXIV) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de

25 polinucleótidos de ARN monocatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de

30 transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos del ARN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y copolímero de poliéster y silicona y una sal inorgánica, en donde el

35 copolímero de poliéster y silicona es un copolímero de heptametil trisiloxano modificado

con óxido de polialquileno y aliloxipolipropilenglicol metiléter (disponible como el tensioactivo Silwet® L-77). (LXXV) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN monocatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos del ARN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, que incluye además una molécula herbicida no polinucleotídica. (LXXVI) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN monocatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos del ARN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el gen vegetal codifica una proteína que proporciona tolerancia a herbicidas y es una 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una ácido acetohidroxi sintasa o una acetolactato sintasa (ALS), una acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase), una dihidropteroato sintasa, una fitoeno desaturasa (PDS), una protoporfirina IX oxigenasa (PPO), una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), una para-aminobenzoato sintasa, una glutamina sintasa (GS), una glutamina sintasa tolerante al glufosinato, una 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DOXP) sintasa, una dihidropteroato (DHP) sintasa, una fenilalanina amoniaco liasa (PAL), una glutatión S-transferasa (GST), una proteína D1 de fotosistema II, una mono-oxigenasa, un citocromo P450, una celulosa sintasa, una beta-tubulina y una serina hidroximetiltransferasa. (LXXVII) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para

54

producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN desde la superficie de la planta hacia las células de la planta. (LXXVIII) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario

5 no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el

10 silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo y una sal. (LXXIX) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN

15 bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para

20 producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y una sal inorgánica. (LXXX) Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de

25 polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN

30 transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y copolímero de poliéster y silicona y una sal inorgánica. (LXXXI) Una

35 composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de híbrido

de ADN/ARN bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el agente de transferencia se selecciona del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y copolímero de poliéter y silicona y una sal inorgánica, en donde el copolímero de poliéster y silicona es un copolímero de heptametil trisiloxano modificado con óxido de polialquileno y aliloxipolipropilenglicol metiléter (disponible como el tensioactivo Silwet® L-77). (LXXXII)

Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, que incluye además una molécula herbicida no polinucleotídica. (LXXXIII)

Una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario no transcribible que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN desde la superficie de la planta hacia las células de la planta, en donde el gen vegetal codifica una proteína que proporciona tolerancia a herbicidas y es una 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una ácido acetohidroxi sintasa o una acetolactato sintasa (ALS), una acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase), una dihidropteroato sintasa, una fitoeno desaturasa (PDS), una protoporfirina IX oxigenasa (PPO), una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa

56

(HPPD), una para-aminobenzoato sintasa, una glutamina sintasa (GS), una glutamina sintasa tolerante al glufosinato, una 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DOXP) sintasa, una dihidropteroato (DHP) sintasa, una fenilalanina amoníaco liasa (PAL), una glutatión S-transferasa (GST), una proteína D1 de fotosistem II, una mono-oxigenasa, un citocromo P450, una celulosa sintasa, una beta-tubulina y una serina hidroximetiltransferasa.

(LXXXIV) Un método para controlar selectivamente plantas espontáneas resistentes a herbicidas objetivo en un campo de cultivos resistentes a herbicidas que incluye aplicar sobre las hojas de las plantas espontáneas una composición que incluye oligómeros polinucleotídicos que proporciona a células de las plantas espontáneas ARN monocatenario sistémico que es capaz de hibridar en condiciones fisiológicas en células de las plantas espontáneas con ARN mensajero que se transcribe a partir de una gen endógeno que (i) es un gen esencial para mantener el crecimiento o la vida de la planta espontánea, (ii) codifica una proteína que proporciona resistencia herbicida la planta espontánea o (iii) se transcribe en un agente regulador de ARN. (LXXXV) Un método para controlar selectivamente plantas espontáneas resistentes a herbicidas objetivo en un campo de cultivos resistentes a herbicidas que incluye aplicar sobre las hojas de las plantas espontáneas una composición que incluye oligómeros polinucleotídicos que proporciona a células de las plantas espontáneas ARN monocatenario sistémico que es capaz de hibridar en condiciones fisiológicas en células de las plantas espontáneas con ARN mensajero que se transcribe a partir de una gen endógeno que (i) es un gen esencial para mantener el crecimiento o la vida de la planta espontánea, (ii) codifica una proteína que proporciona resistencia herbicida la planta espontánea o (iii) se transcribe en un agente regulador de ARN, en donde la composición incluye un tensioactivo y oligómeros seleccionados del grupo que consiste en ARN monocatenario, ARN bicatenario, ADN monocatenario, ADN bicatenario y ARN/ADN hibridados bicatenarios, en donde los oligómeros tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria al ARN mensajero del gen endógeno; y en donde el gen endógeno es un gen natural o un transgén recombinante. (LXXXVI) Un método para controlar selectivamente plantas espontáneas resistentes a herbicidas objetivo en un campo de cultivos resistentes a herbicidas que incluye aplicar sobre las hojas de las plantas espontáneas una composición que incluye oligómeros polinucleotídicos que proporciona a células de las plantas espontáneas ARN monocatenario sistémico que es capaz de hibridar en condiciones fisiológicas en células de las plantas espontáneas con ARN mensajero que se transcribe a partir de una gen endógeno que (i) es un gen esencial para mantener el crecimiento o la vida de la planta espontánea, (ii) codifica una proteína que proporciona

57

resistencia herbicida la planta espontánea o (iii) se transcribe en un agente regulador de ARN, en donde la planta espontánea es amaranto, yute de china, amaranto tuberculoso, lechuga espinaca, diente de león, alfalfa, maíz, soja, colza, algodón, remolacha azucarera, caña de azúcar, trigo, arroz o una verdura. (LXXXVII) Un método para

5 controlar selectivamente plantas espontáneas resistentes a herbicidas objetivo en un campo de cultivos resistentes a herbicidas que incluye aplicar sobre las hojas de las plantas espontáneas una composición que incluye oligómeros polinucleotídicos que proporciona a células de las plantas espontáneas ARN monocatenario sistémico que es capaz de hibridar en condiciones fisiológicas en células de las plantas espontáneas con

10 ARN mensajero que se transcribe a partir de un gen endógeno que (i) es un gen esencial para mantener el crecimiento o la vida de la planta espontánea, (ii) codifica una proteína que proporciona resistencia herbicida la planta espontánea o (iii) se transcribe en un agente regulador de ARN, en donde los cultivos son maíz, soja, algodón, colza, remolacha azucarera, alfalfa, caña de azúcar, arroz, trigo o cultivos de frutas o verduras.

15 (LXXXVIII) Un método para controlar selectivamente plantas espontáneas resistentes a herbicidas objetivo en un campo de cultivos resistentes a herbicidas que incluye aplicar sobre las hojas de las plantas espontáneas una composición que incluye oligómeros polinucleotídicos que proporciona a células de las plantas espontáneas ARN monocatenario sistémico que es capaz de hibridar en condiciones fisiológicas en células

20 de las plantas espontáneas con ARN mensajero que se transcribe a partir de un gen endógeno que (i) es un gen esencial para mantener el crecimiento o la vida de la planta espontánea, (ii) codifica una proteína que proporciona resistencia herbicida la planta espontánea o (iii) se transcribe en un agente regulador de ARN, en donde el gen endógeno codifica una proteína que proporciona resistencia a herbicidas a la planta

25 espontánea y la proteína es una 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una ácido acetohidroxi sintasa o una acetolactato sintasa (ALS), una acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase), una dihidropteroato sintasa, una fitoeno desaturasa (PDS), una protoporfirina IX oxigenasa (PPO), una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), una para-aminobenzoato sintasa, una glutamina sintasa (GS), una glutamina sintasa tolerante a

30 glufosinato, una 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DOXP) sintasa, una dihidropteroato (DHP) sintasa, una fenilalanina amoníaco liasa (PAL), una glutatión S-transferasa (GST), una proteína D1 de fotosistema II, una mono-oxigenasa, un citocromo P450, una celulosa sintasa, una beta-tubulina o una serina hidroximetiltransferasa. (LXXXIX) Un método para controlar selectivamente plantas espontáneas resistentes a herbicidas objetivo en un

35 campo de cultivos resistentes a herbicidas que incluye aplicar sobre las hojas de las

plantas espontáneas una composición que incluye oligómeros polinucleotídicos que proporciona a células de las plantas espontáneas ARN monocatenario sistémico que es capaz de hibridar en condiciones fisiológicas en células de las plantas espontáneas con ARN mensajero que se transcribe a partir de un gen endógeno que (i) es un gen esencial para mantener el crecimiento o la vida de la planta espontánea, (ii) codifica una proteína que proporciona resistencia herbicida a la planta espontánea o (iii) se transcribe en un agente regulador de ARN, en donde el gen endógeno codifica una proteína que proporciona resistencia a herbicidas a la planta espontánea y la proteína es una 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una ácido acetohidroxi sintasa o una acetolactato sintasa (ALS), una acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase), una dihidropteroato sintasa, una fitoeno desaturasa (PDS), una protoporfirina IX oxigenasa (PPO), una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), una para-aminobenzoato sintasa, una glutamina sintasa (GS), una glutamina sintasa tolerante a glufosinato, una 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DOXP) sintasa, una dihidropteroato (DHP) sintasa, una fenilalanina amoníaco liasa (PAL), una glutatión S-transferasa (GST), una proteína D1 de fotosistema II, una mono-oxigenasa, un citocromo P450, una celulosa sintasa, una beta-tubulina o una serina hidroximetiltransferasa, que incluye además aplicar sobre la planta espontánea una cantidad del herbicida para el que la proteína proporciona resistencia. (XC) Un método para investigar la genética inversa modulando un gen objetivo endógeno en una planta, incluyendo el método aplicar sobre tejido de una planta en crecimiento: (1) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN bicatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ADN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; o (2) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN monocatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de

59

transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ADN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; o (3) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN bicatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o

5 complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la

10 transferencia de los polinucleótidos de ARN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; o (4) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN monocatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los

15 polinucleótidos de ARN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ARN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; o (5) una

20 composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en

25 células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta. (XCI)

Un método para investigar la genética inversa modulando un gen objetivo endógeno en

30 una planta, incluyendo el método aplicar sobre tejido de una planta en crecimiento: (1) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN bicatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN

35 bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con

~~60~~

el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ADN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; o (2) una composición que consiste esencialmente en (a)

5 una solución de polinucleótidos de ADN monocatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir

10 del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ADN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; o (3) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN bicatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o

15 complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la

20 transferencia de los polinucleótidos de ARN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; o (4) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN monocatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir del gen endógeno; en donde los

25 polinucleótidos de ARN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ARN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; o (5) una

30 composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en

35 células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen

61

endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; en donde la composición produce la modulación del gen objetivo durante un período de al

5 menos 1 semana durante la vida de la planta. (XCII) Un método para investigar la genética inversa modulando un gen objetivo endógeno en una planta, incluyendo el método aplicar sobre tejido de una planta en crecimiento: (1) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN bicatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la

10 secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los

15 polinucleótidos de ADN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; o (2) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN monocatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir del gen endógeno; en donde los

20 polinucleótidos de ADN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ADN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; o (3) una

25 composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN bicatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con

30 el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ARN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; o (4) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN monocatenario no transcribible que tienen una

35 secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno

de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ARN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; o (5) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; en donde el ARN transcrito en las células es ARN mensajero que codifica una proteína o ARN regulador. (XCIII) Un método para investigar la genética inversa modulando un gen objetivo endógeno en una planta, incluyendo el método aplicar sobre tejido de una planta en crecimiento: (1) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN bicatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ADN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; o (2) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN monocatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ADN monocatenario desde la superficie de la

~~68~~

planta hacia las células de la planta; o (3) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN bicatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ARN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; o (4) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN monocatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ARN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; o (5) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; incluyendo además exponer la planta a un conjunto de compuestos para identificar interacciones con herbicidas. (XCIV) Un método para investigar la genética inversa modulando un gen endógeno en una planta, incluyendo el método aplicar tópicamente sobre tejido de una planta viva: (1) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN bicatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el

ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ADN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; o (2) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ADN monocatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ADN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ADN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; o (3) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN bicatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ARN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; o (4) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de ARN monocatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de ARN monocatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de ARN monocatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta; o (5) una composición que consiste esencialmente en (a) una solución de polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario no transcribible que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir del gen endógeno; en donde los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con el ARN transcrito a partir del gen

- endógeno para producir el silenciamiento del gen endógeno; y (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de los polinucleótidos de híbrido de ADN/ARN bicatenario desde la superficie de la planta hacia las células de la planta. (XCV) Una composición herbicida que incluye una solución acuosa de (a) un agente para
- 5 acondicionar una planta para la permeación de oligómeros polinucleotídicos y (b) oligómeros polinucleotídicos que incluyen al menos una cadena polinucleotídica que incluye al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos de un gen endógeno de la planta en sentido antisentido o sentido, en donde el gen endógeno codifica una proteína que proporciona a la planta resistencia a un herbicida químico o es un gen esencial.
- 10 (XCVI) Una composición herbicida que incluye una solución acuosa de (a) un agente para acondicionar una planta para la permeación de oligómeros polinucleotídicos y (b) oligómeros polinucleotídicos que incluyen al menos una cadena polinucleotídica que incluye al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos de un gen endógeno de la planta en sentido antisentido o sentido, en donde el gen endógeno codifica una proteína
- 15 que proporciona a la planta resistencia a un herbicida químico o es un gen esencial, incluyendo además un herbicida químico. (XCVII) Una composición herbicida que incluye una solución acuosa de (a) un agente para acondicionar una planta para la permeación de oligómeros polinucleotídicos y (b) oligómeros polinucleotídicos que incluyen al menos una cadena polinucleotídica que incluye al menos un segmento de 18 o más nucleótidos
- 20 contiguos de un gen endógeno de la planta en sentido antisentido o sentido, en donde el gen endógeno codifica una proteína que proporciona a la planta resistencia a un herbicida químico o es un gen esencial, incluyendo además un herbicida químico, que incluye compuestos herbicidas de glifosato, dicamba, fosfinotricina, bromoxinilo, ioxinilo o clorsulfurón. (XCVIII) Una composición herbicida que incluye una solución acuosa de (a)
- 25 un agente para acondicionar una planta para la permeación de oligómeros polinucleotídicos y (b) oligómeros polinucleotídicos que incluyen al menos una cadena polinucleotídica que incluye al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos de un gen endógeno de la planta en sentido antisentido o sentido, en donde el gen endógeno codifica una proteína que proporciona a la planta resistencia a un herbicida químico o es
- 30 un gen esencial, incluyendo además un herbicida químico, que incluye un compuesto de glifosato, un tensioactivo de copolímero de poliéster y silicona y oligómeros polinucleotídicos. (XCIX) Una planta que incluye ADN o ARN exógeno para suprimir un gen endógeno, donde el ADN exógeno no está integrado en un cromosoma de la planta y el ARN exógeno no se transcribe a partir de ADN integrado en un cromosoma de la planta
- 35 y en donde el gen endógeno se suprime mediante aplicación tópica de un polinucleótido

en la planta después que la planta ha emergido de una semilla. (C) Un método para administrar un polinucleótido en el interior de una célula vegetal mediante aplicación tópica del polinucleótido al exterior de la célula vegetal, incluyendo el método combinar el polinucleótido con un tensioactivo de organosilicona. (CI) Un método para administrar un polinucleótido en el interior de una célula vegetal mediante aplicación tópica del polinucleótido al exterior de la célula vegetal, incluyendo el método combinar el polinucleótido con un tensioactivo de organosilicona, en donde el tensioactivo de organosilicona es un copolímero de poliéster y silicona. (CII) Un método para administrar un polinucleótido en el interior de una célula vegetal mediante aplicación tópica del polinucleótido al exterior de la célula vegetal, incluyendo el método combinar el polinucleótido con un tensioactivo de organosilicona, en donde el tensioactivo de organosilicona es un copolímero de poliéster y silicona, en donde el copolímero de poliéster y silicona es un copolímero de heptametil trisiloxano modificado con óxido de polialquileno y aliloxipolipropilenglicol metiléter. (CIII) Un método para administrar un polinucleótido en el interior de una célula vegetal mediante aplicación tópica del polinucleótido en el exterior de la célula vegetal, incluyendo el método combinar el polinucleótido con un tensioactivo de organosilicona y una sal orgánica o una inorgánica. (CIV) Un método para administrar un polinucleótido en el interior de una célula vegetal mediante aplicación tópica del polinucleótido en el exterior de la célula vegetal, incluyendo el método combinar el polinucleótido con un tensioactivo de organosilicona y una sal orgánica o una inorgánica, en donde la sal es una sal de amonio. (CV) Un método para administrar un polinucleótido en el interior de una célula vegetal mediante aplicación tópica del polinucleótido en el exterior de la célula vegetal, incluyendo el método combinar el polinucleótido con un tensioactivo de organosilicona y una sal orgánica o una inorgánica, en donde la sal es una sal de amonio, en donde la sal de amonio es sulfato de amonio. (CVI) Un método para administrar un polinucleótido en el interior de una célula vegetal mediante aplicación tópica del polinucleótido al exterior de la célula vegetal, incluyendo el método combinar el polinucleótido con un tensioactivo de organosilicona, en donde la composición polinucleotídica se aplica sobre las plantas u órganos vegetales en crecimiento mediante un aparato pulverizador.

Ejemplo 1

- 82) Este ejemplo ilustra la utilidad de las moléculas polinucleotídicas de esta invención en el control de malezas resistentes a herbicidas. Se identificó que los genotipos de palmera amaranto resistente a glifosato tienen múltiples copias, por ejemplo, de 4 a más de 100 copias del gen que codifica la 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) a la cual se dirigen los compuestos de glifosato en los tratamientos con herbicidas.
- 83) En referencia a la SEQ ID NO:1 tal como se muestra en la Figura 1, se diseñaron cuatro moléculas de ARNbc "cortas" de tamaño de oligonucleótido con una cadena antisentido que es capaz de hibridar con ARNm transcrito a partir del gen EPSPS de la palmera amaranto en las posiciones 14-38 (ARNbc-1 corto), en las posiciones 153-177 (ARNbc-2 corto), 345-369 (ARNbc-3 corto) y 1105-1129 (ARNbc-4 corto), tal como se indica mediante los nucleótidos subrayados en la Figura 1. Los cuatro ARNbc cortos diseñados se adquirieron de Integrated DNA Technologies (IDT); los ARNbc tenían un excedente de dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido y tenían dos desoxinucleótidos como los nucleótidos terminales en el extremo 3' de la cadena sentido.
- 84) En referencia a la SEQ ID NO:1 y la Figura 1, se diseñaron tres polinucleótidos de ARN bicatenario "largo" con una cadena que es capaz de hibridar con el ARNm transcrito a partir del gen EPSPS de la palmera amaranto en las posiciones 16-170 (ARNbc-1 largo), 451-722 (ARNbc-2 largo) y 1109-1328 (ARNbc-3 largo) tal como se indica mediante los nucleótidos en negrita en la Figura 1. Los ARNbc largos diseñados se hicieron utilizando el Ambion MEGAscript® RNAi Kit, Cat. No. 1626.
- 85) Se cultivaron clones vegetativos de palmera amaranto resistente e glifosato con 16 copias del gen endógeno que codifica EPSPS (Gaines, et al. (2010) Proceedings of the National Academy of Sciences 107(3): 1029-1034) en pocillos cuadrados de 3,5 pulgadas con mezcla para plántulas SunGro® Redi-earth que contenía 3,5 kg/metro cúbico de fertilizante Osmocote® 14-14-14 en un invernadero con un fotoperíodo de 14 horas y una temperatura diurna de 30 grados centígrados y una temperatura nocturna de 20 grados centígrados; las plantas se regaron con agua desionizada según fuera necesario.
- 86) Se preparó una solución de pretratamiento de tensioactivo para bañar las hojas, diluyendo el tensioactivo de organosilicona de marca Silwet L-77 con agua destilada hasta 0,1% (v/v). Se preparó una solución de pretratamiento de carburo de silicio al 5% (p/v) mezclando 2 g de carburo de silicio (arena 400) en 40 ml de agua destilada. Se preparó una solución amortiguadora de tratamiento con 10 mM de fosfato de sodio y tensioactivo de organosilicona Silwet L-77 al 0,01% (v/v) en agua DEPC (Omega Bio-Tek) y se ajustó hasta pH 6,8. Se preparó una solución de ARNbc corto con cantidades equimolares de

cada uno de los cuatro ARNbc cortos (identificados anteriormente) en la solución amortiguadora de tratamiento a una concentración de 0,005 nanomoles de cada ARNbc corto por microlitro. Se preparó una solución de ARNbc largo con cantidades equimolares de cada uno de los tres ARNbc largos en la solución amortiguadora de tratamiento a una concentración de 0,0006 nanomoles de cada ARNbc largo por microlitro. Se preparó una solución mixta de ARNbc (corto/largo) con 0,005 nanomoles de cada uno de los cuatro ARNbc cortos y 0,0006 nanomoles de cada uno de los tres ARNbc largos por microlitro.

87) Los clones vegetativos de palmera amaranto resistente a glifosato con 16 copias del gen endógeno que codifica EPSPS se pretrataron con la solución de carburo de silicio o la solución de tensioactivo para acondicionar las hojas para transferir o permear los ARNbc. Para el pretratamiento con solución de carburo de silicio se llevó a cabo la abrasión de la hoja frotando suavemente 0,5 ml de la solución de carburo de silicio sobre la superficie superior de una hoja, se enjuagó con agua y se secó con papel secante. Para el pretratamiento con la solución de tensioactivo se sumergieron cuatro hojas fuente maduras, completamente expandidas en la solución de tensioactivo y se dejaron secar. Después del pretratamiento de la hoja con la solución de carburo de silicio o la solución de tensioactivo, las hojas acondicionadas se trataron con la solución amortiguadora (como testigo) o con 40 microlitros de una solución de ARNbc (aplicando 10 microlitros de solución de ARNbc en cada una de 4 hojas por planta). En el tratamiento con la solución de ARNbc corto se aplicaron aproximadamente 0,8 nanomoles de moléculas de ARNbc corto (0,2 nanomoles de cada ARNbc corto) a cada planta tratada. En el tratamiento con la solución de ARNbc largo se aplicaron aproximadamente 0,072 nanomoles de moléculas de ARNbc largo (0,024 nanomoles de cada ARNbc largo) a cada planta tratada. En el tratamiento con la solución mixta de ARNbc (corto/largo) se aplicaron aproximadamente 0,8 nanomoles de las moléculas de ARNbc corto y aproximadamente 0,072 nanomoles de las moléculas de ARNbc largo a cada planta tratada. Excepto los testigos, todas las plantas se pulverizaron con una solución de herbicida glifosato (1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX®) inmediatamente, 48 o 72 horas después del tratamiento con ARNbc y se evaluaron al menos después de 7 días postratamiento con glifosato.

Resultados:

88) Seis plantas testigo tratadas con tensioactivo (sin tratamiento con molécula de ARNbc) sobrevivieron al tratamiento con glifosato. Ver la Figura 3A que muestra una fotografía de las plantas 7 días después del tratamiento con glifosato.

- 89) Dos de cuatro plantas testigo tratadas con abrasión con carburo de silicio (sin tratamiento con molécula de ARNbc) murieron a causa del tratamiento con glifosato.
- 90) Seis plantas tratadas con tensioactivo que se trataron con glifosato inmediatamente después de la aplicación de la solución mixta de ARNbc (corto/largo) sobrevivieron pero presentaban enanismo.
- 91) Seis plantas tratadas con tensioactivo que se trataron solo con la solución mixta de ARNbc (corto/largo) y sin glifosato, sobrevivieron. Cinco de seis plantas tratadas con tensioactivo que se trataron con las soluciones mixtas de ARNbc (corto/largo) y posteriormente con tratamiento con glifosato, murieron.
- 92) Cinco de seis plantas tratadas con tensioactivo que se trataron con glifosato 48 horas después de la aplicación de la solución mixta de ARNbc (corto/largo) murieron.
- 93) Tres de cuatro plantas tratadas con carburo de silicio que se trataron con glifosato 48 horas después de la aplicación de la solución mixta de ARNbc (corto/largo) murieron.
- 94) Cinco de seis plantas tratadas con tensioactivo que se trataron con la solución de ARNbc largo y posteriormente con tratamiento con glifosato después de 72 horas, murieron; ver Figura 3B. Seis de seis plantas tratadas con tensioactivo que se trataron con la solución de ARNbc corto y posteriormente con tratamiento con glifosato después de 72 horas, murieron; ver Figura 3C.
- Ejemplo 2
- 95) Este ejemplo ilustra la utilidad de las moléculas polinucleotídicas de esta invención en la mejor del control de malezas sensibles al herbicida glifosato. Las soluciones mixtas de ARNbc (corto/largo) preparadas en el Ejemplo 1 se aplicaron a plantas de yute de china sensibles al glifosato (un total de 40 microlitros aplicados a dos hojas) que se pretrataron con la solución de tensioactivo utilizada en el Ejemplo 1. Las plantas testigo se trataron solo con solución amortiguadora luego del pretratamiento con la solución de tensioactivo. 48 horas después del tratamiento con ARNbc las plantas se trataron con una solución del herbicida glifosato (53 g de equivalente ácido por hectárea del herbicida glifosato de marca Roundup® WeatherMAX®). Se observó un aumento por duplicado de la actividad del glifosato según se estimó por la observación del crecimiento de la planta (medido como la altura de planta) en las plantas tratadas con la composición polinucleotídica y el herbicida en comparación con las plantas testigo tratadas con solución amortiguadora y herbicida. Las plantas tratadas con la composición polinucleotídica y el herbicida sobrevivieron con un enanismo grave; las plantas testigos tratadas con solución amortiguadora y herbicida sobrevivieron y se recuperaron completamente. Se obtuvieron

resultados similares con otras malezas sensibles al herbicida glifosato, es decir, amaranto tuberculoso, bleo, ambrosía gigante, lechuga espinaca, tabaco y diente de león.

Ejemplo 3

- 5 96) Este ejemplo ilustra la utilidad de las moléculas polinucleotídicas de esta invención en el control de malezas en cultivos transgénicos resistentes a glifosato. Se trataron plantas transgénicas de alfalfa, colza, maíz, algodón, arroz, soja, caña de azúcar y trigo que tienen ADN recombinante para expresar una EPSPS bacteriana (ver Patente de los Estados Unidos RE39.247 para ver la descripción de los genes de EPSPS "tipo II"
- 10 resistentes a glifosato) con (a) la solución de tensioactivo utilizada en el Ejemplo 1, (b) la solución mixta de ARNbc (corto/largo) preparada en el Ejemplo 1 y (c) una solución de herbicida glifosato (1682 g de equivalente ácido por hectárea de Roundup® WeatherMAX®) 48 horas después del tratamiento con ARNbc. Después de 30 días todas las plantas de cultivos transgénicos resistentes a glifosato sobrevivieron y no presentaron
- 15 enanismo.

Ejemplo 4

- 97) Este ejemplo ilustra la utilidad de las moléculas polinucleotídicas de esta invención como agentes herbicidas. Se diseñaron dos moléculas polinucleotídicas de ARNbc para
- 20 dirigirse a segmentos superpuestos de ARNm que codifican fitoeno desaturasa en tabaco (*Nicotiana benthamiana*). En referencia a la SEQ ID NO:2 y la Figure 5, un ARNbc dirigido a 192 nt de longitud (se muestra en negrita en la Figura 5) y a 685 nt de longitud (se muestra subrayado en la Figura 5) del ARNm se hizo utilizando un kit Ambion® MEGAscript®. Se prepararon solución de ARNbc separadas. Las hojas de planta de
- 25 tabaco se pretrataron con la solución de tensioactivo preparada tal como en el Ejemplo 1 y luego se trataron con uno de las soluciones de ARNbc aplicando aproximadamente 0,6 micromoles de ARNbc por planta. El día 9 después del tratamiento con ARNbc, el silenciamiento de la fitoeno desaturasa se evidenció a partir del blanqueado de hojas en hojas apicales; ver Figura 4. A los 15 días después del tratamiento con ARNbc una mitad
- 30 de las plantas tratadas parecía estar muerta y la otra mitad de las plantas tenía blanqueada la mayor parte de los tejidos por encima del suelo. El análisis de transferencia northern indica la presencia de los ARNip correspondientes a los ARNbc utilizados en el tratamiento.

35 Ejemplo 5

98) Este ejemplo ilustra adicionalmente la utilidad de las moléculas polinucleotídicas de esta invención como agentes herbicidas. Se diseñaron moléculas oligonucleotídicas de ARNbc para dirigirse a ARN que codifica EPSPS para cada una de las siguientes plantas: ambrosía común (*Ambrosia artemisiifolia*), ambrosía gigante (*Ambrosia trifida*), sorgo de Alepo (*Sorghum halepense*), rama negra (*Conzya bonariensis*), cola de zorro (*Digitaria insularis*), urochloa (*Urochloa panicoides*), Poinsettia salvaje (*Euphorbia heterophylla*), arocillo (*Echinochloa colona*), quínoa blanca (*Chenopodium album*), almorojo (*Setaria viridis*), moha (*Setaria italica*), amor de hortelano (*Echinochloa crus-galli*), digitaria (*Digitaria sanguinalis*), cadillo (*Xanthium strumarium*), alopecuro de campo (*Alopecurus myosuroides*), avena salvaje (*Avena fatua*), palo zorrillo (*Senna obtusifolia*), bejucos (*Ipomoea* sp.), correhuela (*Convolvulus arvensis*), sorgo (*Sorghum bicolor*), hierba del pollo (*Commelina*), amor de hombre (*Tradescantia* sp.), ryegrás (*Lolium* sp.), pata de ganso (*Eleusine indica*), cola de caballo (*Conzya canadensis*), llantén (*Plantago lanceolata*), palmera amaranto (*Amaranthus palmeri*), amaranto tuberculoso (*Amaranthus tuberculatus*), amaranto blanco (*Amaranthus albus*), quintonil (*Amaranthus hybridus*), abrebujó (*Amaranthus retroflexus*), cánamo común (*Amaranthus rudis/tuberculatus*), amaranto sudamericano (*Amaranthus viridis*), amaranto de Thunberg (*Amaranthus thubergii*), amaranto espinoso (*Amaranthus spinosus*), (*Amaranthus rubra*), (*Amaranthus lividus*), bleado (*Amaranthus graecizans*), alegría (*Amaranthus chlorostachys*), amaranto de Powell (*Amaranthus powellii*), cenizo (*Amaranthus blitoides*), rodadora (*Kochia scoparia*), abrepuño (*Centaurea solstitialis*) y abutilón (*Abutilon theophrasti*). Las hojas de la planta se pretrataron con la solución de tensioactivo preparada tal como en el Ejemplo 1 y se trataron con las soluciones de ARNbc a una tratamiento de aproximadamente 1 nanomol por planta. Después de 15 días las plantas tratadas murieron, están muriendo o presentan enanismo.

Ejemplo 6

99) Este ejemplo ilustra adicionalmente la utilidad de las moléculas polinucleotídicas de esta invención como agentes herbicidas. Se diseñaron moléculas oligonucleotídicas de ARNbc para dirigirse a ARN que codifica acetolactato sintasa y fitoeno desaturasa para cada una de las plantas indicadas en el Ejemplo 5. Las hojas de la planta se pretrataron con la solución de tensioactivo preparada tal como en el Ejemplo 1 y se trataron con las soluciones de ARNbc a una tratamiento de aproximadamente 1 nanomol por planta. Después de 15 días las plantas tratadas murieron, están muriendo o presentan enanismo.

72

Ejemplo 7

100) Este ejemplo ilustra adicionalmente la utilidad de las moléculas polinucleotídicas de esta invención como agentes herbicidas. El método del Ejemplo 4 se repite para proporcionar oligonucleótidos de ARNbc corto diseñados para dirigirse a ARN que codifica cada una de las siguiente proteínas en la palmera amaranto: una 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una acetil-coenzima A carboxilasa, una dihidropteroato sintasa, una protoporfirina IX oxigenasa, una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, una glutamina sintasa, proteína D1, un factor de iniciación de traducción (TIF), una ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO) y una ATPasa dependiente de ADN (ddATPasa). Las hojas de plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato separadas se trataron con la solución de tensioactivo preparada tal como en el Ejemplo 1 y por separado cada una con las moléculas oligonucleotídicas de ARNbc en la forma del Ejemplo 1 a una tratamiento de 1 nanomol de ARNbc por planta. Después de 30 días las plantas tratadas murieron, están muriendo o presentan enanismo.

Ejemplo 8

101) Este ejemplo ilustra la utilidad de emplear un gen Pol III sintético en composiciones y métodos de esta invención. En referencia a la SEQ ID NO:3 y la Figura 2, se creó un gen Pol III sintético utilizando elementos de un gen de ARNmc de U6 de Arabidopsis thaliana para proporcionar una molécula de ADNbc con dos copias de elementos RGCCCR (en **negrita y subrayado**), un elemento de secuencia hacia 5 (USE) que tiene la secuencia "TCCCACATCG" (SEQ ID NO:4, en **negrita y subrayada**), una secuencia TATA (en **negrita y subrayada**), un nucleótido "G" (en **negrita y subrayado**), ADN antisentido (en *cursiva*) correspondiente a una ADN bacteriano que codifica una proteína EPSPS (ver Patente de los Estados Unidos RE39.247) que imparte resistencia al herbicida glifosato cuando se expresa en plantas de maíz transgénicas, un elemento "AAGATTAGCACGG" (SEQ ID NO:5, en **negrita y subrayado**) incluido en el ADN antisentido, un elemento "ACGCATAAAAT" (SEQ ID NO:6, en **negrita y subrayado**) seguido por el ADN sentido (en minúsculas) y un elemento de terminación "TTTTTT" (SEQ ID NO:7, en **negrita y subrayado**). Se pulverizaron una solución de tensioactivo de organosilicona de marca Silwet L-77 al 0,1%p y una solución de múltiples copias de la molécula de ADNbc sobre las hojas de plantas espontáneas de maíz resistentes al glifosato que crecieron en un campo de plantas de soja resistentes al glifosato y posteriormente, 7 días después, se aplicó el tratamiento con el herbicida glifosato de marca Roundup WeatherMAX®. 15 días después las plantas de maíz murieron y las plantas de soja siguieron creciendo; las

73

plantas de maíz resistentes a glifosato testigo tratadas solo con tensioactivo y herbicida glifosato siguieron creciendo.

Ejemplo 9

- 5 102) Este ejemplo ilustra un aspecto de la invención. En este ejemplo, las moléculas polinucleotídicas se aplicaron y permearon en tejido vegetal induciendo así la regulación sistémica, es decir, el silenciamiento de un gen objetivo (una EPSPS endógena). Más específicamente, una composición que incluye oligonucleótidos de ADN monocatenario (ADNmc) suprimió la expresión de una EPSPS endógena en palmera amaranto tolerante
- 10 a glifosato (*Amaranthus palmeri*).
- 103) Los oligonucleótidos de ADNmc antisentido se diseñaron utilizando el programa informático IDT SciTools (disponible en idtdna.com/Scitools/Applications/Anti-sense/Anti-sense.aspx). Los oligonucleótidos incluían cuatro oligonucleótidos de ADNmc antisentidos para EPSPS de *Amaranthus palmeri* (SEQ ID NOs:8, 9, 10 y 11), dos
- 15 oligonucleótidos de ADNmc antisentido químicamente modificados (modificado con fosgorotioato) para EPSPS de *Amaranthus palmeri* (SEQ ID NOs:12 y 13) y un oligonucleótido de ADNmc antisentido testigo para un gen testigo, proteína de semilla de cebada (*Hordeum vulgare*), identificación de GenBank X97636 (SEQ ID NO:14) y un oligonucleótido de ADNmc antisentido químicamente modificado (marcado en 5' con Alexa
- 20 Fluor 488 de Invitrogen) para EPSPS de *Amaranthus palmeri* (SEQ ID NO:15), tal como se indica en la Tabla 1.

74

Tabla 1: Oligonucleótidos de ADNmc antisentido

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia (5' a 3')	Notas
Anti-sense_PO1	8	ACCCTCCACGACTGCCCTTT	
Anti-sense_PO2	9	GTTTCCTTCACTCTCCAGC	
Anti-sense_PO3	10	GTAGCTTGAGCCATTATTGT	
Anti-sense_PO4	11	GTTGATGGTAGTAGCTTGAG	
Anti-sense_PS1	12	ACCCTCCACGACTGCCCTTT	Modificación con fosforotioato de tres nucleótidos terminales en 5'-terminal de tres nucleótidos terminales en 3'
Anti-sense_PS2	13	GTTTCCTTCACTCTCCAGC	Modificación con fosforotioato de tres nucleótidos terminales en 5'-terminal de tres nucleótidos terminales en 3'
Anti-sense_ck	14	AAGCGGTTGAGCACTGAA	Secuencia testigo, proteína de semilla de cebada, identificación de GenBank X97636
Anti-sense_PO1_488	15	ACCCTCCACGACTGCCCTTT	Marcado en 5'con Alexa Fluor 488

104) La absorción de los oligonucleótidos se demostró con los oligonucleóitos de ADNmc marcados fluorescentmente (SEQ ID NO:15) que confirmaron que los oligonucleótidos de
5 ADNmc permearon el tejido de la hoja. Se colocaron peciolos de hojas arrancadas de

75

palmera amaranto resistente a glifosato en 200 mM de solución de sacarosa con oligonucleótidos de ADNmc marcados fluorescentemente (SEQ ID NO:15). Las imágenes de la hoja se obtuvieron con un generador de imágenes Bio-Rad PharosFX equipado con un láser de 488 nm de 4 h hasta 48 h después de la absorción a través del peciolo. Las

5 hojas se incubaron con 200 mM de sacarosa solo y sirvieron como testigo. Se observó una absorción vacuolar ligeramente dependiente del tiempo de los oligonucleótidos de ADNmc marcados fluorescentemente (ver Figura 6). Los oligonucleótidos de ADNmc marcados fluorescentemente se liberaron del tejido vacuolar hacia las células tan temprano como 8 h después del tratamiento y se observó que se acumularon en el borde

10 de la hoja a las 24 h y 48 h, lo que sugiere un efecto de la transpiración.

105) La supresión de EPSPS se demostró con hojas arrancadas de palmera amaranto resistente a glifosato utilizando la técnica de absorción del peciolo. Se colocaron peciolo de hojas arrancadas de palmera amaranto resistente a glifosato en 200 mM de solución de sacarosa con oligonucleótidos de acuerdo con los tratamientos indicados en la Tabla 2.

15 Las hojas testigo se permearon con el testigo antisentido (SEQ ID NO:14) y adicionalmente se trataron con o sin 50 microgramos/mL de glifosato. Se midieron los niveles de ARNm de EPSPS, proteína EPSPS y shiquimato después de 48 h de incubación. Para evaluar los efectos de los oligonucleótidos de ADNmc antisentidos sobre el ARNm de EPSPS, se aisló el ARN total de la hoja y se llevó a cabo una RT-PCR

20 en tiempo real cuantitativa para comparar los niveles de ARNm de EPSPS. Para evaluar los efectos de los oligonucleótidos de ADNmc antisentidos sobre la proteína EPSPS, se aisló la proteína soluble total de la hoja, se separó mediante SDS-PAGE y se midieron los niveles de proteína EPSPS mediante transferencia Western utilizando anticuerpos contra EPSPS_TIPA de maíz. Los efectos de los oligonucleótidos de ADNmc antisentidos sobre

25 la acumulación de shiquimato como un indicador de la supresión de la EPSPS se evaluaron en dos experimentos: en el experimento 1, las hojas tratadas con oligonucleótidos se incubaron con 50 microgramos/mL de glifosato durante 48 h adicionales mediante absorción de peciolo (las hojas testigo se permearon con el testigo antisentido (SEQ ID NO:14) y se trataron adicionalmente con o sin 50 microgramos/mL de

30 glifosato); en el experimento 2, se llevaron a cabo experimentos con discos de hoja en las hojas tratadas con oligonucleótidos y se midieron los niveles de shiquimato mediante HPLC (los testigos en este caso fueron hojas que no habían sido tratadas con oligonucleótidos pero se incubaron con 50 microgramos/mL de glifosato).

76

Tabla 2: Lista de tratamientos que utilizan oligonucleótidos de ADNmc antisentido

Tratamiento	ADNmc antisentido	Concentración final
No.1	Anti-sense_PO1 (SEQ ID NO:8)	5 microM
No.2	Anti-sense_PO2 (SEQ ID NO:9)	5 microM
No.3	Anti-sense_PS1 (SEQ ID NO:12)	5 microM
No.4	Anti-sense_PS2 (SEQ ID NO:13)	5 microM
No.5	Anti-sense_PS1, PS2 (SEQ ID NOs:12, 13)	10 microM cada uno (20 microM en total)
No.6	Anti-sense_PO1, PO2, PO3, PO4 (SEQ ID NOs:8, 9, 10, 11)	5 microM cada uno (20 microM en total)
Testigo	Anti-sense_ck (SEQ ID NO:14)	5 microM o 20 microM

106) Los resultados para expresión de ARNm de EPSPS, niveles de proteína EPSPS y niveles de shiquimato se muestran en las Figuras 7, 8 y 9, respectivamente. Estos resultados demuestran que el tratamiento con los oligonucleótidos de ADNmc antisentidos regularon o suprimieron sistémicamente el gen objetivo disminuyendo los niveles del transcrito del gen objetivo (ARNm de EPSPS) de la proteína (EPSPS) codificada por el gen objetivo en el tejido vegetal. En este experimento específico, los tratamientos No. 1 y No. 6 parecieron ser más eficaces en la supresión de los niveles de ARNm de EPSPS y proteína y en el aumento de la eficacia del glifosato, tal como se evidencia por la acumulación aumentada de shiquimato. Estos resultados también indican que la eficacia del glifosato mejora suprimiendo el ARNm de EPSPS y la proteína en la palmera amaranto resistente al glifosato.

Ejemplo 10

107) Este ejemplo ilustra un aspecto de la invención. En este ejemplo, se trataron plantas en crecimiento con una composición aplicada tópicamente para induir el silenciamiento sistémico de un gen objetivo en una planta que incluye (a) un agente para acondicionar una planta para la permeación de polinucleótidos y (b) polinucleótidos que incluyen al menos una cadena polinucleotídica que incluye al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos del gen objetivo en dirección antisentido o sentido. Más específicamente, se trataron plantas de tabaco (Nicotiana benthamiana) con (a) una solución de tensioactivo aplicada tópicamente para acondicionar la planta para la permeación de polinucleótidos y (b) una composición que incluye oligonucleótidos o

polinucleótidos de ADN aplicados tópicamente que tiene al menos una cadena que incluye al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos del gen objetivo en dirección antisentido o sentido, con la cual se logró la regulación o supresión sistémica del gen objetivo (una fitoeno desaturasa, "PDS").

- 5 108) El gen objetivo utilizado fue de una fitoeno desaturasa de *Nicotiana benthamiana* (SEQ ID NO:2), que se muestra en la Figura 10; el segmento que consistía en los nucleótidos 421 – 1120 de la SEQ ID NO:2 (texto subrayado en la Figura 10) se utilizó para diseñar un polinucleótido de ARNbc de 700-mer ("PDS 700-mer") y el segmento que consistía en los nucleótidos 914 – 1113 de la SEQ ID NO:2 (texto en negrita subrayado en
- 10 la Figura 10) se utilizó para diseñar un polinucleótido de ARNbc de 200-mer ("PDS 200-mer"). Las secuencias de otros polinucleótidos u oligonucleótidos utilizados en los tratamientos se indican en la Tabla 3. La Figura 11 representa esquemáticamente la ubicación de las secuencias de estos oligonucleótidos y polinucleótidos en relación con la secuencia de fitoeno sintasa (SEQ ID NO:2). Se utilizaron secuencias no vegetales
- 15 obtenidas del gusano de la raíz del maíz ("CRW"), SEQ ID NOs:27, 28, 29 y 30 como testigos no homólogos. Algunos de los polinucleótidos incluían una secuencia promotora de T7 (indicada por el texto en minúsculas en la Tabla 3) que es un promotor reconocido por una polimerasa de ARN del bacteriófago T7.

78

Tabla 3

Descripción	sentido/ antisentido	Secuencia	Cantidad de nucleótidos	SEQ ID NO:
oligo 1 con promotor de T7	C	taatacgactcactataggGCAAGAGATG TCCTAGGTGGG	40	16
oligo 2 con promotor de T7	C	taatacgactcactataggACAGATTTCTT CAGGAGAAACATGG	44	17
oligo 1 sin el promotor de T7	C	GCAAGAGATGTCCTAGGTGGG	21	18
oligo 2 sin el promotor de T7	C	ACAGATTTCTTCAGGAGAAACAT GG	25	19
mezcla oligo 3 con promotor de T7	NC	taatacgactcactataggCATCTCCTTTA ATTGTA CTGCC (SEQ ID NO:20) y taatacgactcactataggTTTAATTGTAC TGCCATTATTC (SEQ ID NO:21)	41 (SEQ ID NO:20), 41 (SEQ ID NO:21)	20, 21
mezcla oligo 3 sin el promotor de T7	NC	CATCTCCTTTAATTGTA CTGCC (SEQ ID NO:22) y TTTAATTGTA CTGCCATTATTC (SEQ ID NO:23)	22 (SEQ ID NO:22), 22 (SEQ ID NO:23)	22, 23
oligo 4 sin el promotor de T7	NC	CACTTCCATCCTCATT CAGCTCGA T	25	24
oligo 5 sin el promotor de T7	NC	ACACCTCATCTGTCACCCTATCA G	24	25
oligo 6 sin el promotor de T7	NC	CAGTCTCGTACCAATCTCCATCAT	24	26

78

mezcla CRW oligo con promotor de T7	C y NC	taatacgactcactatagggATCCATGATA TCGTGAACATC (SEQ ID NO:27) y taatacgactcactatagggGCAAAGAAA AATGCGTCG (SEQ ID NO:28)	41 (SEQ ID NO:27), 38 (SEQ ID NO:28)	27, 28
mezcla CRW oligo sin promotor de T7	C y NC	ATCCATGATATCGTGAACATC (SEQ ID NO:29) y GCAAAGAAAAATGCGTCG (SEQ ID NO:29)	21 (SEQ ID NO:29), 18 (SEQ ID NO:30)	29, 30

- 109) El siguiente procedimiento se utilizó para todos los ensayos descritos en este ejemplo. Se utilizaron plantas de *Nicotiana benthamiana* con cuatro semanas en todos los ensayos. Las plantas se trataron con solución de Silwet L-77 al 0,1% hecho recientemente con H2O bidestilada. Se sumergieron dos hojas completamente expandidas por planta (un cotiledón, una hoja verdadera) en la solución de Silwet L-77 durante poco segundos y se dejaron secar durante 15-30 minutos antes de la aplicación de la composición polinucleotídica. La concentración final para cada oligonucleótido o polinucleótido fue 25 microM (en Silwet L-77 al 0,01% , 5 mM de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 6,8) a menos que se indique lo contrario. Se aplicaron 20 microlitros de la solución a la superficie superior de cada una de las dos hojas pretratadas para proporcionar un total de 40 microlitros (1 nmol de oligonucleótido o polinucleótido) para cada planta. El blanqueado de la hoja se observó 3 días postratamiento.
- 110) La Figura 12A ilustra los resultados de un ensayo donde se aplicaron por separado un polinucleótido de ARNbc de 200-mer con una secuencia de ARN correspondiente al segmento "PDS 200-mer" (nucleótidos 914 – 1113 de la SEQ ID NO:2) y una combinación de oligonucleótidos y polinucleótidos de ADN monocatenario (SEQ ID NOs:16, 17, 20, 21, 24, 25 y 26) a plantas de tabaco. El polinucleótido de ARNbc de 200-mer se aplicó a una concentración de 0,6 microM. El blanqueado de las hojas aplicales se observó después del tratamiento tópico con los polinucleótidos y oligonucleótidos, indicando la regulación o supresión sistémica del gen de fitoeno desaturasa objetivo.
- 111) La Figura 12B ilustra los resultados del análisis de transferencia northern de ARN aislado a partir de plantas *Nicotiana benthamiana* tratadas con solución amortiguadora (testigo), el polinucleótido de ARNbc de 200-mer y los oligonucleótidos de ADNmc. También se muestra el ARN aislado a partir de plantas que se habían estresado

manteniéndolas a 4 grados Celsius y en la oscuridad durante toda la noche antes del tratamiento con los polinucleótidos de ARNbc de 200-mer.

- 112) La Figura 13 ilustra los fenotipos observados el día 12 después del tratamiento en otro ensayo del efecto de doce combinaciones de polinucleótidos u oligonucleótidos (ver
- 5 Tabla 4). La Tabla 4 también indica observaciones de blanqueado visible de las plantas el día 5 después del tratamiento y los resultados de las mediciones de clorofila llevadas a cabo los días 7 y 12 después del tratamiento. Las mediciones de clorofila son un indicador de la supresión de la fitoeno desaturasa del gen objetivo y las mediciones que se llevaron a cabo en 6 lugares del área apical, enfocándose en hojas visiblemente blanqueadas o
- 10 (en plantas sin blanqueado visible) en hojas en ubicaciones equivalentes en las plantas; los valores de medición de clorofila más bajos indicaron supresión de la fitoeno desaturasa. Estos resultados muestran que las combinaciones de oligonucleótidos y polinucleótidos en los tratamientos 2, 3, 4, 8 y 11 fueron eficaces para regular (suprimir) sistemáticamente el gen objetivo en las plantas tratadas; el tratamiento 1 también produjo
- 15 la regulación (supresión) sistemática del gen objetivo en menor medida. El polinucleótido de ARNbc de 200-mer también fue eficaz para regular (suprimir) sistemáticamente el gen objetivo en las plantas tratadas. Los oligonucleótidos de un gen no homólogo (gusano de la raíz de maíz) (tratamientos 5 y 6) no suprimieron el gen de la fitoeno desaturasa objetivo. Estos resultados demuestran que los oligonucleótidos y polinucleótidos de ADN
- 20 monocatenario sentidos y antisentido fueron eficaces para regular (suprimir) sistemáticamente el gen objetivo en las plantas tratadas. En este ejemplo específicos, los oligonucleótidos sentidos con el promotor de T7 (tratamiento 1) produjeron una supresión sistemática débil del gen de la fitoeno desaturasa, mientras que los oligonucleótidos sentidos sin el promotor de T7 (tratamiento 7) no suprimió el gen de la fitoeno desaturasa.
- 25 In este ejemplo específico, los oligonucleótidos antisentido con el promotor de T7 (tratamiento 2) así como los oligonucleótidos antisentido sin el promotor de T7 (tratamiento 8) proporcionaron un blanqueado intenso, indicando una regulación sistémica fuerte del gen de la fitoeno desaturasa objetivo.

81

Tabla 4

Tratamiento	Descripción	SEQ ID NO:	Comentario	Blanqueado (día 5)	Clorofila a (día 7)	Clorofila (día 12)
1	Oligos 1 y 2	16, 17	Oligos sentidos con promotor de T7	débil	18,6	17,5
2	Oligo 3	20, 21	Oligos antisentido con promotor de T7	intenso	12,7	1,6
3	Oligos 1, 2 y 3	16, 17, 20, 21	Oligos sentidos y antisentido con promotor de T7	intenso	11,5	2,6
4	Oligos 1, 2, 3, 4, 5 y 6	16, 17, 20, 21, 24, 25, 26	Oligos sentidos y antisentido con promotor de T7, más oligos antisentido sin promotor de T7	intenso	15,1	2,5
5	mezcla CRW oligo con promotor de T7	27, 28	Oligos sentidos y antisentido con promotor de T7	todavía no	30,8	37,3
6	mezcla CRW oligo sin promotor de	29, 30	Oligos sentidos y antisentido sin promotor de	todavía no	34,2	38,2

	T7		T7			
7	Oligos 1 y 2 sin promotor de T7	18, 19	Oligos sentidos sin promotor de T7	todavía no	32,0	41,1
8	Oligo 3 sin promotor de T7	22, 23	Oligos antisentido sin promotor de T7	intenso	11,3	3,2
9	Oligos 1, 2 y 3 sin promotor de T7 y oligos 4, 5 y 6	18, 19, 22, 23, 24, 25, 26	Oligos sentidos y antisentido sin promotor de T7	todavía no	30,2	34,4
10	Polinucleótido de ARNbc de 200-mer	Secuencia de ARN correspondiente al segmento "PDS 200-mer" que consiste en los nucleótidos 914 – 1113 de la SEQ ID NO:2	Polinucleótido de ARNbc sentido y antisentido	intenso	11,3	4,0

83

11	Mezcla de oligonucleódtidos 1/10º del Experimento 4	16, 17, 20, 21, 24, 25, 26	Oligos sentidos y antisentido con promotor de T7, más oligos antisentido sin promotor de T7	intenso	11,4	4,5
12	Mezcla de oligonucleódtidos 1/100º del Experimento 4	16, 17, 20, 21, 24, 25, 26	Oligos sentidos y antisentido con promotor de T7, más oligos antisentido sin promotor de T7	todavía no	31,0	38,0
13	Testigo	(ninguna)	Solo solución amortiguadora	todavía no	31,2	38,4

113) La Tabla 5 muestra seis polinucleótidos: un segmento de 40-mer ("PDS 40-mer sense ssDNA", SEQ ID NO:31) que consiste en los 40 nucleótidos más hacia 5' de la "PDS 700-mer" (nucleótidos 1081 – 1120 de la SEQ ID NO:2) y cuatro polinucleótidos de ADN monocatenario antisentido y un polinucleótido de ADN monocatenario sentido sintetizado en base a la secuencia "PDS 40-mer sense ssDNA" (SEQ ID NO:31). La Figura 14 ilustra los resultados del tratamiento tópico de plantas de tabaco con los polinucleótidos y oligonucleótidos. Se observó un blanqueado intenso de las hojas apicales que indica la regulación o supresión sistémica del gen objetivo de la fitoeno desaturasa después del tratamiento tópico con el ADNmc antisentido de 21 mer de PDS y el ADNmc antisentido de 33 mer de PDS, así como también después del tratamiento tópico con el polinucleótido de ARNbc de 700 mer aplicado por PCR y purificado en columna ("PDS 700-mer dsRNA"), oligonucleótidos de 22 mer antisentido de PDS sometidos a ensayo previamente con un promotor de T7 (SEQ ID NOs:20 and 21) ("PDS T7 anti-sense") o oligonucleótidos de 22 mer antisentido de PDS sometidos a ensayo previamente sin un promotor de T7 (SEQ ID NOs:22 y 23) ("PDS anti-sense"). No se observó o se observó poco blanqueado de las hojas aplicales después del tratamiento

84

tópico solo con la solución amortiguadora ("Buffer") o después del tratamiento tópico con polinucleótido de ARNbc de 700 mer desnaturalizados por calor (5 minutos a 95 grados Celsius, a continuación almacenados sobre hielo) ("PDS 700-mer dsRNA heated"), el ADNmc antisentido de 15 mer de PDS o el ADNmc antisentido de 18 mer de PDS .

5 Tabla 5

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO:
ADNmc antisentido de 40-mer de PDS	TGTTTTATACTGAATAATGGCAGTACAATTAAAG GAGATG	31
ADNmc antisentido de 15-mer de PDS	CATCTCCTTTAATTG	32
ADNmc antisentido de 18-mer de PDS	CATCTCCTTTAATTGTAC	33
ADNmc antisentido de 21-mer de PDS	CATCTCCTTTAATTGTACTGC	34
ADNmc antisentido de 33-mer de PDS	CATCTCCTTTAATTGTACTGCCATTATTCAGTA	35
ADNmc sentido de 21-mer de PDS	GCAGTACAATTAAAGGAGATG	36

114) Los resultados de otro ensayo se muestran en la Figura 15, se observó un blanqueado de las hojas apicales indicando una regulación o supresión sistémica del gen objetivo de la fitoeno desaturasa después del tratamiento tópico con el ADNmc antisentido de 21 mer de PDS (SEQ ID NO:34, "21nt PDS anti-sense") o con oligonucleótidos de 22 mer antisentido de PDS sometidos a ensayo previamente sin un promotor de T7 (SEQ ID NOs:22 y 23) ("PDS anti-sense"). No se observó o se observó un blanqueado de hojas apicales poco visible después del tratamiento tópico solo con la solución amortiguadora



("control: buffer") o después del tratamiento tópico con ADNmc sentido de 21 mer de PDS (SEQ ID NO:36, "21nt PDS sense").

Ejemplo 11

- 5 115) Este ejemplo ilustra el tratamiento de plantas en crecimiento con una composición aplicada tópicamente para inducir el silenciamiento sistémico de un gen objetivo en una planta que incluye (a) un agente para acondicionar una plant a la permeación de polinucleótidos y (b) polinucleótidos que incluyen al menos una cadena polinucleotídica que incluye al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos del gen objetivo en
- 10 dirección antisentido o sentido. Más específicamente, este ejemplo demuestra la especificidad objetivo (especificidad secuencial) de los polinucleótidos.
- 116) La fitoeno desaturasa de palmera amaranto (PDS) tiene la secuencia
- 15 TCAATTTTCATCTATTGGAAGTGATTTTTGGGTCATTCTGTGAGAAATTCAGTGTTAG
TAAAGTTTATGGAGCAAAGCAAAGAAATGGGCACTGCCCTTTAAAGGTTGTTTGTATA
GATTATCCTAGGCCAGAGCTTGAAAGTACATCCAATTTCTTGGAAGCCGCCTACTTAT
CTTCTACTTTTCGGAATTCGCCTCGTCCTCAGAAGCCATTAGAAGTTGTAATTGCTGG
AGCAGGTTTGGCTGGTCTATCCACGGCAAAGTATTTAGCTGATGCAGGTCACAAACC
CATATTGTTGGAAGCACGAGATGTTTAGGAGGAAAGGTTGCAGCGTGGAAGGATGA
GGATGGTGACTGGTATGAGACTGGGCTACATATATTCTTTGGGGCATATCCAAATGTC
20 CAAAATCTATTTGGAGAACTTGGTATAAATGACCGACTGCAATGGAAGGAGCACTCTA
TGATTTTTGCAATGCCCAGCAAGCCCGGTGAATTCAGTCGCTTTGATTTCCCGAAAT
CCTGCCTGCACCATTAATGGCATATGGGCAATCCTAAGAAATAATGAAATGCTAACC
TGGCCAGAAAAAATCAAGTTTGCCATTGGCTTGTTGCCTGCTATGGCAGGCGGACAG
TCATATGTTGAAGCACAAGATGGTTTGAGTGTCCAAGAGTGGATGAGAAAACAAGGA
25 GTACCCGATCGTGTAAGTGAAGTGTGTTTATTGCCATGTCAAAGGCACTGAACTTCA
TAAATCCCGATGAACTTTCAATGCAGTGCATCTTGATTGCTCTGAACCGATTCTGCA
GGAGAAACATGGTTCTAAGATGGCCTTCCTAGACGGAAACCCTCCAGAGAGGCTGTG
CATGCCTATTGTTAAACACATCGAGTCACTAGGTGGTGAAGTTAACTTAACTCTCGT
ATACAAAAGATTGAGTTGGACCAGAGTGGAAGCGTGAAGAGTTTTTGCTAAATAACG
30 GGAGGGAAATACGAGGAGATGCCTATGTTTTTGCCACCCAGTTGACATCTTGAAGC
TGTTACTACCTGATACTTGGAAGGAAATCTCATACTTCAAAAACTTGAGAAATTAGTG
GGCGTTCCTGTGATTAATGTTACATATGGTTTGACAGAAAATTAAGAATACATATGA
CCATCTACTCTTCAGCAGGAGTCCTCTTTGAGTGTCTATGCTGATATGTCGGAGACA
TGCAAGGAATATAAGGATCCAAATAGATCCATGCTGGAATTGGTTTTTGACCCGCGG
35 AGGAATGGATTTACGAAGCGACACTGATATTATAGAGGCAACAATGAAAGAGCTTGC

86

CAAGCTTTTCCCGGATGAAATCGCTGCCGATGGAAGCAAGGCCAAGATCCTCAAATA
 TCATGTTCGTCAAACTCCAAGGTCGGTTTATAAGACTGTACCGGATTGTGAACCTTGT
 CGGCCGCTGCAAAGATCACCAATAGAGGGTTTCTATTTAGCTGGTGATTACACAAAAC
 AAAAATATTTGGCTTCTATGGAAGGTGCTGTCTTATCTGGGAAGCTTTGTGCACAGGC
 5 TATCGTACAGGATTATGATCTGCTGAGTTCTCGAGCACAAAGAGAATTGGCG (SEQ ID
 NO:37). Se sintetizaron un polinucleótido de ARNbc de 678 pares de bases con una
 cadena antisentido capaz de hibridar con el ARN codificado por los nucleótidos en las
 posiciones 317 – 994 (se muestran como texto subrayado) en la SEQ ID NO:37 y un
 polinucleótido de ARNbc de 198 pares de bases con una cadena antisentido capaz de
 10 hibridar con el ARN codificado por los nucleótidos en las posiciones 797 – 994 (se
 muestran como texto en cursiva y subrayado) en la SEQ ID NO:37.

117) La fitoeno desaturasa de *Nicotiana benthamiana* tiene la secuencia
 ATGCCCCAAATCGGACTTGTATCTGCTGTTAATTTGAGAGTCCAAGGTAATTCAGCTT
 ATCTTTGGAGCTCGAGGTCTTCGTTGGGAACTGAAAGTCAAGATGTTTGCTTGCAAAG
 15 GAATTTGTTATGTTTTGGTAGTAGCGACTCCATGGGGCATAAGTTAAGGATTCGTA
 CCAAGTGCCACGACCCGAAGATTGACAAAGGACTTTAATCCTTTAAAGGTAGTCTGCA
 TTGATTATCCAAGACCAGAGCTAGACAATACAGTTAACTATTTGGAGGCGGCGTTATT
 ATCATCATCGTTTCGTAATTCCTCACGCCAACTAAACCATTGGAGATTGTTATTGCTG
 GTGCAGGTTTGGGTGGTTTGTCTACAGCAAAATATCTGGCAGATGCTGGTCACAAAC
 20 CGATATTGCTGGAGGCAAGAGATGTCCTAGGTGGGAAGGTAGCTGCATGGAAAGATG
ATGATGGAGATTGGTACGAGACTGGGTTGCACATATTCTTTGGGGCTTACCCAAATAT
GCAGAACCTGTTTGGAGAACTAGGGATTGATGATCGGTTGCAGTGGAAGGAACATTC
AATGATATTTGCGATGCCTAACAAGCCAGGGGAGTTCAGCCGCTTTGATTTTCCTGAA
GCTCTTCCTGCGCCATTAAATGGAATTTTGGCCATACTAAAGAACAACGAAATGCTTA
 25 CGTGGCCCGAGAAAGTCAAATTTGCTATTGGACTCTTGCCAGCAATGCTTGGAGGGC
AATCTTATGTTGAAGCTCAAGACGGTTTAAGTGTTAAGGACTGGATGAGAAAGCAAGG
TGTGCCTGATAGGGTGACAGATGAGGTGTTTCATTGCCATGTCAAAGGCACTTAACTTC
ATAAACCCCTGACGAGCTTTCGATGCAGTGCATTTTGATTGCTTTGAACAGATTTCTTCA
GGAGAAACATGGTTCAAAAATGGCCTTTTTAGATGGTAACCCTCCTGAGAGACTTTGC
 30 ATGCCGATTGTGGAACATATTGAGTCAAAAGGTGGCCAAGTCAGACTAACTCACGAA
TAAAAAAGATCGAGCTGAATGAGGATGGAAGTGTCAAATGTTTTATACTGAATAATGG
CAGTACAATTAAGGAGATGCTTTTGTGTTTGCCACTCCAGTGGATATCTTGAAGCTT
 CTTTTGCCTGAAGACTGGAAAGAGATCCCATATTTCCAAAAGTTGGAGAAGCTAGTGG
 GAGTTCCTGTGATAAATGTCCATATATGGTTTGACAGAAAACGAAGAACACATCTGA
 35 TAATCTGCTCTTCAGCAGAAGCCCGTTGCTCAGTGTGTACGCTGACATGTCTGTTACA

TGTAAGGAATATTACAACCCCAATCAGTCTATGTTGGAATTGGTATTTGCACCCGCAG
AAGAGTGGATAAATCGTAGTGAAGTCTAGTAAATTATTGATGCTACAATGAAGGAACTAGC
GAAGCTTTTCCCTGATGAAATTTTCGGCAGATCAGAGCAAAGCAAAAATATTGAAGTAT
CATGTTGTCAAAACCCCAAGGTCTGTTTATAAACTGTGCCAGGTTGTGAACCCTGTC
5 GGCCCTTGCAAAGATCCCCTATAGAGGGTTTTTATTTAGCTGGTGAAGTACACGAAACA
GAAGTACTTGGCTTCAATGGAAGGTGCTGTCTTATCAGGAAAGCTTTGTGCACAAGCT
ATTGTACAGGATTACGAGTTACTTCTTGGCCGGAGCCAGAAGATGTTGGCAGAAGCA
AGCGTAGTTAGCATAGTGAAGTAA (SEQ ID NO:38). Se sintetizaron un polinucleótido
de ARNbc de 685 pares de bases con una cadena antisentido capaz de hibridar con el
10 ARN codificado por los nucleótidos en las posiciones 421 – 1105 (se muestran como texto
subrayado) en la SEQ ID NO:38 y un polinucleótido de ARNbc de 192 pares de bases con
una cadena antisentido capaz de hibridar con el ARN codificado por los nucleótidos en las
posiciones 914 – 1105 (se muestran como texto en cursiva y subrayado) en la SEQ ID
NO:38.

15 118) Se llevó a cabo una alineación de las secuencias de ADN de PDS de palmera
amaranto y Nicotiana benthamiana utilizando una alineación en pares global (extensor) y
se ilustra en la Figura 16; con este método las dos secuencias exhibieron
aproximadamente 71% de identidad (1252/1762).

20 119) Las plantas de palmera amaranto que tenían 16 copias de EPSPS y 5 – 8 pulgadas
de altura se trataron con una solución de Silwet L-77 al 0,1% preparada recientemente
con H2O bidestilada. Se sumergieron cuatro hojas completamente expandidas por planta
en la solución de Silwet L-77 durante pocos segundos y se dejaron secar durante 30
minutos hasta 1 hora antes de la aplicación de la composición polinucleotídica. Se
hicieron soluciones individuales de polinucleótidos para cada uno de ARNbc de PDS de
25 palmera de 678 bp, ARNbc de PDS de palmera de 198 bp, el ARNbc de PDS de Nicotiana
benthamiana de 685 bp y el ARNbc de PDS de Nicotiana benthamiana de 192 bp (0,6
micromolares de polinucleótido en Silwet L-77 al 0,01%, 5 mM de solución amortiguadora
de fosfato de sodio, pH 6,8). Se aplicaron 10 microlitros de solución de polinucleótido (o
solución amortiguadora como testigo) sobre la superficie superior de cada una de las
30 cuatro hojas pretratadas por planta para proporcionar un total de 40 microlitros para cada
planta. Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento y el blanqueado de
hojas se observó 3 días postratamiento. Las plantas tratadas tópicamente con ARNbc de
PDS de palmera de 678 bp o ARNbc de PDS de palmera de 198 bp, exhibieron
blanqueado de hojas (que indica silenciamiento de la fitoeno desaturasa endógena) pero
35 las plantas de palmera amaranto tratadas tópicamente con ARNbc de PDS de Nicotiana

benthamiana de 685 bp o ARNbc de PDS de *Nicotiana benthamiana* de 192 bp no exhibieron blanqueado de hojas. Esta especificidad secuencial demuestra que las composiciones polinucleotídicas y métodos de la invención son útiles para el control selectivo de una especie o taxón dado que tiene una secuencia de gen objetivo específica, por ejemplo, para el control de plantas espontáneas resistentes a herbicidas que crecen en una campo de plantas de cultivo resistentes al mismo herbicida.

120) En un ensayo aparte, las plantas de palmera amaranto tratadas tópicamente con ARNbc de PDS de palmera 678 bp (marcados como "700 nt dsRNA PDS") o ARNbc de PDS de palmera de 198 bp (marcados como "200 nt dsRNA PDS") exhibieron blanqueado de hojas (que indica el silenciamiento de la fitoeno desaturasa endógena) pero las plantas de palmera amaranto tratadas tópicamente con un ARNbc de 260 pares de bases de un gen invertebrado (marcado como "260 nt dsRNA DV49", del gusano de la raíz de maíz *Diabrotica virgifera*) no resultaron en un fenotipo blanqueado, indicando que no hubo silenciamiento de la fitoeno desaturasa endógena (Figura 17). Esta especificidad secuencial demuestra que las composiciones polinucleotídicas y los métodos de la invención son útiles para el control selectivo de una especie o taxón dado.

Ejemplo 12

121) Este ejemplo describe el use de una composición aplicada tópicamente que incluye al menos una cadena polinucleotídica que incluye al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos de un gen objetivo en dirección antisentido o sentido para inducir el silenciamiento sistémico de un gen objetivo en una planta. Más específicamente, este ejemplo demuestra el uso de un único tratamiento con un oligonucleótido de fitoeno desaturasa (PDS) para inducir el silenciamiento sistémico en diferentes órganos vegetales incluidos hojas, tallos y flores.

122) Se utilizaron plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) con cuatro semanas en todos los tratamientos. Se acondicionaron dos hojas completamente expandidas (un cotiledón, una hoja verdadera) sumergiéndolas en solución de tensioactivo preparada recientemente (Silwet L-77 al 0,1% en agua bidestilada) durante pocos segundos y se dejaron secar durante 15 – 30 minutos. Se aplicaron veinte microlitros de un oligonucleótido de 22 mer de ADN monocatenario (ADNmc) con la secuencia GGCAGTACAATTAAAGGAGATG (SEQ ID NO:39), correspondiente a los nucleótidos en las posiciones 1099 – 1120 de la fitoeno desaturasa de *Nicotiana benthamiana* (SEQ ID NO:2) como 25 micromolares de solución de 0,01% de Silwet L-77 en 5 milimolares de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 6,8 sobre la superficie superior de cada

hoja acondicionada para un total de 40 microlitros (1 nanomol de oligonucleótido) por planta. Las plantas testigo se trataron con la solución de Silwet sin el oligonucleótido de ADN. Las plantas se observaron para determinar el blanqueado 3 días postratamiento. Las hojas apicales, tallos y flores de plantas tratadas con el oligonucleótido de ADN exhibieron todos blanqueado indicando el silenciamiento sistémico de PDS (Figura 18A).

123) Se dejó que las flores de las plantas tratadas con ADNmc y testigo produjeran semillas. Se recogieron semillas de frutas maduras, se pesaron y se dejaron germinar. Los pesos de las semillas eran idénticos (aproximadamente 11 mg por 100 semillas) y la morfología de la semilla parecía similar entre las plantas tratadas con ADNmc y las testigo. Se observó una cantidad reducida de semillas producidas por fruta y una reducción en la tasa de germinación (4 de 100 semillas germinaron) en semillas de las plantas tratadas con ADNmc, en comparación con la cantidad de semillas por fruta y tasa de germinación (95 de 100 semillas germinadas) de semillas de plantas testigo.

124) En un ensayo aparte utilizando un procedimiento similar, se acondicionaron plantas de tabaco sumergiéndolas en Silwet L-77 al 0,1% en agua bidestilada, se dejaron secar durante 15 – 30 minutos y se trataron con ADNmc de 22 mer de PDS (SEQ ID NO:39) aplicado como 25 micromolares de solución de 0,01% de Silwet L-77 en 5 milimolares de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 6,8 sobre la superficie superior de cada hoja acondicionada para un total de 40 microlitros (1 nanomol de oligonucleótido) por planta. Otras plantas no se acondicionaron con tratamiento de tensioactivo pero se trataron solo con 1 nanomol del ADNmc de 22 mer de PDS (SEQ ID NO:39) aplicado mediante infiltración con una jeringa sin aguja (se muestra en la Figura 18B) o mediante aplicación manual de gotas sobre la superficie de la hoja (no se muestra en la Figura 18B) y como 25 micromolares de solución de 0,01% de Silwet L-77 en 5 milimolares de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 6,8 o como 25 micromolares de solución en 5 milimolares de una solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 6,8 (sin tensioactivo). Las plantas control negativo se trataron con la solución amortiguadora de Silwet sin el oligonucleótido de ADN. Los resultados se muestran en la Figura 18B. Todas las plantas tratadas solo con aplicación directa del ADNmc de PDS (sin acondicionamiento mediante tratamiento con tensioactivo Silwet L-77), ya sea aplicado por infiltración o por aplicación manual de gotas, exhibieron blanqueado de hojas apicales, tallos y flores, indicando el silenciamiento sistémico de PDS.

Ejemplo 13

125) Este ejemplo ilustra métodos y composiciones aplicadas tópicamente para inducir el silenciamiento sistémico que incluye el uso de agentes para acondicionar una planta para

- la permeación de polinucleótidos. Más específicamente, este ejemplo describe el uso de polinucleótidos de la invención para controlar la palmera amaranto resistente a herbicidas.
- 126) Las plantas de palmera amaranto que tienen una cantidad menor (menos de 30) de copias de 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) son susceptibles al
- 5 tratamiento con ARNbc diseñado para silenciar la EPSPS con posterior tratamiento con glifosato (ver detalles en el Ejemplo 1). Sin embargo, las plantas de palmera amaranto que tienen grandes cantidades de copias de EPSPS (es decir, 30 o más copias de EPSPS) son resistentes al tratamiento con glifosato y son un desafío la gestión de la resistencia a malezas. Por ejemplo, en un ensayo (no se muestran los resultados) en
- 10 palmera amaranto resistente a glifosato con gran cantidad de copias utilizando tratamientos similares a los descritos en el Ejemplo 1 pero donde se aumentó la dosis de ARNbc hasta diez veces (es decir, 8 nanomoles de ARNbc corto descrito en el Ejemplo 1 por planta) o donde se utilizó una formulación de glifosato patentada ("Roundup® WeatherMAX® brand herbicide") combinada con un tensioactivo de amina de cebo, la
- 15 actividad del glifosato mejoró (estimada mediante la observación del crecimiento de la planta medido por la altura de la planta) pero las plantas resistentes no murieron.
- 127) Se trataron tres líneas diferentes de palmera amaranto resistente a glifosato con gran cantidad de copias (3 plantas por repetición) con ARNbc utilizando las condiciones de tratamiento indicadas en la Tabla 6, donde el vehículo de administración de ARNbc, el
- 20 agente de permeabilización o acondicionamiento y otras etapas se variaron. Los resultados se muestran en la Figura 19. El tratamiento con glifosato "4X" (es decir, tratamiento con 3360 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX® que es cuatro veces mayor a la tasa estándar de aplicación de 840 g equivalente ácido por hectárea) solo no mató la palmera amaranto con 35 copias
- 25 (experimento 3) ni con 57 copias (experimento 6).
- 128) En un conjunto de experimentos (1 – 3, Tabla 6), que incluyen sulfato de amonio al 2% en un vehículo de administración de ARNbc acuoso que comprende tensioactivo de amina de cebo al 0,1% y glicerol al 10% (experimento 2) se mejoró la eficacia de una dosis 10 veces mayor de ARNbc con posterior aplicación de un glifosato 4X. También se
- 30 observó una eficacia mejorada de una dosis 10 veces mayor de ARNbc con posterior aplicación de glifosato cuando se incluyó sulfato de amonio en un vehículo de administración ARNbc sin un tensioactivo de amina de cebo (experimento 8).
- 129) En otro conjunto de experimentos (4 – 6, Tabla 6), la aplicación del tensioactivo Silwet L-77 antes de la aplicación del ARNbc en un vehículo de administración que
- 35 contiene sulfato de amonio fue eficaz, mientras que la combinación del surfactante Silwet

91

L-77 con el ARNbc en el vehículo de administración de ARNbc que contenía sulfato de amonio no fue eficaz. La aplicación de glifosato ("Roundup® WeatherMAX® brand herbicide") a las 72 horas (experimento 7) fue menos eficaz que la aplicación de glifosato a las 48 horas (experimento 2) después del tratamiento con ARNbc.

5 Tabla 6

Línea de palmera amaranto	Cantidad de copias de EPSPS	Número de experimento	Paso 1		Paso 2	Paso 3*
			Concentración relativa de EPSPS ARNbc	Vehículo de administración de ARNbc		
R31	35	1	10X	0,1% de tensioactivo de amina de cebo + 10% de glicerol	1% de Silwet L-77	4x WeatherMAX (48 h)
		2	10X	2% de sulfato de amonio + 0,1% de tensioactivo de amina de cebo + 10% de glicerol	1% de Silwet L-77	4x WeatherMAX (48 h)
		3	Solo solución amortiguadora (testigo)	2% de sulfato de amonio + 0,1% de tensioactivo de amina de cebo + 10% de glicerol	1% de Silwet L-77	4x WeatherMAX (48 h)
Línea de palmera	Cantidad de copias	Número de experi	Paso 1	Paso 2		Paso 3*
				Concentración relativa de	Vehículo de	

92

a amaran to	de EPSPS	mento		EPSPS ARNbc	administr ación de ARNbc	
R34	57	4	--	10X	1% de Silwet L- 77 + 2% de sulfato de amonio	4x WeatherMA X (48 h)
		5	1% de Silwet L- 77	10X	2% de sulfato de amonio	4x WeatherMA X (48 h)
		6	1% de Silwet L- 77	Solo solución amortiguadora (testigo)	2% de sulfato de amonio	4x WeatherMA X (48 h)
Línea de palmer a amaran to	Cantida d de copias de EPSPS	Núme ro de experi mento	Paso 1		Paso 2	Paso 3*
			Concentra ción relativa de EPSPS ARNbc	Vehículo de administración de ARNbc		
R28	87	7	10X	2% de sulfato de amonio + 0,1% de tensioactivo de amina de cebo + 10% de glicerol	1% de Silwet L- 77	4x WeatherMA X (72 h)
Línea de palmer	Cantida d de copias	Núme ro de experi	Paso 1	Paso 2		Paso 3*
				Concentració n relativa de	Vehículo de	

a amaran to	de EPSPS	mento		EPSPS ARNbc	administr ación de ARNbc	
R28	87	8	1% de Silwet L- 77	10X	2% de sulfato de amonio	4x WeatherMA X (72 h)
		9	1% de Silwet L- 77	Solo solución amortiguador a (testigo)	2% de sulfato de amonio	4x WeatherMA X (72 h)

*el glifosato (como la formulación comercial "Roundup® WeatherMAX® brand herbicide" que contiene 660 g/L de glifosato K+ sal en un portador que incluye la mezcla de tensioactivo de amina de cebo MON56151 de amina de cebo (16-18C) y cocoamina (12-14C) en la relación 55:45) se indica en la cantidad utilizada (donde 1X = 840 g equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX®, 4X = 3360 g equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX®) y las horas después de la aplicación del ARNbc.

10 Ejemplo 14

130) Este ejemplo ilustra métodos y composiciones aplicadas tópicamente para inducir el silenciamiento sistémico que incluyen el uso de agentes para acondicionar una planta para la permeación de polinucleótidos.

131) Se descubrió que dos ARN pequeños identificados a través de secuenciación de ARN pequeños eran abundantes y exclusivos de plantas de palmera amaranto que habían sido tratadas con cuatro moléculas de ARNbc "corto" de EPSPS de tamaño de oligonucleótidos tal como se describió en el Ejemplo 1. Estos dos ARN pequeños se mapearon respectivamente en las posiciones de nucleótidos 743 – 764 y 566 – 585 de la EPSPS de longitud completa que tiene la secuencia que se muestra en la Figura 20 (SEQ ID NO:40). Se diseñaron dos moléculas de ARNbc "corto" de tamaño de oligonucleótido de 25 nucleótidos de longitud con una cadena antisentido que es capaz de hibridar con el ARNm transcrito a partir del gen EPSPS de palmera amaranto en las posiciones nucleotídicas 743 – 767 ("short RNAbc-5") y 564 – 588 ("short RNAbc-6"), tal como se indica mediante los nucleótidos en cursiva subrayados en la SEQ ID NO:40 que se muestra en la Figura 20, que también muestra las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "corto" de tamaño de oligonucleótido (texto subrayado sin cursiva) y los tres

polinucleótidos de ARN bicatenario "largos" (texto en negrita), tal como se describió en Ejemplo 1.

- 132) La aplicación de una mezcla de cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "corto" de tamaño de oligonucleótido (descritos en el Ejemplo 1) con posterior aplicación de glifosato repitiendo el procedimiento de tratamiento descrito en el Ejemplo 1 resultó en 4 de 4 plantas de palmera amaranto con 16 copias de EPSPS muertas. El uso del mismo procedimiento de tratamiento pero aplicando ARNbc de 5 corto y ARNbc de 6 corto juntos resultó en 0 de 4 plantas de palmera amaranto muertas. La adición de cualquiera o ambos ARNbc de 5 corto y ARNbc de 6 corto a la mezcla de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "corto" de tamaño de oligonucleótido (descritas en el Ejemplo 1) resultó en 4 de 4 plantas de palmera amaranto muertas, es decir, no se observó un efecto antagonístico del ARNbc de 5 corto y el ARNbc de 6 corto.

Ejemplo 15

- 133) Este ejemplo ilustra métodos and composiciones aplicadas tópicamente para inducir el silenciamiento sistémico que incluyen el uso de agentes para acondicionar una plant para la permeación de polinucleótidos. Más específicamente, este ejemplo describe el uso de ácido salicílico y polinucleótidos.

- 134) El ácido salicílico (SA) induce la resistencia a virus en el tabaco; ver, por ejemplo, Chivasa et al. (1997) Plant Cell, 19:547 – 557. Las plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato que tienen 49 o 63 copias de EPSPS se pretrataron con 15 milimolares de SA. Se aplicó una solución de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "corto" de tamaño de oligonucleótido (descritas en el Ejemplo 1) manualmente a 1, 5 o 24 horas después del tratamiento con SA, con posterior con pulverización con glifosato 72 horas después (1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida de marca Roundup® WeatherMAX®). No se observó mejora de los efectos de los ARNbc y la actividad de glifosato (estimada mediante la observación del crecimiento de la planta medido por la altura de la planta) para cualquiera de los tratamientos con SA a los 7 días después del tratamiento con glifosato.

30

Ejemplo 16

- 135) Este ejemplo ilustra métodos and composiciones aplicadas tópicamente para inducir el silenciamiento sistémico que incluyen el uso de agentes para acondicionar una planta para la permeación de polinucleótidos. Más específicamente, este ejemplo describes

variations in the order and timing of aplicación de polinucleótidos and solución de tensioactivo.

- 136) Estos ensayos se llevaron a cabo en plantas de palmera amaranto con grandes cantidades de copias (56, 63 o 100 copias) de EPSPS, utilizando un protocolo que incluye las siguientes etapas: (1) aplicación de ARNbc (una solución de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "corto" de tamaño de oligonucleótido descritas en el Ejemplo 1) en una solución que contenía tensioactivo de amina de cebo y glicerol; (2) aplicación de 1% de tensioactivo de silicona Silwet L-77; y (3) aplicación de glifosato (1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida de marca Roundup® WeatherMAX®). Se evaluó la separación del tiempo de aplicación de los polinucleótidos y la aplicación de Silwet, aplicándose el Silwet por pulverización a los 30 minutos, 1 hora o 2 horas después de la aplicación de la solución de ARNbc. En este conjunto de ensayos, los tres tiempo diferentes de aplicación de la solución de Silwet produjeron resultados similares, es decir, enanismo de crecimiento en la mayoría de las plantas con gran cantidad de copias que se trataron con la solución de ARNbc, tal como se comparó con las plantas de gran cantidad de copias testigo que se trataron con una solución testigo que contenía solo tensioactivo de amina de cebo y glicerol.

Ejemplo 17

- 137) Este ejemplo ilustra métodos y composiciones aplicadas tópicamente para inducir el silenciamiento sistémico que incluyen el uso de agentes para acondicionar una plant para la permeación de polinucleótidos. Más específicamente, este ejemplo describe la aplicación de polinucleótidos de la invención mediante pulverización de bajo volumen y el uso de un tensioactivo de silicona y sulfato de amonio.
- 138) Se aplicó una solución de ARNbc (una solución de los cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "corto" de tamaño de oligonucleótido descritas en el Ejemplo 1) en una solución que contenía 2% de sulfato de amonio mediante pulverización de bajo volumen a palmera amaranto que tenía 16 copias de EPSPS, con posterior pulverización con glifosato (1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX®), que resultó en la muerte de las plantas de palmera amaranto.
- 139) Se trataron seis plantas de palmera amaranto por tratamiento con un procedimiento de tres etapas utilizando pulverización de bajo volumen: (1) pulverización de Silwet L-77 al 1%; (2) pulverización de 2 mililitros de una solución de ARNbc que contenía cantidades iguales de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "corto" de tamaño de oligonucleótido descritas en el Ejemplo 1 a una de 3 dosis (1X o 0,8 nanomoles por

- planta, 2X o 1,6 nanomoles por planta o 4X o 3,2 nanomoles por planta); y (3) pulverización de glifosato (1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX®) a una tasa de 159 litros/acre. Nueve días después de la pulverización con glifosato, todas las seis plantas que se pulverizaron con 4X (3,2 nanomoles por planta) de ARNbc murieron y las plantas pulverizadas con 2X (1,6 nanomoles por planta) de ARNbc o 1X (0,8 nanomoles por planta) de ARNbc presentaban enanismo (Figura 21A).
- 140) Se llevaron a cabo varios ensayos en palmera amaranto resistente a glifosato cultivada a partir de semillas recogidas en el campo. Las plantas se trataron con varios protocolos descritos a continuación, tratándose tópicamente algunas plantas con una solución de ARNbc y tratándose las plantas testigo con la solución amortiguadora (vehículo de ARNbc); la aplicación se hizo mediante pulverización de bajo volumen. A menos que se indique lo contrario, la solución de ARNbc contenía cantidades iguales de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "corto" de tamaño de oligonucleótido descritas en el Ejemplo 1 en solución amortiguadora a una dosis "4X" (3,2 nanomoles por planta); la solución amortiguadora consistía en 10 milimolares de fosfato de sodio y 0,01 % (v/v) de tensioactivo de organosilicona Silwet L-77 en agua con dietilpirocarbonato (DEPC) (Omega Bio-Tek) y se ajustó hasta pH 6,8; y el herbicida era un herbicida de glifosato aplicado a 840 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre. Los resultados se proporcionan en la Tabla 7.
- 141) Ensayos 1 y 2: Estos ensayos se llevaron a cabo en palmera amaranto resistente a glifosato cultivada a partir de semillas obtenidas de una muestra de suelo de una granja con plantaciones de palmera amaranto resistente a glifosato conocidas. Para el ensayo 1, se trataron diez plantas por tratamiento de la siguiente forma: (1) pulverización de Silwet L-77 al 1%; (2) pulverización de 2 mililitros de la solución de ARNbc; y (3) pulverización de glifosato. Para el ensayo 2, se trataron dieciocho plantas por tratamiento utilizando el mismo procedimiento que en el ensayo 1.
- 142) Ensayo 3: Este ensayo comparó tratamientos aplicados a diferentes etapas de desarrollo y utilizó plántulas cultivadas a partir de semillas de palmera amaranto de un sitio del Condado de Macon, GA y seleccionados por su resistencia al glifosato. La solución amortiguadora incluía 2% de sulfato de amonio. Se trataron doce plántulas pequeñas (etapa de hoja 3) o doce plántulas grandes (etapa de hoja 5) por tratamiento de la siguiente forma: (1) pulverización de Silwet L-77 al 1%; (2) pulverización de 2 mililitros de la solución de ARNbc; y (3) pulverización de glifosato. Este tratamiento proporcionó

97

mejor control (murieron más plantas) en plántulas pequeñas en comparación con plántulas más grandes. El tratamiento con ARNbc mató o provocó enanismo en más plantas resistentes al glifosato que el tratamiento con solución amortiguadora y herbicida, aunque a los 16 días después del tratamiento no todas las plantas tratadas con ARNbc habían muerto.

143) Ensayos 4 y 5: Estos ensayos utilizaron plantas de palmera amaranto cultivadas a partir de semillas en suelo de una granja de Pemiscot, MO. La solución amortiguadora incluía 2% de sulfato de amonio. Se trataron once plántulas pequeñas (etapa de hoja 3) de la siguiente forma: (1) pulverización de Silwet L-77 al 1%; (2) pulverización de 2 mililitros de la solución de ARNbc; y (3) pulverización de glifosato. Para el ensayo 5, Se trataron doce plantas por tratamiento utilizando el mismo procedimiento que en el ensayo 4.

144) Ensayo 6: Este ensayo utilizó plantas de palmera amaranto cultivadas a partir de semillas en suelo de la granja "Ivy2". La solución amortiguadora incluía 2% de sulfato de amonio. Se trataron dieciocho plántulas pequeñas (etapa de hoja 3) por tratamiento de la siguiente forma: (1) pulverización de Silwet L-77 al 1%; (2) aplicación de 2 mililitros de la solución de ARNbc, manualmente o mediante pulverización; y (3) pulverización de glifosato. En este ensayo el método de aplicación (manualmente o pulverización) proporcionó resultados similares.

145) Ensayo 7: Este ensayo utilizó plántulas de palmera amaranto en la etapa de hoja 3 a 4 cultivadas a partir de semillas F3 seleccionadas por su resistencia al glifosato y por ser más resistentes al glifosato que las plantas en los ensayos 1 - 6. La solución amortiguadora incluía 2% de sulfato de amonio. Se trataron dieciocho plantas por tratamiento de la siguiente forma: (1) pulverización de Silwet L-77 al 1%; (2) pulverización de 2 mililitros de la solución de ARNbc; y (3) pulverización de glifosato.

Tabla 7

Número de ensayo	plantas muertas/plantas totales		Comentarios
	tratadas con ARNbc	testigo	
1	2/10	0/10	Enanismo en las supervivientes tratadas con ARNbc en comparación con las testigo (Figura 21B)
2	7/18	4/18	Enanismo en las supervivientes tratadas con ARNbc a los 8 y 30 días después del tratamiento, en comparación con las testigo
3 (plántulas grandes)	5/12	3/12	Mayor enanismo en supervivientes tratadas con ARNbc/sulfato de amonio después del tratamiento, en comparación con las testigo
3 (plántulas pequeñas)	9/12	6/12	
4	7/11	2/11	Mayor enanismo en supervivientes tratadas con ARNbc/sulfato de amonio después del tratamiento, en comparación con las testigo
5	8/12	3/12	
6 (manual)	14/18	--	
6 (pulverización)	13/18	9/18	
7	8/18	2/18	

Ejemplo 18

- 146) Este ejemplo ilustra métodos y composiciones aplicadas tópicamente para inducir el silenciamiento sistémico que incluyen el uso de agentes para acondicionar una planta para la permeación de polinucleótidos.
- 147) En este ensayos, la solución de ARNbc contenía cantidades iguales de de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "corto" de tamaño de oligonucleótido descritas en el Ejemplo 1 a una dosis "10X" (8 nanomoles por planta) en una solución que contenía 0,2% de tensioactivo de amina de cebo y 2% de sulfato de amonio (identificada en la Figura 22 como "amina de cebo/AMS") o uno de los siguiente reactivos de transfección: (a) a

poliamina (JetPRIMETM, Polyplus-transfection SA, Illkirch, Francia), (b) una nanopartícula magnética (SilenceMag, OZ Biosciences, Marsella, Francia), (c) un péptido (N-TERTM Nanoparticle, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), (d) un lípido (siPORTTM NeoFXTM, Ambion, Foster City, CA) o (e) un lípido/polímero catiónico (TransIT®, Mirus Bio, Madison, WI). Las plantas se trataron de la siguiente forma: (1) aplicación manual de la solución de ARNbc; (2) pulverización de Silwet L-77 al 1%; y (3) pulverización con glifosato aplicado a 840 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre. Este protocolo cuando se utiliza con ARNbc en la solución de tensioactivo de amina de cebo/sulfato de amonio mata a la palmera amaranto resistente a glifosato que tiene 35 copias de EPSPS. Los resultados se muestran en la Figura 22. Se observó enanismo o muerte de las plantas para plantas tratadas con ARNbc en soluciones que contienen poliamina (JetPRIMETM), péptido (N-TERTM Nanoparticle), lípido/polímero catiónico (TransIT®) o tensioactivo de amina de cebo/sulfato de amonio.

15 Ejemplo 19

148) Este ejemplo ilustra métodos que utilizan composiciones que incluyen polinucleótidos aplicados tópicamente para inducir el silenciamiento sistémico en una planta. Más específicamente, este ejemplo describe el uso de diferentes tipos de polinucleótidos para inducir el silenciamiento sistémico.

20 149) Se adquirieron ADN monocatenarios sentidos (ADNmc) y ARN monocatenarios antisentido (ARNmc) correspondientes al gen de EPSPS de la palmera amaranto en las posiciones 14-38, posiciones 153-177, 345-369 y 1105-1129 (indicadas por los nucleótidos subrayados en la Figura 1) de Integrated ADN Technologies. Los ADNmc sentidos y ARNmc antisentido se aparearon calentando moles iguales de ADNmc y ARNmc mezclados a 95 grados Celsius durante 5 minutos y se enfriaron lentamente durante 1,5 – 2 horas hasta alcanzar temperatura ambiente para proporcionar los híbridos de ADN/ARN.

150) Se utilizaron plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato de 16 copias en los ensayos que utilizaron este procedimiento: (1) pulverización de Silwet L-77 al 1% ; (2) aplicación manual sobre cuatro hojas maduras de cada planta para un total de 0,8 nanomoles de los ARNbc de EPSPS de palmera (tal como se describió en Ejemplo 1) o de los híbridos de ADN/ARN de EPSPS de palmera; y (3) pulverización con glifosato aplicada a 840 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre.

151) Los resultados se representan en la Figura 23. Siete días después de la pulverización del herbicida, 4 de 6 plantas tratadas con ARNbc estaban muertas y las 2 restantes estaban muriendo, mientras que las plantas pulverizadas con el híbrido de ADN/ARN presentaban enanismo en el crecimiento (lesión por glifosato) en comparación con las testigo.

Ejemplo 20

152) Este ejemplo ilustra métodos que utilizan composiciones que incluyen polinucleótidos aplicados tópicamente para inducir el silenciamiento sistémico en una planta. Más específicamente, este ejemplo describe el uso de tipos diferentes de polinucleótidos para inducir el silenciamiento sistémico.

153) Se utilizaron seis plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato que tenían 16 copias de EPSPS por tratamiento en este ensayo. Se aplicaron un tratamiento de 0,8 nanomoles de ARNbc ("1X") por planta, un tratamiento con una cantidad diez veces mayor (tratamiento de 8 nanomoles por planta, "10X") de polinucleótidos de ADNmc (descritos en el Ejemplo 19) y solución amortiguadora sola como testigo a plantas separadas manualmente en solución amortiguadora que contenía 2% de sulfato de amonio, con posterior pulverización con glifosato a las 48 horas aplicado a 840 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre. La Figura 24 muestra los resultados. Ambos tratamientos polinucleotídicos proporcionaron un control mejor de palmera amaranto en comparación con plantas tratadas solo tratadas con solución amortiguadora y herbicida. De las plantas tratadas con el tratamiento con ADNmc 10X, dos de seis murieron y las cuatro restantes presentaron enanismo en el crecimiento en el 30%. De las plantas tratadas con el tratamiento con ARNbc 1X, las seis plantas murieron a los 8 días después de la pulverización con WM o 10 días después del tratamiento con ARNbc.

Ejemplo 21

154) Este ejemplo ilustra métodos que utilizan composiciones que incluyen polinucleótidos aplicados tópicamente para inducir el silenciamiento sistémico en una planta. Más específicamente, este ejemplo describe la selección de una secuencia polinucleotídica para inducir el silenciamiento sistémico en una planta.

155) Se diseñaron doce ARNbc de aproximadamente 250 bp cada uno y con una cadena del ARNbc correspondiente a las secuencias de ADN traslapadas de EPSPS de las SEQ ID NOS:41-52 (Tabla 8) para cubrir de forma traslapada la secuencia sentido completa y

101

parte de las regiones sin traducir en 5' y 3' del gen de EPSPS de palmera amaranto, tal como se muestra en la Figura 25A.

Tabla 8

Número de segmento de traslape (ver Figura 25A)	Secuencia	SEQ ID NO.
1	CGCCAGGGCTGCAGACGCGTTACGTANTCGGATCC AGAATTCGTGATTAACGTCACAGCATGTCATGTAAAA CACGCGAATCAGACCGGTCCACTCTTGTTTTAATTT GAGACAATTTTGATGTTGAGTCATCCCACACCAACC CCAAAAAATTCAACAACAACTCTTATAATGATTCCC TCTACTCTACTAGAGTCTACACCAACCCACTTTCTCT TTGCCACCAAACTTTGGTTTGGTAAGAACT	41
2	CACCAACCCACTTTCTCTTTGCCACCAAACTTTG GTTTGGTAAGAACTAAGCCCTCTTCTTTCCCTTCTCT CTCTTAAAAGCCTAAAATCCACCTAACTTTTTTCAGCC AACAAACAACGCCAAATTCAGAGGAAGAATAATGAT GGCTCAAGCTACTACCATCAACAATGGTGTCCATAC TGGTCAATTGCACCATACTTTACCCAAAACCCAGTTA CCCAAATCTTCAAAACTCTTAATT	42
3	CCATACTTTACCCAAAACCCAGTTACCCAAATCTTCA AAAATCTTAATTTTGGATCAAACCTTGAGAATTTCTC CAAAGTTCATGTCTTTAACCAATAAAAGAGTTGGTGG GCAATCATCAATTGTTCCCAAGATTCAAGCTTCTGTT GCTGCTGCAGCTGAGAAACCTTCATCTGTCCCAGAA ATTGTGTTACAACCCATCAAAGAGATCTCTGGTACT GTTCAATTGCCTGGGTCAAAGTCTTTATCC	43
4	TCAAAGAGATCTCTGGTACTGTTCAATTGCCTGGGT CAAAGTCTTTATCCAATCGAATCCTTCTTTTAGCTGC TTTGTCTGAGGGCACAACAGTGGTGCACAACCTTGCT GTATAGTGATGATATTCTTTATATGTTGGACGCTCTC AGAACTCTTGGTTTAAAAGTGGAGGATGATAGTACA GCCAAAAGGGCAGTCGTAGAGGGTTGTGGTGGTCT GTTTCCTGTTGGTAAAGATGGAAAGGAAGAGAT	44

5	GAGGGTTGTGGTGGTCTGTTTCCTGTTGGTAAAGAT GGAAAGGAAGAGATTCAACTTTTCCTTGGTAATGCA GGAACAGCGATGCGCCCATTGACAGCTGCGGTTGC CGTTGCTGGAGGAAATTCAAGTTATGTGCTTGATGG AGTACCAAGAATGAGGGAGCGCCCCATTGGGGATC TGGTAGCAGGTCTAAAGCAACTTGGTTCAGATGTAG ATTGTTTTCTTGGCACAAATTGCCCTCCTGTTCTGGG	45
6	TGGTTCAGATGTAGATTGTTTTCTTGGCACAAATTGC CCTCCTGTTCTGGGTCAATGCTAAAGGAGGCCTTCCA GGGGGCAAGGTCAAGCTCTCTGGATCGGTTAGTAG CCAATATTTAACTGCACTTCTCATGGCTACTCCTTTG GGTCTTGGAGACGTGGAGATTGAGATAGTTGATAAA TTGATTTCTGTACCGTATGTTGAAATGACAATAAAGT TGATGGAACGCTTTGGAGTATCCGTAGAACAT	46
7	TTGAAATGACAATAAAGTTGATGGAACGCTTTGGAG TATCCGTAGAACATAGTGATAGTTGGGACAGGTTCT ACATTCGAGGTGGTCAGAAATACAAATCTCCTGGAA AGGCATATGTTGAGGGTGATGCTTCAAGTGCTAGCT ACTTCCTAGCCGGAGCCGCCGTCACTGGTGGGACT GTCAGTGTCAAGGGTTGTGGAACAAGCAGTTTACAG GGTGATGTAAAATTTGCCGAAGTTCTTGAGAAGAT	47
8	ACAAGCAGTTTACAGGGTGATGTAAAATTTGCCGAA GTTCTTGAGAAGATGGGTTGCAAGGTCACCTGGACA GAGAATAGTGTAAGTGTACTGGACCACCCAGGGAT TCATCTGGAAAGAAACATCTGCGTGCTATCGACGTC AACATGAACAAAATGCCAGATGTTGCTATGACTCTT GCAGTTGTTGCCTTGTATGCAGATGGGCCCACCGC CATCAGAGATGTGGCTAGCTGGAGAGTGAAGGAAA	48
9	AGATGGGCCCACCGCCATCAGAGATGTGGCTAGCT GGAGAGTGAAGGAAACCGAACGGATGATTGCCATTT GCACAGAACTGAGAAAGCTTGGGGCAACAGTTGAG GAAGGATCTGATTACTGTGTGATCACTCCGCCTGAA AAGCTAAACCCCACCGCCATTGAACTTATGACGAT CACCGAATGGCCATGGCATTCTCTTGTGCTGCCTGT GCAGATGTTCCCGTCACTATCCTTGATCCGGGATGC	49

10	CTCTTGCTGCCTGTGCAGATGTTCCCGTCACTATCC TTGATCCGGGATGCACCCGTAAAACCTTCCCGGACT ACTTTGATGTTTTAGAAAAGTTCGCCAAGCATTGATG AGTAGCTATATACGAGATCCTTAAATTGTACGCCGA AGGTTTTGATTTGAGTCTAATAGTAGATAAAAGGCTA TAAATAAACTGGCTTTCTGCTTGAGTAATTATGAAAT TCTTTGTATTATGTTTGTGAGATTTGAAGTAGCTTAT A	50
11	TAATTATGAAATTCTTTGTATTATGTTTGTGAGATTTG AAGTAGCTTATAAATTACAATGTACTAAAGTCTAGAA ATAAGTTATGTATCTTTTAAATCAATGAGAAATGCAT ACTTGAAAGGCTTGACCTTGATTTGTGACCTAAAGA GTACTAACTTTGGAGTTTCCAACCTCATTTGTTTATCT CATTTTTTTTTAATTTTTGATTTAAATTGTTTATTTTA TGAGTAATCATGTATCTTTCTTATTCTAACCAAATGTA ATACTCCTTC	51
12	TATGAGTAATCATGTATCTTTCTTATTCTAACCAAATG TAATACTCCTTCCAACCTCTCTTTAAACGTCCACACTC TGGGCACAGAGTGTAATAGTGTGGTGGTTGGAGTCT TTTAAGTGATTATAATAATTGTAAATGTGGTAGTTAG AATATTTTAAGTAATGTAGGTGGGGTATTATGGTCTT GTTGAACATAGGATATTTAGGTAAAAAATCTATGCAA AAAAAGGAAAGTAAGCAAATAAAGCGAATTGACCTG AAAAGAAAAGTGGACATGTATAGTGAGTTGGAGGAA GTATTTT	52

156) Las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "corto" de tamaño de oligonucleótido tales como se describieron en el Ejemplo 1 y la Figura 1 están ubicadas en los segmentos de traslape 2, 3, 4 y 8 respectivamente y se muestran como barras gris claro dentro de dichos segmentos. Los polinucleótidos se sintetizaron mediante transcripción in vitro utilizando un vector pBR322 con los polinucleótidos de EPSPS insertados en los sitios de clonación EcoRI y BamHI; el ADN de plásmido se aisló con kits Qiagen Maxi prep y se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. La solución de ADN digerido se utilizó en el tratamiento de las plantas sin purificación adicional.

157) Las plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato que tenían 16 copias de EPSPS se trataron de la siguiente forma: pulverización con Silwet L-77 al 1%; (2) aplicación manual de una solución de ARNbc (que contenía polinucleótidos seleccionados de los doce segmentos de traslape de las cuatro moléculas de ARNbc "corto" descritas en el Ejemplo 1 a la tasa de 0,01 nanomol ADN/planta) o de solución amortiguadora como testigo; y (3) pulverización con glifosato 48 horas después aplicada a 840 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre. Se observó la altura por encima del suelo de las plantas tratadas 11 días después del tratamiento con herbicida; a las plantas que estaban muertas o muriendo se les asignó una altura de cero. Los resultados se muestran en las Figuras 25B y 25C. Las combinaciones de polinucleótidos de ARNbc que mostraron la mayor eficacia en este ensayo incluyeron las cuatro moléculas de ARNbc "corto" descritas en el Ejemplo 1, la combinación de los segmentos de traslape 2, 5, 8 y 11 y la combinación de los segmentos de traslape 7, 8 y 9.

15

Ejemplo 22

158) Este ejemplo ilustra métodos que utilizan composiciones que incluyen polinucleótidos aplicados tópicamente para inducir el silenciamiento sistémico en una planta. Más específicamente, este ejemplo describe la aplicación tópica de polinucleótidos con posterior aplicación de herbicida a una planta.

159) En un ensayo, las plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato que tenían 16 copias de EPSPS se pulverizaron con glifosato aplicado a 840 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre. Dos o 24 horas después de la aplicación de herbicida, las plantas se trataron con pulverización con Silwet L-77 al 1%. Quince a 20 minutos después del tratamiento con Silwet, las plantas se trataron mediante aplicación manual con 0,8 nanomoles ("1X") por planta de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "corto" de tamaño de oligonucleótido tal como se describieron en Ejemplo 1 en solución amortiguadora que contenía 2% de sulfato de amonio o en solución amortiguadora que contenía 2% de sulfato de amonio. En este ensayo, las plantas testigo no tratadas ("UT") se trataron solo con pulverización de Silwet L-77 al 1% pero no con herbicida o ARNbc. Los resultados se muestran en la Figura 26. En este ensayo, la aplicación de Silwet al 1% resultó en una actividad de glifosato mejorada en 60% cuando se aplicó 2 horas después de la pulverización del herbicida y en 20% cuando se aplicó 24 horas después de la pulverización del herbicida. En este ensayo, la aplicación de Silwet al 1% con posterior aplicación de ARNbc de EPSPS

resultó en actividad de glifosato mejorada en al menos 80% cuando se aplicó 2 horas después de la pulverización del herbicida y en 20% cuando se aplicó 24 horas después de la pulverización del herbicida.

160) En otro ensayo, las plantas de palmera amaranto cultivadas a partir de semillas en suelo de una granja en Macon, GA se pulverizaron con glifosato aplicado a 840 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre. Tres días después del tratamiento con herbicida, 9 de 40 plantas murieron y 3 presentaban enanismo grave. Las plantas supervivientes se pulverizaron con Silwet L-77 al 1% , con posterior aplicación tópica manual de 8 nanomoles ("10X") por planta de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "corto" de tamaño de oligonucleótido tal como se describieron en Ejemplo 1 o de solución amortiguadora como testigo. Tres días después, 3 plantas más en el grupo de las tratadas con ARNbc murieron y 2 plantas más en el grupo de las tratadas con solución amortiguadora murieron. En este punto (6 días después del tratamiento original con herbicida y 3 días después del tratamiento con Silwet/ARNbc o solución amortiguadora), la mitad de las plantas supervivientes en cada grupo se pulverizó con una segunda aplicación de glifosato (aplicado a las misma dosis que la primera aplicación). Dose semanas después de este segundo tratamiento con herbicida, las plantas tratadas con ARNbc restantes exhibieron 80% de lesión y las plantas tratadas con solución amortiguadora restantes exhibieron 40% de lesión.

20

Ejemplo 23

161) Este ejemplo ilustra métodos que utilizan composiciones que incluyen polinucleótidos aplicados tópicamente para inducir el silenciamiento sistémico en una planta. Más específicamente, este ejemplo describe una aplicación tópica de una sola etapa de una sola composición que incluye polinucleótidos, tensioactivo y herbicida para controlar malezas resistentes a herbicidas.

162) Este ensayo se llevó a cabo en una población de campo de plantas de palmera amaranto resistentes al glifosato conocidos por tener cantidades muy grandes de copias de EPSPS (Gaines et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107:1029-1034 informó que las plantas de este sitio de estudio tienen de 5 a más de 160 copias de EPSPS). Los polinucleótidos utilizados en este ensayo eran una mezcla equimolar de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "corto" de tamaño de oligonucleótido tal como se describieron en Ejemplo 1.

163) Se pulverizaron plantas de cuatro a seis pulgadas de altura en un área de tratamiento de 1 pie por 5 pies es un único tratamiento con 264 microgramos ("100X") o

35

52,8 micrograms ("20X") de los ARNbc de EPSPS en una solución que también contenía 1% de tensioactivo Silwet L-77, 2% de sulfato de amonio y glifosato (aplicado a 1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre). Para la comparación, se pulverizaron otras plantas en áreas de
5 tratamiento de 1 pie por 5 pies con glifosato (en una solución que también contenía 1% de tensioactivo Silwet L-77 y 2% de sulfato de amonio) aplicado a la misma tasa.

164) Los resultados se muestran en la Figura 27. El tratamiento de las plantas solo con glifosato (aplicado a 1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre) en una solución que también
10 contenía Silwet L-77 y sulfato de amonio resultó en un control de aproximadamente 70% (muerte de las plantas). El tratamiento de una etapa utilizando una composición que contenía 20X de los polinucleótidos de ARNbc de EPSPS, tensioactivo, sulfato de amonio y herbicida resultó en un control de aproximadamente 80 – 85% de la palmera amaranto resistente a glifosato, que es la tasa de control aproximada obtenida mediante
15 pulverización con glifosato aplicado a 6720 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre (es decir, 8 veces la tasa de aplicación estándar de aproximadamente 840 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre). El tratamiento de una etapa utilizando una composición que contenía 100X de los
20 polinucleótidos de ARNbc de EPSPS, tensioactivo, sulfato de amonio y herbicida resultó en un control de aproximadamente 90 – 95% de la palmera amaranto resistente a glifosato, que es la tasa de control aproximada obtenida mediante pulverización con glifosato aplicado a 13440 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre (es decir, 16 veces la tasa de
25 aplicación estándar de aproximadamente 840 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre).

Ejemplo 24

165) Este ejemplo ilustra un método para inducir la regulación sistémica de un gen
30 objetivo en una hortaliza mediante aplicación tópica a la hortaliza de una molécula polinucleotídica que incluye un segmento con una secuencia nucleotídica esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen objetivo o el ARN transcrito a partir de gen objetivo, por el cual la molécula permea el interior de la hortaliza e induce la regulación sistémica del gen
35 objetivo. En este ejemplo, se trataron hortalizas en crecimiento con una composición

aplicada tópicamente para inducir el silenciamiento sistémico de un gen objetivo en una hortaliza o planta de cultivo frutal que incluye (a) un agente para acondicionar una planta para la permeación de polinucleótidos y (b) polinucleótidos que incluyen al menos una cadena polinucleotídica que incluye al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos del gen objetivo en dirección antisentido o sentido. Más específicamente, este ejemplo demuestra el uso de polinucleótidos aplicados tópicamente para inducir el silenciamiento sistémico de un gen de fitoeno desaturasa (PDS) en una hortaliza, es decir, lechuga (*Lactuca sativa*).

166) La PDS de lechuga tiene la secuencia

10 ATGTCTCTGTTTGGAAATGTTTCTGCCATTAAGTCAAGTGGAAAGTGTATAGTAATGAA
TCTTTCAAGCACACAAATCACTTCAAGAGATTGTTTCAAGATTACCTCAGGGCAAAAA
GATGTTTTGTCAATTGGATGCTGTGATGCTATGGGTAACAGATTGCAATTTCCAAGTG
CTCGTTCTTTTACACCAAGATCAAAGAAGAATGTCTCCCCTCTAAAGGTAGTTTGTGTT
GATTATCCAAGACCAGATCTTGATAACACATCTAATTTCTTGGAAGCTGCTCACTTGTC

15 TTCAACCTTCAGAACTTCCCCACGCCCCTAAGCCATTGAAGATTGTAATTGCTGGT
GCAGGTTTAGCTGGTTTATCAACTGCTAAGTATTTAGCTGATGCAGGTCACAAGCCAA
TTTTACTAGAAGCAAGAGATGTTCTTGGTGGAAAGGTGGCAGCTTGGAAAGATGATGA
TGGAGATTGGTATGAGACAGGTTTACACATATTCTTTGGAGCTTACCCAAATGTACAA
AATTTATTTGGAGAGCTAGGAATTAATGATAGATTACAGTGGAAGGAGCATTCTATGAT

20 ATTTGCAATGCCAAATAAGCCTGGAGAATTTAGTAGGTTTGACTTCCCAGATGTTTTAC
CTGCACCATTGAATGGAATTTTTGCTATATTGAGGAACAATGAAATGCTGACGTGGCC
TGAGAAAGTGAAGTTTGCAATTGGGCTGTTGCCTGCAATGTTAGGTGGACAGGCTTAT
GTTGAGGCCCAAGATGGGCTTAGTGTTGAGGACTGGATGAGAAAGCAAGGTATACCT
GATCGAGTTACTACTGAAGTGTTTATTGCAATGTCAAAGCATTAACTTTATAAATCC

25 AGATGAACTTTCAATGCAATGTATTCTCATTGCTCTAAACCGTTTTCTTCAGGAAAAGC
ATGGTTCCAAGATGGCATTTTTTAGATGGGAGCCCCACCAGAAAGACTTTGCAAGCCAA
TGTTGACCACATCGAGTCACTCGGTGGCCAAGTCAGAGTCAACTCACGAATACAAAA
AATTGAGTTAAACAAAGACGGAAGTGTCCGGAAGTTTCTATTGAGTGATGGGAATGTT
CTAGAAGCTGATGCTTATGTTTTCGCTACCCCTGTTGACATTCTCAAGCTTCTTTTACC

30 CGAAGAATGGAAACCAATTCCATATTTCAAAAAATTAGAGAAGTTAGTCGGTGTTCCCT
GTTATAAACGTTTCATATATGGTTTGACAGAAAGCTGAAAAACACATATGATCACTTACT
TTTCAGTAGGTACCTCTGCTGAGTGTGTATGCTGACATGTCAGTGACATGTAAGGAA
TATTATGATCCGAATAAGTCAATGTTGGAGTTGGTTCTTGCTCCAGCTGAGGAATGGA
TTTCAAGAAGTGACACTGATATTATTGATGCAACAATGAGTGAAGTTTCAAGGCTTTTT

35 CCTGATGAAATTGCAGCTGATCAAAGTAAAGCAAAAATCTTGAAATATAAAGTTGTAA

AACACCAAGGTCTGTTTATAAACTGTTCCAGATTGTGAACCATGTCGACCCCTACAA
AGATCTCCAATTCAAGGATTTTATTTATCTGGTGATTATACTAAACAAAAGTATTTGGCT
TCAATGGGGGGTGCTGTTTTATCTGGAAAAATTTGTGCACAAGCTATTTTACAAGATTA
TGAGATGCTTGCTACA (SEQ ID NO:53). Se sintetizaron ADN monocatenarios

5 polinucleotídicos de 21 – 45 nucleótidos de longitud con las siguientes secuencias:
taatacgactcactatagggttggagcttacccaaATGtac ("HL286", dirección sentido, SEQ ID
NO:54), taatacgactcactatagggaggccacgtcagcatttcattgttc ("HL287", dirección antisentido,
SEQ ID NO:55), ccattcaATGgtgcaggtaaaac ("HL288", dirección antisentido, SEQ ID
NO:56), catagaATGctccttcactg ("HL289", dirección antisentido, SEQ ID NO:57) y
10 caaataaattttgtacatttggttaagctccaa ("HL290", dirección antisentido, SEQ ID NO:58). Se
preparó una solución de ADNmc con una mezcla igual de los cinco polinucleótidos en
0,01% de Silwet L-77 en 5 milimolares de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH
6,8.

167) Se utilizó la variedad de lechuga LS49 "Green Tower" en los ensayos. Se
15 sumergieron dos hojas completamente expandidas en una solución preparada
recientemente de 0,1% de Silwet L-77 en agua bidestilada durante pocos segundos. Las
hojas se dejaron secar durante 15-30 minutos. A continuación cada planta se trató
mediante aplicación de 20 microlitros de solución de ADNmc sobre la superficie superior
de dos hojas tratadas con Silwet (total 40 microlitros por planta). La Tabla 9 indica las
20 condiciones del ensayo utilizadas y el blanqueado observado en las plants tratadas
tópicamente con polinucleótidos de ADNmc. La Figura 28 representa la evolución del
blanqueado y la muerte de las plantas de lechuga tratadas con 1 nanomol de ADNmc por
planta a los (de arriba hacia abajo) 37, 46 y 60 días después del tratamiento.

108

Tabla 9

Etapa de desarrollo	Cantidad de cada ADNmc aplicado (nanomoles/planta)	Observación más temprana del blanqueado
4 semanas posgerminación, las plantas tienen 2 hojas completamente expandidas	1	3 semanas postratamiento
5 semanas posgerminación, las plantas tienen 4 hojas completamente expandidas	4	4 días postratamiento

168) Los ensayos se repitieron con 2 o 4 nanomoles de ADNmc aplicados por planta. La Figura 29A muestra el silenciamiento sistémico evidenciado por el blanqueado observado a los 4 u 12 días después del tratamiento tópico con los polinucleótidos.

169) Los ensayos se repitieron utilizando cada ADNmc individual antisentido ("HL287", SEQ ID NO:55; "HL288", SEQ ID NO:56; "HL289", SEQ ID NO:57; y "HL290", SEQ ID NO:58) aplicándose 8 nanomoles de polinucleótido por planta; las plantas testigo positivo se trataron con una mezcla de los cuatro ADNmc individuales antisentido a 2 nanomoles de cada uno (para un total de 8 nanomoles de polinucleótido aplicados por planta) y las plantas testigo negativo se trataron solo con solución amortiguadora. La Figura 29B muestra el silenciamiento sistémico evidenciado por el blanqueado observado a 4 después del tratamiento tópico con los ADNmc antisentido.

Ejemplo 25

170) Este ejemplo ilustra un aspecto de la invención. En este ejemplo, se trataron plantas en crecimiento con una composición aplicada tópicamente para inducir el silenciamiento sistémico de un gen objetivo en una planta que incluye (a) un agente para acondicionar una planta para la permeación de polinucleótidos y (b) polinucleótidos que incluyen al menos una cadena polinucleotídica que incluye al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos del gen objetivo en dirección antisentido o sentido. Más específicamente, este ejemplo demuestra el uso de polinucleótidos aplicados tópicamente

para inducir el silenciamiento sistémico de un gen de fitoeno desaturasa (PDS) en una hortaliza, es decir, tomate (*Solanum lycopersicum*).

171) El PDS del tomate tiene la secuencia

GGGTTTATCTCGCAAGTGTGGCTATGGTGGGACGTGTCAAATTTTGGATTGTAGCCAA
 5 ACATGAGATTTGATTTAAAGGGAATTGGCCAAATCACCGAAAGCAGGCATCTTCATCA
 TAAATTAGTTTGTATTATTATACAGAATTATACGCTTTTACTAGTTATAGCATTCCGGTAT
 CTTTTCTGGGTAAGTCCAAACCACCACAAATTTCAAGTTTCCATTTAACTCTTCAAC
 TTCAACCCAACCAATTTATTTGCTTAATTGTGCAGAACCACTCCCTATATCTTCTAGG
 TGCTTTCATTGTTCCGAGTAAATGCCTCAAATTGGACTTGTTTCTGCTGTAACTTG
 10 AGAGTCCAAGGTAGTTCAGCTTATCTTTGGAGCTCGAGGTCGTCTTCTTTGGGAAGTG
 AAAGTCGAGATGGTTGCTTGCAAAGGAATTCGTTATGTTTTGCTGGTAGCGAATCAAT
 GGGTCATAAGTTAAAGATTTCGTAATCCCATGCCACGACCAGAAGATTGGTTAAGGA
 CTTGGGGCCTTTAAAGGTCGTATGCATTGATTATCCAAGACCAGAGCTGGACAATACA
 GTTAACTATTTGGAGGCTGCATTTTTATCATCAACGTTCCGTGCTTCTCCGCGCCCAA
 15 CTAACCATTTGGAGATTGTTATTGCTGGTGCAGGTTTGGGTGGTTTGTCTACAGCAAA
 ATATTTGGCAGATGCTGGTCACAAACCGATACTGCTGGAGGCAAGGGATGTTCTAGG
 TGGAAGGTAGCTGCATGGAAAGATGATGATGGAGATTGGTACGAGACTGGTTTGCA
 TATATTCTTTGGGGCTTACCCAAATATTCAGAACCTGTTTGGAGAATTAGGGATTAACG
 ATCGATTGCAATGGAAGGAACATTCAATGATATTTGCAATGCCAAGCAAGCCAGGAGA
 20 ATTCAGCCGCTTTGATTTCTCCGAAGCTTTACCCGCTCCTTTAAATGGAATTTAGCCA
 TCTTAAAGAATAACGAAATGCTTACATGGCCAGAGAAAGTCAAATTTGCAATTGGACT
 CTTGCCAGCAATGCTTGGAGGGCAATCTTATGTTGAAGCTCAAGATGGGATAAGTGTT
 AAGGACTGGATGAGAAAGCAAGGTGTGCCGGACAGGGTGACAGATGAGGTGTTTCAT
 TGCTATGTCAAAGGCACTCAACTTTATAAACCTGACGAACCTTCAATGCAGTGCATTT
 25 TGATCGCATTGAACAGGTTTCTTCAGGAGAAACATGGTTCAAAAATGGCCTTTTTAGA
 TGGTAATCCTCCTGAGAGACTTTGCATGCCGATTGTTGAACACATTGAGTCAAAAGGT
 GGCCAAGTCAGACTGAACTCACGAATAAAAAAGATTGAGCTGAATGAGGATGGAAGT
 GTCAAGAGTTTTATACTGAGTGACGGTAGTGCAATCGAGGGAGATGCTTTTGTGTTTG
 CCGCTCCAGTGGATATTTTCAAGCTTCTATTGCCTGAAGACTGGAAAGAGATTCCATA
 30 TTTCCAAAAGTTGGAGAAGTTAGTCGGAGTACCTGTGATAAATGTACATATATGGTTT
 GACAGAAAAGTGAAGAACACATATGATCATTGCTCTTCAGCAGAAGCTCACTGCTCA
 GTGTGTATGCTGACATGTCTGTTACATGTAAGGAATATTACAACCCCAATCAGTCTAT
 GTTGGAATTGGTTTTTGCACCTGCAGAAGAGTGGATATCTCGCAGCGACTCAGAAATT
 ATTGATGCAACGATGAAGGAACTAGCAACGCTTTTTCTGATGAAATTTAGCAGATC
 35 AAAGCAAAGCAAAAATATTGAAGTACCATGTTGTCAAACCTCCGAGGTCTGTTTATAAA

1/1

ACTGTGCCAGGTTGTGAACCCTGTCGGCCTTTACAAAGATCCCCAATAGAGGGGTTT
 TATTTAGCCGGTGACTACACGAAACAGAAATACTTGGCTTCAATGGAAGGCGCTGTCT
 TATCAGGAAAGCTTTGTGCTCAAGCTATTGTACAGGATTATGAGTTACTTGTGGACG
 TAGCCAAAAGAAGTTGTGCGAAGCAAGCGTAGTTTGTGGTTATTATTTAGCT
 5 TCTGTACACTAAATTTATGATGCAAGAAGCGTTGTACACAACATATAGAAGAAGAGTG
 CGAGGTGAAGCAAGTAGGAGAAATGTTAGGAAAGCTCCTATACAAAAGGATGGCATG
 TTGAAGATTAGCATCTTTTTAATCCCAAGTTTAAATATAAAGCATATTTTATGTACCACT
 TTCTTTATCTGGGGTTTGTAAATCCCTTTATATCTTTATGCAATCTTTACGTTAGTTAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGA (SEQ ID NO:59).

- 10 172) Se sintetizó un polinucleótido de ARNbc de 201 nucleótidos con una cadena antisentido capaz de hibridar con el ARN codificado por la secuencia tcgcagcgactcagaaattattgATGcaacgATGaaggaactagcaacgcttttctgATGaaattcagcagatcaaa gcaaagcaaaaatattgaagtaccATGttgtcaaaactccgaggtctgtttataaaactgtgccaggtgtgaaccctgtcgg cctttacaagatccccaatagaggggtttatttag (SEQ ID NO:60) que corresponde a los nucleótidos en las posiciones 1724 – 1923 del ARNm transcrito a partir de la secuencia del gen de PDS del tomate (SEQ ID NO:59) mediante RT PCR utilizando cebadores oligonucleotídicos con las secuencias taatacgactcactatagggtcgcagcgactcagaaattattg (SEQ ID NO:61, cebador sentido) y taatacgactcactataggggttaaaggccgacaggggtcacaacc (SEQ ID NO:62, cebador antisentido). Se preparó una solución de ARNbc de 2,5 micromolares con el polinucleótido de ARNbc de 201 nucleótidos (SEQ ID NO:60) en 0,01% de Silwet L-77 en 5 milimolares de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 6,8.

- 173) Se trataron plántulas de tomate de tres semanas de la siguiente forma. Se sumergieron dos hojas completamente expandidas en una solución preparada recientemente de 0,1% de Silwet L-77 en agua bidestilada durante pocos segundos. Las 25 hojas se dejaron secar durante 30 minutos a 1 hora. A continuación cada planta se trató mediante aplicación de 20 microlitros de solución de ARNbc sobre la superficie superior de dos hojas tratadas con Silwet (total 40 microlitros por planta). Las plantas testigo se trataron con solución amortiguadora. Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento para la observación. La Figura 30 muestra el silenciamiento sistémico del gen objetivo de PDS, tal como se evidencia por el blanqueado de las plantas tratadas con 30 ARNbc 30 días después del tratamiento tópico. Las plantas tratadas con ARNbc presentaban enanismo grave en comparación con las plantas testigo.

Ejemplo 26

- 174) Este ejemplo ilustra una mejora en composiciones herbicidas adaptadas para revestimiento tópico sobre la superficie exterior de una planta en crecimiento donde el agente letal para plantas incluye polinucleótidos que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a secuencias de uno o más genes vegetales o a la secuencia del ADN transcrito a partir de los genes vegetales. Los polinucleótidos producen la supresión sistémica del gen vegetal en órganos o tejidos vegetales distintos a los que recibieron la aplicación tópica del polinucleótido. Más específicamente, este ejemplo ilustra una composición herbicida adaptada para revestimiento tópico sobre la superficie exterior de una planta en crecimiento que comprende tensioactivo y al menos un agente letal para plantas que incluye combinaciones de polinucleótidos que tienen una secuencia dirigida al gen de 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), un factor de iniciación de la transcripción (TIF) y ATPasa dependiente de ADN (ddATPasa) en palmera amaranto.
- 175) La composición herbicida incluye al menos uno de los siguientes polinucleótidos de ARN bicatenario de 21 pares de bases:
- (1) nDsRNA1: cadena sentido CUACCAUCAACAAUGGUGUCC (SEQ ID NO: 63) y cadena antisentido GGACACCAUUGUUGAUGGUAG (SEQ ID NO: 64)
 - (2) nDsRNA3: cadena sentido GUCGACAACUUGCUGUAUAGU (SEQ ID NO: 65) y cadena antisentido ACUAUACAGCAAGUUGUCGAC (SEQ ID NO: 66)
 - (3) nDsRNA4: cadena sentido GGUCACCUGGACAGAGAAUAG (SEQ ID NO: 67) y cadena antisentido CUAUUCUCUGUCCAGGUGACC (SEQ ID NO: 68)
 - (4) nDsRNA5: cadena sentido AAUGCCAGAUGUUGCUAUGAC (SEQ ID NO: 69) y cadena antisentido GUCAUAGCAACAUCUGGCAUU (SEQ ID NO: 70)
- 176) Una mezcla de múltiples polinucleótidos es ventajosa para prevenir la selección de resistencia en las plantas tratadas. En una realización, la composición herbicida incluye una mezcla de los cuatro polinucleótidos de ARNbc mencionados anteriormente que tienen las SEQ ID NOS: 63-70. En otra realización, la composición herbicida incluye polinucleótidos de ADN monocatenario con secuencias desoxirribonucleotídicas que corresponden a una o más de las secuencias de ARNbc SEQ ID NOS: 63-70. En otra realización, la composición herbicida incluye híbridos de ARN/ADN con secuencias nucleotídicas que corresponden a una o más de las secuencias de ARNbc SEQ ID NOS: 63-70. En otra realización, la composición herbicida incluye polinucleótidos de ARNbc donde los 2' hidroxilos se metilan para proporcionar estabilidad.

- 177) La composición herbicida incluye un tensioactivo tal como Silwet L-77 (u otros tensioactivos eficaces tales como los proporcionados en el Ejemplo 36). Opcionalmente, la composición herbicida puede incluir uno o más aditivos tales como una sal, agente quelante o un humectante (tales como los proporcionados en el Ejemplo 35) para mejorar el rendimiento herbicida, por ejemplo, potenciando la transferencia de polinucleótidos hacia el interior de la planta, potenciando la eficacia de los polinucleótidos o potenciando la actividad herbicida del herbicida no polinucleotídico.
- 178) Opcionalmente, la composición herbicida incluye polinucleótidos diseñados para regular múltiples genes en la planta. En una realización, la composición herbicida incluye polinucleótidos que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un segundo gen o a la secuencia del ARN transcrito a partir del segundo gen, en donde la regulación del segundo gen proporciona una mejora sinérgica de la actividad herbicida de la composición.
- 179) En una realización, la composición herbicida incluye polinucleótidos que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia del gen endógeno de 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de palmera amaranto o a la secuencia del ARN transcrito a partir del gen endógeno de EPSPS así como también polinucleótidos que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia del gen endógeno del factor de iniciación de traducción (TIF) de la palmera o a la secuencia del ARN transcrito a partir del gen endógeno de TIF. El factor de iniciación de traducción (TIF) es una proteína cloroplástica codificada en el núcleo que es esencial para la iniciar la síntesis proteica y se expresa en toda la planta. La *Arabidopsis thaliana* tiene un ortólogo denominado AT1G17220,1 (descrito en la base de datos disponible públicamente The Arabidopsis Information Resource que se encuentra en línea en www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=AT1G17220) y con el número de acceso a GenBank GI:186478573, que se ha identificado como una proteína localizada en el cloroplasto con similitud al factor de iniciación de traducción bacteriano 2; ver además Miura et al. (2007) Plant Cell, 19:1313–1328 para ver la descripción de este gen. Las secuencias de TIF se identificaron a partir de la palmera amaranto (*Amaranthus palmeri*); se identificó que un gen de TIF tiene la secuencia de SEQ ID NO:71. Los ejemplos de polinucleótidos para la supresión de este gen de TIF en *Amaranthus palmeri* se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Polinucleótido	Posición en la secuencia de TIF	Secuencia	SEQ ID NO.
TIF de palmera amaranto	Secuencia completa de SEQ ID NO:71	ATGGCAACAATGGcTTCCCTAGTGAGTTTG GGAAGCTCTGGAGCAACTTGCTCAGGGCA ATTGGAGGTTtCCTTTTCATTGGTTAAGAAA ATTaCATTGCCTAGAAAGAAATTGTAGTTgCA ATTTTAGGCAATTAGgAGGGGGGAGGAGAT GGCGTTACGTTTCGGTGTGTAGACTTTCTG TCACTACTGATTATGTTTCTGAGCAAGGAA ATGCTGTTTCTCTTGAAAATGCATATAGTGA GAGTAAAGAAGAGGGTCTCATCTTGAAGC CTTCTCCTAAGCCGGTTTTGAAATCCGGGT CTGATGGAAATCGGAAATTTGGGGAGAGTT CGGTGGCGTTTTTCGAGTAATGGGAAATTG GATAATGTAGAGGAGAGGAAGAAGGTTATT GATTCATTGGATGAGGTATTAGAAAAGGCc GAGAGATTAGAAACGGCGAACTTACAAGC AGATAATAGAAAGGATAGCACAAATGTAAA TAAACCGTCTCCGAGTGTAAGTAGTTCAAC CAATGGTAAACCTGTAAATAATTTGAACAAA GGGAAGCCTAAAGCTGCGAAGAGCGTTTG GAGAAAGGgAAATCCAGTTTCTACTGTGCA AAAAGTAGTGCAAGAATCTCCGAAGATTGA AAAGGTTGAGAGAGTGGAAGCTCGAACGA CCAGCCAATCGTCTGAAACGATAAGACCC CCAGTGCCACTACAGAGGCCTGAGATTAA GTTGCAGGCAAAGCCTTCTACTGCTCCTCC ACCCATGCCTAAGAAGCCGGTTTTGAAGG ATGTGGGGATGTCCTCCAGAGCTGATGGG AAGGACCAGTCTGTGAAATCTAAAGAGAG GAAGCCTATTCTAGTGgACAAATTTGCCAC CAAGAAGGCATCAGTTGATCCGTCGATTGC	71

		TCAAGCAGTAATTGCCCCACcAAAACCTGC TAAATTTCTTCTGGAAAGTTTAAAGATGAT TATCGGAAGAAGGGTCTTGCAGCTGGTGG GCCGAAGAGGCGTATGGTCAATGATGATG ATATTGAAATGCATGAAGACACTTCAGAGC TCGGTCTTTCTATTCTGGTGCTGCTACGG CTCGGAAAGGCAGGAAATGGAGTAAGGCA AGTCGCAAGGCTGCCAGACGCCAAGCAGC TAGAGATGCCGCTCCTGTAAAGTGGAAAT CTTAGAGGTTGAAGAAAAGGGCATGTCGA CCGAAGAATTAGCATACAACCTTGGCTATTA GCGAAGGTGAAATTCTTGGGTACCTGTATt CTAAGGGGATAAAACCAGaTGGTGTGCAAA CTCTTGACAAGGCAATGGTAAAGATGATAT GTGAAAGATATGACGTGGAGGTTTTGGAC GCACTTTCTGAACAAATGGAAGAAATGGCT CGAAAGAAGGAAATTTTCGACGAAGATGAC CTTGACAAGCTTGAAGATAGGCCTCCTGTG CTTACTATAATGGGTCATGTAGATCATGGC AAGACGACCCTTCTGGATTATATACGGAAG AGCAAGGTTGCTGCTTCTGAAGCTGGTGG GATTACACAAGGTATTGGTGCTTATAAAGT GGAAGTACCGGTTGATGGCAAGTTGCTGC CTTGTGTCTTTCTTGACACTCCCGGACACG AGGCGTTCGGGGCAATGAGGGCTCGTGGA GCAAGAGTGACAGATATTGCTATTATAGTtG TAGCTGCTGACGATGGGATCCGTCCTCAA ACAAATGAAGCCATAGCACATGCAAAAGCA GCTGGTGTACCTATTGTGGTTGCAATTAAT AAGATTGACAAGGATGGGGCTAATCCGGA CCGTGTGATGCAAGAGCTTTCATCAATTGG TCTAATGCCAGAGGATTGGGGTGGTGATA CCCCAATGGTCAAGATAAGTGCTCTAAAAG GTGAAAATGTGGACGAGTTACTCGAGACA GCcATGCTTGTGCGCCGAGTTGCAAGAGTTA	
--	--	--	--

116

		AAGGCTAATCCTCAGAGGAACGCTAAGGG CACTGTAATTGAGGCTGGTCTTCATAAATC AAAAGGACCCATTGCCACTTTTATtGTGCAG AATGGTACCCTCAAACAAGGGGATACTGTA GTTTGTGGGGAAGCATTGTTGGAAGGTTTCG TGCCCTATTTGATCACGGAGGGAATCGCG TTGATGAAGCTGGTCCATCTATTCCcGTGC AGGTTATTGGATTGAATAATGTtCCTTTTGC CGGTGATGAGTTCGAGGTAGTGAGTTCCC TTGAiATAGCTCGTGAAAAGGCAGAGGTCC GTGCAGAgTCTTTACGAAATGAGCGTATAG CTGCTAAGGCCGGAGACGGAAAGGTTAagc TGTCATCCTTGGCATCGGctGTTTCTTCaGG GAAGATGGCTGGTTTGGATTTGCACCAGTT AAaTATCATTTTGAAGGTTGATGTTCAGGG ATCAATCGAGGCATTGAGGCAAGCTCTAGA AGTTCTTCCTCAAGAtAACGTCACTTTGAAG TTTCTCTTACAAGCGACCGGAGATGTTACT ACAAGTGATGTTGATCTTGCAGTTGCTAGT AAAGCTATTATCTTGGGGTTCAATGTGAAG GCACCAGGTTCTGTGAAAAATTAGCAGAT AACAAAGGTGTTGAAATTCGGCTTTATAAA GTCATTTATGATCTAATTGACGACATGCGG AGTGCAATGGAAGGAATGCTAGATCCCGTT GAGGAACAAGTTgCAATTGGTTCAGCCGAA GTGCGGGCTACATTCAGTAGTGGTAGTGG CCGTGTCGCTGGATGCATGGTGACCGAGG GAAAGATTACCAAAGGCTGTGGGATTTCGA GTGATACGGAAGGGAAAAaCTGTCCACGTT GGAGTTCTTGATTGTTGCGTCGAGTAA	
ADN de 200 bp	341-541	TTTCGAGTAATGGGAAATTGGATAATGTAG AGGAGAGGAAGAAGGTTATTGATTCATTGG ATGAGGTATTAGAAAAGGCcGAGAGATTAG AAACGGCGAACTTACAAGCAGATAATAGAA AGGATAGCACAAATGTAAATAAACCGTCTC	72

		CGAGTGTAAGTAGTTCAACCAATGGTAAAC CTGTAAATAATTTGAACAAA	
ARNbc de 160 bp	342-501	Sentido: UUCGAGUAAUGGGAAAUUGGAUAAUGUAG AGGAGAGGAAGAAGGUUAUUGAUUCAUU GGAUGAGGUAAUAGAAAAGGCCGAGAGA UUAGAAACGGCGAACUUACAAGCAGAUAA UAGAAAGGAUAGCACAAAUGUAAAUAAC CGUCUCCGAGUGUAAGU	73
		Antisentido: ACUUACACUCGGAGACGGUUUAUUUACAU UUGUGCUAUCCUUUCUAUUAUCUGCUUG UAAGUUCGCCGUUUCUAAUCUCUCGGCC UUUUCUAAUACCUCAUCCAAUGAAUCAAU AACCUUCUCCUCUCCUCUACAUUAUCCA AUUUCCCAUUACUCGAA	74
ADN antisentido de TIF_AS1	555-576	ATTTCTCCAAACGCTCTTCGca	75
ADN antisentido de TIF_AS2	342-363	ATCCAATTTCCCATTACTCGaa	76
ADN antisentido de TIF_AS3	412-433	GTTTCTAATCTCTCGGCCTTtt	77
ADN antisentido de TIF_AS4	488-509	TTGAACTACTTACACTCGGag	78
ADN antisentido de TIF_AS5	368-389	TAACCTTCTTCCTCTCCTCta	79
ADN antisentido de TIF_AS6	790-811	GTCCTTCCCATCAGCTCTGGA	80

ADN antisentido de TIF_AS7	1052- 1073	CGTAGCAGCACCAGGAATAG	81
ADN antisentido de TIF_AS8	1655- 1676	CAGCAGCTACaACTATAATAG	82

- 180) En una realización, la composición herbicida incluye una mezcla de al menos dos de los polinucleótidos de ARNbc de EPSPS mencionados anteriormente que tienen la SEQ ID NOS: 63-70 y también al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia del gen endógeno del factor de iniciación de traducción (TIF) de palmera o a la secuencia del ARN transcrito a partir del gen endógeno de TIF, tales como los proporcionados en la Tabla 10. En una realización específica, la composición herbicida incluye una mezcla de los cuatro polinucleótidos de ARNbc de EPSPS que tienen las SEQ ID NOS: 63-70 y un polinucleótido de ARN bicatenario de TIF de 160 pares de bases que tiene la secuencia sentido de UUCGAGUAAUGGGAAAUUGGAUAAUGUAGAGGAGAGGAAGAAGGUUAUUGAUUCA UUGGAUGAGGUAAUAGAAAAGGCCGAGAGAUUAGAAACGGCGAACUACAAGCAGA UAAUAGAAAGGAUAGCACAAAUGUAAAUAACCGUCUCCGAGUGUAAGU (SEQ ID NO. 73) y la secuencia antisentido de ACUUACACUCGGAGACGGUUUAAUUUACAUUUGUGCUAUCCUUUCUAAUUAUCUGCU UGUAAGUUCGCCGUUUCUAAUCUCUCGGCCUUUUCUAAUACCUCAUCCAAUGAAUC AAUAACCUUCUCCUCUCCUCUACAUUAUCCAAUUUCCCAUUACUCGAA (SEQ ID NO. 74).
- 181) En algunas realizaciones, los polinucleótidos se diseñan para regular múltiples genes objetivo, que resultan en un efecto sinérgico sobre la actividad herbicida. Por ejemplo, se obtuvo un efecto sinérgico sobre la actividad herbicida mediante el tratamiento de una planta con polinucleótidos diseñados para suprimir un factor de iniciación de traducción (TIF) y la 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) con posterior tratamiento con el herbicida glifosato no polinucleotídico.
- 182) Los polinucleótidos indicados en la Tabla 11 se produjeron mediante síntesis o mediante transcripción in vitro.

119

Tabla 11

Nombre	Comentarios	Secuencias nucleotídicas
IDT [1]	ARNbc de EPSPS de palmera con dos 2-desoxirribonucle	Sentido: CUACCAUCAACAAUGGUGUCCAUA <u>AC</u> (SEQ ID NO. 83) Antisentido: GUAUGGACACCAUUGUUGAUGGUAGUA (SEQ ID NO. 84)
IDT [2]	ótidos (en <u>texto en negrita subrayado</u>) en el extremo 3' de la cadena sentido	Sentido: AGUUGGUGGGCAAUCAUCAAUUG <u>TT</u> (SEQ ID NO. 85) Antisentido: AACAAUUGAUGAUUGCCCACCAACUCU (SEQ ID NO. 86)
IDT [3]	(25 mer) y un excedente de 2 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena	Sentido: GGUCGACAACUUGCUGUAUAGUG <u>AT</u> (SEQ ID NO. 87) Antisentido: AUCACUAUACAGCAAGUUGUCGACCUC (SEQ ID NO. 88)
IDT [4]	antisentido (27 mer); sintetizados químicamente mediante IDT	Sentido: UGCAAGGUCACCUGGACAGAGA <u>ATA</u> (SEQ ID NO. 89) Antisentido: UAUUCUCUGUCCAGGUGACCUUGCAAC (SEQ ID NO. 90)
IDT [5]	ARNbc de EPSPS de palmera (21 mer) con extremos romos; sintetizado químicamente mediante IDT	Sentido: AACAUGAACAAAAUGCCAGAU (SEQ ID NO. 91) Antisentido: AUCUGGCAUUUUGUUCAUGUU (SEQ ID NO. 92)

120

IDT romo [1]	ARNbc de EPSPS de palmera (27 mer) con extremos romos; sintetizado a través de transcripción T7 in vitro	1S-Antisentido GUAUGGACACCAUUGUUGAUGGUAGUA (SEQ ID NO. 93) 1S-Sentido UACUACCAUCAACAAUGGUGUCCAUAAC (SEQ ID NO. 94)
IDT romo [2]		2S-Antisentido AAUAAUUGAUGAUUGCCCCACCAACUCU (SEQ ID NO. 95) 2S-Sentido AGAGUUGGUGGGCAAUCAUCAAUUAUU (SEQ ID NO. 96)
IDT romo [3]		3S-Antisentido AUCACUAUACAGCAAGUUGUCGACCAC (SEQ ID NO. 97) 3S-Sentido GUGGUCGACAACUUGCUGUAUAGUGAU (SEQ ID NO. 98)
IDT romo [4]		4S-Antisentido UAUUCUCUGUCCAGGUGACCUUGCAAC (SEQ ID NO. 99) 4S-Sentido GUUGCAAGGUCACCUGGACAGAGAAUA (SEQ ID NO. 100)
3OH [1]	ARNbc de EPSPS de palmera (27 mer) con excedentes en 3'; sintetizado a través de transcripción T7 in vitro	1S-Antisentido gGUAUGGACACCAUUGUUGAUGGUAGUAC (SEQ ID NO. 101) 1S-Sentido GCUACCAUCAACAAUGGUGUCCAUAACCAC (SEQ ID NO. 102)
3OH [2]		2S-Antisentido gAAGAAUUGAUGAUUGCCCCACCAACUCAC (SEQ ID NO. 103)

121

		2S-Sentido GAGUUGGUGGGCAAUCAUCAUUAUUCAC (SEQ ID NO. 104)
3OH [3]		3S- Antisentido gAUCACUAUACAGCAAGUUGUCGACAC (SEQ ID NO. 105) 3S-Sentido GUCGACAACUUGCUGUAUAGUGAUCAC (SEQ ID NO. 106)
3OH [4]		4S-Antisentido gUAUUCUCUGUCCAGGUGACCUUGCACAC (SEQ ID NO. 107) 4S-Sentido GUGCAAGGUCACCUGGACAGAGAAUACAC (SEQ ID NO. 108)
IDT HP [1]	Cadena simple de ARN de EPSPS de palmera diseñada para autohibridarse en una horquilla, que contiene una secuencia antisentido en el bazo 5' y una secuencia antisentido en el brazo 3', con un bucle tetranucleotide intermediario	1S- GUAUGGACACCAUUGUUGAUGGUAGUAGAAU ACUACCAUCAACAAUGGUGUCCAUC (SEQ ID NO. 109)
IDT HP [2]		2S- AAUAAUUGAUGAUUGCCCACCAACUCUGAAAAG AGUUGGUGGGCAAUCAUCAUUAUU (SEQ ID NO. 110)
IDT HP [3]		3S- AUCACUAUACAGCAAGUUGUCGACCACGAAA GUGGUCGACAACUUGCUGUAUAGUGAU (SEQ ID NO. 111)
IDT HP [4]		4S- UAUUCUCUGUCCAGGUGACCUUGCAACGAAA GUUGCAAGGUCACCUGGACAGAGAAUA (SEQ ID NO. 112)

1/2

	GAAA; sintetizada químicamente mediante IDT	
[TIF]	ARNbc de factor de iniciación de traducción (TIF) de palmera (160 mer) sintetizado a través de transcripción T7 in vitro	Sentido: UUCGAGUAAUGGGGAAAUUGGAUAAUGUAGAGG AGAGGAAGAAGGUUAUUGAUUCAUUGGAUGAG GUAUUAGAAAAGGCCGAGAGAUUAGAAACGGCG AACUUACAAGCAGAUAAUAGAAAGGAUAGCACA AAUGUAAAUAACCGUCUCCGAGUGUAAGU (SEQ ID NO. 73) Antisentido: ACUUACACUCGGAGACGGUUUAUUUACAUUUGU GCUAUCCUUUCUAUUAUCUGCUUGUAAGUUCG CCGUUUCUAAUCUCUCGGCCUUUUCUAAUACCU CAUCCAAUGAAUCAUAACCUUCUUCCUCUCCU CUACAUUAUCCAAUUUCCCAUUAUCUCGAA (SEQ ID NO. 74)
[ddATPasa]	ARNbc de ATPasa dependiente de ADN de palmera (ddATPasa) (168- mer) sintetizado a través de transcripción T7 in vitro	Sentido: GAUCACAAAUUUGCCGGUUUAUGAUCAAAUACG GAACAUAAAGACAGAUACACUUGAACACCAUGAU UCGCAUUGGGGGUGUGGUUACUCGUCGUUCUG GAGUAUUCCUCAGUUGAUGCAGGUGAAGUAU GACUGCAAUAAAUGUGGGGCUAUCCUGGGUCC CUUUUU (SEQ ID NO. 113) Antisentido: AAAAAGGGACCCAGGAUAGCCCCACAUUUAUUG CAGUCAUACUUCACCUGCAUCAACUGAGGGAAU ACUCCAGAACGACGAGUAACCACACCCCCAAUG CGAAUCAUGGUGUUAAGUGUAUCUGUCUUAU GUUCCGUUUUGAUCAUAAACCGGCAAUUUGU GAUC (SEQ ID NO. 114)

183) Las soluciones de los polinucleótidos se prepararon y aplicaron a las hojas de palmera amaranto utilizando los protocolos descritos en la Tabla 12.

Tabla 12

Número de protocolo (descripción)	Protocolo
1 (1 etapa - aplicación manual)	1. Aplicar una mezcla de polinucleótidos en 1% de Silwet L-77, 2% de sulfato de amonio en 10 milimolares de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 6,8 (o solución amortiguadora testigo de 1% de Silwet L-77, 2% de sulfato de amonio en 10 milimolares de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 6,8) mediante pipeteo manual 2. 48 o 72 horas después, pulverización de glifosato ("2X Wmax" o 1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX®) mediante pulverizador común (10 galones/acre)
2 (1 etapa - pulverizador)	1. Pulverizar una mezcla de polinucleótidos en 1% de Silwet L-77, 2% de sulfato de amonio en 10 milimolares de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 6,8 (o solución amortiguadora testigo de 1% de Silwet L-77, 2% de sulfato de amonio en 10 milimolares de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 6,8) mediante pulverizador Milli 2. 48 o 72 horas después, pulverización de glifosato ("2X Wmax" o 1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX®) mediante pulverizador común (10 galones/acre)
3 (2 etapas - aplicación manual)	1. Pulverización de 1% de Silwet como en la 1ª etapa mediante pulverizador común o pulverizador Milli; 2. Aplicar una mezcla de polinucleótidos en 1% de Silwet L-77, 2% de sulfato de amonio en 10 milimolares de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 6,8 (o solución amortiguadora testigo de 1% de Silwet L-77, 2% de sulfato de amonio en 10 milimolares de solución amortiguadora de fosfato

	de sodio, pH 6,8) mediante pipeteo manual 3. 48 o 72 horas después, pulverización de glifosato ("2X Wmax" o 1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX®) mediante pulverizador común (10 galones/acre)
4 (2 etapas - pulverizador)	1. Pulverización de 1% de Silwet como en la 1ª etapa mediante pulverizador común o pulverizador Milli; 2. Pulverizar mezcla de polinucleótidos en 1% de Silwet L-77, 2% de sulfato de amonio en 10 milimolares de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 6,8 (o solución amortiguadora testigo de 1% de Silwet L-77, 2% de sulfato de amonio en 10 milimolares de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 6,8) mediante pulverizador Milli 3. 48 o 72 horas después, pulverización de glifosato ("2X Wmax" o 1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX®) mediante pulverizador común (10 galones/acre)
5 (mezcla en tanque)	Pulverizar mezcla de polinucleótidos en 1% de Silwet L-77, 2% de sulfato de amonio en 10 milimolares de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 6,8 que contiene glifosato a 1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX® (o solución amortiguadora testigo de 1% de Silwet L-77, 2% de sulfato de amonio en 10 milimolares de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 6,8, que contiene glifosato a 1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX®) mediante pulverizador Milli.

184) Las combinaciones de polinucleótidos se evaluaron tal como se indica en la Tabla 13.

Tabla 13

Polinucleóti dos aplicados en combinació n	SEQ ID NO,	Protocolo	Cantidad aplicada de cada polinucleóti do (g/acre)	Total de polinucleóti dos aplicados (g/acre)	Cantidad de copias de EPSPS*	Resultad os**
IDT [1] IDT [3] IDT [4]	83,84, 87,88 89,90	1	0,29 0,29 0,29	0,87	112	75% de muerte (27 DDT)
IDT [1] IDT [3] IDT [4] [TIF]	83,84, 87,88 89,90 73,74	1	0,29 0,29 0,29 0,50	1,4	112	100% de muerte (27 DDT)
IDT [1] IDT [3] IDT [4] [ddATPasa]	83,84, 87,88 89,90 113,114	1	0,29 0,29 0,29 0,50	1,37	112	11,2% de enanism o (27 DDT)
IDT [1] IDT [3] IDT [4] [TIF] [ddATPasa]	83,84, 87,88 89,90 73,74 114,114	1	0,29 0,29 0,29 0,50 0,50	1,87	112	100% de muerte (27 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3] IDT [4]	83,84, 85,86 87,88 89,90	1	0,29 0,29 0,29 0,29	1,2	112, 36	0% testigo (11 DDT); 0% testigo

~~126~~

						(31 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3] IDT [4]	83,84, 85,86 87,88 89,90	1	1,4 1,4 1,4 1,4	5,8	112, 36	0% testigo (11 DDT); 15% de enanismo (31 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3] IDT [4]	83,84, 85,86 87,88 89,90	1	2,9 2,9 2,9 2,9	12	112, 36	0% testigo (11 DDT); 35% de enanismo (31 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3] IDT [4]	83,84, 85,86 87,88 89,90	1	5,8 5,8 5,8 5,8	23	112, 36	51% de enanismo (11 DDT); 100% de enanismo (31 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3]	83,84, 85,86 87,88	2	0,29 0,29 0,29	1,2	33, 54	9% de enanismo

127

IDT [4]	89,90		0,29			(6 DDT)
IDT [1]	83,84,	2	5,8	23	33, 54	100% de muerte
IDT [2]	85,86		5,8			(6 DDT)
IDT [3]	87,88		5,8			
IDT [4]	89,90		5,8			
IDT [1]	83,84,	2	0,29	0,87	33, 54	20% de enanismo
IDT [3]	87,88		0,29			(6 DDT)
IDT [4]	89,90		0,29			
IDT [1]	83,84,	2	5,8	17	33, 54	100% de muerte
IDT [3]	87,88		5,8			(6 DDT)
IDT [4]	89,90		5,8			
IDT [5]	91,92	1	0,29	0,29	34, 36, 54	14,1% de enanismo
						(22 DDT)
IDT [5]	91,92	1	2,9	2,9	34, 36, 54	100% de muerte
						(22 DDT)
IDT [1]	83,84,	1	2,9	12	34, 36, 54	100% de muerte
IDT [2]	85,86		2,9			(22 DDT)
IDT [3]	87,88		2,9			
IDT [4]	89,90		2,9			
IDT [1]	83,84,	1	2,9	14	34, 36, 54	100% de muerte
IDT [2]	85,86		2,9			(22 DDT)
IDT [3]	87,88		2,9			
IDT [4]	89,90		2,9			
IDT [5]	91,92		2,9			
IDT [1]	83,84,	1	2,9	8,7	34, 36,	100% de

IDT [3]	87,88		2,9		54	muerte
IDT [4]	89,90		2,9			(22 DDT)
IDT [1]	83,84,	1	2,9	12	34, 36,	100% de
IDT [3]	87,88		2,9		54	muerte
IDT [4]	89,90		2,9			(22 DDT)
IDT [5]	91,92		2,9			
IDT [5]	91,92	1	0,29	0,29	33, 54,	71% de
					55	enanism
						o
						(18 DDT)
IDT [5]	91,92	1	2,9	2,9	33, 54,	100%
					55	de
						muerte
						(18 DDT)
IDT [1]	83,84,	1	0,29	1,4	33, 54,	100%
IDT [2]	85,86		0,29		55	de
IDT [3]	87,88		0,29			muerte
IDT [4]	89,90		0,29			(18 DDT)
IDT [5]	91,92		0,29			
IDT [1]	83,84,	1	0,29	1,2	33, 54,	100%
IDT [2]	85,86		0,29		55	de
IDT [3]	87,88		0,29			muerte
IDT [4]	89,90		0,29			(18 DDT)
IDT HP [1]	109	3	0,29	1,2	16, 33	100%
IDT HP [2]	110		0,29			de
IDT HP [3]	111		0,29			muerte
IDT HP [4]	112		0,29			(18 DDT)
IDT [1]	83,84,	3	0,29	1,2	16, 33	100%

129

IDT [2]	85,86		0,29			de
IDT [3]	87,88		0,29			muerte
IDT [4]	89,90		0,29			(18 DDT)
IDT [1]	83,84,	3	0,29	0,87	16, 36	100%
IDT [3]	87,88		0,29			de
IDT [4]	89,90		0,29			muerte
						(18 DDT)
IDT [1]	83,84,	3	5,8	17	16, 36	100%
IDT [3]	87,88		5,8			de
IDT [4]	89,90		5,8			muerte
						(18 DDT)
IDT [1]	83,84,	3	29	87	16, 36	100%
IDT [3]	87,88		29			de
IDT [4]	89,90		29			muerte
						(18 DDT)
IDT [1]	83,84,	3	0,29	1,1	16, 36	100%
IDT [2]	85,86		0,29			de
IDT [3]	87,88		0,29			muerte
IDT [4]	89,90		0,29			(18 DDT)
3'-OH [1]	101,102	3	No	22-26	16	100% de
3'-OH [2]	103,104		correspond	microlitros		muerte
3'-OH [3]	105,106		e	(en		(10
3'-OH [4]	107,108			volumen)		DDT)
IDT romo	93,94	3	0,29	1,1	16	75% de
[1]	95,96		0,29			muerte
IDT romo	97,98		0,29			(10
[2]	99,100		0,29			DDT)
IDT romo						
[3]						

IDT romo [4]						
IDT romo [1] IDT romo [2] IDT romo [3] IDT romo [4]	93,94 95,96 97,98 99,100	3	5,8 5,8 5,8 5,8	23	16	100% de muerte (10 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3]	83,84, 85,86 87,88	3	29 29 29	87	16	34% de enanism o (14 DDT)
IDT [2] IDT [3] IDT [4]	85,86 87,88 89,90	3	29 29 29	87	16	48% de enanism o (14 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [4]	83,84, 85,86 89,90	3	29 29 29	87	16	25% de enanism o (14 DDT)
IDT [1] IDT [4]	83,84, 89,90	3	29 29	58	16	44% de enanism o (14 DDT)
IDT [3] IDT [4]	87,88 89,90	3	29 29	58	16	41% de enanism o (14

						DDT)
IDT [2] IDT [4]	85,86 89,90	3	29 29	58	16	40% de enanismo (14 DDT)
IDT [1]	83,84	3	29	29	16	51% de enanismo (13 DDT)
IDT [2]	85,86	3	29	29	16	0% testigo (13 DDT)
IDT [3]	87,88	3	29	29	16	51% de enanismo (13 DDT)
IDT [4]	89,90	3	29	29	16	51% de enanismo (13 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3] IDT [4]	83,84, 85,86 87,88 89,90	3	29 29 29 29	116	16	75% de muerte (13 DDT)

*cuando se indica más de una cantidad de copias, las plantas tratadas eran una mezcla de cantidades de copias

**DDT = días después del tratamiento; "0% testigo" significa que no se observaron

5 diferencias entre las plantas tratadas y las testigo; el % de enanismo se calcula como [100

132

- (promedio de altura de las plantas de prueba/promedio de altura de las plantas testigo)*100]

185) Se diseñaron secuencias polinucleotídicas de ARN bicatenario de 25 mer para la supresión del gen TIF en Amaranthus palmeri tal como se indica en la Tabla 14.

Tabla 14

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
TIF_ARNbc1	antisentido: 5'-UUUUCUAAUACCUCAUCCAAUGAAU-3'	115
	sentido: 5'-AUUCAUUGGAUGAGGUAAUAGAAAA-3'	116
TIF_ARNbc2	antisentido: 5'-UAUCUGCUUGUAAGUUCGCCGUUUC-3'	117
	sentido: 5'-GAAACGGCGAACUUACAAGCAGAUUA-3'	118
TIF_ARNbc3	antisentido: 5'-GGAGACGGUUUAAUUUACAUUUGUGC-3'	119
	sentido: 5'-GCACAAUUGUAAAUAAACCGUCUCC-3'	120
TIF_ARNbc4	antisentido: 5'-UAUUUACAGGUUUACCAUUGGUUGA-3'	121
	sentido: 5'-UCAACCAAUGGUAAAACCGUAAAUA-3'	122

186) Los polinucleótidos de ARNbc de TIF de 25 mer se evaluaron en palmera amaranto resistente a glifosato con alta cantidad de copias (112) y baja cantidad de copias (16) de EPSPS.

187) Las plantas con alta cantidad de copias se trataron con una mezcla de 4 ARNbc cortos de EPSPS (ARNbc 1 corto, ARNbc 3 corto, ARNbc 4 corto, tales como se describieron en el Ejemplo 1 y IDT [5] (SEQ ID NOS:91-92 tales como se describieron en la Tabla 11) a 11,5 gramos/acre y un ARNbc de TIF individual a 5,8 gramos/acre o con cada ARNbc de TIF individual de 25 mer a 5,8 gramos/acre; las soluciones de

- polinucleótidos se formularon en 10 milimolares de solución amortiguadora de fosfato de sodio (pH 6,8) que contenía 2% de sulfato de amonio y 1% de Silwet L-77. Treinta minutos después del tratamiento con polinucleótidos, las plantas se pulverizaron con glifosato (1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX®) o no.
- 188) Las plantas con baja cantidad de copias se trataron con una mezcla de 4 ARNbc cortos de EPSPS (ARNbc 1 corto, ARNbc 3 corto, ARNbc 4 corto, tales como se describieron en el Ejemplo 1 y IDT [5] (SEQ ID NOS:91-92 tales como se describieron en la Tabla 11)) a 0,23 grams/acre un ARNbc de TIF individual a 5,8 gramos/acre o con cada
- 189) Los resultados se muestran en las Figuras 31 y 32 y muestran que los polinucleótidos de TIF potencian la actividad de los polinucleótidos de EPSPS y que los polinucleótidos de TIF tienen actividad herbicida propia.

Ejemplo 27

- 190) Los aspectos de la invención incluyen composiciones polinucleotídicas y métodos de uso para potenciar la actividad de un herbicida no polinucleotídico en una planta. Por ejemplo, una composición polinucleotídica diseñada para regular un gen dirigido a un herbicida o un gen de desactivación de un herbicida o un gen de respuesta a estrés o una combinación de dichos genes objetivo, se aplica a una maleza o a una planta espontánea, simultáneamente o posteriormente o antes de la aplicación de un herbicida no polinucleotídico (típicamente un herbicida químico convencional), resultando en la mejora de la actividad del herbicida no polinucleotídico. La combinación de una composición polinucleotídica con un herbicida no polinucleotídico (por ejemplo, un herbicida químico convencional) proporciona un efecto sinérgico, es decir, el efecto herbicida de la combinación es mayor que la suma del efecto herbicida de la composición polinucleotídica y el efecto herbicida del herbicida no polinucleotídico.
- 191) Se proporcionan ejemplos de herbicidas químicos convencionales y sus genes dirigidos al herbicida correspondientes en la Tabla 15.

Tabla 15

Ejemplos de herbicidas	Gen objetivo (gen dirigido al herbicida)
Glifosato	5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS)
Lactofeno, flumioxazina, etc.	protoporfirinogen oxidase (PPO)
Mesotriona, isoxaflutol	4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa (HPPD)
Quizalofop, cletodim	acetil coenzima A carboxilasa (ACCase)
Norflurazona, clomazona	fitoeno desaturasa (PDS)
Glufosinato	glutamina sintasa (GS)
Rimsulfurón, clorsulfurón	acetolactato sintasa (ALS)
Atrazina, diurón, bromoxinilo, metribuzina	proteína D1 de fotosistem II (PSII)
Dinitroanilina, pendimetalina	tubulina
Diclobenilo, isoxabeno	Celulosa sintasa

192) Se proporcionan ejemplos de herbicidas químicos convencionales y sus genes de desactivación del herbicida correspondientes en la Tabla 16.

5

Tabla 16

Ejemplos de herbicidas	Gen objetivo (gen de desactivación del herbicida)
Acetoclor, metolaclor	glutación S-transferasa (GST)
Muchos incluidos los herbicidas SU	Monooxigenasas incluidos citocromos P450 (ver, por ejemplo, un citocromo P450 para conferir resistencia a inhibidores de HPPD, benzotiadiazinonas, sulfonilureas y otros clases de herbicidas, descritas en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos 2009/0011936)
Tiazopir	esterasas (por ejemplo, esterasas implicadas en la apoptosis o senescencia)
2,4-D, metribuzina,	glucosil transferasas; malonil transferasas
Glifosato, paraquat	Compartimentación celular y genes de secuestro (por ejemplo, transportadores ABC)

Ejemplo 28

193) Este ejemplo ilustra un método para inducir la regulación sistémica de un gen objetivo endógeno en una planta en crecimiento que incluye revestir tópicamente hojas de la planta en crecimiento con polinucleótidos que tienen una secuencia esencialmente
5 idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen objetivo endógeno o en el ARN mensajero transcrito a partir de gen objetivo endógeno, por los cual los polinucleótidos permean el interior de la planta en crecimiento e inducen la regulación sistémica del gen objetivo endógeno.

194) Se diseñaron polinucleótidos de ARN bicatenario o ADNmc antisentido para los
10 genes dirigidos al herbicida 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), fitoeno desaturasa (PDS), protoporfirina IX oxigenasa (PPO), fenilalanina amoníaco liasa (PAL), hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase), acetolactato sintasa (ALS) y glutamina sintasa (GS). Para cada gen dirigido a herbicida,
15 se aplicó una solución que contenía una mezcla de 8 polinucleótidos de ADNmc antisentido en 2% de sulfato de amonio en 10 milimolares de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 6,8, a una tasa de 2,32 g/acre con posterior aplicación de 0,5% de Silwet L-77 por pulverización (10 galones/acre). Los polinucleótidos evaluados y las observaciones del fenotipo resultante se indican en la Tabla 17.

136

Tabla 17

Gen	Nombre	Tamaño o (nt)	Secuencia	SEQ ID NO :	Fenotipo
EPS PS			(Ver secuencias proporcionadas en los Ejemplos 1, 9, 13, 14, 21, 26)	--	El ARNbc aplicado tópicamente con posterior aplicación de glifosato mató a palmera resistente a glifosato (hasta 60 copias de EPSPS) en 7-10 días
PDS	PDS sentido	185	GACGGAAACCCUCCAGAG AGGCUGUGCAUGCCUAUU GUUAAACACAUCGAGUCA CUAGGUGGUGAAGUUAAA CUUAAACUCUCGUAUACAA AAGAUUCAGUUGGACCAG AGUGGAAGCGUGAAGAGU UUUUUGCUAAAUACGGG AGGGAAAUACGAGGAGAU GCCUAUGUUUUUGCCACC CCAGU	12 3	El ARNbc aplicado tópicamente provocó el fenotipo de blanqueado y enanismo y es sistémico.
	PDS antisentido	185	ACUGGGGUGGC AAAACA UAGGCAUCUCCUCGUAUU UCCCUCCCGUUAUUUAGC	12 4	

137

			AAAAACUCUUCACGCUU CCACUCUGGUCCAACUGA AUCUUUUGUAUACGAGAG UUAAGUUUAACUUCACCA CCUAGUGACUCGAUGUGU UUAACAAUAGGCAUGCAC AGCCUCUCUGGAGGGUU UCCGUC		
PPO	PPO_OLIG O1	21	GTGATATTACCTCCAACAC GAT	12 5	Los ADN ansentido aplicados tópicamente provocaron enanismo en el crecimiento vegetal.
	PPO_OLIG O2	21	ATAGTAAGCACAGGATCG GAG	12 6	
	PPO_OLIG O3	21	CTTTCAATCCACTGTCAAC CG	12 7	
	PPO_OLIG O4	21	ATCAAGCGTTCGAAGACCT CAT	12 8	
	PPO_OLIG O5	21	CAGCAATGGCGGTAGGTA ACA	12 9	
	PPO_OLIG O6	21	GCAATTGCCCGAATCCTTT TA	13 0	
	PPO_OLIG O7	21	TAGCTCAAATCAAGGTCC TA	13 1	
	PPO_OLIG O8	21	TCATAAGCACCTCTATAC AC	13 2	
PAL	PAL_OLIG O1	21	TTCTTAACCTCGTCGAGAT G	13 3	Los ADN ansentido aplicados tópicamente provocaron enanismo en el crecimiento vegetal.
	PAL_OLIG O2	21	ATACCCGAGTATCCTTGCA AA	13 4	
	PAL_OLIG O3	21	TAGGGCCACGGCCTTGG AGT	13 5	
	PAL_OLIG O4	21	AGCGGATATAACCTCAGCT AG	13 6	
	PAL_OLIG O5	21	CTTCGTGGCCCAACGAAT GAC	13 7	

	PAL_OLIG O6	21	CAAGCTCGGGTCCCTGCT TGC	13 8	
	PAL_OLIG O7	21	GGAAGGTAGATGACATGA GTT	13 9	
	PAL_OLIG O8	21	GATGGCATAGTTACCACTG TC	14 0	
HPP D	HPPD_OLI GO1	21	TCCGTAGCTTACATACCGA AG	14 1	Los ADN ansentido aplicados tópicamente provocaron enanismo en el crecimiento vegetal.
	HPPD_OLI GO2	21	TCCAAGTGAATAGGAGAAA CA	14 2	
	HPPD_OLI GO3	21	AGCAGCTTctgCGTCTTCTA C	14 3	
	HPPD_OLI GO4	21	ACAGCACGCACGCCAAGA CCG	14 4	
	HPPD_OLI GO5	21	CGaTGTAAGGAATTTGGtA AA	14 5	
	HPPD_OLI GO6	21	CGAGGGGATTGCAGCAGA AGA	14 6	
	HPPD_OLI GO7	21	GTAGGAGaATacGGTGAAG TA	14 7	
	HPPD_OLI GO8	21	GACCCCAAGaAAATCGTCT GC	14 8	
ACC asa	ACCA_OLI GO1	20	gtcttacaagggttctcaa	14 9	El ADN ansentido aplicado tópicamente provocó enanismo en el crecimiento vegetal.
	ACCA_OLI GO2	21	ATCTATGTTACCTCCCTG TG	15 0	
	ACCA_OLI GO3	21	ATAAACCATTAGCTTTCCc GG	15 1	
	ACCA_OLI GO4	21	TTtATtGgAaCAaGCGgAgTT	15 2	
	ACCA_OLI GO5	21	TATAGCACCACTTCCCGAT AG	15 3	
	ACCA_OLI GO6	21	GCACCACGAGGATCACAA GAA	15 4	

	ACCA_OLIGO7	21	CCACCCGAGAAACCTCTC CAA	15 5	
	ACCA_OLIGO8	21	CAGTCTTGaCGAGTGATTC CT	15 6	
ALS	ALS-OLIGO1	22	gTTCTtCAGGgCTAAATCGG GA	15 7	Sin fenotipo significativo
	ALS-OLIGO2	22	GTTCAAGAGCTTCAACGA GAAC	15 8	
	ALS-OLIGO3	22	ATACAAACTCCAACGCGTC CAG	15 9	
	ALS-OLIGO4	22	CTCTTGgAAAGCATCAGTA CCA	16 0	
	ALS-OLIGO5	22	CTAGAAAGATACCCACCCA ATT	16 1	
	ALS-OLIGO6	22	ACTAGAATTCAAACACCCA CCC	16 2	
	ALS-OLIGO7	22	TTTCTGCTCATTCAACTCC TCC	16 3	
	ALS-OLIGO8	22	TATGTATGTGCCCGGTTAG CTT	16 4	
GS (glutamina sintasa)	GS_OLIGO 1	21	TCATATCCAAGCCAGATCC TC	16 5	Sin fenotipo significativo
	GS_OLIGO 2	21	TGCATCACACATCACCAAG AT	16 6	
	GS_OLIGO 3	21	GTA CTCTGTTCAATGCCA TA	16 7	
	GS_OLIGO 4	21	ATTGATACCAGCATAGAGA CA	16 8	
	GS_OLIGO 5	21	AGCAATTCTCTCTAGAATG TA	16 9	
	GS_OLIGO 6	21	CATCATTCCTCATCGACTT AG	17 0	
	GS_OLIGO 7	21	CTCTCGTTGCCCTCTCCAT AA	17 1	

~~140~~

	GS_OLIGO	21	CAACGCCCCAGGAGAAAAG	17	
	8		TTC	2	

- 195) Se investigaron la actividad herbicida de los polinucleótidos de ADNmc que se dirigen a las enzimas 4-hidroxifenilpiruvato (HPPD) y protoporfirinógeno oxidasa (PPO) y un factor de iniciación de transcripción (TIF) y su efecto sobre la actividad herbicida cuando se usan en combinación con los herbicidas mesotriona, fomesafen y atrazina en palmera amaranto. Los polinucleótidos utilizados en este experimento eran 8 oligonucleótidos de ADNmc antisentido de HPPD (SEQ ID NOS:141-148), 8 oligonucleótidos antisentido de PPO (SEQ ID NOS:125-132) y 8 oligonucleótidos de ADNmc antisentido de TIF (SEQ ID NOS:75-82, ver Ejemplo 26).
- 196) Se cultivaron plantas de palmera amaranto (*Amaranthus palmeri*) sensibles al glifosato en macetas cuadradas de 4 pulgadas con mezcla para plántulas Sun Gro® Redi-Earth que contenía 3,5 kg/metro cúbico de fertilizante Osmocote® 14-14-14 en un invernadero con un fotoperíodo de 14 h p y una temperatura diurna de 30 grados Celsius y una temperatura nocturna de 20 grados Celsius. Se subregaron las plantas según fue necesario.
- 197) Las plantas de 10 a 15 cm de altura se pretrataron manualmente con 40 microlitros (se trataron 4 hojas maduras completamente expandidas con 10 microlitros de solución por hoja en cada planta) de una solución de solución amortiguadora-tensioactivo (como testigo; 0,5% de Silwet L-77 y 2% de sulfato de amonio) o una mezcla de solución amortiguadora-tensioactivo-polinucleótido de ADNmc de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a HPPD, PPO o TIF. Algunas plantas se dejaron sin tratamiento y se usaron como testigos. Veinticuatro horas después, las plantas sin tratamiento, las plantas tratadas con solución amortiguadora-tensioactivo y las plantas tratadas con solución amortiguadora-tensioactivo-ADNmc se trataron utilizando un pulverizador agrícola equipado con una boquilla 9501E y calibrado para administrar 93 litros de solución por hectárea con un inhibidor de HPPD, mesotriona (4 libras de ingrediente activo por galón;) o con un inhibidor de PPO, fomesafen (2 libras de ingrediente activo por galón) o con un inhibidor de Fotosistema II, atrazina (90% de ingrediente activo) tal como se indica en la Table 18. Se agregó concentrado de aceite de cultivo (CAC) a 1% a todos los tratamientos con herbicida. Se usó una tasa baja de cada herbicida (mesotriona: 13 g por acre, equivalente a 1/8X de la tasa de campo recomendada; fomesafen: 16 g por acre, equivalente a 1/22X de la tasa de campo recomendada; y atrazina: 170 g por acre,

equivalente a1/8X de la tasa de campo recomendada), para poder detectar cualquier mejora en la actividad herbicida mediante la mezcla oligonucleotídica.

Tabla 18

Número de tratamiento	Pretratamiento	Ingrediente activo	Tasa (gramos por hectárea de ingrediente activo)
0	Solución amortiguadora-tensioactivo	--	
1	Sin tratamiento	Mesotriona	13
2	Solución amortiguadora-tensioactivo	Mesotriona	13
3	Solución amortiguadora-tensioactivo-ADNmc-HPPD		
4	Solución amortiguadora-tensioactivo-ADNmc-HPPD	Mesotriona	13
5	Sin tratamiento	Fomesafén	16
6	Solución amortiguadora-tensioactivo	Fomesafén	16
7	Solución amortiguadora-tensioactivo-ADNmc-PPO		
8	Solución amortiguadora-tensioactivo-ADNmc-PPO	Fomesafén	16
9	Sin tratamiento	Atrazina	170

10	Solución amortiguadora- tensioactivo-ADNmc- TIF		
11	Solución amortiguadora- tensioactivo-ADNmc- TIF	Atrazina	170

198) La altura de las plantas se determinó cuatro días después del tratamiento con herbicida. Se recogieron los datos de un experimento con cuatro repeticiones por tratamiento. Los resultados (expresados como altura de las plantas de palmera amaranto según fue afectada por la solución de solución amortiguadora-tensioactivo, ADNmc y combinaciones de tratamientos con herbicida) se muestran en la Tabla 19 y la Figura 33. Las plantas tratadas con oligonucleótidos de ADNmc antisentido de HPPD, oligonucleótidos de ADNmc antisentido de PPO y oligonucleótidos de ADNmc antisentido de TIF exhibieron enanismo en el crecimiento, midiendo 125, 153 y 115 mm, respectivamente, mientras que las plants tratadas con solución amortiguadora-tensioactivo (testigo) midieron 185 mm (Figura 33). El tratamiento con oligonucleótidos de ADNmc antisentido de HPPD, oligonucleótidos de ADNmc antisentido de PPO y oligonucleótidos de ADNmc antisentido de TIF respectivamente provocó una reducción del crecimiento de 32%, 18% y 38% con respecto al testigo con solución amortiguadora-tensioactivo.

199) No se observaron diferencias importantes en la altura de las plantas entre plantas tratadas con solución amortiguadora-tensioactivo y posteriormente con herbicida y plantas tratadas solo con herbicida. Las plantas tratadas con oligonucleótidos de ADNmc antisentido de HPPD y posteriormente con mesotriona exhibieron la mayor reducción en el crecimiento de la planta, midiendo 100 mm, una reducción del 46% en comparación con las plantas tratadas con solución amortiguadora-tensioactivo. Las plantas tratadas con oligonucleótidos de ADNmc antisentido de PPO y posteriormente con fomesafen midieron 126 mm, un reducción del 32% en comparación con las plantas tratadas con solución amortiguadora-tensioactivo. Las plantas tratadas con oligonucleótidos de ADNmc antisentido de TIF y posteriormente con atrazina midieron 121 mm, un reducción del 34% en comparación con las plantas tratadas con solución amortiguadora-tensioactivo.

Tabla 19

Número de tratamiento	Pretratamiento	Ingrediente activo	Tasa (gramos por hectárea de ingrediente activo)	Altura de la planta (mm)	Error estándar
0	Solución amortiguadora	--	--	185	15
1	Sin tratamiento	Mesotriona	13	180	18
2	Solución amortiguadora	Mesotriona	13	179	18
3	ADNmc-HPPD			125	19
4	ADNmc-HPPD	Mesotriona	13	100	7
5	Sin tratamiento	Fomesafén	23	158	12
6	Solución amortiguadora	Fomesafén	23	139	10
7	ADNmc-PPO			153	20
8	ADNmc-PPO	Fomesafén	23	126	6
9	Sin tratamiento	Atrazina	170	146	19
10	ADNmc-TIF			115	17
11	ADNmc-TIF	Atrazina	170	121	16

Ejemplo 29

200) Este ejemplo ilustra las secuencias evaluadas de polinucleótidos ARN bicatenario diseñadas para diferentes genes esenciales para determinar el efecto de la secuencia evaluada en el fenotipo observable. Para cada gen esencial, se aplicó una solución que contenía el polinucleótido de ARNbc en 2% de sulfato de amonio en 10 milimolares de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 6.8, a palmera amaranto a una tasa de 240 picomol por planta con posterior aplicación de 0,5% de Silwet L-77 por pulverización (10 galones/acre). Los polinucleótidos evaluados y las observaciones del fenotipo resultante se indican en la Tabla 20.

Tabla 20

Gen	Nom bre	Tam año (nt)	Secuencia	SEQ ID NO:	Fenotipo
Factor de iniciación de traducción (TIF)	senti do	160	UUCGAGUAAUGGGAAAUUGGAUAAUG UAGAGGAGAGGAAGAAGGUUAUUGAU UCAUUGGAUGAGGUAAUAGAAAAGGC CGAGAGAUUAGAAACGGCGAACUUACA AGCAGAUAAUAGAAAGGAUAGCACAAA UGUAAAUAACCGUCUCCGAGUGUAAG U	73	El ARNbc aplicado tópicamen te provocó enanismo en el crecimient o vegetal.
	antis entid o	160	ACUUACACUCGGAGACGGUUUAUUUA CAUUUGUGCUAUCCUUUCUAAUUAUCU GCUUGUAAGUUCGCCGUUUCUAAUCU CUCGGCCUUUUCUAAUACCUCAUCCAA UGAAUCAAUAAACCUUCUCCUCUCCUC UACAUUAUCCAAUUUCCCAUUACUCGA A	74	
ATPasa dependien te de ADN (ddATPas a)	senti do	168	GAUCACAAAUUUGCCGGUUUAUGAUCA AAUACGGAACAUAAAGACAGAUACACUU GAACACCAUGAUUCGCAUUGGGGGUG UGGUUACUCGUCGUUCUGGAGUAUUC CCUCAGUUGAUGCAGGUGAAGUAUGA CUGCAAUAAAUGUGGGGCUAUCCUGG GUCCCUUUUU	113	El ARNbc aplicado tópicamen te provocó enanismo en el crecimient o vegetal.
	antis entid o	168	AAAAAGGGACCCAGGAUAGCCCCACAU UUAUUGCAGUCAUACUUCACCUUGCAUC AACUGAGGGAAUACUCCAGAACGACGA GUAACCACACCCCCAAUGCGAAUCAUG GUGUUAAGUGUAUCUGUCUUAUGUU CCGUAAUUUGAUCAUAAACCGGCAAAUU UGUGAUC	114	
Hidroxi-3- Metilbut-2-	senti do	200	CUGAAGCUGGUGAAGGUGAAGAUGGA CGAAUGAAAUCUGCGAUUGGAAUUGG	173	Sin fenotipo

145

enil difosfato sintasa (HMEDS)			GACCCUUCUUCAGGAUGGCUUGGGAG AUACGAUCAGGGUGUCUCUAACAGAAC CACCAGAAGAGGAGAUAGACCCUUGCA GAAGGUUGGCAAUUCUUGGAACAAAAG CAGCUGAAAUUCAGCAAGGAGUGGCA CCAUUUGAAG		significativ o
	antis entid o	200	CUUCAAAUGGUGCCACUCCUUGCUGA AUUUCAGCUGCUUUUGUCCAAGAUU UGCCAACCUUCUGCAAGGGUCUAUCU CCUCUUCUGGUGGUUCUGUUAGAGAC ACCCUGAUCGUAUCUCCCAAGCCAUCC UGAAGAAGGGUCCCAAUCCAUCGCA GAUUUCAUUCGUCCAUCUUCACCUUCA CCAGCUUCAG	174	
TF (FIE) de endosper ma indpendie nte de fertilizació n	senti do	183	UCCCAUCAAAAGUUCCCUACAAAAUAUG UGCAGUUUCCUAUCUUCCUUGCCGCC AUUCAUACAAACUAUGUUGAUUGUAC AAGGUGGCUUGGUGAUUUUGUUCUUU CUAAGAGUGUUGACAAUGAGAUUGUA CUGUGGGAGCCAAUUAUGAAGGAGCA AUCUCCUGGAGAGGGUUCAGUUGACA	175	Sin fenotipo significativo
	antis entid o	183	UGUCAACUGAACCCUCUCCAGGAGAU UGCUCUUCUAUAAUUGGCUCCACAG UACAAUCUCAUUGUCAACACUCUAG AAAGAACAAAAUCACCAAGCCACCUUG UACAAUCAACAUAGUUUGUAUGAAUG GCGGCAAGGAAGAUAGGAAACUGCAC AUUUUUUGUAGGGAACUUUGAUGGGA	176	
subunidad RPT5B de 26S proteasom a de ATPasa	senti do	143	UUGUGCUUAAAACAUCGACCAGACAG ACAAUAAUUCUUCUGUUGUUGGACU AGUUGAUCCUGAUACGCUGAAACCUG GUGAUUUAGUUGGUGUCAACAAAGAU AGUUAUCUUAUCCUGGACACUCUGCC GUCGGAUAUGAU	177	Sin fenotipo significativo

146

(RPTB)	antis entido	143	AUCAUAUCCGACGGCAGAGUGUCCA GGAUAAGAUAAACUAUCUUUGUUGACA CCAACUAAAUCACCAGGUUUCAGCGU AUCAGGAUCAACUAGUCCAACAACAG GAAGAAAUAUUGUCUGUCUGGUCGAU GUUUUAAGCACAA	178	
ligasa 1 (LIG1)	senti do	159	CGCUGCAGUUGGUGAAGUAGAUCCCG GCAAGGGGAUUUCACUCCGGUUUCCA CGUCUGGUUCGUAUCCGAGAGGAUAA AUCUCCAGAGGACGCCACAUCAUCUG AGCAGGUGGCGGAUAUGUACAGAUCU CAAGCAAACAAUCCACACCGCAAAAAG AG	179	Sin fenotipo significativo
	antis entido	159	CUCUUUUUGCGGUGUGGAUUGUUUG CUUGAGAUCUGUACAUAUCCGCCACC UGCUCAGAUGAUGUGGCGUCCUCUG GAGAUUUAUCCUCUCGGAUACGAACC AGACGUGGAAACCGGAGUGAAAUCCC CUUGCCGGGAUCUACUUCACCAACUG CAGCG	180	
ARNt sintetasa (tS)	senti do	159	UAAAGAUGGCGGAAAAAUCGACUAUG AUAAAUUGAUUGACAAAUUCGGCUGU CAGCGACUUGAUUUUAUCGCUCAUUCA GAGAAUUGAGCGCAUCACUGCUCGUC CUGCUCAUUGUAUUUCUUCGCCGCAAC GUUUUCUUCGCUCACCGUGAUUUGAA UGA	181	Sin fenotipo significativo
	antis entido	159	UCAUUCAAAUCACGGUGAGCGAAGAA AACGUUGCGGCGAAGAAAUACAUGAG CAGGACGAGCAGUGAUGCGCUCAAUU CUCUGAAUGAGCGAUAAAUCAAGUCG CUGACAGCCGAAUUUGUCAAUCAAUU UAUCAUAGUCGAUUUUUCCGCCAUCU UUA	182	

147

Proteasa 14 específica de ubiquitina (UBP)	senti do	150	UGAAGCUGAUGCUGAAGGAAAGGAU AUUGAUGCUAGUGAAGUAGUUCGCC CAAGGGUGCCAUUAGAAGCUUGCCU AGCUAGCUACUCAGCUCCGGAGGAG GUGAUGGACUUCUACAGCACUGCAU UGAAGGCAAAGGCAACUGCUACAAA	183	Sin fenotipo significativo
	antis entido	150	UUUGUAGCAGUUGCCUUUGCCUUCA AUGCAGUGCUGUAGAAGUCCAUCAC CUCCUCCGGAGCUGAGUAGCUAGCU AGGCAAGCUUCUAAUGGCACCCUUG GGCGAACUACUUCACUAGCAUCAUA UCCUUUCCUUCAGCAUCAGCUUCA	184	
Serina hidroximetil transferasa 2 (SHMT)	senti do	155	ACACCUGCCCUAACAUUCUGGGGUU UUCUCGAAGAAGAUUUUGUUAAGU GGCCGAGUAUUUGAUGCUGCUGUU AAGCUGGCUCUAAAAUCAAGGCUGA CACAAAAGGAACAAAGUUGAAGGACU UCGUUGCCACCUUGCAGUCUGGUGU UUU	185	Sin fenotipo significativo.
	antis entido	155	AAACACCAGACUGCAAGGUGGCAAC GAAGUCCUUCACUUUGUUCUUUU GUGUCAGCCUUGAUUUUUAGAGCCA GCUUACAGCAGCAUCAAUACUCG GCCACUUUAACAAAUCUUCUUCGAG AAAACCCCGAGAUGUUAGGGCAGGU GU	186	
Metionina-ARNt ligasa/sintasa (Mts)	senti do	159	UGAACUACGAAGCAGGCAAAUUCUCC AAAAGUAAAGGCAUUGGAGUUUUUG GGAAUGACGCCAAGAAUUCUAAUAUA CCUGUAGAAGUGUGGAGAUACUAUC UGCUAACAAACAGGCCUGAGGUAUCA GACACAUUGUUCACUUGGGCGGAUC UUCAAG	187	Sin fenotipo significativo.

	antis entid o	159	CUUGAAGAUCCGCCCAAGUGAACAAU GUGUCUGAUACCUCAGGCCUGUUUG UUAGCAGAUAGUAUCUCCACACUUCU ACAGGUAAUUAAGAAUUCUUGGCGU CAUUCCCCAAAACUCCAAUGCCUUUA CUUUUGGAGAAUUUGCCUGCUUCGU AGUUCA	188	
--	---------------------	-----	---	-----	--

Ejemplo 30

- 201) Este ejemplo ilustra polinucleótidos diseñados para dirigirse a una región de homología secuencial baja específica y son útiles, por ejemplo, para seleccionar un alelo específico de un gen objetivo o un gen de una especie específica. Los polinucleótidos diseñados para dirigirse a secuencias antisentidos son útiles para regular ARN antisentidos que participan en la regulación génica, por ejemplo, regular ARN antisentidos que se procesan en ARNip en una vía regulada por iARN. La Figura 34 muestra una alineación del promotor de locus 1 de PDS de Nicotiana benthamiana (SEQ ID NO:319) y del promotor de locus 3 de PDS (SEQ ID NO:320); en el caso del locus 1 que contiene múltiples sitios de inicio de transcripción, la secuencia promotora usada en esta alineación es la que tiene más sitios de inicio de transcripción en 5'. Se descubrió que los genes PDS1 y PDS2 de Nicotiana benthamiana tienen baja homología secuencial en la región promotora pero alta homología secuencial en la región sentido.
- 202) Los polinucleótidos diseñados para dirigirse a partes diferentes de los promotores de PDS1 y PDS2 se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21

Mezcla	Polinucl eótido	Objetivo del promotor	Secuencia	SE Q ID NO.	posició n/dir
2	HL419	Motivo del promotor 1 de PDS objetivo	TCCCATCTCCC ACATGGGTTAC TG	189	590- 567
2	HL420	Motivo del promotor 1 de PDS objetivo	CAGTAACCCAT GTGGGAGATGG GA	190	567- 590
2	HL421	Motivo del promotor 1 de PDS objetivo	GGCTGATGAAA TTCAAGTGCTA	191	557- 536
2	HL422	Motivo del promotor 1 de PDS objetivo	AAACTGAGCTT GGAAATAATC	192	517- 497
2	HL423	Motivo del promotor 1 de PDS objetivo	GAACCCAAAAT TGTCACTTTTT	193	448- 427
3	HL424	Motivo del promotor 1 de PDS objetivo	ATGCACTTGTTT ATACTCTTGTC	194	403- 438
3	HL425	Motivo del promotor 1 de PDS objetivo	ATTTATTAGTGT TCTAAAGAA	195	357- 337
3	HL426	Motivo del promotor 1 de PDS objetivo	TGTAGTAGCTT ATAAGATTAGCT T	196	287- 264
3	HL427	Motivo del promotor 1 de PDS objetivo	GTTGTCCCTTTT ATGGGTCTTT	197	240- 183
3	HL428	Motivo del promotor 1 de PDS objetivo	CCCGTGCAATT TCTGGGAAGC	198	86-66
5	HL429	Motivo del promotor 2 de PDS objetivo	ATTAGTTTTTTA TACACGAAAGA T	199	1313- 1336
5	HL430	Motivo del promotor 2 de PDS objetivo	ATCTTTCGTGTA TAAAAAACTAAT	200	1336- 1313
5	HL431	Motivo del promotor 2 de PDS objetivo	TTGGTGTTTG GCCACTTCCGT	201	1291- 1270

150

5	HL432	Motivo del promotor 2 de PDS objetivo	TTTGTTTGCTAT TTAGCTGGA	202	1256- 1236
5	HL433	Motivo del promotor 2 de PDS objetivo	CAATTTGCAGC AACTCGCACTG GA	203	1205- 1182
6	HL434	Motivo del promotor 2 de PDS objetivo	TCCCACCATTG GCTATTCCGAC	204	1156- 1135
6	HL435	Motivo del promotor 2 de PDS objetivo	CTGTCTCTCTTT TTAATTTCT	205	1105- 1085
6	HL436	Motivo del promotor 2 de PDS objetivo	CCACTTTGCAC ACATCTCCCAC TT	206	1056- 1033
6	HL437	Motivo del promotor 2 de PDS objetivo	GAGGATCCACG TATAGTAGTAG	207	1016- 995
6	HL438	Motivo del promotor 2 de PDS objetivo	TTTAAATAAAGA AATTATTTA	208	889- 869
1	HL439	Promotor 1 de PDS	taatacgactcactata gggcttgagttataac gaagct	209	
1	HL440	Promotor 1 de PDS	taatacgactcactata gggcttctaatttcaag gacg	210	
1	HL441	Promotor 1 de PDS	agcttctaatttcaagg acgata	211	Antisen- tido
1	HL442	Promotor 1 de PDS	gtcATGtgactccact ttgatttg	212	Antisen- tido
1	HL443	Promotor 1 de PDS	ctcaattccgataaattt aagaaat	213	Antisen- tido
1	HL444	Promotor 1 de PDS	cgaagctattggaccg acctaatttc	214	Sentido
1	HL445	Promotor 1 de PDS	ggaattgagggcttcc cagaaattgc	215	Sentido
1	HL446	Promotor 1 de PDS	ATGactttttgattggt gaaactaA	216	Sentido

4	HL447	Promotor 2 de PDS	taatacgactcactata ggtggaactccaacac acaaaaaatttc	217	Sentido
4	HL448	Promotor 2 de PDS	taatacgactcactata ggttgaaaaataatcat aatttta	218	Antisen tido
4	HL449	Promotor 2 de PDS	gcataatatattgatcc ggtat	219	Antisen tido
4	HL450	Promotor 2 de PDS	ctgaaagttcatacata ggtactc	220	Antisen tido
4	HL451	Promotor 2 de PDS	ggtactccaatttcagt atat	221	Antisen tido
4	HL452	Promotor 2 de PDS	ctgaaaattggagtac ctATGtAT	222	Sentido
4	HL453	Promotor 2 de PDS	ATGtATGaacttca gaatattataacc	223	Sentido
4	HL454	Promotor 2 de PDS	taccggatcaatatatt ATGct	224	Sentido

203) Se evaluaron seis combinaciones diferentes de polinucleótidos (1 nanomol/planta de cada polinucleótido aplicado) tal como se indica en la Tabla 21 y se ilustra en la Figura 35 en plantas de *Nicotiana benthamiana* de 4 semanas usando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 12. Las soluciones polinucleotídicas se prepararon en 0,01% (v/v) de Silwet L-77 y 2% (p/v) de sulfato de amonio en 5 milimolares de fosfato de sodio, pH 6,8. Se sumergieron dos hojas completamente expandidas por planta en solución de 0,1% de Silwet L-77 preparada recientemente con H₂O bidestilada durante pocos segundos y se dejaron secar. Aproximadamente 30 minutos después, se aplicaron 20 microlitros de solución polinucleotídica a cada una de las dos hojas pretratadas. Las plantas testigo positivo se trataron de forma similar con un oligonucleótido de ADN dirigido a un segmento conservado de la región sentido de PDS1 y PDS2; las plantas testigo negativo se trataron de forma similar con un oligonucleótido de ADN diseñado para silenciar la proteína verde fluorescente (GFP). Las seis combinaciones de polinucleótidos diseñados para dirigirse a las regiones promotoras de PDS1 o PDS2 indujeron el silenciamiento sistémico en las plantas tratadas tal como se evidenció por el blanqueado. El tratamiento con polinucleótidos de ARNbc o ADNbc de aproximadamente 200 bp y

152

dirigidos a las regiones promotoras de PDS1 o PDS2 también indujo el silenciamiento sistémico en las plantas tratadas tal como se evidenció por el blanqueado.

204) Las siguientes secuencias genómicas adicionales (incluidos el promotor y la secuencia del intrón y exón transcrita) indicadas en la Tabla 22 se identificaron para los genes de *Amaranthus palmeri* para uso en el diseño de polinucleótidos para aplicación tónica:

Tabla 22

Nombre del gen	Secuencia	SEQ ID NO.
ACC1	ttcaaatgaatttaaattatataaaaaatcaatatggacacaagaccggatatc aatccgacccgaaatagttgacttgaaatcaacctgatgacccgaatgaacac ctctagttatcactaacaagggtcagattgctacatcaaaccctcaaatcctg cttaggtgggagcttgcaatggcttagggtaacgggaatgtgtgtctatgtac attgtgcatctattctatgtctattatgttagttagtttttttgatcaaataaaa gagcttaacttttgattttcttgatgtggtgtagtgtgatgaagatcaggctGAG AGAATCTAAATTGGCCAAAATTCTGAGAGACAAGAA GTGAGTTCAGCCCTTCGTGCTGCTGGTGTGTTGGTGTGA TTAGTTGCATCATACAGAGAGATGAAGGGCGAACTCC GATGAGGCATTCACTTCTATTGGTCAGCAGAAAAACAAT ATTATAGTGAGGAGCCTTTACTACGTCATTTGGAACCC CCTCTATCTATGTATCTCGAGCTGGtactagtctctgaaccgatt gcctttctctgctttgtattttgtgtgatatttcgacttaagtctaattacatcgtttgt acatttgtatc	225
ACC3	tttgctttttactattatttccttctttcaaggattgagtggttattgctgactgcttct atgtattaccatagtctctgtataggcattacgggagctgtacctacaTCTAA CTCCTATACAACGTGTGAATATTGCCCGGCATCCTAAT CGCCCCACTTTTCTTGACCACGTATTCAGCATCACAG AAAAGgtttctgatttattataattttgtcatttgattcactcttcaataaagtatcat ccattatcaatctttacggagggtgttcacacaactctgtttcattttgcataattAG TTTGTGGAACACTACATGGAGATCGTGCTGGTTATGATG ACCCTGCTATAGTTACTGGCCTTGGTACGATAGATGG TAGGCGTTATATGTTCACTGGTCATCAAAAGGGAAGAA ATACGAAGGAAAATATTGCACGGAATTTCGGGATGCC TACTCCTCATGGgtaaagtctttactataatgtttactttaatttaattaccta	226

153

	tgttatttaggatgaaaatgaatacttttcttactattacttaggttctaatgcac aaaaaccgtaattattaatgtaccctaattggaattaacacatggtaattaagctct ccgctttgtgtaattaatccaatttttagagagtcaaatagttcagggtaaactaga gcttttcatacccaaataataaaaaccaagggtaaatttccaaaa	
ACC4	atgtgatcaattaaagaaaaagcttaattatatgagcccgtctcacagtgcgg agctatcatagagcccatggggcacgtgccctcggggttttagaaaaaattc aaagtatacttttctattaataagagtaaaaatgaaaattaatattaaactctttg ataataaactctctcactttagtaattttgtcttatttattttatctcatgtgttaat aaggtcagttgacttattttgtccattttctttatgggatgccgtattttaaatttagc aagtaaagataaaaatagttgtaactttacaaaataaaactctatcgaaatttcac cattagttaatgtcccaaaaagtcgaactacaaatcgaccactgtcatcacat ggtgagatagctcatataaaacgagttcagttattaaaggaaaataggaaac acgaaacagttaatttaggcggggcctatgtattatccaaatgtgatactccagtc cacattactcagtccttccaattgaacagttggcttaacttaccagcgctggcc ataaatgccttaacacttttcaatctctcagataactctcacaccACTTATC ATCACAATTCACAATTACTCTAATTCTTTTTATTCCCTT CCATGTCGCTAATTTTCTACTGATTCAGGTTttattctcagctt ttatcaattttattcatgcttttatgtcaatttctgtttcgattttgtctccacttgctgt ctgttttattaatcaattttgatgtgttggaataattgtatgtattttcatgatttctc ttatggagggtcataatgtattgctagatttgttactttcac	227
ACC5	aatttgagcgggaaaaattttaatatcattaaatagctttgctttagtatatagaata gttaaaattaatagtcaaacttattgtaatagcatgcactaatctataataatcttat cctgaaagctataataaaaattataaaaaaatatatgtgaaaaactaatttgagc gggaaaattttaaccaagggctaacacgtatcattaaatagctttactttagtata tagaatgataattaacgatcataaaacaaaattgtcactttcagtagcaaactta caaaatgagcagagtacctcatatcataaaattgcttcttctcattgttgtgtgct ctcattttaggaGTTTCATCGTTTATATCGTCGTCTTACCACTC AATCACTTTTAGATTTATTAGTAGCACTTCCTCAATCTA CAGCAGCAATTTCTACAGTTCAACAACCTC	228
ACC6	ggaaaatttacctagaataatccaatttattcgtgattttctacaaattccaacttca aggggtatttgctaaagtaattaaacttgataccccgatgacctgctatagta gataattaccagaaaattaaaaatgaaaattaattttaaatttagagaaaaattt gaaattcatataaaaaattttaataataaaaaaaatataaatttttgaacattt attttaatctatctttttgaaaaataaaaacttagttatagcaagtgatctggtcacc gggttactctaggaaaatatccctcaaagttgagattattcatggttaataaatag	229

gtgagattattatagaaaaattacgaataaattggattattgttgtaatttttttca aaactatccctaggaaggaccttattagtgattctccctctactttggaggagata ttgtggacttcccatctcctaattgtattgtaactttaactattgattcttaaaaaa aagaactataaaattgtagggtaataaaatctaagatttatctaatttcacttg attattccgattttgtattcacatttttaaatgacattcgtcaaataaaaaaaaata gttcattgcattccaattttgtgactagggggattaaagaaagaatagtatcaat aatcgtaatgtagcaagtagtacaaaagaagtataattcaaatgtcaaactttga tctcgttgaacttgaattgtacgatcggtgtgaatgacatacttcaccttttcatt attttactggtagtgacatgggattatttgcgatatttgcagtaatgaaaatttt ttggttgtctttacaaacaaaaattctaccgaatttttattaatttaattcaacac gttggtgttacctatgatttataggctcgggtccgccactgctagctaacattaaac aatttaacaaactcaatacaccaacctaataaaaaattttttggccataatttt agaatttttagtttaaacattatattgggaattttttcctttatatataaaaaaaa aaaaaatccaaaaaaggggacacacattaatacacacttgaaagcatcgat gatatcgaagaaaaaccagatggggtgcccaattatctcgtctccttcgatatta tcgaattcattaacaacattatatcaaaaaccaacCAAATTACCAACTT TCGAAACCAATATTCGCCGTATTTTTCTCTATTCAACA ATCCCTACAATGGCGGCATTGCCAGCTTCTTCTTCTC CTGCAATTCGGAATCACCCACTTGCAATTTTCTTCTC ATTCAAAAATCACTACCACTCGCTTTCTAAGGTTTCA TTCGGTTTTACTCCCAAGCCTAAATTTGGCCTTTTCTC CAAGgtttatttctatctcttttaattggtaataatggattgttgaattttcagg gtttaacggtataatattgtgggtttttcagtagcattctgggtttagtattggatt ggcattgctttaattttgagattgggtttttgggttttatttggttctgtgattcaagg tattgattgctgcattaaactgtattatggaatgatgtcaattaactgttacattaca ttgctttatggtttcatcatgctgattagtgattactgtgttgaatctctgtctctat gtactatttaatctgataacaagaagtaaacctagaaaacagggttaaagggaa atctataagcttagtaaattaacacttgaaagaagctaatacgagagagagg gtcttttggagaaggcagtttcatattattgctcagttcttagtcagcttacttca cttagacactttaagtagaggcataggtgttcagaatagatccaaagaccg atattaccggactttgtaacaacttaacccgacttcaaatgaattacaatcat ataaaagcaatatggacttaaacggattttgaaccgaccttgaccggttgatccg aatgaatgcctctactcttaagcatgtcaactgtaatatgaaatagaattataat aaactaagttcatgttttctcaactacaaatgaaattttatgacccaaataatgtg gaataccccagcaatagggtgaatggcatttagttcagttgatttagcagacca	
--	--

catctgccctcatattccattgttcagtttagttgtagtagctgtacataatagacta attaagttgtcattttgatccatgttatggtgtctgggataaacggattggaattgta taataaaagttgggtagttattttgctctaggagggggtatgtcatatgtgcactct gttggcaacccgacaatgcaaaacattttcatacttggtacggtgttgcgtgtttgt gcccttcgtattttgtaactgttgatgaatgtgtaaaaatatactacatgatcatatg ctagtaggtcttctcacctagtaaagaaattttctaacacgagaagttcaaaac atattcccattaccattatccaacatcagtagcccgagtccaagtaacatagggtg tccctttatgatagtataagaattggtgcatgaaaaacgcgtgattgtagcgagg atagtagggcgggagaggtacaggatttgaaaatttgtaattgctaaaacgctatc aggatctgttttcttactttgatgttgctttttgaaatttgatccaaattgttaaattatt gagactaattcctgttgatcctgtcgtgaactttgtAGAATCTTTCAGGCC GCATTCTCACAGTGAAGGCTCAATTAACAAGGTGagtc tttttgtcttaactcttatgcagttcattatctcttactgatgagaaaaccactattt ggcctaattctaattccttctaggttgcTTTGGATGGTTCAAATCATG CTCCATCACCTTCGCACGAAAAATCTGGGCTACCAGC CCAAGAAAAGAAGAACGATGAGCCGTCTAGTGAATCT TCTCCTGCAGCATCAGTGTCTGAAGAACGAGTCTCCG AATTCTTGAGCCAAGTTGCCGGTCTTGTCAAgtatgtaaca ttctttatttcttccacacactcgcaatttgataacgagatgtctttagagac gtctggggaacaagggagaaatgagtctagaggttgctagagagaacgaga taaatactaataatataatgaatatttcataatccacattaaaaaaatacaattgaattt gcattatggtgaactaccaagaatcgaatatttttaatactccatgttttggtgt agACTTGTGGATTCTAGAGACATTGTAGAGTTGCAATT AAAACAACCTGGACTGTGAGATATTGATCCGCAAGCAG GAAGCTATTCCTCAACCACAAATTCCTAATCCTACACA TGTCGTTGCAATGCAACCACCACCACCTGCTGTAGCG TCTGCCCCAGCTCCCGTCTCTTCACCAGCCACTCCTC GTCCTGCGTTACCTGCCCCAGCGCCTGCTGCCACGT CAGCTAAGCCATCACTTCCACCTCTCAAGAGCCCTAT GTCAGGCACATTCTACCGTAGTCCAGCTCCTGGCGAG CCGCCTTTCGTGAAGGTaagtgatacccccttttagtggtgatttctgt gttatatcaattttgcattttggaagctgaaaataaatctttcattttccatAGGT TGGAGATAAAGTTAAGAAAGGACAAGTCATATGCATTA TCGAGGCTATGAAGTTGATGAATGAAATCGAGGtacgtat gttattgctttaaactcatgccttaggccgtgaagtt	
--	--

ALS1	acaaaaagcacaaattcaataataactctttaagttgttatcttctaattagttcg gttaaaacggttccccactttcttccgactctcacaaattatcttcccattcatttt ctccaccctctctaattggcggctGTTTCCTTCAATATCAATGGTG GAAAGATTGGAAC TTTATGTTCAAGACACGAATTCGTT TGTGGGTTTGTAAGAAAATTTCATTTTAGAACTCATAC TTCTATATTTGAAAAACATATGCCAAAACTTCAAGGTT TAAAGCAATGGAAGTTTCTGCAAATGCAACAGTAAATA TAGTTCCTGTTTCAGCTCATTCTAGGtaattttctcgaaaat ttccgattacaattaaatactgtttgtaggtaatgaattgcagaagaaatag atggattctattgtttatgttattgtataaattttgttatattagtttctgaattgtg attattctgattgtaigtcaaggtttaggtgttattaataaatgtaaattggattgattg aagtgcaataaggatggcgatgctgattgtgttaaattt	230
ALS2	caacaatgagaatttagaatccatatcaatcttgatattcaagggtatttaagtaat taaagaacaaccattgttaagcgctccactatcttcttcttctcattctc gcttagcttctctcgcactAATTACCTCCATTGCAACCTTTCA AGCTTTCAACAATGGCGTCCACTTCTTCAAACCCACCA TTTTCTCTTTTACTAAACCTAACAAAATCCCTAATCTG CAATCATCCATTTACGCTATCCCTTTGTCCAATTCTCTT AAACCCACTTCTTCTTCTTCAATCCTCCGCCGCCCCCT TCAAATCTCATCATCTTCTTCTCAATCACCTAAACCTAA ACCTCCTTCGCTACTATAACTCAATCACCTTCATCTC TCACCGATGATAAACCCCTCTTCTTTTGTTCCTCGATTT AGCCCTGAAGAACCCAGAAAAGGTTGCGATGTTCTCG TTGAAGCTCTTGAACGTGAAGGTGTTACCGATGTTTTT GCTTACCCTGGTGGAGCATCCATGGAAATCCATCAAG CTCTTACTCGTTCTAATATCATTAGAAATGTTCTTCCTC GACATGAACAAGGTGGGGTTTTCGCTGCTGAAGGCTA CGCTCGTGCTACTGGACGCGTTGGAGTTTGTATTGCC ACTTCTGGTCC	231
EPSPS1	atttgataacttttccttgattcgaatcggtatttttaatacagtattatgaactg atttaatgaaagtgagggaagttcaatttttaaagttgtaggtgtaattgtttctcatt ttggatatgaaagtgagggaagttcaatttcgaatcatgtttgccagttgattcaat gaatgctcttgaaatgaccaagagttcaaggcttctgttataaaacatttcaatt ttgatctaagaatgaactatttagaactaaagtaattaaattattagttataacttat aaaaaaattcaatttaaccttaaatttataaattatgaccttaaaaagatcaagta	232

157

ttgaacgcataatttagaaaaattataattcggcttatcagtctcatattgagacggt ctcgtccaagacaagttgtaicatttatataatcaaataaattatgagtgtattcat gtaggtttcaactttaagcctaggtgaaagatatgtttagcatctttgtgaaagt cagcctataacttggttctaaaattttgaagcataaccatatagtccctcgaattca ttcaagttgtccaatttactttttatacttgcgagacaacattaaacccttaatttt ctaattaatcttaattaaaaattatgaaaatttgatattaataatctttgtattgaaac gaatttaacaagatctcacatgactatgttttaacttatagattaaaaaaaatac aaattaagagtgataagtgaaatagtgcccaaaaacaaatgggacaacttagat gaattggaggtaatattaggtagcaagtgatcactttaacatcaaaattgatcact tatagggtcaaattgaaacttttactttaattgatatgtttaataactactttaattga aattgatattttaagggtcaaaattgaaaccttaagattataattgaaaattggca gaagaaaaacaaagagaaagaataagacacgcaaattgtaccgatctac tcttattcaatttgagacggtctcgcccaagactagatgttcggtcatcctacacc aaccctcaaaaaattcaacaacaaagtcttataatgattccctctaactactaca gtctacaccaaccactttctcttgcgccacaaaactttggttgtaagaactaa gccctctcttccctctctctctttaaagcctgaaaaatccacctaactttttta agccaacaacaacgccaattcagagaaagaataATGGCTCAAGC TACTACCATCAACAATGGTGTCCAACTGGTCAATTGC ACCATACTTTACCCAAATCCCAGTTACCCAAATCTTCA AAACTCTTAATTTTGGATCAAACCTTGAGAATTTCTCCA AAGTTCATGTCTTTAACCAATAAAAAAGAGTTGGTGGG CAATCATTCAATTGTTCCCAAGATTCAAGCTTCTGTTG CTGCTGCAGCTGAGAAACCTTCATCTGTCCCAGAAAT TGTGTTACAACCCATCAAAGAGATCTCTGGTACTGTTT AATTGCCTGGGTCAAAGTCTTTATCCAATCGAATCCTT CTTTTAGCTGCTTTGTCTGAGGtatttatttcaactgcgaaaac aatctctatttgatattggaatttatattacatactccatctgttgtaattgcattagta gatacttatgtttgaccttgttcatttgttgaattggtagtgtagaattgaaat gtaattattgttttccatgtgaattaatctgattaaatccacttctattatgtaagt gcaatgatgttgccaaatggttatcattgaaggataagttgcctacttttgacct cccaactcgcggtgtagagccatttatgtattgggggaaattagaaagattt attgtttgccttcgaaatagtagcggtcgtgattctgatttgggtgtcttatagatat gatatatgggttattcatgtaatgtgtaggttatgcattatgttgatgcattgtctggt gttattgtgtaaatggatgaatgtgttatttggagacatttttcattcattttccctt ttaattggaactggaagagggaaggtattgggagtaattaaagggtgtgagtt	
---	--

	cgatacactgcatcaaagacgaagaactgacatagatgttgaaggctaacct tatcactgcttgaattcaatatgtatctgaaaattttaccctctatatgcatctgtttt gctaataaagtgttttggactatcatgtttgtgatgcttaagaggggatattactg agataaatggaaatatcaaaataacatctattgtgaagt	
EPSPS2	CAAGCTTCAATTATCGTTTTCAAATAAGTATTTCAAAG TCTATAAAGATATTGTATAAGTTTTAGTTCAAATTTAAT AAGttTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAAAATCCAAA TTGAATAAGTTAATARTTAAATTATGACATATAATTATG ACATATAATTTGACCATGATATTTTACAATCTAACTTAA TTTTGAACTTATTATTTCTAATATTCAATTATCGTTCTAA AAATAAGTATTTAAATTGTATAGATATATTGTATAACAT TTAGTTCAAATTTAATTATTGATAGTTTTATTGACTATTT ATTTGGKGTGTTGAAATTCATCCATAGAATGATAGAATA ACACCATTTTTTATATAACTTCGTTCTAAAATTTGAAG CATAACCATATACTCCCTCCAATTCATCCAAGTTGTCC AATTTACTTTTTCATACTTGCCGAGGCAACATTTAAAC CCTTAATATTTCTAATTAATGTTAATTAATAAATTATGAA AATTTGATATTAATAATCCTTGTATTGAAACAAATCTAA CAAGATCCCACATGACTATGTTTTAACTTATAGATTAA GAATAAAATACAAATTAAGAGTAATAAGTGAATAGTGT CCCAAAACAAATAGGACAACCTTGGATGAATTGGAGGT AGTATTAGGTAGCAAGTGATCACTTTAACATCAAATT GATCAGTTACAGGTTCAAATTGAACTTTTACTTTAATT GATATGTTTAAATACTACTTTAAATTGAAATTGATATTC TTAAGGTCAAAATTGAAAACTTTAAGATTATAATTGAAA AATGCCCAGAAGATGAAAAACAGAGAGAAAGCATGT AAGACACGCAAATTGAACCAGTCTACTCTTGTTTCAAT TTGAGACGGTCTCGCCCAAGACCAGATGTTGAGTCAT CCTACACCAACCCCAAAAAATTCAACAACAACTCTTA TAATGATTCCCTCTAATCTACTAGAGTCTACACCAACC CACTTTCTCTTTGCCACCAAACTTTGGTTTGGTGAG AACTAAGCCCTCTTCTTTCCCTTCTCTCTTAAAAGC CTAAAACCCACCAACTTTTTTCAGCCAAGAAACAACGC GAAATTCAGAGGAAGAATAATGGCTCAAGCTACTACC ATCAACAATGGTGTCCATACTGGTCAATTGCACCATAC	233

159

TTTACCCAAAACCCAGTTACCCAAATCTTCAAAAACCTC TTAATTTTGGATCAAACCTTGAGAATTTCTCCAAAGTTCA TGTCTTTAACCAATAAAAGAGTTGGTGGGCAATCATCA ATTGTTCCCAAGATTCAAGCTTCTGTTGCTGCTGCAGC TGAGAAACCTTCATCTGTCCCAGAAATTGTGTTACAAC CCATCAAAGAGATCTCTGGTACTGTTCAATTGCCTGG GTCAAAGTCTTTATCCAATCGAATCCTTCTTTTAGCTG CTTTGTCTGAGGGCACAACAGTGGTCGACAACTTGCT GTATAGTGATGATATTCTTTATATGTTGGACGCTCTCA GAACTCTTGGTTTAAAAGTGGAGGATGATAGTACAGC CAAAAGGGCAGTCGTAGAGGGTTGTGGTGGTCTGTTT CCTGTTGGTAAAGATGGAAAGGAAGAGATTCAACTTTT CCTTGGTAATGCAGGAACAGCGATGCGCCCATTGACA GCTGCGGTTGCCGTTGCTGGAGGAAATTCAAGTTATG TGCTTGATGGAGTACCAAGAATGAGGGAGCGCCCCAT TGGGGATCTGGTAGCAGGTCTAAAGCAACTTGGTTCA GATGTAGATTGTTTTCTTGGCACAAATTGCCCTCCTGT TCGGGTCAATGCTAAAGGAGGCCTTCAGGGGGGCAA GGTCAAGCTCTCTGGATCGGTTAGTAGCCAATATTTAA CTGCACTTCTCATGGCTACTCCTTTGGGTCTTGGAGA CGTGGAGATTGAGATAGTTGATAAATTGATTTCTGTAC CGTATGTTGAAATGACAATAAAGTTGATGGAACGCTTT GGAGTATCCGTAGAACATAGTGATAGTTGGGACAGGT TCTACATTGAGGTGGTCAGAAATACAAATCTCCTGG AAAGGCATATGTTGAGGGTGATGCTTCAAGTGCTAGC TACTTCCTAGCCGGAGCCGCCGTCACTGGTGGGACT GTCACTGTCAAGGGTTGTGGAACAAGCAGTTTACAGgt ataatgttaacccttacccttcacattgttctgctaaattctagaggacccttcaatt ctgggtgggataagcacggcaatttgaccgcaaaaaaattgcaaaattattctg ctgatagaacatctcgagatgagatcatattgagtttggcgtcaacataaacct aatcaaataatgaaaaatacaaacatcatatggtttctttgtctttatgactagac actctctatttcttgattgggatcttattgaaattgctgtgtagcctacacctcat gttcagatttggcgtataccagacttttcttgattgggatcttattgtcccctggattt gcatagGGTGATGTAAAATTTGCCGAAGTTCTTGAGAAG ATGGGTTGCAAGGTCACCTGGACAGAGAATAGTGTA	
--	--

160

	CTGTTACTGGACCACCCAGGGATTTCATCTGGAAAGAA ACATCTGCGTGCTATCGACGTCAACATGAACAAAATG CCAGATGTTGCTATGACTCTTGCA GTTGTG CCTTGTA TGCAGATGGGCCCACCGCCATCAGAGATGTGGCTAG CTGGAGAGTGAAGGAAACCGAACGGATGATTGCCATT TGCACAGAACTGAGAAAAGCTTGGGGCAACAGTTGAG GAAGGATCTGATTACTGTGTGATCACTCCGCTGAAA AGCTAAACCCACCGCCATTGAACTTATGACGATCA CCGAATGGCCATGGCATTCTCTCTTGCTGCCTGTGCA GATGTTCCCGTCACTATCCTTGATCCGGGATGCACCC GTAAAACCTTCCCGGACTACTTTGATGTTTTAGAAAAG TTCGCCAAGCATTGA	
GS3	tcttaattgtattttattattaatctataagttaaaacatagtcagtgcagatcttgtt gattcgctctatgcaaggattttcatatcaacttttcataattttgattatacacaatt acaaatattaacgaacgaataagtgcatataaaagagtgcaaaaagcaa gggacactgtgtgaataggagggagtagatacattaagatgaatctaacgagat ctcacatggatataaattgtcttctatatatgtctaaaatcttgatcaaatttctctt ccaaaatagaatattctaaatgggaagaacattaagaaaacggagggagtagt tataagttaagatagttgggggtatttaggtaaaaaatctatgccaaaagtaga aagtggaacaattagagtgactttactaaataaggaaagtggaacatttaaaatga atcggagggagcatattaactttattttcaaagtggaacataatcatatttaggt aaaaaaattatcaatttaacgtcaaaattgatcacaatagggtaaaattgaaat ttttatgttaattgatctattgttcactttaaattgaaattgatatccttaagggtaaaa ttaatacctctaaaattaaaattattaaggccagaaaataaaaaaaaaaaga agacaggctattagtaaaattattaagtagtaagggtgatacacgcgcgaattg agccggccacttttagttcaattgaaacagtcctcaatcaagaccaattatttatt atttattattttattgtttaagctcaatgggtggacttgataaattatatttgaggag acgggctattagtaaaattaatagttggaatctttttgatatactataaaaagagg tATCTGGTGGAGCCTTAAATCTGCGCAATTGAAGTCCT CAATACACATCTCGCTCTTCTTATTCTCTTTCATCTATT TCCTCCTTTGATCAAACCTACGCCATGTCTCTCTTAAAT GATCTCGTTAACCTTAATCTCTCTGAACTACCGATAA GATTATCGCTGAATACATATGGtaatacaacaatccttctcttttc attt	234

161

GS5	aaaaaaccgtcttattgtagaaaaataaaaaactaaaaagtagtatcaacttta gactagtcataagtgagtgccatcaaactgttctataaaaaggaagagttcct caacttgagattcatatTTTTgtgattctaaatAGAAGAACATACTCAT CTTCCACTTCTCTTATTCATCAAATTTTATTTGTTCCCC AAAAAACATGTCTCTTCTTACAGATCTCATCAATCTTA ATCTTTCTGACTCCACTGAGAAGATCATTGCTGAAtacat atggtcagtttcatccctTTTTtaccttaatcccacttttgttttaccaccattttt catctatTTTcttaaagatttaacttttacttttTgtatataacattcatTTTTcaat tgggtaggttagaaaattctataaataaataaataatnnnnnnnnntacctta atcccacttttgttctaccaccatttttcatcaattttcttaaagatttaactttt aacttttctggTTTTgtgtatataccaatcatttttactagtgtaggttaaaaaa tatctaaaaataaataaataagaataaaaatgtaatcactagattaacccatga attattccctgttttactcaaacttttaccctgttaaaaaaataatgatataaata aattttgagggttTgtaaacccatatgtaatctatacgaaaaaattagatagcg ggtttTgttggaactaaataacaaatttaggaataaactttgagggttatt gaaaaaataacccatatTaatctatatcgaaaaaattgatagcgagcttTgata gat	235
HPPD	cgtcgaagtagaagacgcggaagctgctttaacatcagcgttcgcatggggc tattccctgttttctctattcaattggaaaacgggtgcgtttatctgaggttcatttat atggggatgtTgtctcggtatgaagctacggaaatgaatgTggggatgtgttt ttctctgggttgaggaaatgccggaggaatcatcgtttagaggacttgatttg gcattcgaaggTtgatcatgctgtagggaatgtccctgagttggctcctgaatt gcttattgaagaagtttactgggttcatgagtttctgagtttacagctgaagatg tgggacgagtgaaagtggattgaattcagccgtattggcaaacaatgatgaaat ggtgtTgttccgatgaatgaacctgtgtatgggacaaaaggaagagccaaat tcaaacttatttgagcataatgaaggggctggtgtaCAGCATTTGGCT TTGATGAGTGAAGACATATTTTGGACTTTAAGGGAGAT GAGGAAGAGAAGTGTTCTTGGTGGGTTTGAGTTTATG CCGTCGCCGCCTCCGACTTATTACCGGAATTTGAGGA ACAGAGCTGCTGATGTATTGAGTGAGGAGCAGATGAA GGAGTGTGAAGAGTTGGGGATTTTGGTGGATAAAGAT GATCAGGGCACTTTGCTTCAAATCTTCACCAAACCTAT TGGAGACAGGtaaattttaatcttgcTTcaattgctttgcttgatggattgact agcaaattTgatcgcatTTTgttcttatatgacttgatgatacttctctgtttcgaaa tactcgctacattcgctacattttgtttTgtcactattcatcgTcaagcttattTacat	236

162

	attgcgactaatgtgtaactaaaaatatagtcaagtgggatctgtttgaatcgct aatggcatactttcatcatattaaattttataattttagattagtgtagttaagatatt aatgctcaaaattgtgcattggattgcgtaaaaaagtgaaatgtagcaagtatta tgaaa	
PDS	aaaaccaaaggaaataagttataggtaggaaaaattgtattgaagtaatgta gtaaaactagtaactaaactgtgataccccgatttagcttaaaaagagattgat agactactcatatcaacaaggtgcatcttctttctagggagcccatttgctaaga actctacagttaagcgtgcttggtggggagcaatcttaggatgggtgacctcctg ggaagtttctgggtgcgacgggtgaggccaaagtgcgttaaaaagacttgt gttggtctgtggggctgtctacagtcctcatgagtagtcaccggcggtagcaga ggccggggtgttacataaacagactcaaaggcgctaagccaagtagccaata gcaacatgtgtggcctgcggacagtcacaaaaacacacaatttctattttactc tctttatctcttttaggcttttagccatcaacaataaaacaacaTGATAAAGC AATTCATTTACTGCTAAATTCCAACAATTTGGTCCCTTT TTCCTGTTCTTTCAGTTTCACATACCCTCTTATCAATCT ATATCCAAAAC TATTTCATTTTCCAAACTCTTTTAAACC CAAAAATCAAAACTTTTGATTGAAGAACAACTTTGGG GGTTTTGGAAATGAGTCATTTTGGATATGCTTGTGCT ACTCAATCCACATCAAGATATGTTCTTTTAGGAAATTC AAATAACCCCACTTCAATTTCATCTATTGGAAGTGATT TTTTGGGTCATTCTGTGAGAAATTT CAGT	237
PPOX	tggtacctaccctgtttacattttcaatttccccctttttctctactactcctactttattg attcttatccatgtgtgttctatgggaattgacattaattgttcagggtgtatgctggt gatccttctaagttgagtatgaaagctgcatttggaaaggctggaccttagagc aaaagggtggtagatcattgccggtacactcaaaactattcaggaaaggaag aataatctccaccgcctcgagaccgctcgtaatcaccattactcattgcttccct tcaccttgatcttaccttaatacatgtatttaattgataatgtcacattgcctcattt gcagccgccttccaaacctaagggccagactgttgatccttaggaaaggg ctcattatgttacctaccgccattgctgctaggtatctttgactctcaaatcttaaat attctcatcttctccttctgctaatactagtagtttaccatcttttatttttTAGGCT TGGCAGTAAAGTCAAAC TATCGTGGACACTTTCTAATA TTGATAAGTCGCTCAATGGTGAATACAATCTCACTTAT CAAACACCCGATGGACCGGTTTCTGTTAGGACCAAAG CGGTTGTCATGACTGTCCCTTCATACATTGCAAGTAG CCTGCTTCGTCCGCTCTCagtgagtatcattcttccctcatttctttcgt	238

ttattgttccaatgtctgttaaacaccagtttggccttgctcgtgaattatggct acaatgttaactgattcaggcactgtgggagatgcctaagtttctaaaacctctgc gcataatgttgttggatgttaggaattgcattgaaaaattgctttgtgatgttgatg ttaataccaattacaagtggttcttcaacttctgcaataacctgttcgagtgagcttg aggggggttagattagtgccaatgtgaaactagcaaatgaactccaagcgctg ggataggctccttgggatggagcccctgatacccaagacagtattcaaacctct aagtagagtgaagatcaaggaaagaaactgggtggttcctcaaatacgtaaa aatgaatacagtgatgattgctaatttatcacaatacgtaaaaaatgaatta tggtcgatttggactatttgggtcattttagtgaaatctcgaactaaaaagcga gtctctagcagttctgttacagcggggcatacataggtaggaattggtttttact atttgagcctttgactgtgtggccggtaatatggaatagtctagcacttctcgctg tgtacaactagattattgttaattatgtatgcacttaactctcagataaaacctt aagcactaacatttgttgggtgaaggaatcaggaggaaagaaaattgaggg atttgttggtatatagattccttgggtgataacaaaattggagtggagagatttg aaggaagaatttatagggaattgtccattacacttatgttgattacaaaatttct ccaaaagtggaaagattttagtgaaaatgtttttatttcttctccttcttcttct cctcttaacaaacaaggaaagttaattctatcattccgtaccttccccttctgttctt tttttctctccaaaattcttacttaacgtagtgttattgtcactgtcttatgaacgaga attcttttctcctaatactgctgtgtgcacagtcaatgatttagctagatcatcttg gttagctactcaaaatattacataaaatactgtagaaataaataccaataggctc ttgtcaagaagtagttcaatgtctataagtttaaccaatcctcaaaatttacaccat ggagatatctgcggaataagaactagtaactgtacagctgtaactgttgcaatc agtttatggttgccttgcaaatcaaatcttggaatgttggccttacaattgttact attacgtgaagtttagtctgcccctcacattgtacttggttttgttttcttgcaattt gctcttgaagtataaagtgtgagtgctgagtgctgagtgctgaccttctgctc agGATGTTGCTGCAGATTCTCTTTCTCAATTTTACTATC CACCAGTCGCAGCAGTGTCCCTTTCTTATCCCAAAGA AGCAATTAGACCAGAATGCTTGATCGATGGAGAACTA AAAGGATTCGGGCAATTGCATCCTCGCAGCCAGGGT GTGGAAACCTTGGGtatatgctcccattcaactatatctcaattttatga gtattttcttctcgaattattcaatttggtgacgttaaatttgattgtactcgacaG GAACAATTTATAGTTCATCTCTTTTCCCTGGTTCGAGCA CCACCTGGTAGGACCTTGATCTTGAGCTACATTGGAG GTGCTACAAATGTTGGCATATTACAAAAGgcaagtcatttata caattatatctgtgtatcctcaaataagtggggtatcaatcctgacgacatgcttgct	
--	--

123

164

	tgtatcgatgcagagtgaagatga	
--	--------------------------	--

Ejemplo 31

205) Este ejemplo ilustra una secuencia polinucleotídica que regula la expresión génica en más de una especie vegetal. Se identificaron dos regiones altamente conservadas en secuencias de EPSPS de diferentes especies de malezas y se muestran como las secuencias "Región 1" y "Región 2" en la Tabla 23.

Tabla 23

Especie/gen o secuencia consenso	Región 1	SEQ ID NO:	Región 2	SEQ ID NO:
Euphorbia_h eterophylla_1 Contig1	AGTTTACAGGG AGATGTAAAGT T	239	TCGATGTGAACATGAACAAA ATGCCAGATGTCGCTATGA CATTGGCTGTGGTTG	251
Euphorbia_h eterophylla_2 Contig1	AGTTTGCAGGG AGATGTGAAAT T	240	TCGATGTGAATATGAACAAA ATGCCAGATGTTGCTATGA CATTAGCTGTGGTTGC	252
Ambrosia_trif ida_1Contig1	AGTTTACAGGG GGATGTAAAGT T	241	TCGATGTTAACATGAACAAA ATGCCAGATGTTGCCATGA CGCTTGCAATCGTTGC	253
velvetleaf_1C ontig1	AGTTTGCAGGG TGATGTAAAATT	242	TTGATGTCAACATGAACAAA ATGCCAGATGTTGCCATGA CTCTCGCTGTTGTTGC	254
Xanthium_str umarium_2C ontig1	AGTTTGCAGGG TGATGTGAAATT	243	TTGATGTCAACATGAACAAA ATGCCTGATGTCGCAATGA CTCTTGCTGTGGTTGC	255
Ipomoea_he deracea_1Co ntig1	AGTTTACAGGG GGATGTAAAGT T	244	TTGATGTCAACATGAACAAA ATGCCAGATGTTGCCATGA CTCTTGCTGTAGTTGC	256
Chenopodiu m_album_1C ontig1	AGTTTACAGGG TGATGTAAAATT	245	TTGATGTCAACATGAACAAA ATGCCAGATGTCGCAATGA CTCTTGCTGTTGTTGC	257
Digitaria_san	AGTTTGCAGGG	246	TTGACGTCAACATGAACAAA	258

guinalis_1Contig1	TGATGTGAAATT		ATGCCTGATGTCGCAATGA CTCTTGCTGTGGTTGC	
Senna_obtusifolia_1Contig3	AGTTTACAGGG AGATGTAAAATT	247	TTGATGTCAACATGAACAAG ATGCCAGATGTTGCCATGA CGCTTGCTGTAGTTGC	259
Waterhemp_EPSPS	AGTTTACAGGG TGATGTAAAATT	248	TCGACGTCAACATGAATAAA ATGCCAGATGTTGCTATGA CTCTTGCAAGTTGTTGC	260
Palmer_EPSPS	AGTTTACAGGG TGATGTAAAATT	249	TCGACGTCAACATGAACAA AATGCCAGATGTTGCTATGA CTCTTGCAAGTTGTTGC	261
palmer_1Contig1	AGTTTACAGGG TGATGTAAAATT	250	TCGACGTCAACATGAACAA AATGCCAGATGTTGCTATGA CTCTTGCAAGTTGTTGC	262

206) La Tabla 24 muestra secuencias de polinucleótidos de ARNbc de 21, 22, 24, 35, 45 y 55 mer diseñadas en base a la secuencia consenso de EPSPS para la región 2, TNGANGTcAAcATGAACAAaATGCCaGATGTNGCNATGACNcTtGCNGTNGTTGC (SEQ ID NO:263).

Tabla 24

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
Consenso_21mer ARNbc	Sentido: AACAUGAACAAAAUGCCAGAU	264
	Antisentido: AUCUGGCAUUUUGUUCAUGUU	265
Consenso_22mer ARNbc	Sentido: AACAUGAACAAAAUGCCAGAUG	266
	Antisentido: CAUCUGGCAUUUUGUUCAUGUU	267
Consenso_24mer ARNbc	Sentido: CAACAUGAACAAAAUGCCAGAU GU	268
	Antisentido: ACAUCUGGCAUUUUGUUCAUGUUG	269
Consenso_35mer ARNbc	Sentido: UCGACGUCAACAUGAACAAAAUGCCAGAUGUUGC U	270
	Antisentido: AGCAACAUCUGGCAUUUUGUUCAUGUUGACGUCG A	271
Consenso_45mer ARNbc	Sentido: UCGACGUCAACAUGAACAAAAUGCCAGAUGUUGC UAUGACUCUUG	272
	Antisentido: CAAGAGUCAUAGCAACAUCUGGCAUUUUGUUCAU GUUGACGUCGA	273
Consenso_55mer ARNbc	Sentido: UCGACGUCAACAUGAACAAAAUGCCAGAUGUUGC UAUGACUCUUGCAGUUGUUGC	274
	Antisentido: GCAACAACUGCAAGAGUCAUAGCAACAUCUGGCAU UUUGUUCAUGUUGACGUCGA	275

207) Los polinucleótidos de ARNbc de consenso de EPSPS se sintetizaron mediante transcripción in vitro y se aplicaron tópicamente como preparaciones de ARN en bruto. Las malezas resistentes de glifosato (palmera amaranto de 16 copias e hierba de caballo) se trataron con los seis ARNbc consenso individuales (21, 22, 24, 35, 45, 55 mer); las malezas no resistentes a glifosato (hierba de caballo, palo zorrillo, digitaria, bejuco, quínoa

blanca, poinsettia salvaje) se trataron con los tres ARNbc consenso individuales más cortos (21, 22, 24 mer). Luego del tratamiento con polinucleótidos las plantas resistentes a glifosato se trataron con glifosato (1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX®) y las plantas no resistentes a glifosato se trataron con glifosato (105 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX®). A los 7 días después del tratamiento se descubrió que los seis polinucleótidos de ARNbc consenso de región 2 de EPSPS proporcionan 100% de control (plantas muertas) de palmera amaranto resistente a glifosato; plantas de palmera amaranto testigo tratadas solo con glifosato no murieron. A los 7 días después del tratamiento, se descubrió que los tres polinucleótidos de ARNbc consenso de región 2 de EPSPS más cortos (21, 22, 24 mer) evaluados individualmente proporcionan 95%, 80% y 65% de control (combinación de plantas muertas y lesionadas), respectivamente, de amaranto tuberculoso; las plantas de amaranto tuberculoso tratadas solo con glifosato proporcionaron aproximadamente 40% de control (combinación de plantas muertas y lesionadas); y una mezcla de los tres polinucleótidos de ARNbc consenso de región 2 de EPSPS más cortos (21, 22, 24 mer) proporcionó aproximadamente el mismo control que el glifosato solo. Los polinucleótidos de ARNbc consenso de región 2 de EPSPS no provocaron un efecto observable sobre las otras especies de malezas (hierba de caballo, palo zorrillo, digitaria, bejuco, quínoa blanca, poinsettia salvaje) evaluadas.

20

Ejemplo 32

208) Este ejemplo ilustra el uso de un tratamiento con polinucleótidos tóxico para silenciar transitoriamente un gen en una planta para producir un fenotipo deseado. El silenciamiento de polifenol oxidasa en tejidos vegetales inhibe el amarronamiento de los tejidos vegetales cortados o lesionados, una rasgo valorable para frutas y verduras donde la resistencia al amarronamiento es un rasgo deseable.

209) Se diseñaron oligonucleótidos de ADN antisentido con las secuencias que se muestran en la Tabla 25 para dirigirlos a tres genes de polifenol oxidasa (PPO1, PPO2 y PPO3) de lechuga; el texto subrayado indica la secuencia T7 que se incluyó en los polinucleótidos antisentido.

30

Tabla 25

Oligo-nucleótido o antisentido	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO.	Longitud
HH07	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> CTTTATTGAATTTAGC TATGTAATC	276	45
HH09	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> TTTATCAACCAAATGT GCAGC	277	41
HH11	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> TTGTCTGTACATAATT GTGAGATTTGTGG	278	49

- 210) Se trataron plantas de lechuga de tres semanas (variedad SVR3603 L4) de la siguiente forma. Se pretrataron dos hojas fuente (hojas que son más viejas y tiene un ~60% de su tamaño en la madurez) en cada planta con 0,1% (v/v) de Silwet-L-77 y se dejaron secar (~15 minutos). A cada hoja se aplicaron en pequeñas gotas 20 microlitros de una mezcla de los polinucleótidos antisentido de polifenol oxidasa en una solución de 0,01% (v/v) de Silwet L-77 y 2% (p/v) de sulfato de amonio en 5 milimolares de fosfato de sodio, pH 6,8; cada planta se trató con 6,7 nanomoles de cada uno de los tres polinucleótidos HH07, HH09 y HH11 (para un total de 20 nanomoles por planta). Las plantas testigo se trataron con un polinucleótido HH02-05 no relacionado (antisentido para fitoeno desaturasa) o solo con solución amortiguadora (0,01% (v/v) de Silwet L-77 y 2% (p/v) de sulfato de amonio en 5 milimolares de fosfato de sodio, pH 6,8).
- 211) Aproximadamente 3 semanas después del tratamiento con polinucleótidos tópico, las hojas de lechuga " no tratadas" (es decir, las que no fueron tratadas con los polinucleótidos tópicos) se cortaron de la cabeza de la lechuga bajo agua y se incubaron en un recipiente con 1,33 milimolares de jasmonato de metilo en 5% de etanol. Las hojas se inspeccionaron para determinar el amarronamiento de las nervaduras centrales y se fotografiaron cada 24 horas. Se tomaron muestras de las plantas restantes y se congelaron para análisis de ARN pequeño y ARNm.
- 212) Las plantas tratadas con los polinucleótidos antisentido de polifenol oxidasa HH07, HH09 y HH11 exhibieron reducción considerable en el amarronamiento en las nervaduras centrales después del tratamiento con jasmonato de metilo. Las plantas tratadas con HH02-05 (antisentido para fitoeno desaturasa) como testigo exhibieron una leve reducción

en el amarronamiento de las nervaduras centrales en comparación con las tratadas con solución amortiguadora.

Ejemplo 33

5 213) Este ejemplo ilustra una composición herbicida adaptada para revestimiento tópico sobre la superficie exterior de una planta en crecimiento que comprende tensioactivo y al menos un agente letal para plantas, la mejora en donde el agente letal para plantas incluye polinucleótidos que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen vegetal o a la secuencia del ARN transcrito del
10 gen vegetal, produciendo los polinucleótidos la supresión sistémica del gen vegetal. Más específicamente, este ejemplo ilustra una composición herbicida adaptada para revestimiento tópico sobre la superficie exterior de una planta en crecimiento que comprende tensioactivo y al menos un agente letal para plantas, la mejora en donde el agente letal para plantas incluye polinucleótidos que producen la supresión de los genes
15 endógenos de fitoeno desaturasa (PDS), 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) o ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO) de Nicotiana benthamiana. Este ejemplo también ilustra el uso de polinucleótidos aplicados tópicamente para suprimir un gen expresado altamente (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa) en una planta.

20 214) Se diseñó un polinucleótido antisentido con la secuencia CATCTCCTTTAATTGTAAGTGC (SEQ ID NO:34) para el gen endógeno de fitoeno desaturasa (PDS) de Nicotiana benthamiana, que tiene los fragmentos de secuencia de ADNc

ATGCCCCAAATCGGACTTGTATCTGCTGTTAATTTGAGAGTCCAAGGTAATTCAGCTT
25 ATCTTTGGAGCTCGAGGTCTTCGTTGGGAACTGAAAGTCAAGATGTTTGCTTGCAAAG
GAATTTGTTATGTTTTGGTAGTAGCGACTCCATGGGGCATAAGTTAAGGATTCGTACT
CCAAGTGCCACGACCCGAAGATTGACAAAGGACTTTAATCCTTTAAAGGTAGTCTGCA
TTGATTATCCAAGACCAGAGCTAGACAATACAGTTAACTATTTGGAGGCGGCGTTATT
ATCATCATCGTTTCGTACTTCCTCACGCCCAACTAAACCATTGGAGATTGTTATTGCTG
30 GTGCAGGTTTGGGTGGTGTCTACAGCAAAATATCTGGCAGATGCTGGTCACAAAC
CGATATTGCTGGAGGCAAGAGATGTCCTAGGTGGGAAGGTAGCTGCATGGAAAGATG
ATGATGGAGATTGGTACGAGACTGGGTTCACATATTCTTTGGGGCTTACCCAAATAT
GCAGAACCTGTTTGGAGAACTAGGGATTGATGATCGGTTGCAGTGGAAGGAACATTC
AATGATATTTGCGATGCCTAACAAGCCAGGGGAGTTTCAGCCGCTTTGATTTTCCTGAA
35 GCTCTTCCTGCGCCATTAAATGGAATTTTGGCCATACTAAAGAACAACGAAATGCTTA

CGTGGCCCGAGAAAGTCAAATTTGCTATTGGACTCTTGCCAGCAATGCTTGGAGGGC
 AATCTTATGTTGAAGCTCAAGACGGTTTAAGTGTTAAGGACTGGATGAGAAAGCAAGG
 TGTGCCTGATAGGGTGACAGATGAGGTGTTTCATTGCCATGTCAAAGGCACCTTAACCTC
 ATAAACCCTGACGAGCTTTTCGATGCAGTGCATTTTGATTGCTTTGAACAGATTTCTTCA
 5 GGAGAAACATGGTTCAAAAATGGCCTTTTTAGATGGTAACCCTCCTGAGAGACTTTGC
 ATGCCGATTGTGGAACATATTGAGTCAAAGGTGGCCAAGTCAGACTAAACTCACGAA
 TAAAAAAGATCGAGCTGAATGAGGATGGAAGTGTCAAATGTTTTATACTGAATAATGG
 CAGTACAATTAAGGAGATGCTTTTGTGTTTGCCACTCCAGTGGATATCTTGAAGCTT
 CTTTTGCCTGAAGACTGGAAAGAGATCCCATATTTCCAAAAGTTGGAGAAGCTAGTGG
 10 GAGTTCCTGTGATAAATGTCCATATATGGTTTGACAGAAAAGTGAAGAACACATCTGA
 TAATCTGCTCTTCAGCAGAAGCCCGTTGCTCAGTGTGTACGCTGACATGTCTGTTACA
 TGTAAGGAATATTACAACCCCAATCAGTCTATGTTGGAATTGGTATTTGCACCCGCAG
 AAGAGTGGATAAATCGTAGTGAAGTCAAGAAATTATTGATGCTACAATGAAGGAACTAGC
 GAAGCTTTTCCCTGATGAAATTTTCGGCAGATCAGAGCAAAGCAAATATTGAAGTAT
 15 CATGTTGTCAAACCCCAAGGTCTGTTTATAAACTGTGCCAGGTTGTGAACCCTGTC
 GGCCCTTGCAAAGATCCCCTATAGAGGGTTTTATTTAGCTGGTGAAGTACACGAAACA
 GAAGTACTTGGCTTCAATGGAAGGTGCTGTCTTATCAGGAAAGCTTTGTGCACAAGCT
 ATTGTACAGGATTACGAGTTACTTCTTGGCCGGAGCCAGAAGATGTTGGCAGAAGCA
 AGCGTAGTTAGCATAGTGAAGTAA (SEQ ID NO:38). Se diseñaron polinucleótidos
 20 antisentido con las secuencias CTGTGATCATCATATGTATCA (SEQ ID NO:279),
 CCTTAACTCTCCAGCTAGCAA (SEQ ID NO:280), CAGCCCGCAAATGTTTCATTC (SEQ
 ID NO:281), GCCGTCAATGGCCGCATTGCT (SEQ ID NO:282),
 TCCTTCCCTCAGAAAGGGCAG (SEQ ID NO:283) y TTGCCTCATGCTGCTAATCTG
 (SEQ ID NO:284) para el gen endógeno de 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa
 25 (EPSPS) de *Nicotiana benthamiana*, en base a la secuencia de ADNc de EPSPS de
Nicotiana benthamiana
 CTTATATGTGCTTAAGCCTAACGTGCACCCGGCCCTTAACCCAGCAGTTTTCAATC
 TACCTACCGTCTCTACCATTTTCTTCTAGTTGGTGAAAATTTCTAACTTTGAGAAAACA
 AGCCAAAGTTTTTGTCTAAGAACGCAAAATGAGTGAAATTTTTGCAGCAATGGCAC
 30 AGATTAGCAGCATGAGGCAAGGGATACAGACCCCTAATCTTAATTCCTATTTTCCTAA
 AACCCAAAAGGTTCTCTTTTTTCGCATTCTATCTTCTTTGGATCAAAGAAAATAACCC
 AAAATTGAGCAAAATCTTTGTGGGTGTGTAAGAAAGATTGAGTTTTGAGGGTGGCAA
 GTCACCTTTTAGGATTTGTGCATCAGTGGCCACTGCACAGAAGCCCAACGAGATTGT
 GCTGCAACCCATCAAAGATATATCAGGCACTGTAAATTGCCTGGTTCTAAATCCCTTT
 35 CCAACCGTATTCTCCTTCTTGCTGCCCTTTCTGAGGGAAGGACTGTTGTTGACAATTT

171

ACTGAGTAGTGATGACATTCATTACATGCTTGGTGCGTTGAAAACACTTGGACTTCAT
GTAGAAGATGACAATGAAAACCAACGAGCAATTGTGGAAGGTTGTGGTGGGCAGTTT
CCTGTGCGGCGAGAAGTCTGAGGAAGAAATCCAACTATTCCTTGGAATGCAGGAACA
GCAATGCGGCCATTGACGGCAGCAGTTACTGTAGCTGGAGGACATTCAAGATATGTA
5 CTTGATGGAGTTCCTAGGATGAGAGAGAGACCGAT (SEQ ID NO:285),
CACTGACGTTGGATTAGAGGTAGGCTCCTTATATGTGCTTAAGCCTAACGTGCAGCC
GGCCCCCAACCCAGCAGTTTTCAATCTACCTACCGTCTCTACCATTTTCTTATAGTA
GTTGAAAATTTCTAACTTTGAGAAAACAAGCCAAAGTTTTGTTTCTAAGAACACAAAGG
GAGTGAAATTTTTGCAGCAATGGCACAGATTAGCAGCATGAGGCAAGGGATACAGA
10 CCCCTAATCTTAATTCCTATTTTCTAAAACCCAAAAGGTTCTCTTTTTTCGCATTCTA
TCTTCATTGGATCAAAGAAAATAACCCAAAATTGAGCAAAATCTTTGTGGGTGTGTAAG
AAAGATTCAGTTTTGAGGGTGGCAAAGTCACCTTTTAGGATTTGTGCATCAGTGGCCA
CTGCACAGAAGCCTAACGAGATTGTGCTGCAACCTATCAAAGATATATCAGGCACTGT
TAAATTACCTGGTTCTAAATCCCTTTCCAATCGTATTCTCCTTCTTGCTGCCCTTTCTG
15 AGGGAAGGACTGTTGTTGACAATTTACTGAGTAGTGATGACATTCATTACATGCTTGG
TGCATTGAAAACACTTGGACTTCATGTAGAAGATGACAATGAAAACCAACGAGCAATC
GTAGAAGGTTGTGGTGGGCAGTTTCTGTGCGCAAGAAGTCTGAGGAAGAAATCCAA
CTATTCCTTGGAATGCAGGAACAGCAATGCGGCCATTGACGGCAGCAGTTACTGTA
GCTGGTGGACATTCTAGATATGTACTTGATGGAGTTCCTAGGAT (SEQ ID NO:286) y
20 AAATTCTTGGTTGAGGAGGTCAGAAGTACAAGTCTCCTGGAAAAGCATATGTTGAAG
GAGATGCCTCAAGTGCTAGCTACTTTTTGGCGGGTGCAGCTGTCACAGGTGGAAGTG
TCACTGTTGAAGGTTGTGGAACAAGCAGTTTACAGGGGGATGTTAAGTTTGCTGAGG
TCCTCGAAAAGATGGGGGCAGAAGTTACATGGACAGAGAACAGTGTCACGGTTAAAG
GACCTCCAAGGAACTCTTCTGGAATGAAACATTTGCGGGCTGTTGACGTTAACATGAA
25 CAAAATGCCAGATGTTGCCATGACTCTTGCTGTAGTTGCACTTTTTGCTGATAGTCCT
ACTGCCATAAGAGATGTTGCTAGCTGGAGAGTTAAGGAACTGAGCGGATGATTGCC
ATATGCACAGAACTTAGGAAGTTGGGTGCAACAGTTGTAGAAGGGCCAGACTACTGC
ATAATCACTCCACCTGAAAAGTTAAAAGTAGCGGAAATTGATACATATGATGATCACA
GAATGGCCATGGCTTTCTCTCTTGCGGCTTGCTGCTGATGTTCCAGTCACCATTAAGGA
30 CCCCAGTTGTAACGCAAAACCTTCCCAACTACTTTGACGTTCTCCAGCAGTATTCC
AAGCATTAACCACTTTCCATTAAGAATTTTAAAAAGAGAGACTTTGACAACAATGGT
GTCATACCGGAAGAGAAAAGCTTTGATCCAAGCTTTCAACTCCTTTTCATTTGTCATGT
GATGATCATTGTATTTGTTGAAGTTGAGCTGCTTTTCTTTGTCCAGAAGACATGTATG
GATACTATTACTATATAGTTAAGGTGAACTCAGCA (SEQ ID NO:287). Se diseñaron
35 polinucleótidos antisentido con las CCACATGGTCCAGTATCTGCC (AK195, RBCS_1-2-

172

3-4, SEQ ID NO:288), CAAGCAAGGAACCCATCCATT (AK196, RBCS_1-2-3-4, SEQ ID NO:289), GGCCACACCTGCATGCATTGC (AK197, RBCS_1-2-3-4, SEQ ID NO:290), GTGTTACGGTAGACAAATCC (AK198, RBCS_1-2, SEQ ID NO:291), TGCCTGCACTTGACGCACGT (AK199, RBCS_1-2, SEQ ID NO:292),
 5 AACTGATGCATTGCACTTGAC (AK200, RBCS_3-4, SEQ ID NO:293), CAAATCAGGAAGGTATGAGAG (AK201, RBCS_3-4, SEQ ID NO:294) y TGTCAGGTTTTGTTTCCTGG (AK202, RBCS_3-4, SEQ ID NO:295) para el gen endógeno de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO) de Nicotiana benthamiana, en base a los fragmentos de secuencia de ADNc 2A de cadena pequeña
 10 de RuBisCO cloroplástico de Nicotiana benthamianas
 GCAATGGCTTCCTCAGTTCTTTCTCAGCAGCAGTTGCCACCCGCAGCAATGTTGCT
 CAAGCTAACATGGTTGCACCTTTACAGGTCTTAAGTCTGCTGCCTCATTCCCTGTTT
 CAAGAAAGCAAAACCTTGACATCACTTCCATTGCCAGCAACGGCGGAAGAGTGCAAT
 GCATGCAGGTGTGGCCACCAATTAACATGAAGAAGTATGAGACTCTCTCATACCTTCC
 15 CGATTTGAGCCAGGAGCAATTGCTCTCCGAAATTGAGTACCTTTTGAAGAATGGATGG
 GTTCCTTGCTTGGAATTCGAGACTGAGAAAGGATTTGTCTACCGTGAACACCACAAGT
 CACCAGGATACTATGATGGCAGATACTGGACCATGTGGAAGCTACCTATGTTCCGAT
 GCACTGATGCCACCCAAGTGTTGGCTGAGGTGGGAGAGGCGAAGAAGGAATACCCA
 CAGGCCTGGGTCCGTATCATTGGATTTGACAACGTGCGTCAAGTGCAGTGCATCAGT
 20 TTCATTGCCTCCAAGCCTGACGGCTAC (SEQ ID NO:296),
 ACAATGGCTTCCTCAGTTCTTTCTCAGCAGCAGTTGCCACCCGCAGCAATGTTGCTC
 AAGCTAACATGGTTGCACCTTTCACTGGTCTTAAGTCAAGTGCCTTTTTCCCTGTTTCA
 AGGAAGCAAAACCTTGACATCACTTCCATTGCCAGCAACGGCGGAAGAGTGCAATGC
 ATGCAGGTGTGGCCACCAATTAACAAGAAGAAGTACGAGACTCTCTCATACCTTCCCTG
 25 ATCTGAGCGTGGAGCAATTGCTTAGCGAAATTGAGTACCTCTTGAAAAATGGATGGGT
 TCCTTGCTTGGAATTCGAGACTGAGCGCGGATTTGTCTACCGTGAACACCACAAGTC
 ACCGGGATACTATGACGGCAGATACTGGACCATGTGGAAGTTGCCTATGTTCCGATG
 CACTGATGCCACCCAAGTGTTGGCCGAGGTGGAAGAGGCGAAGAAGGCATACCCAC
 AGGCCTGGATCCGTATTATTGGATTCGACAACGTGCGTCAAGTGCAGTGCATCAGTTT
 30 CATTGCCTACAAGCCAGAAGGCTAC (SEQ ID NO:297),
 CAAGCCAACATGGTTGCACCCTTCACTGGCCTCAAGTCCGCCTCCTCCTTCCCTGTTA
 CCAGGAAACAAAACCTTGACATTACCTCCATTGCTAGCAATGGTGGGAAGAGTTCAATG
 CATGCAGGTGTGGCCACCAATTAACATGAAGAAGTACGAGACACTCTCATACCTTCCCT
 GATTTGAGCCAGGAGCAATTGCTTAGTGAAGTTGAGTACCTTTTGA AAAATGGATGGG
 35 TTCCTTGCTTGGAATTCGAGACTGAGCGTGGATTTCGTCTACCGTGAACACCACA ACTC

- ACCAGGATACTACGATGGCAGATACTGGACCATGTGGAAGTTGCCCATGTTCTGGGTG
 CACTGATGCCACTCAGGTGTTGGCTGAGGTGAGGAGGCAAAGAAGGCTTACCCAC
 AAGCCTGGGTTAGAATCATTGGATTGACAAACGTCCGTCAAGTGCAATGCATCAGTTT
 TATCGCCTCCAAGCCAGAAGGCTAC (SEQ ID NO:298) y
- 5 GGCTCAGTTATGTCCTCAGCTGCCGCTGTTTCCACCGGCGCCAATGCTGTTCAAGCC
 AGCATGGTCGCACCCTTCACTGGCCTCAAGGCCGCTCCTCCTTCCCGGTTTCCAGG
 AAACAAAACCTTGACATTACTTCCATTGCTAGAAATGGTGGAAGAGTCCAATGCATGC
 AGGTGTGGCCGCAATTAACAAGAAGAAGTACGAGACACTCTCATACCTTCCTGATTT
 GAGCGTGGAGCAATTGCTTAGCGAAATTGAGTACCTTTTGAAAAATGGATGGGTTCCT
- 10 TGCTTGAATTCGAGACTGAGCATGGATTGCTCTACCGTGAACACCACCACTCACCA
 GGATACTACGATGGCAGATACTGGACGATGTGGAAGTTGCCCATGTTCTGGGTGCACC
 GATGCCACTCAGGTCTTGGCTGAGGTAGAGGAGGCCAAGAAGGCTTACCCACAAGC
 CTGGGTCAGAATCATTGGATTGACAAACGTCCGTCAAGTGCAATGCATCAGTTTCATC
 GCCTACAAGCCCGAAGGCTAT (SEQ ID NO:299).
- 15 215) Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se trataron utilizando un procedimiento similar
 al descrito en el Ejemplo 12. La solución polinucleotídica (o de polinucleótidos mezclados
 en el caso de EPSPS y RuBisCO) se preparó en 0,01% (v/v) de Silwet L-77 y 2% (p/v) de
 sulfato de amonio en 5 milimolares de fosfato de sodio, pH 6,8. Se sumergieron dos hojas
 completamente expandidas por planta en una solución de 0,1% de Silwet L-77 preparada
- 20 recientemente con H₂O bidestilada durante pocos segundos y se dejaron secar.
 Aproximadamente 30 minutos después, se aplicaron 20 microlitros de solución
 polinucleotídica a cada una de las dos hojas pretratadas. Para PDS, cada una de las 5
 plantas recibió 25 nanomoles del polinucleótido antisentido de PDS (SEQ ID NO:34); para
 EPSPS, cada una de las 5 plantas recibió 50 nanomoles de cada polinucleótido
- 25 antisentido de EPSPS (SEQ ID NOS:279-284); y para RuBisCO, cada una de las 5
 plantas recibió 50 nanomoles de cada polinucleótido antisentido de RuBisCO (SEQ ID
 NOS:288-295). Las plantas testigo apareadas se trataron con solución amortiguadora
 (0,01% (v/v) de Silwet L-77 y 2% (p/v) de sulfato de amonio en 5 milimolares de fosfato de
 sodio, pH 6,8). Los resultados se midieron como la altura de la planta a los 12 días (PDS y
- 30 EPSPS) o 10 días (RuBisCO) después del tratamiento y se muestran en las Figuras 36A –
 36B. Las plantas tratadas con el polinucleótido antisentido de PDS exhibieron enanismo
 grave (Figura 36A) y blanqueado. Las plantas tratadas con el polinucleótido antisentidos
 de EPSPS exhibieron enanismo grave (Figura 36B) y lesión severa en los tejidos del
 meristemo y el tallo. Las plantas tratadas con el polinucleótido antisentidos de RuBisCO
- 35 exhibieron enanismo grave (Figura 36C) y tejidos apicales deformes.

174

216) Se diseñó un segundo conjunto de experimentos para investigar los efectos del silenciamiento de un componente de la vía de silenciamiento de iARN endógeno en una planta. Las proteínas Argonauta (AGO) son componentes del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) que une pequeños ARN en el proceso de silenciamiento de iARN. Se esperaba que la supresión de Argonauta redujera el efecto fenotípico observado provocado por un proceso de silenciamiento con iARN. Se diseñaron polinucleótidos antisentido de AGO1 con las secuencias ggaggcaaaatacagagcctca (HL510, SEQ ID NO:300), cactaatcttaatacctaaact (HL511, SEQ ID NO:301), tATGggtcattagcataggcattAT (HL512, SEQ ID NO:302), tctcaagaatatcacgctccc (HL513, SEQ ID NO:303), cccttggggacgctggcaggtcac (HL514, SEQ ID NO:304), taatacgactcactatagggggagagagctagatcttttg (HL515, SEQ ID NO:305), taatacgactcactatagggcacagtatttctctccaacc (HL516, SEQ ID NO:306), TTGCTCATCTTAAATACATGT (HL517, SEQ ID NO:307), TCATCTTAAATACATGTTTTGTCA (HL518, SEQ ID NO:308), ttatcttcagggatacattagc (HL519, SEQ ID NO:309), aatactgcttgctcatcttaaata (HL520, SEQ ID NO:310), gacaattccaagttcagtttc (HL521, SEQ ID NO:311), ccgttttagatcaccataaagaga (HL522, SEQ ID NO:312), ttgtctggtaatatcacatc (HL523, SEQ ID NO:313) para el gen endógeno de Argonaute-1 (AGO1) de Nicotiana benthamiana, en base a dos secuencias de ADNc parcial de AGO1-2 de Nicotiana benthamiana,

ATGGTGAGGAAGAGGAGAACTGAGTTACCTGGTTCTGGTGAGAGCTCTGGGTCTCAA
GAAACTGGCGGACAGGGTCGTGGCCAGCATCCACAGCAGCTGCACCAAGCTACCTC
CCAGACTCCATATCAAAGTGAATGACTACTCAGCCAATACCTTATGCAAGACCAACT
GAAACATCCTCCGAAGCTGGTTCCTCATCTCAGCCACCTGAGCAGGCAGCTCTACAA
GTGACACAACAGTTCCAGCAACTTGCTTTGCAACAAGAAGCGGCTACAACGCAAGCA
GTTCCACCTGCATCAAGCAAATTACTAAGGTTTCCCCTGCGTCCAGGGAAGGGGAGC
AATGGTATGAGATGCATAGTCAAAGCCAATCACTTCTTCGAGAGCTGCCTGACAAAG
ACTTGACACAGTATGATGTCACAATTTCTCCAGAGGTGTCATCACGTGGCGTCAACCG
TGCTGTCATGGCGCAACTGGTGAAGCTGTACCAAGAATCTCATCTTGGGAAGAGACT
TCCAGCATATGATGGAAGGAAAAGTCTATACACTGCAGGGCCCCCTTCCATTTGTTCAA
AAAGACTTCAAATAACTCTTATTGATGATGAGGATGGGCCTGGTGGTGCTAGAAGG
GAAAGGGAATTTAAAGTTGTGATCAAATTGGCTGCCCGTGCTGATCTTCATCACTTGG
GAATGTTTTTAGAAGGGAAACAGGCTGATGCACCTCAAGAGGCGCTTCAAGTTCTGG
ATATTGTTCTGCGTGAGTTGCCAACATCTAGGTTTTGTCCTGTGGGTCGTTCTTTCTAT
TCCCGTGATTTAGGGCGAAAGCAACCATTGGGTGAAGGTTTAGAAAGTTGGCGTGGG
TTCTATCAAAGCATTCGCCCCACACAAATGGGCTTATCACTGAACATCGATATGTCTT

175

CCACTGCATTCATTGAGCCACTGCCAGTCATTGATTTTGTGACACAGCTTCTGAACCG
AGATGTGCCATCTAGACCACTGTCTGATGCTGGCCGTGTAAAGATAAAAAAGCTCTG
AGAGGTGTGAAGGTGGAGGTTACTCATCGTGGAATATGCGGAGGAAGTACCGCATT
TCGGGTTTAAACATCTCAAGCAACAAGAGAGTTGACCTTCCCTGTTGATGAAAATGGTA
5 CAGTGAAATCTGTAATTGAGTATTTTCGAGAAACATATGGGTTTGTAAATCAGCATACT
CAGTGGCCTTGTCTACAAGTTGGAAATCAGCAGAGACCTAATTACTTGCCAATGGAAG
TCTGCAAGATTGTGGAGGGACAAAGGTAATAAGCGCTTGAATGAGAGACAGATTA
CTGCACTTCTGAAAGTGACCTGCCAGCGTCCCCAAGGGAGGGAGCGTGATATTCTTG
AGACCGTACATCATAATGCCTATGCTAATGACCCATATGCCAAGGAGTTTGGTATTAA
10 GATTAGTGACAAGTTGGCACAAGTTGAGGCTCGTATTTTGCCTCCACCTCGGCTTAAA
TATCATGATAACGGTCGAGAAAAGGACTGCCTGCCACAAGTTGGCCAATGGAATATG
ATGAATAAGAAAATGGTAAATGGAGGGACGGTGAACAATTGGATCTGCATAAACTTCT
CTCGCAATGTGCAAGATAGTGTTGCTCATGGGTTTTGCTCTGAGCTTGACAAATGTG
CCAGATATCTGGCATGAATTTCAATCCAAATCCTGTTCTGCCACCTTCGAGTGCACGC
15 CCTGATCAGGTCGAAAGAGTATTGAAAACCTCGATTTTCATGATGCTATGACTAAGTTGC
AGCTGCATGGGAGAGAGCTTGATTTGCTAGTTGTCATCTTGCCAGACAATAATGGATC
TCTTTATGGTGATCTGAAGCGCATTTGTGAGACTGAACTAGGAGTCGTCTCACAGTGC
TGTTTGACAAAACATGTATTTAAGATGAGCAAACAGTATCTAGCCAATGTAGCGCTGA
AAATCAATGTGAAGGTGGGAGGGAGAAACACTGTGCTTGTTGATGCAATATCGAGGC
20 GAATTCCTCTTGTGACGACCGGCCTACCATCATTTTTGGTGCAGATGTCACCCACCC
TCACCCTGGGGAGGACTCTAGCCCATCCATTGCCGCGGTGGTTGCTTCTCAAGATTG
GCCTGAGATTACAAAGTATGCTGGTCTAGTTTCTGCTCAAGCCCATAGGCAAGAGCTT
ATTCAGGATCTGTACACGACTAGGCAAGATCCTGTTAAGGGGACAGTTGCTGGTGGA
ATGATTAAGGACTTACTTATATCCTTCCGAAGAGCTACTGGACAAAAGCCCCAGAGAA
25 TAATTTTCTATAGGGATGGTGTTAGTGAAGGACAATTTTATCAAGTGCTTCTGTTGAA
CTTGATGCGATCCGCAAAGCATGTGCGTCTTTGGAGCCAAATTATCAGCCCCCAGTC
ACATTTGTTGTGGTTCAGAAACGACATCACACAAGGCTTTTTGCCAATAACCACCGTG
ACAGAAATGCAGTTGACAGGAGCGGGAACATTATACCTGGTACTGTTGTAGATTCAAA
GATATGCCACCCGACAGAGTTTGATTTCTATCTTTGTAGCCATGCCGGCATAACAGGGT
30 ACGAGCCGTCCAGCTCACTACCATGTTCTATGGGACGAGAACAAATTCACAGCCGAT
GCGCTGCAGTCTTTGACCAACAACCTCTGCTATACATATGCAAGGTGCACGCGTTCC
GTCTCCATCGTTCCCCCTGCATATTATGCACATTTGGCAGCTTTCCGTGCTCGATTTT
ATATGGAGCCGGAGACATCTGACGGTGGTTCAGTAACAAGTGGGGCTGCTGGTGGC
AGAGGGGGTGGTGCAGGAGCTGCTGGAAGGAACACCCGAGCCCCAAGTGCTGGTG
35 CTGCTGTTAGACCTCTTCCTGCGCTCAAGGATAATGTGAAGAGGGTTATGTTCTACTG

C	(SEQ	ID	NO:314)	y
	CACCTATCACTCTCTTTCTCTCTCTACAAACATATCGTGCCGTTTCTCTCTCGGCCTCT			
	CTTCGTGTTTTAGGGCACCGTGGTGGTTGGTATCCAGGCGGCGGTTTTGAGTTATTA			
	CCATGGTGCGGAAGAAGAGGACTGATGTTCTGGTGGTGCTGAGAGTTTTGAGTCCC			
5	ATGAAACTGGAGGGGACGAGGTGGTGCCCAACGCCCATCACAGCAGCAGCAACAT			
	CAGCATCAGCAAGGCGGAGGAAGAGGCTGGGCACCTCAGCATGGAGGACATGGTG			
	GCCGTGGTGGTGGGGGAGCTCCACGTGGTGGGAATGGCCCCTCAACAATCCTATGGT			
	GGACCTCCTGAATACTACCAACAGGGCAGGGGAACTCAACAGTATCAACGAGGTGGA			
	GGACAACCCCAGCGCCGTGGTGGCATGGGGGGCCGTGGGGCAGGCCACCAGTAC			
10	CCGAGCTGCACCAAGCAACCCAGACTCCACATCAGCCTGTACCATATGGAAGACCAT			
	CAGAAACATACTCAGAGGCTGGTTCCTCGTCTCAGCCACCTGAACCAACGACACAGC			
	AAGTGACTCAGCAATTCCAGCAACTTGTTGTGCAGCCAGAAGCAGCTGCAACCCAAG			
	CAATACAACCAGCATCGAGCAAGTCGATGAGGTTTCCACTCCGGCCAGGAAAGGGTA			
	GTA CTGGTATTAGATGCATAGTTAAGGCCAATCACTTCTTTGCCGAGTTACCTGACAA			
15	AGATCTGCACCAGTATGATGTTTCAATTACTCCTGAGGTCGCCTCTCGGGGTGTCAAC			
	CGGGCCGT CATGGAGCAGCTGGTGAAGCTTTATAGAGAATCCCATCTTGGGAAGAGG			
	CTTCAGCCTATGACGGAAGAAAAAGTCTATACACAGCAGGGCCCCTCCCTTTTGTT			
	AAAAGGATTTTAAAATCACTCTAATTGATGATGATGATGGACCTGGTGGTGCTAGGAG			
	GGAAAGAGAGTTTAAAGTTGTGATCAAGCTGGCGGCTCGTGCTGATCTTCATCACTTG			
20	GGGATGTTCTTACAAGGGAGACAGGCTGATGCACCGCAAGAAGCACTTCAGGTGCTG			
	GATATTGTGCTACGTGAGTTGCCAACATCTAGGTATTGTCCTGTGGGCCGCTCTTTCT			
	ATTCCCCTCATTTAGGACGAAGACAACCACTGGGTGAAGGTTTAGAGAGCTGGCGTG			
	GCTTCTATCAAAGTATTCGTCTACACAGATGGGATTATCCCTGAATATTGATATGTCT			
	TCCACGGCTTTCATTGAGCCACTGCCGATTATTGACTTCGTGAGCCAGCTTCTGAATC			
25	GGGATATCTCTTCTAGACCACTGTCTGATGCTGACCGCGTTAAGATAAAGAAGGCACT			
	GAGAGGTGTAAAGGTGGGGGTCACTCATCGTGGAATATGCGGAGGAAGTATCGCAT			
	TTCTGGCTTGACGTCTCAAGCAACAAGAGAGTTGACTTTTCCTGTGCGATGAAAGGGGT			
	ACGATGAAAGCTGTTGTGGAATATTTTCGGGAAACCTATGGTTTTGTCAATCGGCATA			
	CCCAGTGGCCTTGCTTCAAGTTGGAAATACGCAGAGGCCAAATTACTTGCCAATGG			
30	AAGTATGTAAGATTGTAGAGGGACAGAGATACTCAAAGCGCTTGAATGAGAGGCAGA			
	TAACAGCACTTCTAAAAGTGACCTGCCAACGTCCTCAAGAGAGAGAACGTGATATTCT			
	TCAGACTGTTCAATCACAATGCTTATGCTGATGACCCATATGCGAAGGAGTTTGGTATT			
	AAGATCAGTGAGGAGCTTGCTCAAGTTGAGGCTCGCGTTTTGCCTGCACCTTGGCTT			
	AAATACCATGATACAGGTCGAGAGAAAGACTGTCTGCCACAAGTGGGCCAGTGGAAT			
35	ATGATGAATAAGAAAATGGTTAATGGAGGAACAGTGAACAACTGGATCTGTGTAAACT			

- TTTCTCGCAATGTGCAAGACACAGTTGCACGTGGATTTTGTTCCGAGCTTGCACAAAT
 GTGCATGATATCCGGAATGAACTTCAATCCCAATCCTGTTCTACCACCAGTGAGTGCT
 CGCCCTGATCAAGTTGAGAGAGTCTTGAAAACCTCGATTTACGATGCTATGACAAAGT
 TGCAGCCAAATGGGAGAGAGCTAGATCTTTTGATTGTGATATTACCAGACAATAACGG
 5 CTCTCTTTATGGTGATCTAAAACGGATTTGTGAAACTGAACTTGGAATTGTCTCACAAT
 GCTGCTTGACAAAACATGTATTTAAGATGAGCAAGCAGTATTTAGCTAATGTATCCCT
 GAAGATAAATGTGAAGGTTGGAGGAAGAAATACTGTGCTGGTTGATGCGCTCTCTAG
 ACGAATTCCCCTTGTCAGCGACCGCCCACTATCATTTTTGGTGAGATGTCACCCAT
 CCCCACCCTGGGGAGGATTCTAGCCCGTCAATTGCTGCGGTGGTTGCTTCTCAAGAT
 10 TGGCCTGAAATTACAAAGTATGCTGGTTTGGTTTCTGCTCAAGCGCATAGGCAAGAGC
 TTATACAAGATCTGTACAAGACTTGGCAAGATCCAGTTAGAGGACCTGTGACTGGTGG
 CATGATAAAGGAATTACTTATTTCCCTCCGTCGAGCAACTGGACAGAAGCCGCAGAGA
 ATTATATTCTACAGAGATGGTGTTAGTGAAGGACAATTTTACCAAGTTCTTCTTTTTGA
 ACTTGATGCAATCCGCAAGGCATGTGCATCTTTAGAACCCCACTATCAGCCCCCGGTT
 15 ACGTTTGTGTGGTCCAGAAACGGCATCATACTAGGTTGTTTGCCAATAACCACCACG
 ACAGAAATGCAGTTGATCGGAGTGGAACATTTTGCCTGGTACCGTTGTAGATTCAA
 GATATGCCACCCTACTGAATTTGATTTCTATCTCTGTAGCCATGCCGGCATAACAGGGT
 ACTAGCCGCCAGCTCATTATCATGTTCTGTGGGATGAGAACAATTTTACTGCTGACG
 CCCTGCAGTCTTTGACTAACAATCTTTGCTATACATATGCTAGGTGTAAGTCTGCTG
 20 TCCATTGTTCCACCAGCATATTATGCACATTTGGCAGCTTTCCGTGCTCGGTTTTACAT
 GGAGCCAGAGACATCTGATAATGGATCAGTCACAAGCGCAGCTGCTTCAAACAGAGG
 AGGTTTAGGAGCTATGGGAAGGAGCACGCGAGCACCAAGTGCTGGTGCTGCTGTAA
 GGCCCCCTTCCTGCTCTCAAGGAGAATGTTAAGAGGGTTATGTTTTATTGT (SEQ ID
 NO:315).
- 25 217) Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se trataron utilizando un procedimiento similar
 al descrito en el Ejemplo 12. La solución polinucleotídica (o de polinucleótidos mezclados
 en el caso de AGO1) se preparó en 0,01% (v/v) de Silwet L-77 y 2% (p/v) de sulfato de
 amonio en 5 milimolares de fosfato de sodio, pH 6,8. Se sumergieron dos hojas
 completamente expandidas por planta en una solución de 0,1% de Silwet L-77 preparada
 30 recientemente con H₂O bidestilada durante pocos segundos y se dejaron secar.
 Aproximadamente 30 minutos después, se aplicaron 20 microlitros de solución
 polinucleotídica a cada una de las dos hojas pretratadas. Para PDS, cada una de las 5
 plantas recibió 25 nanomoles del polinucleótido antisentido de PDS (SEQ ID NO:34); para
 AGO1, cada una de las 5 plantas recibió 50 nanomoles de cada uno de los 14
 35 polinucleótidos antisentido de AGO1 (SEQ ID NOS:300-313); para los tratamientos

combinados con PDS y AGO, cada una de las 5 plantas recibió 25 nanomoles del polinucleótido antisentido de PDS (SEQ ID NO:34) y nanomoles de cada uno de los 14 polinucleótidos antisentido de AGO1 (SEQ ID NOS:300-313) aplicados en hojas separadas. Las plantas testigo apareadas se trataron con solución amortiguadora (0,01% (v/v) de Silwet L-77 y 2% de (p/v) de sulfato de amonio en 5 milimolares de fosfato de sodio, pH 6,8). No se observaron diferencias entre las plantas tratadas con los polinucleótidos antisentido de AGO1 y las plantas tratadas solo con solución amortiguadora. Las plantas tratadas con el polinucleótido antisentido de PDS exhibieron blanqueado sistémico. Las plantas tratadas con el polinucleótido antisentido de PDS y los polinucleótidos antisentido de AGO1 aplicados por separado no exhibieron blanqueado sistémico, indicando que la supresión de AGO1 bloqueó la expansión sistémica de la señal de silenciamiento.

Ejemplo 34

218) Este ejemplo ilustra un método para inducir la regulación sistémica de un gen objetivo endógeno en una planta en crecimiento que comprende revestir tópicamente sobre hojas de dicha planta en crecimiento, polinucleótidos que tienen una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en dicho gen objetivo endógeno o en el ARN mensajero transcrito a partir de dicho gen objetivo endógeno, con lo cual dichos polinucleótidos permean el interior de dicha planta en crecimiento e inducen la regulación sistémica de dicho gen objetivo endógeno. Más específicamente, este ejemplo ilustra el uso de una composición que comprende tensioactivo y polinucleótidos para inducir al menos transitoriamente la regulación sistémica del gen endógeno de 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de Zea mays.

219) Se identificó una secuencia genómica del gen endógeno de 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de Zea mays como
ACCTACTTCCCCCTCGCCCCCTCTCATGGTCTCTCTCGCGCCCAGATCTGCTACTAGA
CGGCACCGCTGCAGCGCGTCGTGTCGCGGGGGTTGGTGGCAGGCAGCGAGAGCTT
GCCGTTCTCTCTCTCAGTTGTCAGGTCCTAGGCTCACCTCACCGGCTCCCAGCCCG
CTTCTATTTCTTCTCCCCGACCCCGTGCAGGTGGCAGTCCAGTCCACGCCACCAAC
CGCGAGGCGAACCACCAACCAACCACTCTCCCCAACCCCGCGCGCCCAGGCCGCCC
GCCCTACCAACCATCGGCGTCGGCAATGGCGGCCATGGCGACCAAGGCCGCGCGG
GGCACCGTGTGCTGGACCTCGCCGCGCCGCGGCGGCGGCGAGCGGCGGCGGCGG
GTGCAGGCGGGTGCCGAGGAGATCGTGCTGCAGCCCATCAAGGAGATCTCCGGCAC

CGTCAAGCTGCCGGGGTCCAAGTCGCTTTCCAACCGGATCCTCCTGCTCGCCGCCC
TGTCCGAGGTGAGCGATTTTGGTGCTTGCTGCGCTGCCCTGTCTCACTGCTACCTAA
ATGTTTTGCCTGTGGAATACCATGGATTCTCGGTGTAATCCATCTCACGATCAGATGC
ACCGCATGTGCGATGCCTAGCTCTCTCTAATTTGTCTAGTAGTTTGTATACGGATTAAT
5 ATTGATAAATCGGTACCGCAAAAGCTAGGTGTAAATAAACACTAGAAAATTGGATGTT
CCCCTATCGGCCTGTACTCGGCTACTCGTTCTTGTGATGGCATGCTGTCTCTTCTTGG
TGTTTGGTGAACAACCTTATGAAATTTGGGCGCAAAGAACTCGCCCTCAAGGGTTGAT
CTTATGCCATCGTCATGATAAACAGTGGAGCACGGACGATCCTTTACGTTGTTTTTAA
CAAACCTTTGTCAGAAAAGTAGCATCATTAACTTCTTAATGACGATTTTACAACAAAAAA
10 AGGTAACCTCGCTACTAACATAACAAAATACTTGTGCTTATTAATTATATGTTTTTTAA
TCTTTGATCAGGGGACAACAGTGGTTGATAACCTGTTGAACAGTGAGGATGTCCACTA
CATGCTCGGGGCCTTGAGGACTCTTGGTCTCTCTGTGCGAAGCGGACAAAGCTGCCAA
AAGAGCTGTAGTTGTTGGCTGTGGTGGAAAGTTCCCAGTTGAGGATTCTAAAGAGGA
AGTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGAAGTGAATGCGGCCATTGACAGCAGCTGT
15 TACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACGTATGTTTCCTCTCTTTCTCTCTACAATACTTGCT
GGAGTTAGTATGAAACCCATGGGTATGTCTAGTGGCTTATGGTGTATTGGTTTTTGA
CTTCAGTTACGTGCTTGATGGAGTACCAAGAATGAGGGAGAGACCCATTGGCGACTT
GGTTGTCGGATTGAAGCAGCTTGGTGCAGATGTTGATTGTTTCCTTGGCACTGACTG
CCCACCTGTTGCTGTCAATGGAATCGGAGGGCTACCTGGTGGCAAGGTTAGCTACTA
20 AGGGCCACATGTTACATTCTTCTGTAAATGGTACAACCTATTGTGCGAGCTTTTGCATTTG
TAAGGAAAGCATTGATTGATCTGAATTTGATGCTACACCACAAAATATCCTACAAATGG
TCATCCCTAACTAGCAAACAATGAAGTAATACTTGGCATGTGTTTATCAAATTAATTTCT
CATCTTCTGGGGCATTGCCTGTTTTCTAGTCTAATAGCATTGTTTTTAGCATTAAATTA
GCTCTTACAATTGTTATGTTCTACAGGTCAAGCTGTCTGGCTCCATCAGCAGTCAGTA
25 CTTGAGTGCCTTGCTGATGGCTGCTCCTTTGGCTCTTGGGGATGTGGAGATTGAAAT
CATTGATAAATTAATCTCCATTCCCTACGTGCGAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTT
TTGGTGTGAAAGCAGAGCATTCTGATAGCTGGGACAGATTCTACATTAAGGGAGGTC
AAAAATACAAGTAAGCTCTGTAATGTATTTCACTACTTTGATGCCAATGTTTCAGTTTTCT
AGTTTTCCAAACAGTCGCATCAATATTTGAATAGATGCACTGTAGAAAAAAATCATTG
30 CAGGGAAAAAGTAGTACTGAGTATTTTGAAGTAAATTTTACCAGTCGGAATATAG
TCAGTCTATTGGAGTCAAGAGCGTGAACCGAAATAGCCAGTTAATTATCCCATTATAC
AGAGGACAACCATGTATACTATTGAACTTGGTTTATAAGAGAATCTAGGTAGCTGGA
CTCGTAGCTGCTTGGCATGGATACCTTCTTATCTTTAGGAAAAGACACTTGATTTTTTT
TTTCTGTGGCCCTCTATGATGTGTGAACCTGCTTCTCTATTGCTTTAGAAGGATATATC
35 TATGTCGTTATGCAACATGCTTCCCTTAGCCATTTGTAAGTAAATCAGTTTCATAAGTT

CGTTAGTGGTTCCTAAACGAAACCTTGTTTTCTTTGCAATCAACAGGTCCCCTAAAA
 ATGCCTATGTTGAAGGTGATGCCTCAAGCGCAAGCTATTTCTTGGCTGGTGCTGCAAT
 TACTGGAGGGACTGTGACTGTGGAAGGTTGTGGCACCACCAGTTTGCAGGTAAAGAT
 TTCTTGGCTGGTGCTACAATAACTGCTTTTGTCTTTTGGTTTCAGCATTGTTCTCAGA
 5 GTCATAAATAACATTATCATCTGCAAATGTCAAATAGACATACTTAGGTGAATTCATG
 TAACCGTTTCCTTACAAATTTGCTGAAACCTCAGGGTGATGTGAAGTTTGTCTGAGGTA
 CTGGAGATGATGGGAGCGAAGGTTACATGGACCGAGACTAGCGTAACTGTTACTGGC
 CCACCGCGGGAGCCATTTGGGAGGAAACACCTCAAGGCGATTGATGTCAACATGAAC
 AAGATGCCTGATGTGCCATGACTCTTGCTGTGGTTGCCCTCTTGCCGATGGCCCG
 10 ACAGCCATCAGAGACGGTAAAACATTCTCAGCCCTACAACCATGCCTCTTCTACATCA
 CTA CTTGACAAGACTAAAACTATTGGCTCGTTGGCAGTGGCTTCCTGGAGAGTAAAG
 GAGACCGAGAGGATGGTTGCGATCCGGACGGAGCTAACCAAGGTAAGGCTACATAC
 TTCACATGTCTCACGTCGTCTTTCCATAGCTCGCTGCCTCTTAGCGGCTTGCTGCGG
 TCGCTCCATCCTCGGTTGCTGTCTGTGTTTTCCACAGCTGGGAGCATCTGTTGAGGA
 15 AGGGCCGGACTACTGCATCATCACGCCGCCGGAGAAGCTGAACGTGACGGCGATCG
 ACACGTACGACGACCACAGGATGGCCATGGCCTTCTCCCTTGCCGCCTGTGCCGAG
 GTCCCCGTGACCATCCGGGACCCTGGGTGCACCCGGAAGACCTTCCCCGACTACTT
 CGATGTGCTGAGCACTTTTCGTCAAGAATTAATAAAGCGTGCGATACTACCACGCAGCT
 TGATTGAAGTGATAGGCTTGTGCTGAGGAAATACATTTCTTTGTTCTGTTTTTCTCT
 20 TTCACGGGATTAAGTTTTGAGTCTGTAACGTTAGTTGTTTGTAGCAAGTTTCTATTTG
 GATCTTAAGTTTGTGCACTGTAAGCCAAATTTCAATTCAGAGTGGTTCGTTGGAATAA
 TAAGAATAATAAATTACGTTTCAGTGGCTGTCAAGCCTGCTGCTACGTTTTAGGAGAT
 GGCATTAGACATTATCATCAACAACAATAAAACCTTTTAGCCTCAAACAATAATAGTG
 AAGTTATTTTTTAGTCCTAAACAAGTTGCATTAGGATATAGTTAAACACAAAAGAAGC
 25 TAAAGTTAGGGTTTAGACATGTGGATATTGTTTTCCAT (SEQ ID NO:316), con una
 región en 5' sin traducir ubicada en las posiciones nucleotídicas 1 – 306 y una región en 3'
 sin traducir ubicada en las posiciones nucleotídicas 3490 – 3907. La secuencia de ADNc
 de EPSPS se identificó como
 ACCTACTTCCCCCTCGCCCCCTCATGGTCTCTCTCGCGCCCAGATCTGCTACTAGA
 30 CGGCACCGCTGCAGCGCGTCGTGTCGCGGGGGTTGGTGGCAGGCAGCGAGAGCTT
 GCCGTTCCCTCTCTCTCAGTTGTCAGGTCCTAGGCTCACCTCACCGGCTCCCAGCCCG
 CTTCTATTTCTTCTCCCCGACCCCGTGCGAGGTGGCAGTCCAGTCCACGCCACCAAC
 CGCGAGGCGAACCACCAACCCACTCTCCCCAACCCCGCGCGCCCAGGCCGCCG
 GCCCTACCAACCATCGGCGTCGGCAATGGCGGCCATGGCGACCAAGGCCGCCGCG
 35 GGCACCGTGTGCTGGACCTCGCCGCGCCGCCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCG

GTGCAGGCGGGTGCCGAGGAGATCGTGCTGCAGCCCATCAAGGAGATCTCCGGCAC
CGTCAAGCTGCCGGGGTCCAAGTCGCTTTCCAACCGGATCCTCCTGCTCGCCGCC
TGTCCGAGGGGACAACAGTGGTTGATAACCTGTTGAACAGTGAGGATGTCCACTACA
TGCTCGGGGCCTTGAGGACTCTTGGTCTCTCTGTCTCGAAGCGGACAAAGCTGCCAAAA
5 GAGCTGTAGTTGTTGGCTGTGGTGGAAAGTTCCAGTTGAGGATTCTAAAGAGGAAG
TGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGAAGTGAATGCGGCCATTGACAGCAGCTGTTA
CTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTACGTGCTTGATGGAGTACCAAGAATGAGGGAGA
GACCCATTGGCGACTTGGTTGTCTGATTGAAGCAGCTTGGTGCAGATGTTGATTGTTT
CCTTGGCACTGACTGCCACCTGTTCTGTCAATGGAATCGGAGGGCTACCTGGTGG
10 CAAGGTCAAGCTGTCTGGCTCCATCAGCAGTCAGTACTTGAGTGCCTTGCTGATGGC
TGCTCCTTTGGCTCTTGGGGATGTGGAGATTGAAATCATTGATAAATTAATCTCCATT
CCTACGTGAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTTTTGGTGTGAAAGCAGAGCATT
TGATAGCTGGGACAGATTCTACATTAAGGGAGGTCAAAAATACAAGTCCCCTAAAAAT
GCCTATGTTGAAGGTGATGCCTCAAGCGCAAGCTATTTCTTGGCTGGTGTGCAATTA
15 CTGGAGGGACTGTGACTGTGGAAGGTTGTGGCACCACCAGTTTGCAGGGTGATGTG
AAGTTTGCTGAGGTACTGGAGATGATGGGAGCGAAGGTTACATGGACCGAGACTAGC
GTAAGTGTACTGGCCACCGCGGGAGCCATTTGGGAGGAAACACCTCAAGGCGATT
GATGTCAACATGAACAAGATGCCTGATGTGCGCATGACTCTTGCTGTGGTTGCCCTCT
TTGCCGATGGCCCGACAGCCATCAGAGACGTGGCTTCCTGGAGAGTAAAGGAGACC
20 GAGAGGATGGTTGCGATCCGGACGGAGCTAACCAAGCTGGGAGCATCTGTTGAGGA
AGGGCCGGACTACTGCATCATCAGCCGCGGAGAAAGCTGAACGTGACGGCGATCG
ACACGTACGACGACCACAGGATGGCCATGGCCTTCTCCCTTGCCGCCTGTGCCGAG
GTCCCCGTGACCATCCGGGACCCTGGGTGCACCCGGAAGACCTTCCCCGACTACTT
CGATGTGCTGAGCACTTTCGTCAAGAATTAATAAAGCGTGCGATACTACCACGCAGCT
25 TGATTGAAGTGATAGGCTTGCTGAGGAAATACATTTCTTTGTTCTGTTTTTCTCT
TTCACGGGATTAAGTTTTGAGTCTGTAAAGTTAGTTGTTGTAGCAAGTTTCTATTTG
GATCTTAAGTTTGTGCACTGTAAGCCAAATTTCAATTTCAAGAGTGGTTCGTTGGAATAA
TAAGAATAATAAATTACGTTTCAGTGGCTGTCAAGCCTGCTGCTACGTTTTAGGAGAT
GGCATTAGACATTCATCATCAACAACAATAAAACCTTTAGCCTCAAACAATAATAGTG
30 AAGTTATTTTTTAGTCCTAAACAAGTTGCATTAGGATATAGTTAAACACAAAAGAAGC
TAAAGTTAGGGTTTAGACATGTGGATATTGTTTTCCAT (SEQ ID NO:317). Se diseñó un
polinucleótido de ARN bicatenario de 240 pares de bases con una cadena
correspondiente a la secuencia de ADN
TACTTGAGTGCCTTGCTGATGGCTGCTCCTTTGGCTCTTGGGGATGTGGAGATTGAA
35 ATCATTGATAAATTAATCTCCATTCCGTACGTGAAATGACATTGAGATTGATGGAGC

GTTTTGGTGTGAAAGCAGAGCATTCTGATAGCTGGGACAGATTCTACATTAAGGGAG
GTCAAAAATACAAGTCCCCTAAAAATGCCTATGTTGAAGGTGATGCCTCAAGCGCAAG
CTATTTCTTG (SEQ ID NO:318) que corresponde a un segmento de 240 nucleótidos
ubicado en las posiciones nucleotídicas 937 – 1176 de la secuencia de ADNc de EPSPS.

- 5 220) Se germinaron semillas de *Zea mays* (Gaspe) sobre papel de germinación. Las
plántulas se transfirieron a macetas de 4 oulgadas y las plantas se cultivaron en una
cámara de cultivo. Se trataron tópicamente con polinucleótidos 3 plantas de 17 días y tres
plantas se usaron como testigos. Dos hojas inferiores de cada planta se marcaron y luego
se pretrataron sumergiéndolas en una solución de 0,1% de Silwet L-77. Aproximadamente
10 30 minutos después del pretratamiento con tensioactivo, se aplicaron 20 microlitros de
solución de tratamiento sobre el lado superior de cada una de las dos hojas pretratadas.
La solución de tratamiento consistía en una mezcla de 100 microlitros de 2X solución
amortiguadora, 90 microlitros de agua, 10 microlitros de una solución de 4,6
microgramos/microlitro de ARNbc de EPSPS (con una cadena correspondiente a la SEQ
15 ID NO:318); la 2X solución amortiguadora era una mezcla de 200 microlitros de 0,1% de
Silwet L-77, 200 microlitros de 50 milimolares de fosfato de sodio, 146 microlitros de 34%
de fosfato de amonio y 454 microlitros de agua. A los 8 días después del tratamiento, dos
de las tres plantas tratadas con polinucleótidos presentaban enanismo con hojas apicales
muertas o dañadas (similar al fenotipo observado en plantas de *Nicotiana benthamiana*
20 tratadas de forma similar con polinucleótidos de EPSPS), mientras que las tres plantas
testigo presentaban crecimiento y morfología normales (Figura 37).

Ejemplo 35

- 221) Se investigó la eficacia de diferentes sustancias (incluidas sales, un agente quelante,
25 un humectante y poliaminas) como agentes de transferencia de polinucleótidos o como
potenciadores de agentes de transferencia de polinucleótidos conocidos. Anteriormente el
sulfato de amonio había demostrado que potenciaba la permeabilidad de las plantas a
polinucleótidos (ver, por ejemplo, Ejemplo 13). La Tabla 26 muestra el efecto sobre la
actividad herbicida (presentada como un porcentaje del control/muerte de malezas y como
30 la altura de la planta) del sulfato de amonio y de EDTA como aditivos para soluciones de
pulverización 1% de Silwet L-77 de polinucleótidos aplicados tópicamente (ARN) sobre
plantas de palmera amaranto resistentes al glifosato. En este experimento específico, se
descubrió que el ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA) a 0,004% actúa de forma similar
al 2% de sulfato de amonio en la solución de pulverización, mejorando la eficacia de los
35 polinucleótidos y potenciando la actividad herbicida del glifosato.

Tabla 26

Tratamiento	Control de palmera (%)	Altura de palmera (cm)
Sin adición	0	7,5
+ 2% de sulfato de amonio	43	1,8
+ 0,004% de EDTA	45	1,0

222) La Tabla 27 muestra el efecto sobre la actividad herbicida (presentada como un porcentaje de control/muerte de la maleza y como la altura de la planta) de varias sales incluidas sales inorgánicas (cloruro de sodio, sulfato de sodio, sulfato de amonio, cloruro de amonio) y sales orgánicas (cloruro de tetrametilamonio, cloruro de tetraetilamonio, bromuro de tetrapropilamonio y bromuro de tetrabutilfosfonio) como aditivos para soluciones de 1% de Silwet L-77 para pulverización de polinucleótidos aplicados tópicamente (ARN) sobre plantas de palmera amaranto resistentes al glifosato. En este experimento específico, se descubrió que el cloruro de amonio y el bromuro de tetrabutilfosfonio actúan de forma similar al sulfato de amonio en la solución de pulverización, mejorando la eficacia de los polinucleótidos y potenciando la actividad herbicida del glifosato.

Tabla 27

Tratamiento	Control de palmera (%)	Altura de palmera (cm)
Sin adición	0	16,0
+ 2% de cloruro de sodio	15	15,0
+ 2% de sulfato de sodio	7	17,0
+ 2% de sulfato de amonio	54	9,3
+ 2% de cloruro de amonio	52	10,3
+ 2% de cloruro de tetrametilamonio	19	15,0
+ 2% de cloruro de tetraetilamonio	27	12,0
+ 2% de bromuro de tetrapropilamonio	34	11,0
+ 2% de bromuro de tetrabutilfosfonio	19	13,3
+ 2% de bromuro de tetrabutilfosfonio	55	5,3

223) La Tabla 28 muestra el efecto del humectante glicerina sobre la actividad herbicida (presentada como un porcentaje del control/muerte de la maleza y como la altura de la planta) de polinucleótidos aplicados tópicamente (ARN) sobre plantas de palmera amaranto resistentes al glifosato. Se descubrió que la glicerina mejora la eficacia de los polinucleótidos, potenciando la actividad herbicida del glifosato.

Tabla 28

Tratamiento	Control de palmera (%)	Altura de palmera (cm)
Sin adición	0	16.0
Silwet L-77/AMS (sin glicerina)	54	9.3
Silwet L-77/AMS + 0,5% de glicerina	57	6.3

224) La Figura 38 muestra el efecto de la variación de los contraiones de glifosato sobre la actividad herbicida (presentada como un porcentaje del control/muerte de la maleza y

como la altura de la planta) de polinucleótidos aplicados tópicamente (ARN) sobre plantas de palmera amaranto resistentes al glifosato. Se preparó una mezcla de polinucleótidos de EPSPS (IDT [1] (SEQ ID NO:83-84), IDT [2] (SEQ ID NO:85-86), IDT [3] (SEQ ID NO:87-88) y IDT [4] (SEQ ID NO:89-90)) en 0,5% de Silwet L-77, 2% de sulfato de amonio en 10 milimolares de solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 6,8 con 0,2% de portador Roundup® WeatherMax® (MON56151 tensioactivo de amina de cebo mezcla de amina de cebo (16-18C) y cocoamina (12-14C) en la relación de 55:45) y 1682 g de equivalente ácido por hectárea de una de las sales de glifosato; K+ glifosato, isopropilamonio+ glifosato o monoetanolamonio+ glifosato a 215 litros/acre mediante pulverizador Milli en 3 repetición de palmera amaranto resistente a glifosato de 4-6 pulgadas que contenían 16 copias de EPSPS. La altura de la planta se puntuó a los 21 días después del tratamiento con glifosato. Los resultados (presentados como un porcentaje del control/muerte de la maleza y como la altura de la planta) se proporcionan en la Tabla 29. Las sales de isopropilamonio y monoetanolamonio de glifosato proporcionaron mejor actividad herbicida en comparación con la sal de potasio.

Tabla 29

Tratamiento	Control de palmera (%)	Altura de palmera (cm)
Sin adición	0	16
K+ glifosato	23	12,3
K+ glifosato + polinucleótidos de EPSPS	32	10,8
IPA+ glifosato	9	14,5
IPA+ glifosato + polinucleótidos de EPSPS	66	5,5
MEA+glifosato	9	14,5
MEA+ glifosato + polinucleótidos de EPSPS	66	5,5

225) Se investigó el efecto de los cationes de poliamina de espermina (N,N'-bis(3-aminopropil)butano-1,4-diamina) y espermidina (N-(3-aminopropil)butano-1,4-diamina) sobre la actividad herbicida de polinucleótidos aplicados tópicamente (ARN) sobre plantas de palmera amaranto resistentes al glifosato. Las soluciones polinucleotídicas se prepararon utilizando una mezcla de cantidades iguales de las cuatro moléculas de ARNbc "corto" de tamaño de oligonucleótido descritas en el Ejemplo 1, que tienen una

cadena antisentido diseñada para hibridar con el ARNm transcrito a partir del gen de EPSPS palmera amaranto (SEQ ID NO:1) en las posiciones 14-38 (ARNbc-1 corto), posiciones 153-177 (ARNbc-2 corto), 345-369 (ARNbc-3 corto) y 1105-1129 (ARNbc-4 corto) tal como se indica mediante los nucleótidos subrayados en la Figura 1; los ARNbc

5 tenían un excedente de dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido y tenían dos desoxinucleótidos como los nucleótidos terminales en el extremo 3' de la cadena sentido. Las soluciones de polinucleótidos de ARNbc se prepararon con 1 o 10 milimolares de espermina o espermidina o 2% de sulfato de amonio, en solución amortiguadora de 10 milimolares de fosfato de sodio (pH 6,8). Las soluciones testigo (sin

10 polinucleótidos) se prepararon con 1 o 10 milimolares de espermina o espermidina o 2% de sulfato de amonio, en solución amortiguadora de 10 milimolares de fosfato de sodio (pH 6,8). Las plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato (33, 36 o 57 copias de EPSPS) se prepulverizaron con 1% de Silwet L-77. Las soluciones de polinucleótido de ARNbc (11,6 gramos/acre) o las soluciones amortiguadoras se aplicaron como gotas en

15 cuatro hojas inferiores completamente expandidas de palmera amaranto de resistente a glifosato mediante pipeteo. Dos días después del tratamiento con polinucleótidos las plantas se pulverizaron con glifosato (3360 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX®). Las plantas se fotografiaron a los 14 días después del tratamiento con glifosato; los resultados se muestran en la Figura 39. El

20 tratamiento con ARNbc y 10 milimolares de espermina con posterior tratamiento con glifosato mató a la palmera amaranto resistente a glifosato con 33 copias de EPSPS y lesionó gravemente y produjo enanismo en la palmera amaranto resistente a glifosato con 36 copias de EPSPS. El tratamiento con 10 mM de espermidina sola produjo enanismo en la palmera amaranto resistente a glifosato con 33 copias. En este experimento específico,

25 ni espermina ni espermidina a 1 o 10 milimolares tuvieron el mismo rendimiento que el 2% de sulfato de amonio.

Ejemplo 36

226) Se evaluó la eficacia de diferentes tensioactivos como agentes de transferencia de

30 polinucleótidos en soluciones de polinucleótidos para pulverización aplicadas a palmera amaranto resistente a glifosato. Se adquirieron tensioactivos Break-Thru de Evonik Industries; y tensioactivos Silwet de Momentive. Las soluciones para pulverización se prepararon el mismo día de la pulverización. Se agregó una mezcla de polinucleótidos de EPSPS (IDT [1] (SEQ ID NO:83-84), IDT [3] (SEQ ID NO:87-88) y IDT [4] (SEQ ID NO:89-

35 90)) a soluciones para pulverización 15 a 50 minutos antes de la pulverización y se

aplicaron 1 a 2 mililitros utilizando un pulverizador común de bajo volumen muerto ("milli") a plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato de una a cuatro pulgadas (R-22) cultivadas a partir de cortes. Se aplicaron entre 10 y 225 microgramos de polinucleótidos totales a cada planta, dependiendo del experimento; típicamente se aplicaron 23 microgramos de polinucleótidos totales por planta. Las plantas tratadas se colocaron en un invernadero con una programación fijada de temperatura de 26,7/21,1 grados Celsius o 29,4/21,1 grados Celsius durante 14/10 horas y luz complementaria. 2 a 3 días después, la plantas se pulverizaron con glifosato ("2X Wmax" o 1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida marca Roundup® WeatherMAX®) mediante pulverizador común (10 galones/acre) y se volvieron a colocar en el invernadero. La cantidad de control (lesión visual) con respecto a los tratamientos sin pulverización, la altura de las plantas y las fotografías de la palmera amaranto se tomaron a diferentes intervalos de tiempo de hasta 21 días después del tratamiento con glifosato. El peso fresco del material vegetal por encima del suelo se recogió en el último punto de tiempo. Se otorgó una puntuación general de lesión de la planta 0 y 3 a cada tratamiento en base al análisis combinado de Control, Altura, Peso fresco y Fenotipo vegetal visual, donde "3" es actividad herbicida intensa, "2" es actividad moderada, "1" es actividad leve y "0" es sin actividad observada después de la corrección para cualquier lesión observada provocada por el tratamiento solo con glifosato; los resultados se muestran en la Tabla 30.

227) Las propiedades físicas de los diferentes tensioactivos también se investigaron y se muestra en la Tabla 30. Se prepararon setenta mililitros de solución de tensioactivo (0,5% de tensioactivo en solución acuosa que contenía 2% de sulfato de amonio, solución amortiguadora (20 milimolares de fosfato de potasio, pH 6,8), con o sin un polinucleótido de EPSPS (IDT [2] (SEQ ID NO:85-86), 0,09 miligramos/mililitro) agregados, el mismo día de la medición. La tensión superficial dinámica se midió a temperatura ambiente (22 a 23 grados Celsius) en un tensiómetro Kruss BP100 utilizando el método de presión máxima de burbuja con gráfica de tensión superficial con respecto a edad de la superficie. El instrumento se programó para detectar automáticamente la superficie e sumergir el capilar hasta una profundidad de 10 mm. Se registraron las mediciones de tensión superficial para tres edades de superficie (aproximadamente 20, 500 y 1250 ms). La tensión superficial en dinas por cm se indicó en el intervalo de 1250 ms como una aproximación de la tensión superficial estática y el cambio entre 20 y 500 ms se indicó como una estimación de la tensión superficial dinámica. Los valores de balance hidrófilo-lipófilo balance (HLP) para los tensioactivos se obtuvieron a partir de referencias de tensioactivo e información del producto.

Tabla 30

Nombre de tensioactivo	Número CAS	Composición química	Tipo de tensioactivo	Clase de tensioactivo	Puntuación de lesión de palmera	Tensión superficial		delta 20 - 500 ms	HLB
						bibliografía	1250 ms		
Breack-Thru S 321	nc	polisiloxano modificado con poliéter	organo silicona	no iónico	3	nc	22,7	27,1	40,0
Breack-Thru S 200	6767-4-67-3	polisiloxano modificado con poliéter	organo silicona	no iónico	3	22	26,9	23,0	
Breack-Thru OE 441	6893-7-55-3	polisiloxano modificado con poliéter	organo silicona	no iónico	1	nc	43,8	2,9	40,0
Breack-Thru S 278	2730-6-78-1	polisiloxano modificado con poliéter	organo silicona	no iónico	2	21	24,2	23,4	
Breack-Thru S	nc	polisiloxano modificado	organo silicona	no iónico	2	47	50,3	7,7	16,7

243		con poliéter							
Silw et L- 77	27 30 6- 78- 1	trisiloxa no; polimeti lsiloxan o modific ado con óxido de polialqu ileno	organo silicona	no iónico	3	20,5	26,4	23,4	13,5
Silw et HS 429	nc	silicion a hidrolíti cament e estable	organo silicona	no iónico	3	32-40	40,1	12,1	
Silw et HS 312	nc	silicona	organo silicona	no iónico	3	26,7	29,5	11,3	
Brea k- Thru S 233	13 41 80- 76- 0	trisiloxa no	organo silicona	no iónico	3	23	26,1	10,0	

REIVINDICACIONES SOLICITUD DIVISIONAL

1. Un método para potenciar la actividad de un herbicida no polinucleotídico sobre una planta en crecimiento CARACTERIZADO PORQUE comprende:
- 5 (a) aplicar tópicamente sobre una superficie de la planta:
- (i) al menos un ARN de doble cadena (ARNbc) no transcribible que comprende una secuencia que es esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de un gen endógeno de la planta, donde el gen endógeno codifica una proteína que interactúa con el herbicida, y
- 10 (ii) una cantidad efectiva de un agente de transferencia seleccionado del grupo que consiste de un tensioactivo de organosilicona y un lípido catiónico; y
- (b) aplicar el herbicida no polinucleotídico a la planta;
- donde el al menos un ARNbc no transcribible permea hacia el interior de una célula de la
- 15 planta e induce la supresión del gen endógeno, potenciando de esta manera la actividad del herbicida no polinucleotídico sobre la planta.
2. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la planta está creciendo en un campo.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la planta es una planta de amaranto, yute de china, amaranto tuberculoso, lechuga espinaca, diente de león, alfalfa, maíz, soja, colza, algodón, remolacha azucarera, caña de azúcar, trigo o arroz.
- 25 4. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la planta es una maleza o una planta espontánea.
5. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la planta es resistente a uno o más de entre glifosato, dicamba y sulfonilurea.
- 30 6. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el ARNbc no transcribible y el agente de transferencia se aplican por separado.

7. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el ARNbc no transcribible y el agente de transferencia se aplican simultáneamente.
8. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el tensioactivo de organosilicona es un copolímero de poliéter y silicona
9. El método de la reivindicación 8, CARACTERIZADO PORQUE el copolímero de poliéter y silicona es un copolímero de heptametil trisiloxano modificado con óxido de polialquileno y aliloxipolipropilenglicol metiléter.
10. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE además comprende aplicar una sal orgánica o una sal inorgánica.
11. El método de la reivindicación 10, CARACTERIZADO PORQUE la sal es una sal de amonio.
12. El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO PORQUE la sal de amonio es sulfato de amonio.
13. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el ARNbc no transcribible y el agente de transferencia se aplican en la superficie exterior de la célula vegetal mediante un aparato pulverizador.
14. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el gen endógeno codifica una proteína que se selecciona del grupo que consiste en 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una acetohidroxiácido sintasa o una acetolactato sintasa (ALS), una acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase), una dihidropteroato sintasa, una fitoeno desaturasa (PDS), una protoporfirina IX oxigenasa (PPO), una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), una glutamina sintasa (GS), una fenilalanina amonio liasa (PAL), una proteína D1 de fotosistema II, un factor de iniciación de la traducción (TIF), una ATPasa dependiente de ADN (ddATPasa) y una ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO).

15. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el herbicida no polinucleotídico se selecciona del grupo que consiste en glifosato, dicamba, fosfinotricina, bromoxinilo, ioxinilo o clorsulfurón.
- 5 16. Una composición herbicida líquida adaptada para aplicación tópica sobre la superficie exterior de una planta CARACTERIZADA PORQUE comprende:
- a. una cantidad efectiva de un agente de transferencia seleccionado del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y un lípido catiónico; y
 - b. al menos un ARNbc no transcribible, donde el ARNbc no transcribible
- 10 comprende una secuencia nucleotídica que es esencialmente idéntica o complementaria a al menos 18 nucleótidos contiguos de un gen endógeno o un ARN transcripto de la planta, y en donde el gen endógeno o el ARN transcripto codifica una proteína que es esencial para mantener el crecimiento o la vida de la planta o que le confiere resistencia a herbicida a la planta.
- 15 17. La composición herbicida líquida de la reivindicación 16 CARACTERIZADA PORQUE el gen endógeno o ARN transcripto codifica una proteína 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una acetohidroxiácido sintasa o una acetolactato sintasa (ALS), una acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase), una dihidropteroato sintasa, una fitoeno
- 20 desaturasa (PDS), una protoporfirina IX oxigenasa (PPO), una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), una glutamina sintasa (GS), una fenilalanina amonio liasa (PAL), una proteína D1 de fotosistema II, un factor de iniciación de la traducción (TIF), una ATPasa dependiente de ADN (ddATPasa) o una ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO).
- 25 18. La composición herbicida líquida de la reivindicación 16 CARACTERIZADA PORQUE el gen endógeno es un gen nativo o un transgen recombinante.
- 30 19. La composición herbicida líquida de la reivindicación 16 CARACTERIZADA PORQUE la composición herbicida líquida además comprende una sal orgánica o una sal inorgánica.
20. La composición herbicida líquida de la reivindicación 19 CARACTERIZADA PORQUE la sal es una sal de amonio.
- 35

21. La composición herbicida líquida de la reivindicación 20 CARACTERIZADA PORQUE la sal de amonio es sulfato de amonio.
22. La composición herbicida líquida de la reivindicación 16 CARACTERIZADA PORQUE el tensioactivo de organosilicona es un copolímero de poliéter y silicona
23. La composición herbicida líquida de la reivindicación 22 CARACTERIZADA PORQUE el copolímero de poliéter y silicona es un copolímero de heptametil trisiloxano modificado con óxido de polialquileno y aliloxipolipropilenglicol metiléter.
24. La composición herbicida líquida de la reivindicación 16 CARACTERIZADA PORQUE la composición herbicida líquida además comprende una molécula herbicida no polinucleotídica.
25. La composición herbicida líquida de la reivindicación 24 CARACTERIZADA PORQUE la molécula herbicida no polinucleotídica se selecciona del grupo que consiste en glifosato, dicamba, fosfinotricina, bromoxinilo, ioxinilo o clorsulfurón.
26. La composición herbicida líquida de la reivindicación 16 CARACTERIZADA PORQUE la composición herbicida líquida además comprende un agente quelante o un agente humectante.
27. La composición herbicida líquida de la reivindicación 16 CARACTERIZADA PORQUE dicho al menos un ARNbc no transcribible tiene como blanco a uno o más genes endógenos de la planta.
28. Un método para controlar selectivamente plantas espontáneas blanco resistentes a herbicidas que crecen en un campo CARACTERIZADO PORQUE comprende aplicar sobre las hojas de la planta espontánea:
- a. al menos un ARNbc no transcribible que comprende al menos 18 nucleótidos contiguos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios a un gen que le confiere resistencia a herbicida a las plantas espontáneas o a un transcripto de ARN del mismo;
- b. una cantidad efectiva de un agente de transferencia seleccionado del grupo que consiste en un tensioactivo de organosilicona y un lípido catiónico; y

c. un herbicida no polinucleotídico al cual las plantas espontaneas presentan resistencia.

29. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE las plantas
5 espontáneas se seleccionan del grupo que consiste en alfalfa, maíz, soja, colza, algodón, remolacha azucarera, caña de azúcar, trigo o arroz.

30. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE las plantas
10 espontáneas crecen en un campo de un cultivo de plantas resistentes a herbicida.

31. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE las plantas
espontáneas son resistentes a uno o más de entre glifosato, dicamba y sulfonilurea.

32. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE uno o más de los
15 ARNbc no transcribibles, el agente de transferencia y el herbicida no polinucleotídico se aplican por separado.

33. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE el ARNbc no transcribible y el agente de transferencia se aplican simultáneamente.

20 34. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE el tensioactivo de organosilicona es un copolímero de poliéter y silicona.

35. El método de la reivindicación 34, CARACTERIZADO PORQUE el copolímero de poliéter y silicona es un copolímero de heptametil trisiloxano modificado con óxido de
25 polialquileno y aliloxipolipropilenglicol metiléter.

36. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE además comprende aplicar una sal orgánica o una sal inorgánica.

30 37. El método de la reivindicación 36, CARACTERIZADO PORQUE la sal es una sal de amonio.

38. El método de la reivindicación 37, CARACTERIZADO PORQUE la sal de amonio es sulfato de amonio.

39. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE uno o más de los ARNbc no transcribibles y el agente de transferencia se aplican en la superficie exterior de la célula vegetal mediante un aparato pulverizador.

- 5 40. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE el gen que provee resistencia a herbicida codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en una 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una acetohidroxiácido sintasa o una acetolactato sintasa (ALS), una acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase), una dihidropteroato sintasa, una fitoeno desaturasa (PDS), una protoporfirina IX oxigenasa
10 (PPO), una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), una glutamina sintasa (GS), una fenilalanina amonio liasa (PAL), una proteína D1 de fotosistema II, un factor de iniciación de la traducción (TIF), una ATPasa dependiente de ADN (ddATPasa) o una ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO).
- 15 41. El método de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE el herbicida no polinucleotídico se selecciona del grupo que consiste en glifosato, dicamba, fosfinotricina, bromoxinilo, ioxinilo o clorsulfurón.

RESUMEN

La presente invención proporciona moléculas polinucleótídicas y métodos para regular genes en plantas, por ejemplo, proporcionando ARN para la regulación sistémica de genes. Varios aspectos de la invención proporcionan moléculas polinucleótídicas y
5 métodos para regular genes y transgenes endógenos en una célula vegetal y moléculas polinucleótídicas.

1/42
Figura 1

ATGGCTCAAGCTACTACCATCAACAATGGTGTCCATACTGGTCAATTGCACCATACTTTACCCAAAA
5 CCCAGTTACCCAAATCTTCAAAAACCTTTAATTTTGGATCAAACCTTGAGAATTTCTCCAAAGTTCAT
GTCTTTAACCAATAAAAGAGTTGGTGGGCAATCATCAATTGTTCCCAAGATTCAAGCTTCTGTGTGCT
GCTGCAGCTGAGAAACCTTCATCTGTCCCAGAAATTGTGTTACAACCCATCAAAGAGATCTCTGGTA
CTGTTCAATTGCCTGGGTCAAAGTCTTTATCCAATCGAATCCTTCTTTTAGCTGCTTTGTCTGAGGG
CACAACAGTGGTCGACAACCTTGCTGTATAGTGATGATATTCTTTATATGTTGGACGCTCTCAGAACT
CTTGGITTTAAAAGTGGAGGATGATAGTACAGCCAAAAGGGCAGTCGTAGAGGGTTGTGGTGGTCTGT
10 TTCTGTGGTAAAGATGGAAGGAAGAGATTCAACTTTTCCTTGGTAATGCAGGAACAGCGATGCG
CCCATTGACAGCTGCGGTTGCCGTTGCTGGAGGAAATTCAAGTTATGTGCTTGATGGAGTACCAAGA
ATGAGGGAGCGCCCCATTGGGGATCTGGTAGCAGGTCTAAAGCAAACCTTGGTTCAGATGTAGATTGTT
TTCTTGGCACAAATTGCCCTCCTGTTCGGGTCAATGCTAAAGGAGGCCTTCCAGGGGGCAAGGTCAA
GCTCTCTGGATCGGTTAGTAGCCAATATTTAACTGCACTTCTCATGGCTACTCTTTGGGTCTTGGA
15 GACGTGGAGATTGAGATAGTTGATAAATTGATTCTGTACCGTATGTTGAAATGACAATAAAGTTGA
TGAACGCTTTGGAGTATCCGTAGAACATAGTGATAGTTGGGACAGGTTCTACATTGAGGTGGTCA
GAAATACAAATCTCCTGGAAAGGCATATGTTGAGGGTGATGCTTCAAGTGCTAGCTACTTCCTAGCC
GGAGCCGCCGTCCTGCTGGGACTGTCACTGTCAAGGGTTGTGGAACAAGCAGTTTACAGGGTGATG
TAAAATTTGCCGAAGTTCTTGAGAAGATGGGTTGCAAGGTCACCTGGACAGAGAATAGTGTAAGTGT
20 TACTGGACCACCCAGGGATTCTCTGGAAGAAACATCTGCGTGCTATCGACGTCAACATGAACAAA
ATGCCAGATGTTGCTATGACTCTTGCAAGTTGTTGCCTTGTATGCAGATGGGCCCACCGCCATCAGAG
ATGTGGCTAGCTGGAGAGTGAAGGAAACCGAACGGATGATTGCCATTTGCACAGAACTGAGAAAGCT
TGGGGCAACAGTTGAGGAAGGATCTGATTACTGTGTGATCACTCCGCCTGAAAAGCTAAACCCACC
GCCATTGAAACTTATGACGATCACCGAATGGCCATGGCATTCTCTCTTGCTGCCTGTGCAGATGTTT
CCGTCACATCTCTTGATCCGGGATGCACCCGTAAAACCTTCCCGGACTACTTTGATGTTTTAGAAAA
25 GTTCGCCAAGCATTGA

SEQ ID NO:1

2/42
Figura 2

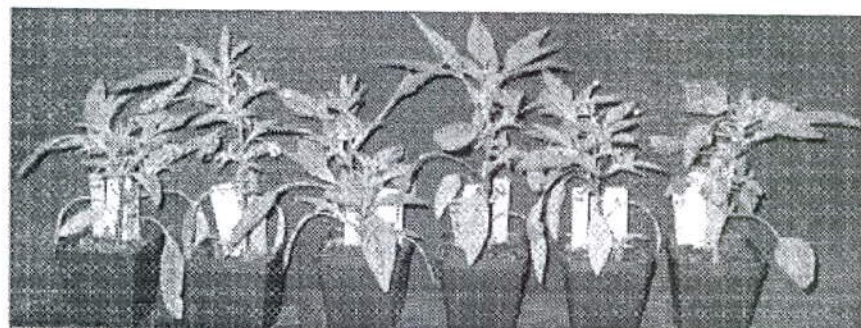
5 GGCCCATAGGCCTTTTTCTAAAATAGGGCCCATTTAAGCTATTAACAATCTTCAAAAAGTACCACATCG
CTTAGGTAAAGAAAGCAGCTGAGTTTATATATTGGTTAGAGACGAAGTAGTGATTGCGACGAGCGACG
TCTCGCCCTCATCGCAATCCACGCCATTGAGCTTGAGGCCATTGGCGACGGCCGAGAGGGCGGTGGCT
TAAGATTAGCATGTCCTTGACGCGGAGTTCTTCCAGACCGTTCATCACGGTCGCCCTTCCGCGAAG
GCGGCGGGACAGCGAGAATCGGATATTCGTGATCATCGAAGGCGCGCGGTCTTCCGGCACCGTGA
CGCATAAAcacgggtgccggaagacgcgcgccttcgatgatcgacgaatatccgattctcgtctgtcg
cgcgcgccttcgcggaagggcgacogtgatgaacgggtctggaagaactccgcgtcaaggaaagcga
cgcctctcggccgtcgccaatggcctcaagctcaatggcgtggattgcgatgagggcgagacgtcg
10 ctcgtcgTTTTTTTTGGCAAAAA

SEQ ID NO:3

3/42
Figura 3

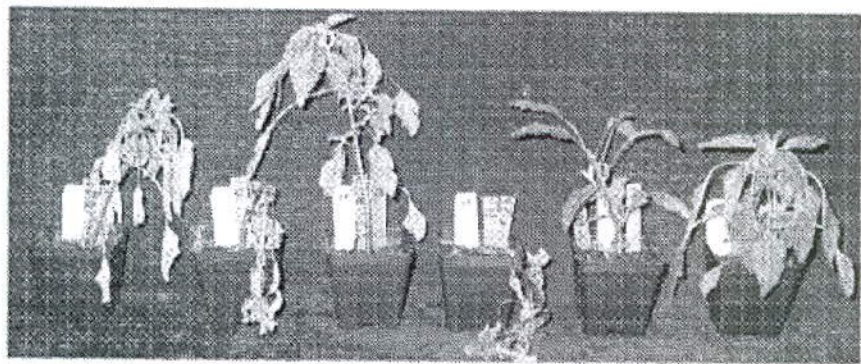
5

10



3A

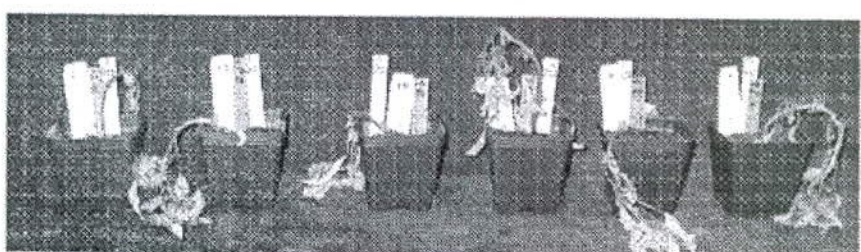
15



3B

20

25



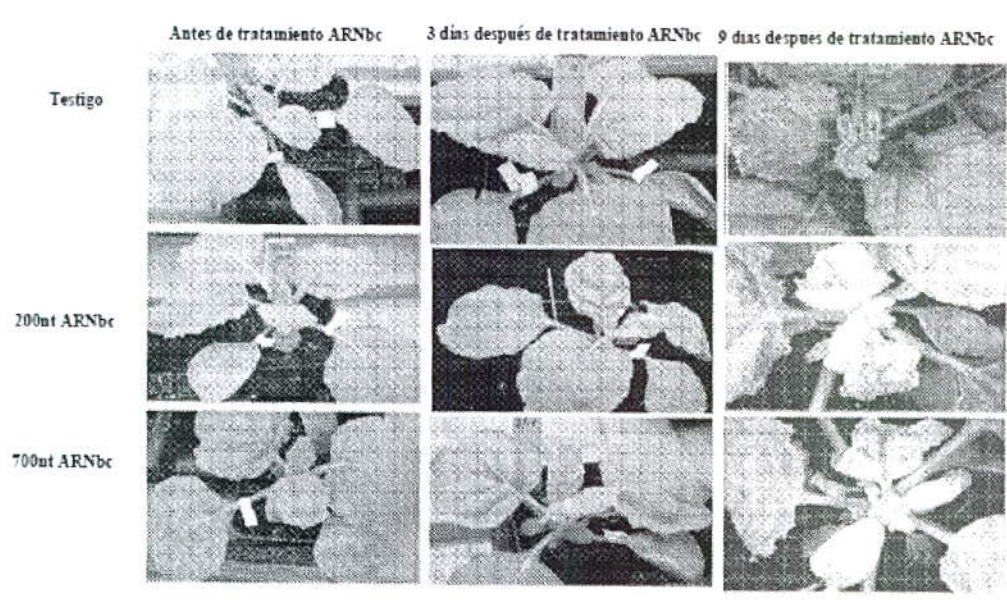
3C

4/42
Figura 4

5

10

15

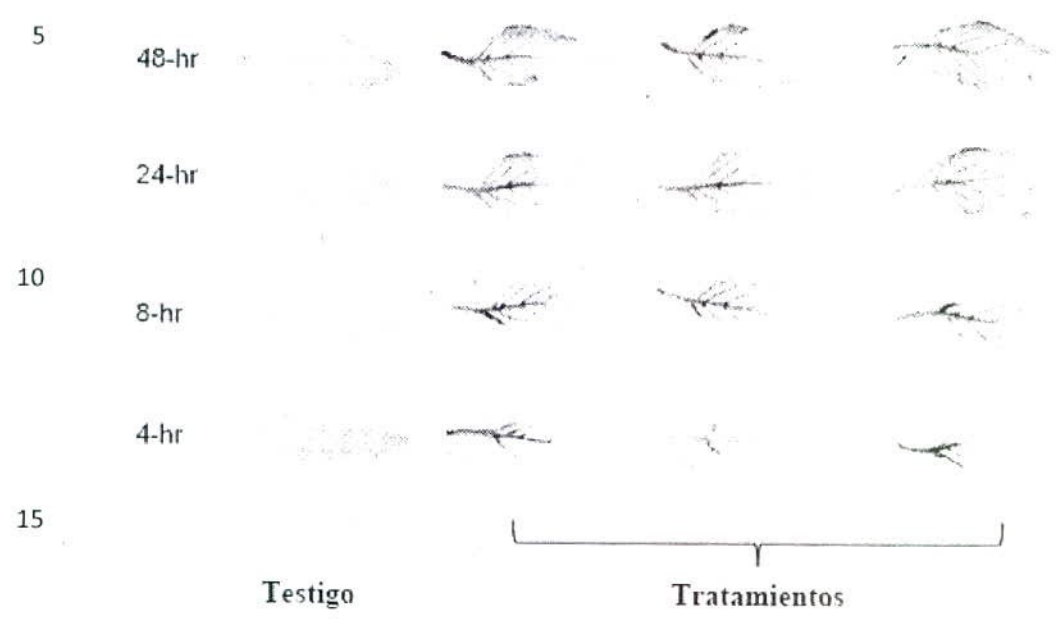


5/42
Figura 5

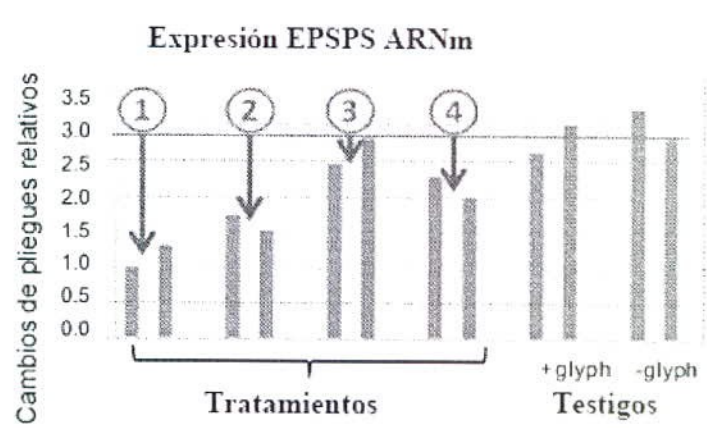
5 ATGCCCCAAATCGGACTTGTATCTGCTGTTAATTTGAGAGTCCAAGGTAATTGAGCTTATCTTTGGA
GCTCGAGGTCTTCGTTGGGAACTGAAAGTCAAGATGTTTGGCTTGCAAAGGAATTTGTTATGTTTTGG
TAGTAGCGACTCCATGGGGCATAAGTTAAGGATTCGTACTCCAAGTGCCACGACCCGAAGATTGACA
AAGGACTTTAATCCTTTAAAGGTAGTCTGCATTGATTATCCAAGACCAGAGCTAGACAATACAGTTA
ACTATTTGGAAGGCGGCGTTATTATCATCATCGTTTCGTACTTCCTCAGGCCCCAACTAAACCATTGGA
GATTGTTATIGCTGGTGCAGGTTTGGGTGGTTTGTCTACAGCAAAATATCTGGCAGATGCTGGTCAC
AAACCGATATTGCTGGAGGCAAGAGATGTCCTAGGTGGGAAGGTAGCTGCATGGAAAGATGATGATG
GAGATTGGTACGAGACTGGGTTGCACATATTCTTTGGGGCTTACCCAAATATGCAGAACCTGTTTGG
AGAACTAGGGATTGATGATCGGTTGCAGTGGGAAGGAACATTCAATGATATTTGCGATGCCTAACAAG
CCAGGGGAGTTGAGCCGCTTTGATTTTCTGAAGCTCTTCCTGCGCCATTAAATGGAATTTTGGCCA
10 TACTAAAGAAACAACGAAATGCTTACGTGGCCCGAGAAAGTCAAATTTGCTATTGGACTCTTGCCAGC
AATGCTTGGAGGGCAATCTTATGTTGAAGCTCAAGACGGTTTAAGTGTAAAGGACTGGATGAGAAAG
CAAGGTGTGCTGATAGGGTGACAGATGAGGTGTTTCATTGCCATGTCAAAGGCACTTAACCTTCATAA
ACCCGTGACGAGCTTTTCGATGCAGTGCATTTTGATTGCTTTGAACAGATTTCTTCAGGAGAAACATGG
TTCAAAAATGGCCTTTTTTAGATGGTAACCCTCCTGAGAGACTTTGCATGCCGATTGTGGAACATATT
GAGTCAAAAAGGTGGCCAAGTCAGACTAACTCACGAATAAAAAAGATCGAGCTGAATGAGGATGGAA
GTGTCAAATGTTTTATACTGAATAATGGCAGTACAATTAAAGGAGATGCTTTTGTGTTTGGCACTCC
AGTGGATATCTTGAAGCTTCTTTTGCCTGAAGACTGGAAAGAGATCCCATATTTCCAAAAGTTGGAG
AAGCTAGTGGGAGTTCTGTGATAAATGTCCATATATGGTTTGACAGAAACTGAAGAACACATCTG
15 ATAATCTGCTCTTCAGCAGAAGCCCGTTGCTCAGTGTGTACGCTGACATGTCTGTTACATGTAAGGA
ATATTACAACCCCAATCAGTCTATGTTGGAATTGGTATTTGCACCCGCAGAAGAGTGGATAAATCGT
ACTGACTCAGAAATTATTGATGCTACAATGAAGGAACTAGCGAAGCTTTTCCCTGATGAAATTTCCG
CAGATCAGAGCAAAGCAAAAATATTGAAGTATCATGTTGTCAAACCCCAAGGTCTGTTTATAAAAC
TGTGCCAGGTTGTGAACCCTGTGCGCCCTTGCAAAGATCCCCCTATAGAGGGTTTTTTATTTAGCTGGT
GACTACACGAAACAGAAGTACTTGGCTTCAATGGAAGGTGCTGTCTTATCAGGAAAGCTTTGTGCAC
AAGCTATTGTACAGGATTACGAGTTACTTCTTGGCCGGAGCCAGAAGATGTTGGCAGAAGCAAGCGT
20 AGTTAGCATAGTGAACATA

SEQ ID NO:2

6/42
Figura 6



7/42
Figura 7



8/42
Figura 8

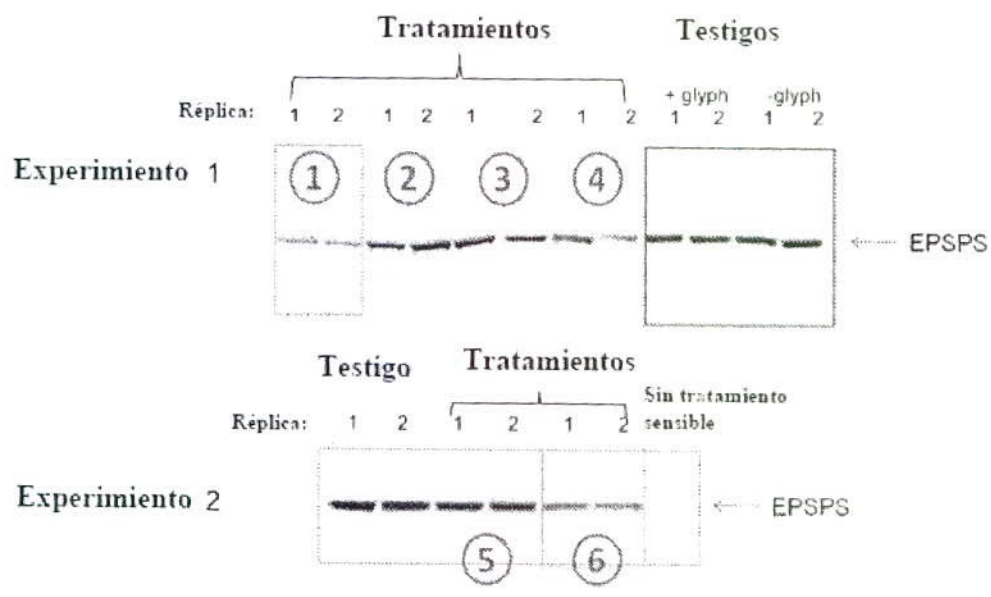
5

10

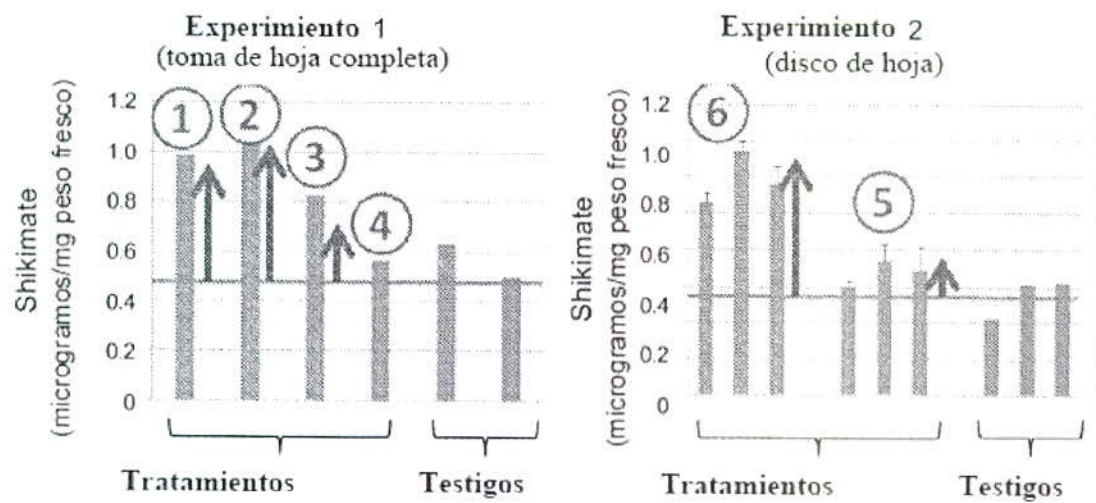
15

20

25



9/42
Figura 9



10/42
Figura 10

>gi|93117609|gb|DQ469932.1| *Nicotiana benthamiana*
5 ARNm fitoeno desaturasa, cds completo
ATGCCCCAAATCGGACTTGTATCTGCTGTTAATTTGAGAGTCCAAGGTAATTCAGCTTATCTTTGGA
GCTCGAGGTCTTTCGTTGGGAACTGAAAGTCAAGATGTTTGTCTTGCAAAGGAATTTGTTATGTTTTGG
TAGTAGCGACTCCATGGGGCATAAGTTAAGGATTCGTAAGTCCAAGTGCCACGACCCGAAGATTGACA
AAGGACTTTAATCCTTTAAAGGTAGTCTGCATTGATTATCCAAGACCAGAGCTAGACAATACAGTTA
ACTATTTGGAGGCGGCGTTATTATCATCATCGTTTCGTAAGTCCAAGTGCCACGACCCGAAGATTGACA
GATTGTTATTGCTGGTGCAGGTTTGGGTGGTTTGTCTACAGCAAAATATCTGGCAGATGCTGGTCAC
10 AAACCGATATTGCTGGAGGCAAGAGATGTCCTAGGTGGGAAGGTAGCTGCATGGAAGATGATGATG
GAGATTGGTACGAGACTGGGTTGCACATATTCTTTGGGGCTTACCCAAATATGCAGAACCTGTTTTGG
AGAACTAGGGATTGATGATCGGTTGCAGTGGAAAGGAACATTCAATGATATTTGCGATGCCTAACAAG
CCAGGGGAGTTTCAGCCGCTTTGATTTTCCTGAAGCTCTTCTGCGGCCATTAAATGGAATTTGGCCA
TACTAAAGAACAACGAAATGCTTACGTGGCCCCGAGAAAGTCAAAATTTGCTATTGGACTCTTGCCAGC
AATGCTTGGAGGGCAATCTTATGTTGAAGCTCAAGACGGTTTAAGTGTTAAGGACTGGATGAGAAAG
CAAGGTGTGCTGATAGGGTGACAGATGAGGTGTTTCAATGCCATGTCAAAGGCACTTAACCTCATAA
ACCGTGACGAGCTTTCGATGCAGTGCATTTTGATTGCTTTGAACAGATTTCTTCAGGAGAAACATGG
15 TTCAAAAATGGCCTTTTTAGATGGTAACCCTCCTGAGAGACTTTGCATGCCGATTGTGGAACATATT
GAGTCAAAAGGTGGCCAAGTCAGACTAACTCACGAATAAAAAAGATCGAGCTGAATGAGGATGGAA
GTGTCAAAATGTTTTATACTGAATAATGGCAGTACAATTAAAGGAGATGCTTTTGTGTTTGCCACTCC
AGTGGATATCTTGAAGCTTCTTTTGCCTGAAGACTGGAAAGAGATCCCATATTTCCAAAAGTTGGAG
AAGCTAGTGGGAGTTCCCTGTGATAAATGTCCATATATGGTTTGACAGAAAAGTGAAGAACACATCTG
ATAATCTGCTCTTCAGCAGAAGCCCGTTGCTCAGTGTGTACGCTGACATGTCTGTTACATGTAAGGA
ATATTACAACCCCAATCAGTCTATGTTGGAATTGGTATTTGCACCCGAGAGAGTGGATAAATCGT
AGTGACTCAGAAATTATTGATGCTACAATGAAGGAAGTACCGAAGCTTTTCCCTGATGAAATTTCCG
20 CAGATCAGAGCAAAGCAAAATATTGAAGTATCATGTTGTCAAAACCCCAAGGTCTGTTTATAAAAC
TGTGCCAGGTTGTGAACCCTGTGCGCCCTTGCAAAGATCCCTATAGAGGGTTTTTATTAGCTGGT
GACTACACGAAACAGAAGTACTTGGCTTCAATGGAAGGTGCTGTCTTATCAGGAAAGCTTTGTGCAC
AAGCTATTGTACAGGATTACGAGTTACTTCTTGGCCGGAGCCAGAAGATGTTGGCAGAAGCAAGCGT
AGTTAGCATAGTGAACATA

SEQ ID NO:2

25

11/42
Figura 11

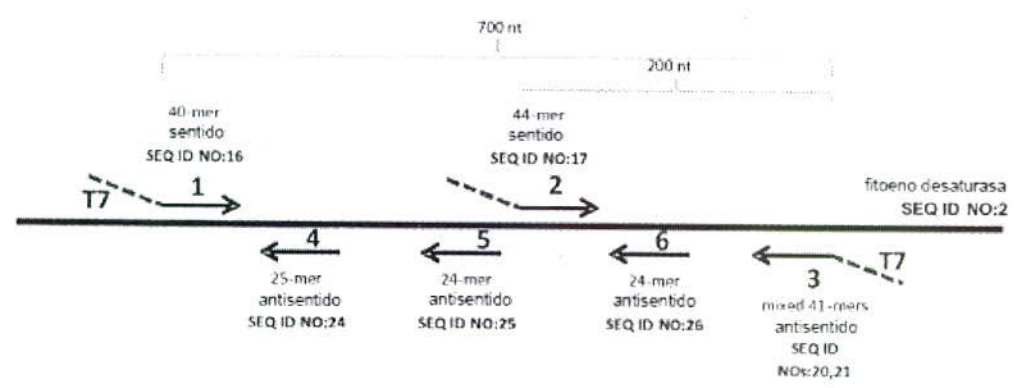
5

10

15

20

25

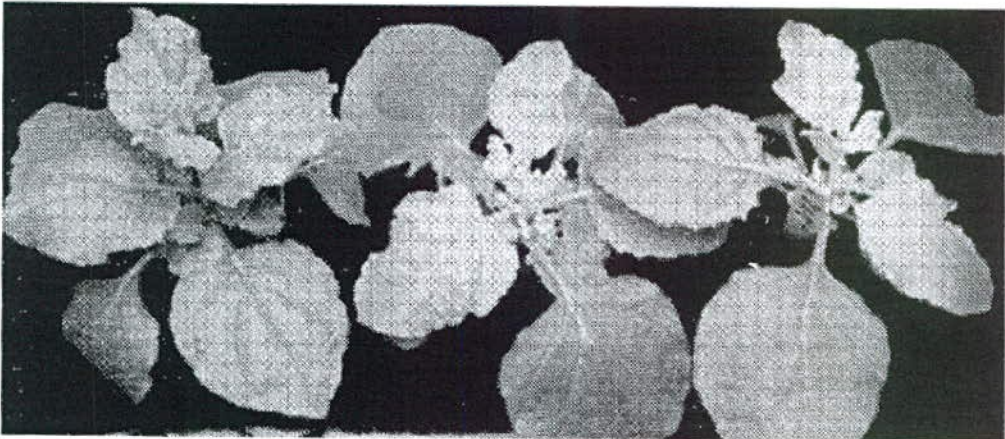


12/42
Figura 12

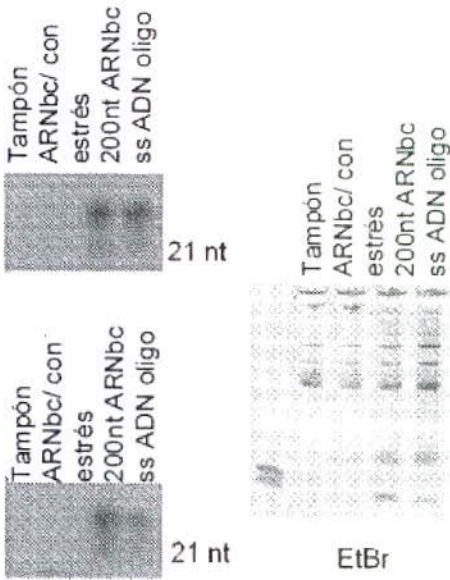
oligos ADNmc
(1+2+3+4+5+6)
SEQ ID NOs:16, 17, 20,
21, 24, 25, and 26

5
10
15
20
25
30

Testigo 200nt dsARN



A



B

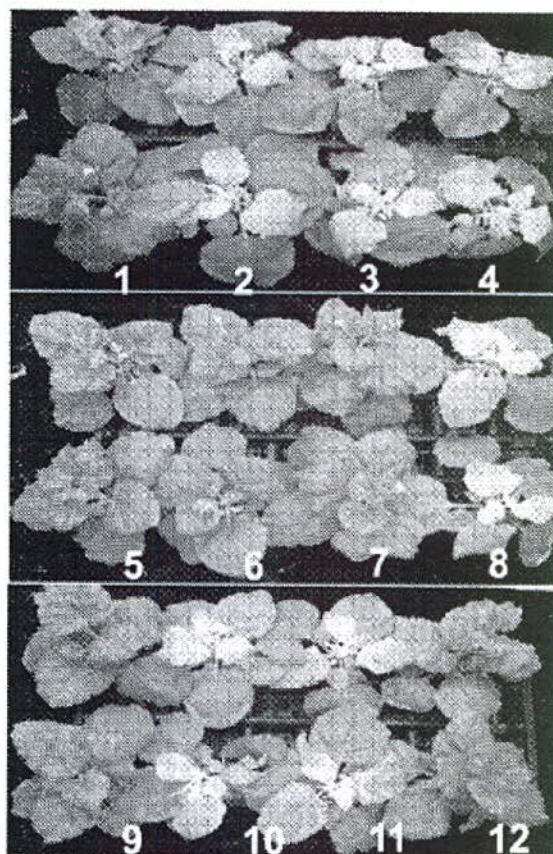
13/42
Figura 13

5

10

15

20



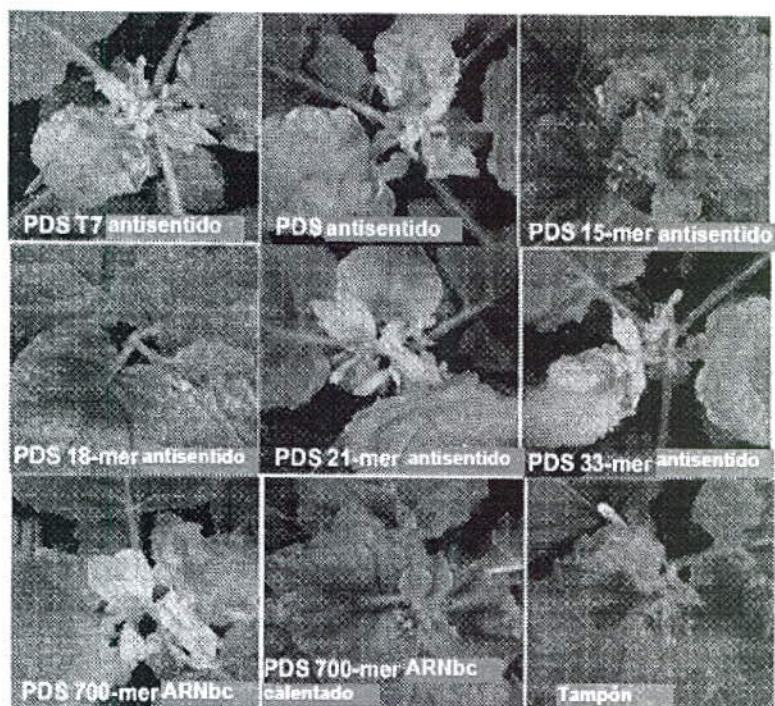
14/42
Figura 14

5

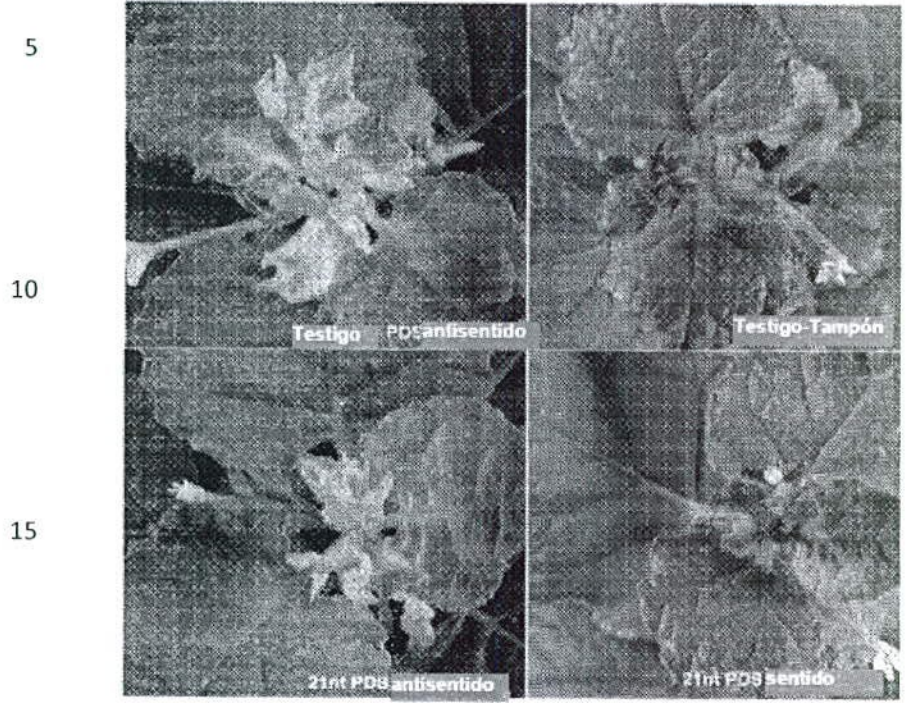
10

15

20



15/42
Figura 15



16/42
Figura 16

		10	20		
	Palmer	T-----CAA-----TTTCATCT-----ATTGGA-----AGTGAT	SEQ ID NO:37		
		::: :: :::: ::: :: ::: ::			
5	Benthamiana	ATGCCCAAATCGGACTTGTATCTGCTGTTAATTTGAGAGTCCAAGGTAA	SEQ ID NO:38		
		10 20 30 40 50			
		30 40 50			
	Palmer	TT-----TTTGG-----GTCATTCTGTGAGAAATTCAGTG--			
		:: :::: ::: ::: ::: ::: ::: ::			
	Benthamiana	TTCAGCTTATCTTTGGAGCTCGAGGTC-TTCGTTGGGAAGTCAA			
		60 70 80 90			
10		60			
	Palmer	-----TTAGTAAAGTT-----AT			
		::: ::: ::: ::: ::			
	Benthamiana	GATGTTTGCTTGCAAAGGAATTTGTTATGTTTGGTAGTAGCGACTCCAT			
		100 110 120 130 140			
		70 80 90			
	Palmer	GGAGCA-AAGCAAAGAAATGGGC-----ACTGCC-----			
		::: ::: ::: ::: ::: ::: ::: ::			
15	Benthamiana	GGGCATAAGTTAAGGATTCTGACTCCAAAGTGCCACGACCCGAAGATTGA			
		150 160 170 180 190			
		100 110 120 130			
	Palmer	-----CTTTAAAGGTTGTTTGTATAGATTATCCTAGGCCA			
		::: ::: ::: ::: ::: ::: ::: ::			
	Benthamiana	CAAAGGACTTTAATCCTTTAAAGGTAGTCTGCATTGATTATCCAAGACCA			
		200 210 220 230 240			
		140 150 160 170 180			
20	Palmer	GAGCTTGAAAGTACATCCAATTTCTTGGAAGCCGCTACTTATCTTCTAC			
		::: ::: ::: ::: ::: ::: ::: ::			
	Benthamiana	GAGCTAGACAATACAGTTAACTATTGGAGGCGCGTTATTATCATCATC			
		250 260 270 280 290			
		190 200 210 220 230			
	Palmer	TTTTCGGAATTCGCCTCGTCCTCAGAAGCCATTAGAAGTTGTAATTGCTG			
		::: ::: ::: ::: ::: ::: ::: ::			
	Benthamiana	GTTTCGTACTTCCTCAGCCCAACTAAACCATTGGAGATTGTTATTGCTG			
		300 310 320 330 340			
25		240 250 260 270 280			
	Palmer	GAGCAGGTTTGGCTGGTCTATCCACGGCAAAGTATTTAGCTGATGCAGGT			
		::: ::: ::: ::: ::: ::: ::: ::			
	Benthamiana	GTGCAGGTTTGGGTGGTTTGTCTACAGCAAAATATCTGGCAGATGCTGGT			
		350 360 370 380 390			
		290 300 310 320 330			
	Palmer	CACAAACCCATATTGTTGGAAGCAGAGATGTTTATAGAGGAAAGGTTGC	SEQ ID NO:37		
		::: ::: ::: ::: ::: ::: ::: ::			
30	Benthamiana	CACAAACCGATATTGCTGGAGGCAAGAGATGTCCTAGGTGGGAAGGTAGC	SEQ ID NO:38		
		400 410 420 430 440			

Figura 16 (continuación)

Palmer AGCGTGGGAAGGATGAGGATGGTGACTGGTATGAGACTGGGCTACATATAT SEQ ID NO:37
 Benthamiana TGCATGGAAAAGATGATGATGGAGATTGGTACGAGACTGGGTTCACATAT SEQ ID NO:38

340 350 360 370 380

5 450 460 470 480 490

Palmer TCTTTGGGGCATATCCAAATGTCCAAATCTATTGGAGAAGCTGGTATA
 Benthamiana TCITTTGGGGCTTACCCAAATATGCAGAACCTGTTTGGAGAAGCTAGGGATT

390 400 410 420 430

500 510 520 530 540

10 Palmer AATGACC GACTGCAATGGAAGGAGCACTCTATGATTTTTGCAATGCCCAG
 Benthamiana GATGATCGGTTGCAGTGAAGGAACATTCAATGATATTGGCGATGCCTAA

440 450 460 470 480

550 560 570 580 590

Palmer CAAGCCC GGTTGAATTCAGTCGCTTTGATTTCCCGAAATCCTGCCTGCAC
 Benthamiana CAAGCCAGGGGAGTT CAGCCGCTTTGATTTCTGAAGCTCTTCTCGCGC

490 500 510 520 530

600 610 620 630 640

15 Palmer CATTAATGGCATATGGGCAATCCTAAGAAATAATGAAATGCTAACCTGG
 Benthamiana CATTAATGGAATTTTGCCATACTAAAGAACAACGAAATGCTTACGTGG

540 550 560 570 580

650 660 670 680 690

Palmer CCAGAAAAATCAAGTTTGCCATTGGCTTGTTGCCTGCTATGGCAGGCGG
 Benthamiana CCCGAGAAAAGTCAAATTTGCTATTGGACTCTTGCCAGCAATGCTTGGAGG

590 600 610 620 630

700 710 720 730 740

20 Palmer ACAGTCATATGTTGAAGCACAAAGATGGTTTGAGTGTCCAAGAGTGGATGA
 Benthamiana GCAATCTTATGTTGAAGCTCAAGACGGTTTAAAGTGTAAAGACTGGATGA

640 650 660 670 680

750 760 770 780 790

Palmer GAAAACAAGGAGTACCCGATCGTGTAAGTATGATGATGTGTTTATTGCCATG
 Benthamiana GAAAGCAAGGTGTGCCTGATAGGGTGACAGATGAGGTGTTTATTGCCATG

690 700 710 720 730

800 810 820 830 840

25 Palmer TCAAAGGCACTGAACTTCATAAATCCCCGATGAACTTTCAATGCAGTGCAT SEQ ID NO:37
 Benthamiana TCAAAGGCACTTAACTTCATAAACCCGTGACGAGCTTTTCGATGCAGTGCAT SEQ ID NO:38

740 750 760 770 780

850 860 870 880 890

18/42
Figura 16 (continuación)

5		790	800	810	820	830	
	Palmer	CTTGATTGCTCTGAACCGATTTCCTGCAGGAGAAACATGGTTCTAAGATGG	SEQ ID NO:37				
							
	Benthamiana	TTTGATTGCTTTGAACAGATTTCTTCAGGAGAAACATGGTTCAAAAATGG	SEQ ID NO:38				
		900	910	920	930	940	
10		840	850	860	870	880	
	Palmer	CCTTCCTAGACGGAACCCCTCCAGAGAGGCTGTGCATGCCTATTGTTAAA					
							
	Benthamiana	CCTTTTATAGATGGTAACCCCTCCTGAGAGACTTTGCATGCCGATTGTGGAA					
		950	960	970	980	990	
15		890	900	910	920	930	
	Palmer	CACATCGAGTCACTAGGTGGTGAAGTTAACTTAACTCTCGTATACAAAA					
		..	..	..	..	..	
	Benthamiana	CATATTGAGTCAAAAGGTGGCCAAGTCAGACTAACTCACGAATAAAAAA					
		1000	1010	1020	1030	1040	
20		940	950	960	970	980	
	Palmer	GATTTCAGTTGGACCAGAGTGAAGCGTGAAGAGTTTTTGGCTAAATAACG					
		...	...	...	...	...	
	Benthamiana	GATCGAGCTGAATGAGGATGGAAGTGTCAAATGTTTATACTGAATAATG					
		1050	1060	1070	1080	1090	
25		990	1000	1010	1020	1030	
	Palmer	GGAGGGAAATACGAGGAGATGCCTATGTTTTGCCACCCAGTTGACATC					
		...	...	...	...	...	
	Benthamiana	GCAGTACAATTAAGGAGATGCTTTGTGTTTGCCACTCCAGTGGATATC					
		1100	1110	1120	1130	1140	
30		1040	1050	1060	1070	1080	
	Palmer	TTGAAGCTGTGTACTACCTGATACTTGAAGGAAATCTCATACTTCAAAAA					
							
	Benthamiana	TTGAAGCTTCTTTTGCCTGAAGACTGGAAGAGATCCCATATTTCCAAAA					
		1150	1160	1170	1180	1190	
35		1090	1100	1110	1120	1130	
	Palmer	ACTTGAGAAATTAGTGGGCGTTCCTGTGATTAATGTTACATATGGTTTG					
							
	Benthamiana	GTTGGAGAAGCTAGTGGGAGTTCCTGTGATAAATGTCCATATATGGTTTG					
		1200	1210	1220	1230	1240	
40		1140	1150	1160	1170	1180	
	Palmer	ACAGAAAATTAAAGAATACATATGACCATCTACTCTTCAGCAGGAGTCCT					
							
	Benthamiana	ACAGAAAATGAAGAACACATCTGATAATCTGCTCTTCAGCAGAAGCCCG					
		1250	1260	1270	1280	1290	
45		1190	1200	1210	1220	1230	
	Palmer	CTTTTGAGTGTCTATGCTGATATGTCGGAGACATGCAAGGAATATAAGGA	SEQ ID NO:37				
							
	Benthamiana	TTGCTCAGTGTGTACGCTGACATGTCTGTTACATGTAAGGAATATTACAA	SEQ ID NO:38				
		1300	1310	1320	1330	1340	

19/42
Figura 16 (continuación)

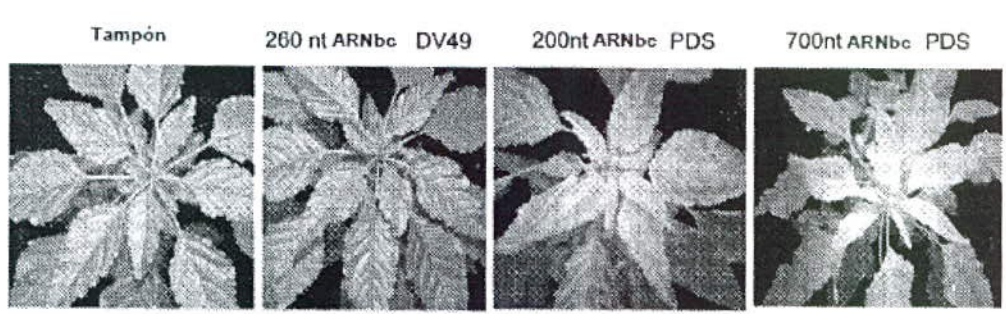
		1240	1250	1260	1270	1280	
5	Palmer	TCCAAATAGATCCATGCTGGAATTGGTTTTTGACCCGCGGAGGAATGGA	SEQ ID NO:37				
		:: ::	:: ::	:: ::	:: ::	:: ::	
	Benthamiana	CCCCAATCAGTCTATGTTGGAATTGGTATTTGCACCCGAGAAAGAGTGA	SEQ ID NO:38				
		1350	1360	1370	1380	1390	
		1290	1300	1310	1320	1330	
	Palmer	TTTCACGAAGCGACACTGATATTATAGAGGCAACAATGAAAGAGCTTGCC					
		:	:: ::	:: ::	:: ::	:: ::	
	Benthamiana	TAAATCGTAGTGACTCAGAAATTATTGATGCTACAATGAAGGAACTAGCG					
		1400	1410	1420	1430	1440	
10		1340	1350	1360	1370	1380	
	Palmer	AAGCTTTTCCCGGATGAAATCGCTGCCGATGGAAGCAAGGCCAAGATCCT					
		:: ::	:: ::	:: ::	:: ::	:: ::	
	Benthamiana	AAGCTTTTCCCTGATGAAATTTCCGGCAGATCAGAGCAAAGCAAAAATATT					
		1450	1460	1470	1480	1490	
		1390	1400	1410	1420	1430	
	Palmer	CAATATCATGTCGTCAAACTCCAAGGTCGGTTTATAAGACTGTACCGG					
		:: ::	:: ::	:: ::	:: ::	:: ::	
15	Benthamiana	GAAGTATCATGTTGTCAAAACCCCAAGGTCTGTTTATAAACTGTGCCAG					
		1500	1510	1520	1530	1540	
		1440	1450	1460	1470	1480	
	Palmer	ATTGTGAACCTTGTCGGCCGCTGCAAGATCACCAATAGAGGGTTTCTAT					
		:: ::	:: ::	:: ::	:: ::	:: ::	
	Benthamiana	GTTGTGAACCTTGTCGGCCCTTGCAAGATCCCTATAGAGGGTTTTTAT					
		1550	1560	1570	1580	1590	
20		1490	1500	1510	1520	1530	
	Palmer	TTAGCTGGTGATTACACAAAACAAAATATTTGGCTTCTATGGAAGGTGC					
		:: ::	:: ::	:: ::	:: ::	:: ::	
	Benthamiana	TTAGCTGGTGACTACACGAAACAGAACTACTTGGCTTCAATGGAAGGTGC					
		1600	1610	1620	1630	1640	
		1540	1550	1560	1570	1580	
	Palmer	TGTCTTATCTGGGAAGCTTTGTGCACAGGCTATCGTACAGGATTATGA--					
		:: ::	:: ::	:: ::	:: ::	:: ::	
	Benthamiana	TGTCTTATCAGGAAAGCTTTGTGCACAAGCTATTGTACAGGATTACGAGT					
25		1650	1660	1670	1680	1690	
		1590	1600	1610			
	Palmer	----TCT--GCTG-----AGTTCTCG--AGCACAAAGAGAA--TTGGC					
		:: ::	:: ::	:: ::	:: ::	:: ::	
	Benthamiana	TACTTCTTGGCCGAGCCAGAAGATGTTGGCAGAAGCAAGCGTAGTTAGC					
		1700	1710	1720	1730	1740	
30	Palmer	G-----	SEQ ID NO:37				
	Benthamiana	ATAGTGAATAA	SEQ ID NO:38				
		1750	1760				

20/42
Figura 17

5

10

15

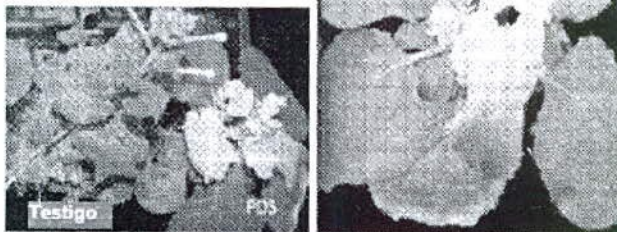


21/42
Figura 18

5



10

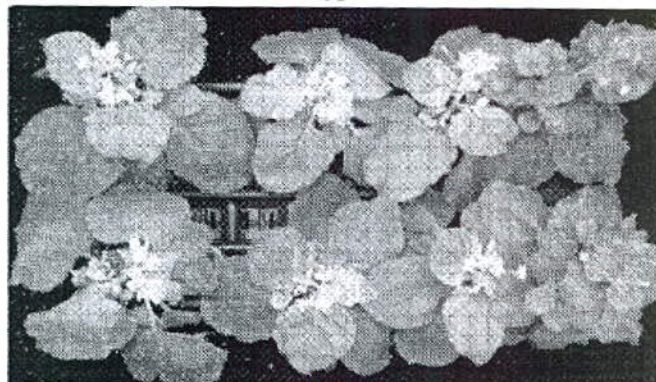


15



A

20



25

Acondicionamiento 0,1% Silwet seguido de 1 nanomol PDS ADNmc + 0,01% Silwet	Sin acondicionamiento Silwet; Infiltrado 1 nanomol PDS ADNmc + 0,01% Silwet	Sin acondicionamiento Silwet; Infiltrado 1 nanomol PDS ADNmc (sin Silwet)	Tampón
---	---	--	--------

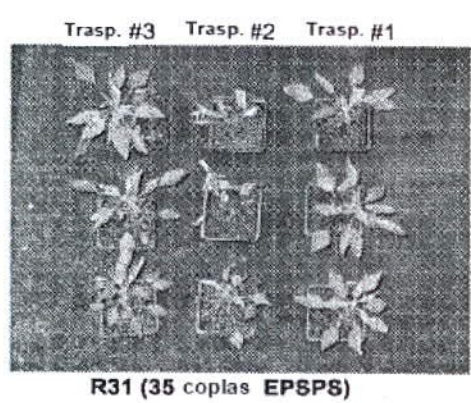
B

30

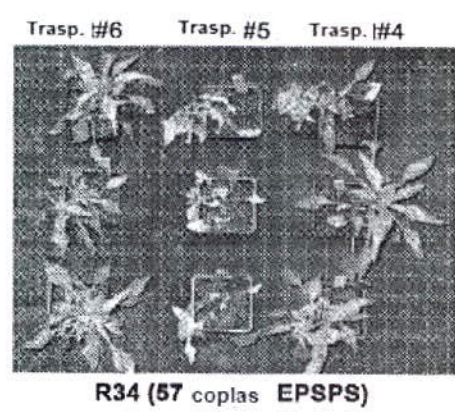
22/42
Figura 19

5

10



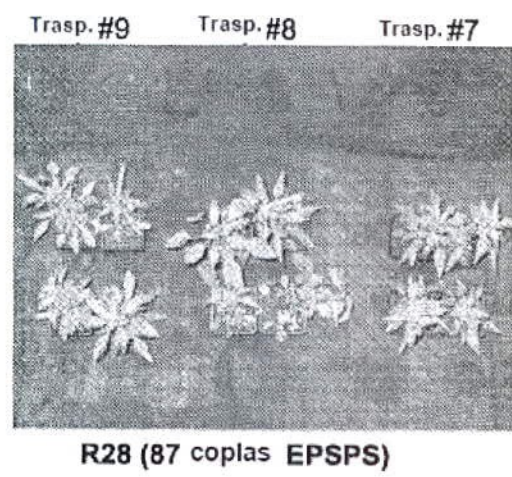
15



20

25

30



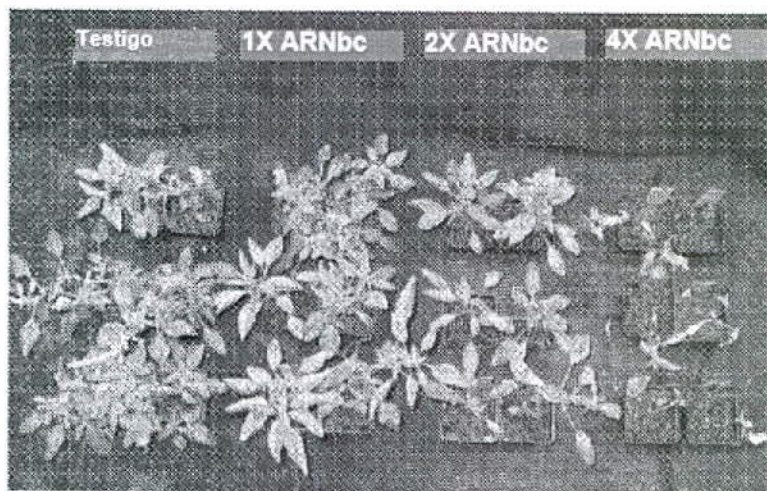
23/42
Figura 20

5 ATGGCTCAAGCTACTACCATCAACAATGGTGTCCATACTGGTCAATTGCACCATACTTTACCCAAAA
CCCAGTTACCCAAATCTTCAAAAACCTTTAATTTTGGATCAAACCTTGAGAATTTCTCCAAAGTTCAT
GTCTTTAACCAATAAAAAGAGTTGGTGGGCAATCATCAATTGTTCCCAAGATTCAAGCTTCTGTTGCT
GCTGCAGCTGAGAAACCTTCATCTGTCCCAGAAATTGTGTTACAACCCATCAAAGAGATCTCTGGTA
CTGTTCAATTGCCCTGGGTCAAAGTCTTTATCCAATCGAATCCTTCTTTTAGCTGCTTTGTCTGAGGG
CACACAGTGGTCGACAACTTGCTGTATAGTGATGATATTCTTTATATGTTGGACGCTCTCAGAACT
CTTGSTTTAAAAGTGGAGGATGATAGTACAGCCAAAAGGGCAGTCGTAAGGGTTGTGGTGGTCTGT
TTCCTGTTGGTAAAGATGGAAAGGAAGAGATTCAACTTTTCCTTGSTAAATGCAGGAACAGCGATGCG
10 CCCATTGACAGCTGCGGTTGCCGTTGCTGGAGGAAATTCAAGTTATGTGCTTGATGGAGTACCAAGA
ATGAGGGAGCGCCCCATTGGGGATCTGGTAGCAGGTCTAAAGCAACTTGGTTCAGATGTAGATTGTT
TTCTTGGCACAAATTGCCCTCCTGTTCCGGTCAATGCTAAAGGAGGCCTTCCAGGGGGCAAGGTCAA
GCTCTCTGGATCGGTTAGTAGCCAATATTTAACTGCACTTCTCATGGCTACTCCTTTGGGTCTTGGA
GACSTGGAGATTGAGATAGTTGATAAATTGATTTCTGTACCGTATGTTGAAATGACAATAAAGTTGA
TGGAACGCTTTGGAGTATCCGTAGAACATAGTGATAGTTGGGACAGGTTCTACATTGAGGTGGTCA
GAAATACAAATCTCCTGGAAAGGCATATGTTGAGGGTGATGCTTCAAGTGCTAGCTACTTCTAGCC
GGAGCCGCCGTCAGTGGTGGGACTGTCACTGTCAAGGGTTGTGGAACAAGCAGTTTACAGGGTGATG
TAAAATTTGCCGAAGTTCTTGAGAAGATGGGTTGCAAGGTCACCTGGACAGAGAATAGTGTAAGTGT
15 TACTGGACCACCCAGGGATTCTGTTGAAAGAAACATCTGCGTGCTATCGACGTCAACATGAACAAA
ATGCCAGATGTTGCTATGACTCTTGAGTTGTTGCCTTGATGCAGATGGGCCCCACCGCCATCAGAG
ATGTGGCTAGCTGGAGAGTGAAGGAAACCGAACGGATGATTGCCATTTGCACAGAACTGAGAAAGCT
TGGGGCAACAGTTGAGGAAGGATCTGATTACTGTGTGATCACTCCGCTGAAAAGCTAAACCCACC
GCCATTGAAACTTATGACGATCACCGAATGGCCATGGCATTCTCTCTTGGCTGGCTGTGCAGATGTTT
CCGTCACTATCCTTGATCCGGGATGCACCCGTAAACCTTCCCGGACTACTTTGATGTTTTAGAAAA
20 GTTCGCCAAGCATTGA

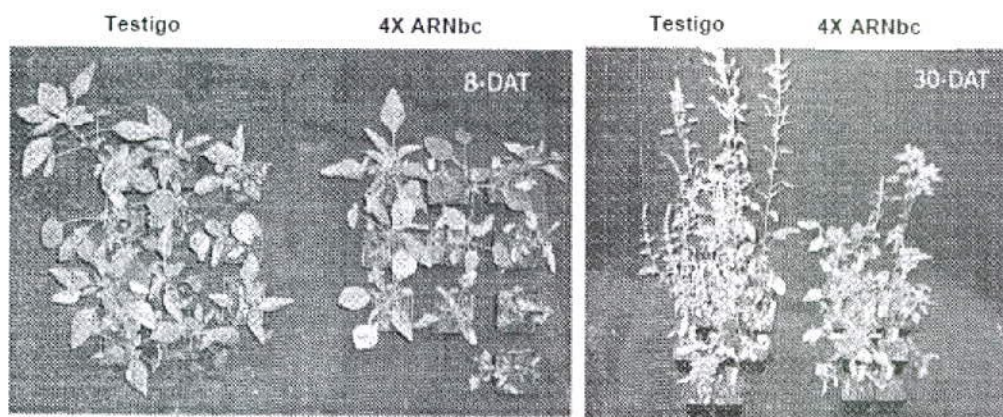
SEQ ID NO:40

20

24/42
Figura 21



A



B

25/42
Figura 22

5

Prueba de cinco reactivos de transfección
(ARNbc el 18 de junio, 4X WM el 21 de junio; Calific. 7-DAT)

10

15

20

Etapa 1: ARNbc colocado a mano		Etapa 2: Spray		Etapa 3:	
10X ARNbc formulado en reactivo de transfección		1% Silwet		4X WM (72-hr)	
	jetPRIME (Polyplus)	SilenceMag (OZ Biosciences)	Nano-particle (Sigma-Aldrich)	MPORT NeoFX (Ambion)	TransIT (Mirus Bio)
MON0818/AMS	Poliamino	Nano-partícula de magneto	Péptido N-TER	Lípido	Lípido catiónico / polímero

Palmera con 35 copias EPSPS; 10X ARNbc

26/42
Figura 23

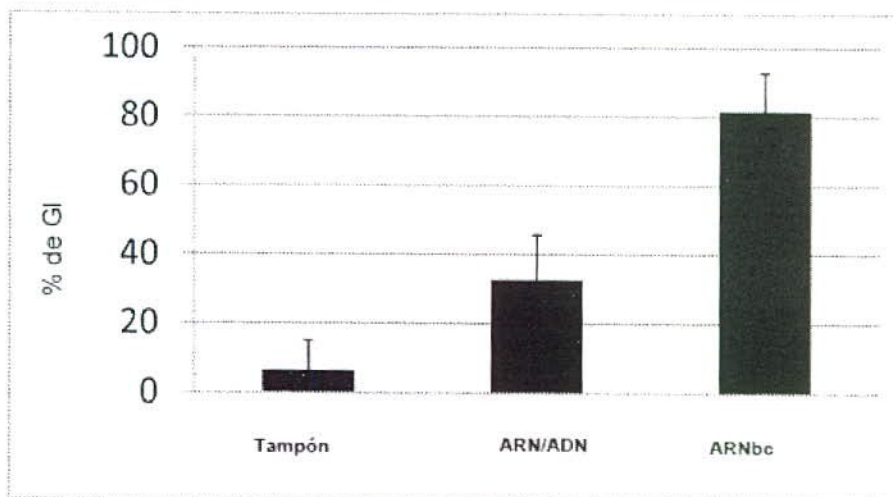
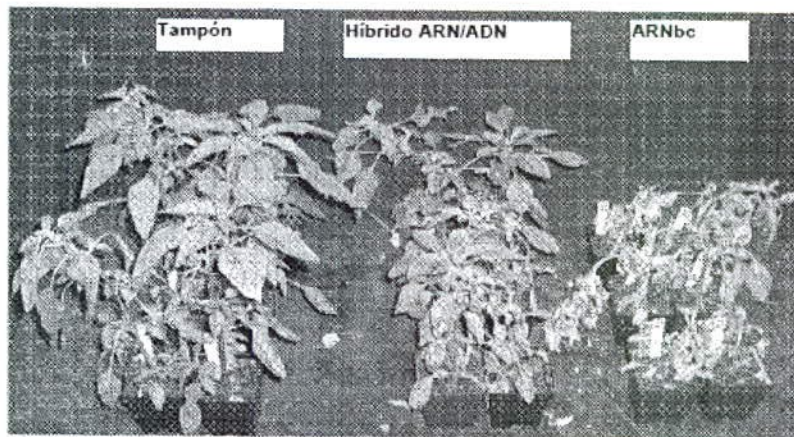
5

10

15

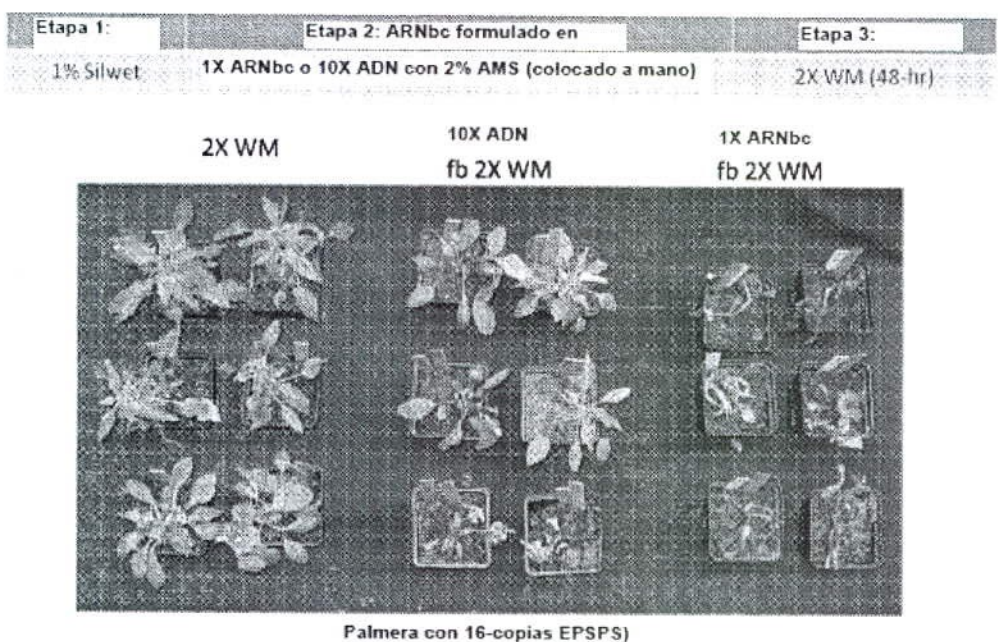
20

25



27/42
Figura 24

5

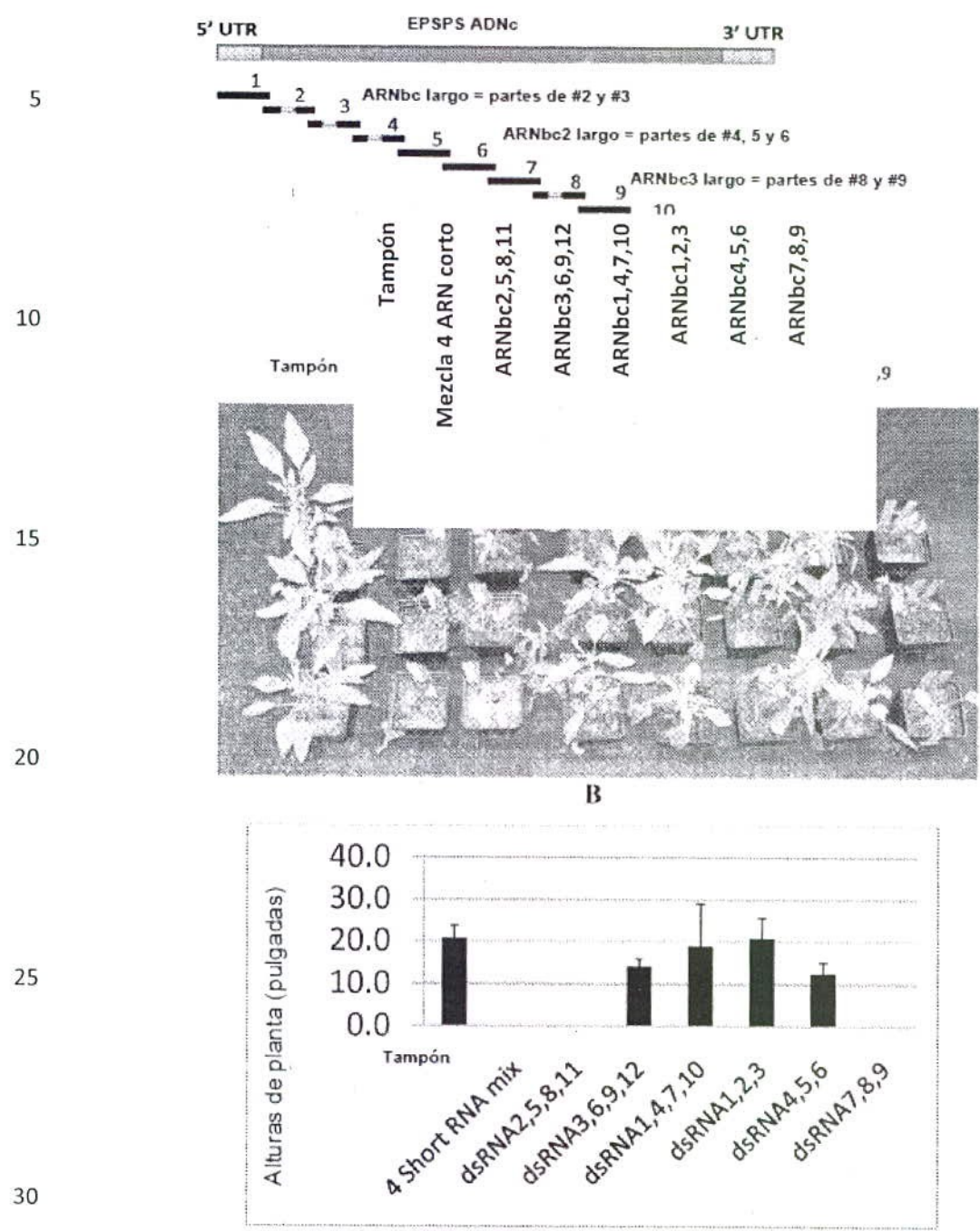


10

15

20

28/42
Figura 25

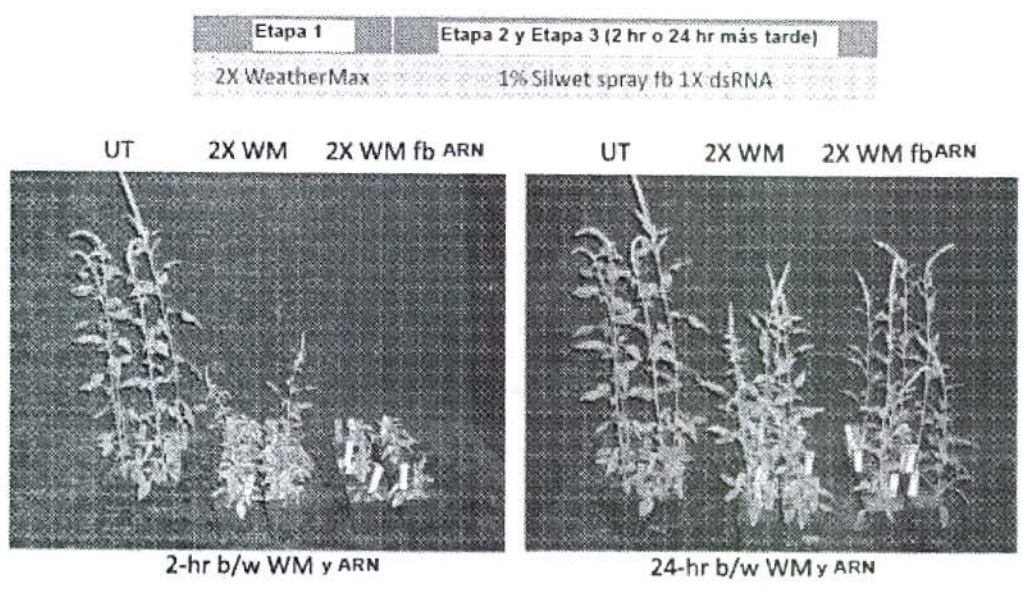


29/42
Figura 26

5

10

15



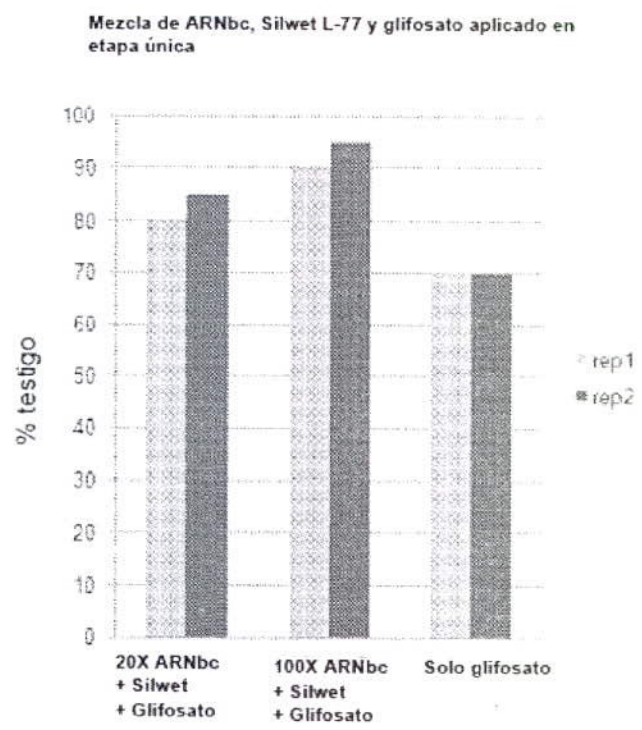
30/42
Figura 27

5

10

15

20



31/42
Figura 28

5

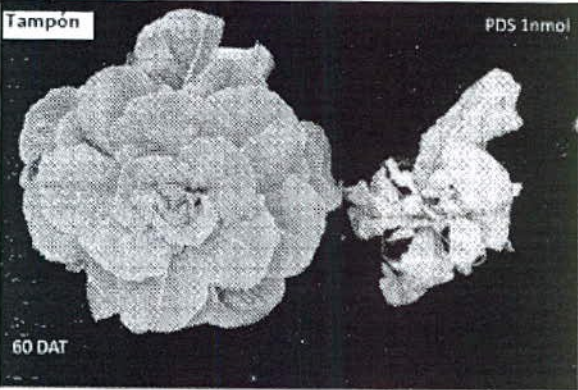
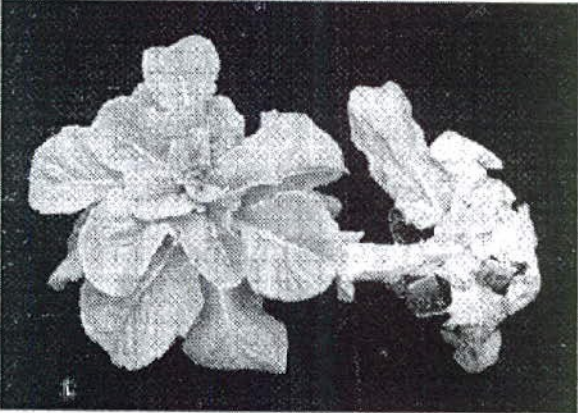
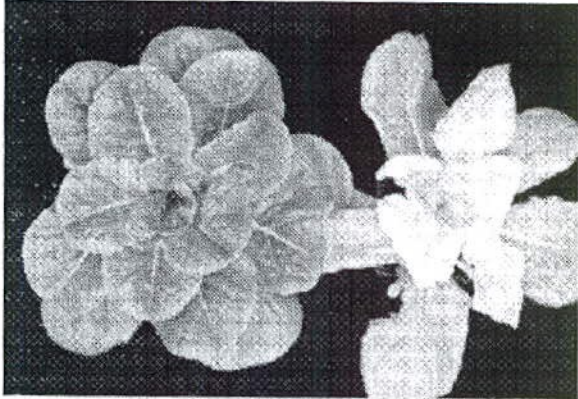
10

15

20

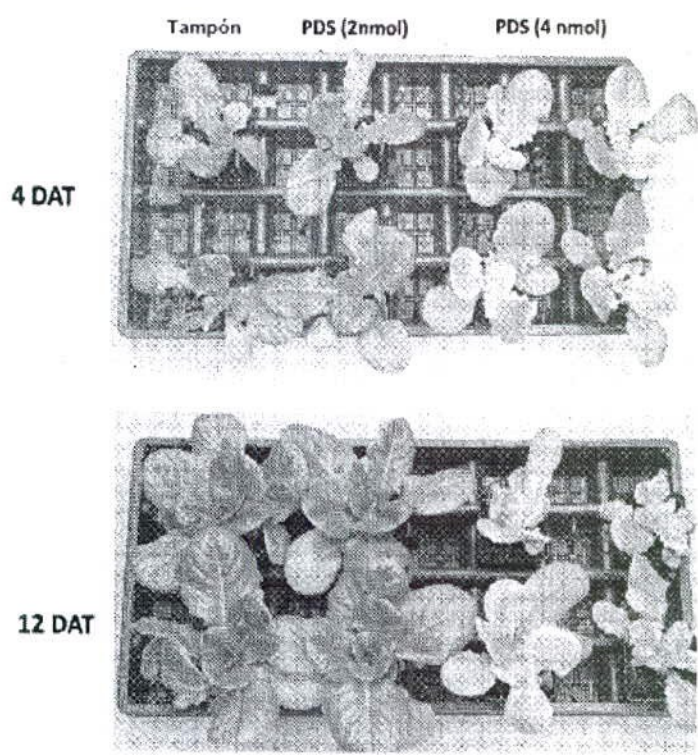
25

30

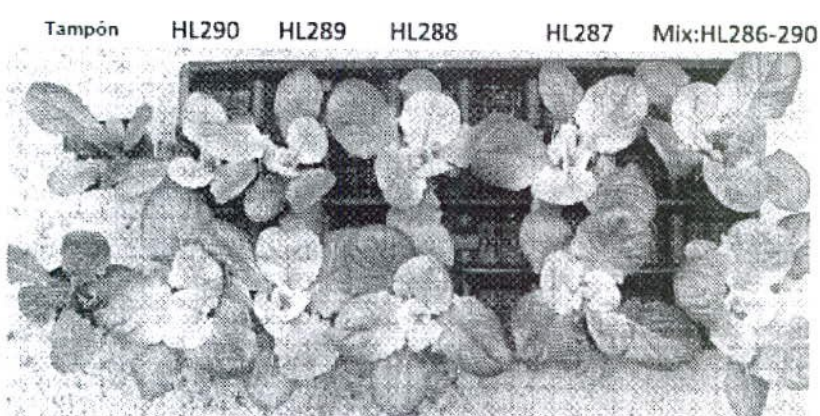


32/42
Figura 29

5
10
15
20
25
30



A



B

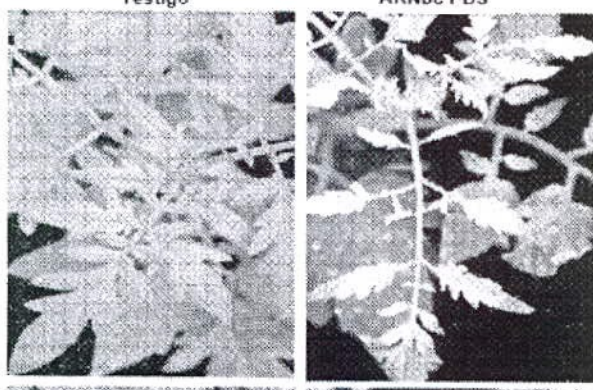
33/42
Figura 30

5

Testigo

ARNbc PDS

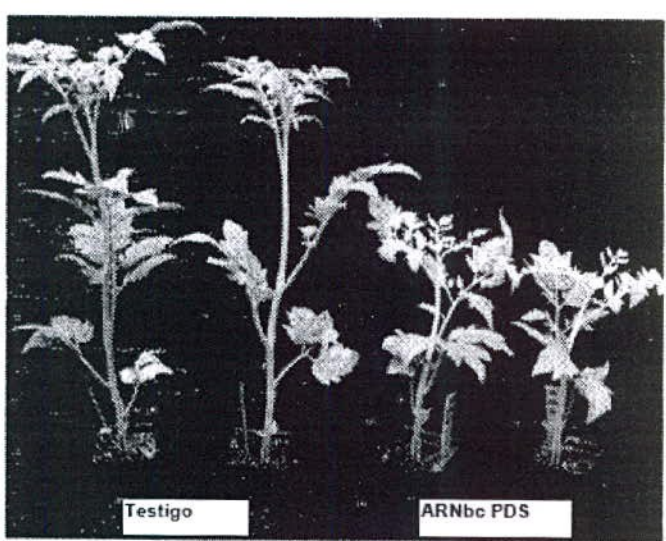
10



15



20



25

30

34/42
Figura 31

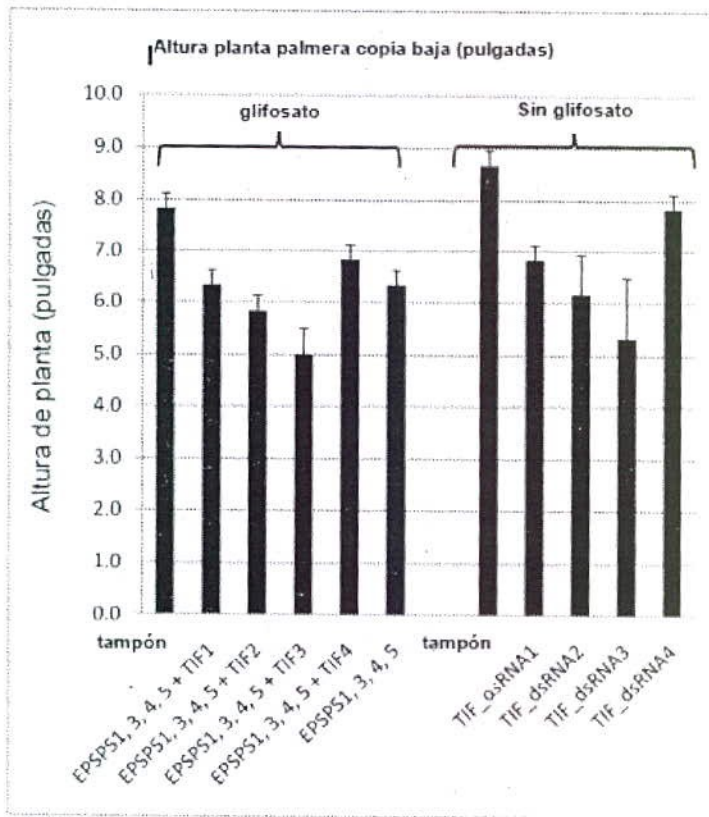
5

10

15

20

25



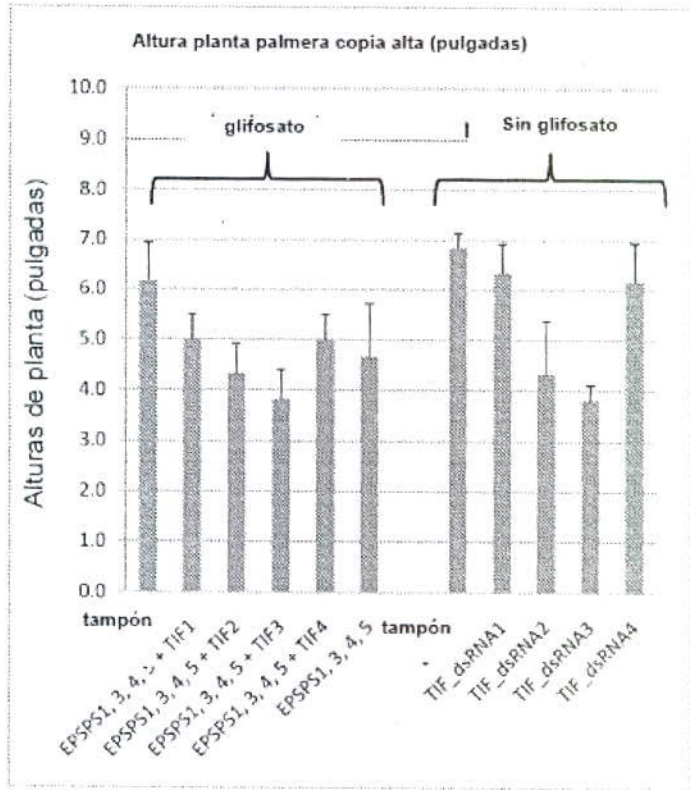
35/42
Figura 32

5

10

15

20



36/42
Figura 33

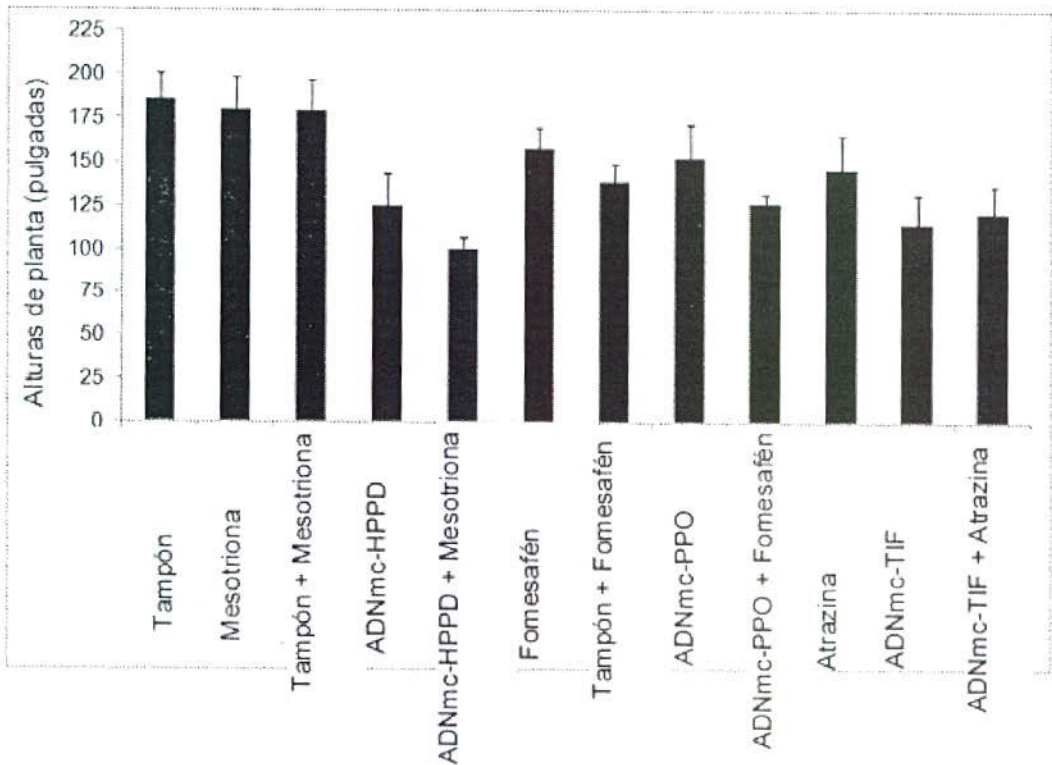
5

10

15

20

25



37/42
Figura 34

5
810 820 830 840 850 860
PDS-2_ G T A T G A A C T T T C A G A A T A T T A T A C C G G A T C A A T A T A T T A T G C T -- G A A A T A T T -- T T T C G
PDS-1_ G C T G T A T C A T A T C T T C T T C T T T A G A A C A C T A A T A A A T T A A A C T T C G A G A T A A T G A T T T C T
330 340 350 360 370 380
870 880 890 900 910
10 PDS-2_ G A C ---- T T T A A A T A A T T T C T T - T A T T T A A A T T T A T T T T T A T A C A A A A T A A C T A A A T T
PDS-1_ G A C A A G A G T A T A A A C A A G T G C A T C T A T G A A G A T T T G A G G T T G T C C A A A A A A G T G A C A A T T
390 400 410 420 430 440
920 930 940 950 960 970
15 PDS-2_ T C A A T T A C T T T T A A A --- A T T A T G A T T A T T T T T C A A T T A C C A C T - T A T A C A T C C T G C --
PDS-1_ T T G G G T T C C T A T A A A C T G T A T T T A C A T T A T T G T T - A T T T G C A A C T A T A A A A A T T T T A G A T
450 460 470 480 490
980 990 1000 1010
20 PDS-2_ T A T T T T G A A T ----- T T C A C C C G A A A - G A A C - T A C T A C T A T A C G T G G A T C --- C T C
PDS-1_ T A T T T C C A A G C T C A G T T T C T T C A A C T T A A A T G A A G G T A G C A C T T G A A T T T C A T C A G C C T C
500 510 520 530 540 550
1020 1030 1040 1050 1060 1070
PDS-2_ A A T G A C C C A G T A A C C C A A G T G G G A G A T G T G T G C A A A G T G G T C A A A T C T T A G A A G G A A T G A
PDS-1_ T A T G A C C C A G T A A C C C A T G T G G G A G A T G G G A G C A A A G T G G T C A A A C T T T A G A A G G A A T
560 570 580 590 600 610

PDS-1 secuencia de promotor (SEQ ID NO:319)
y
PDS-2 secuencia de promotor (SEQ ID NO:320)

38/42
Figura 35

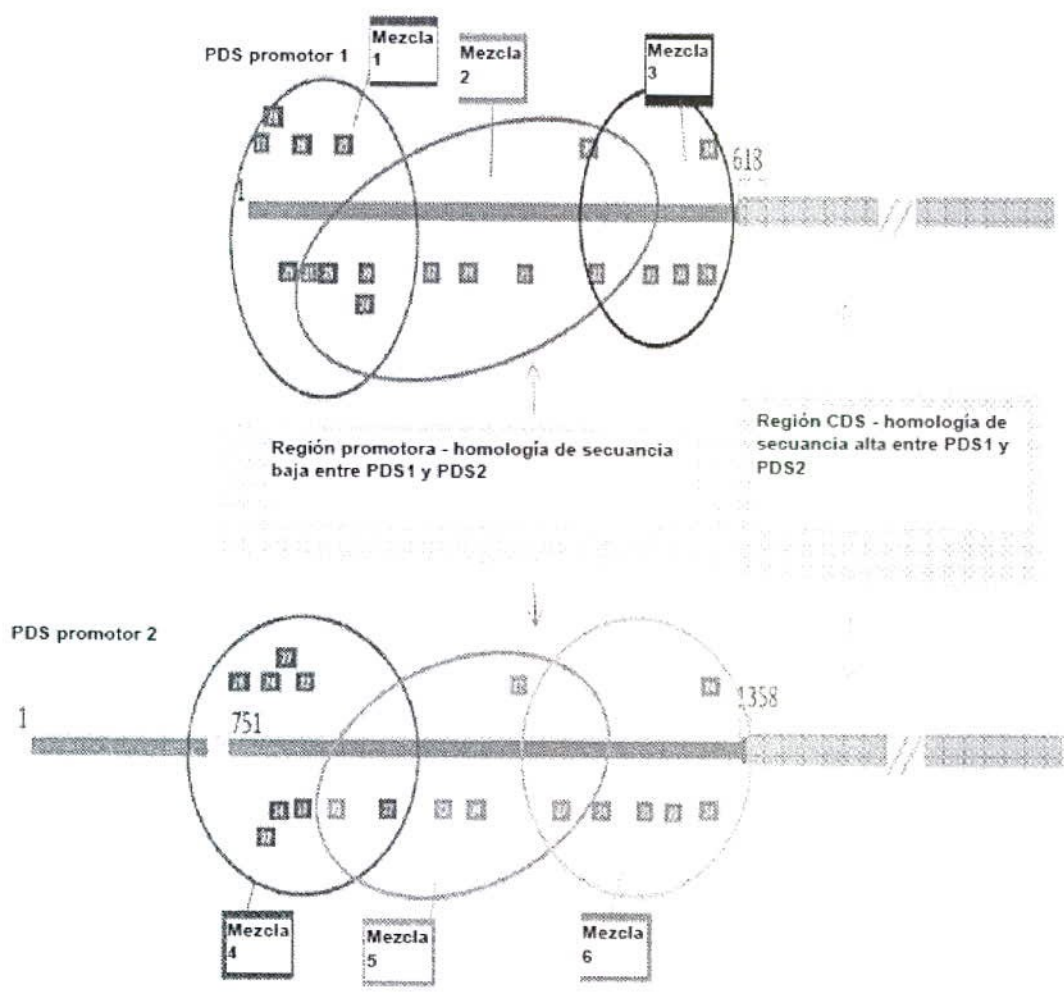
5

10

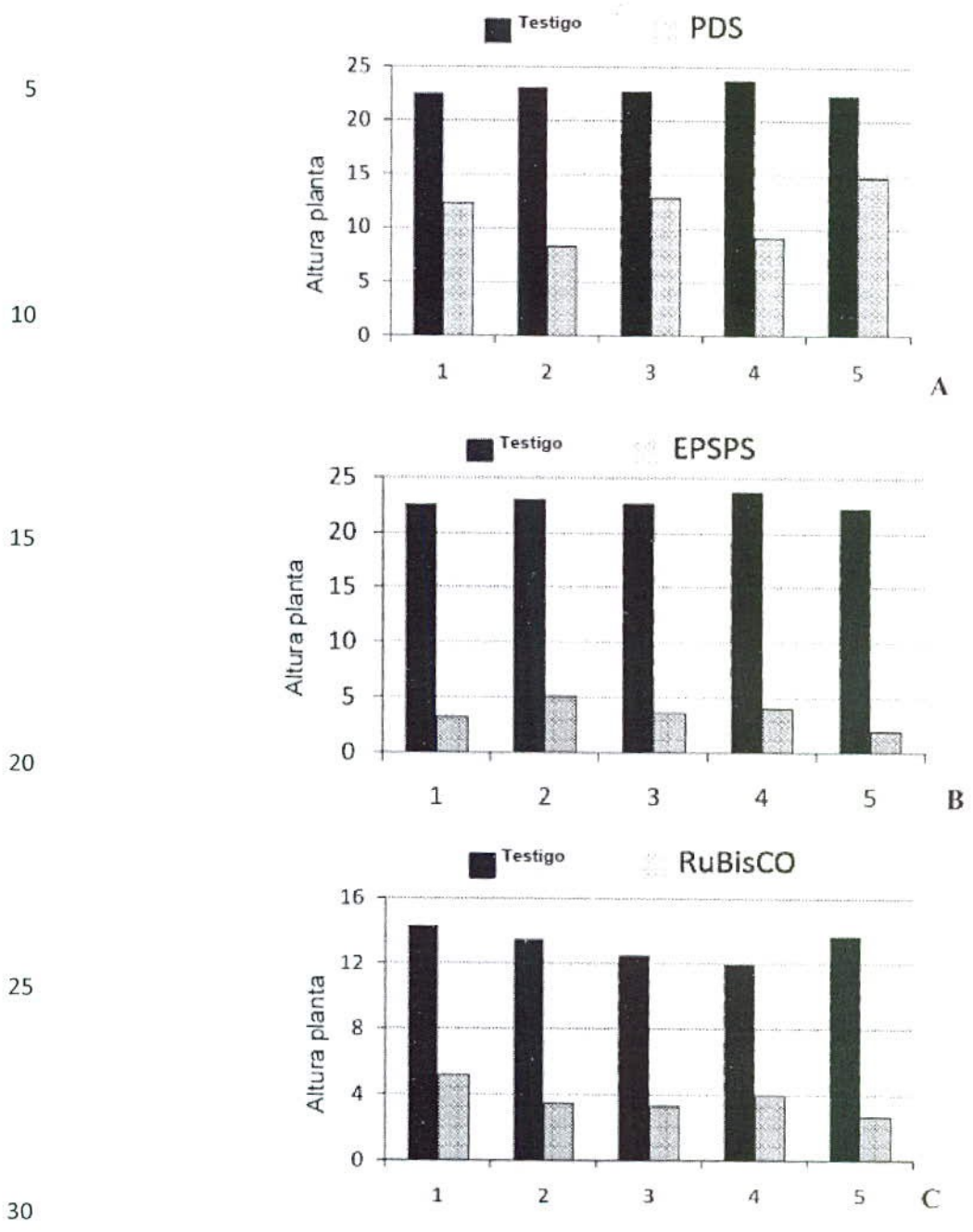
15

20

25



39/42
Figura 36



40/42
Figura 37

5

ADN oligo EPSPS

Tampón (testigo)

10

15

20

25

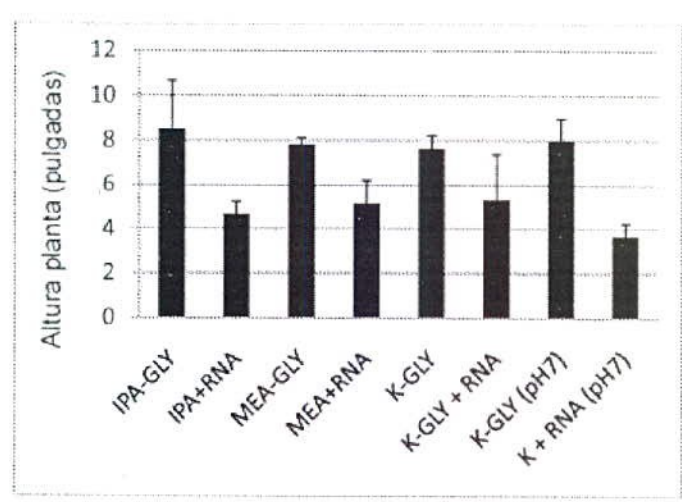


41/42
Figura 38

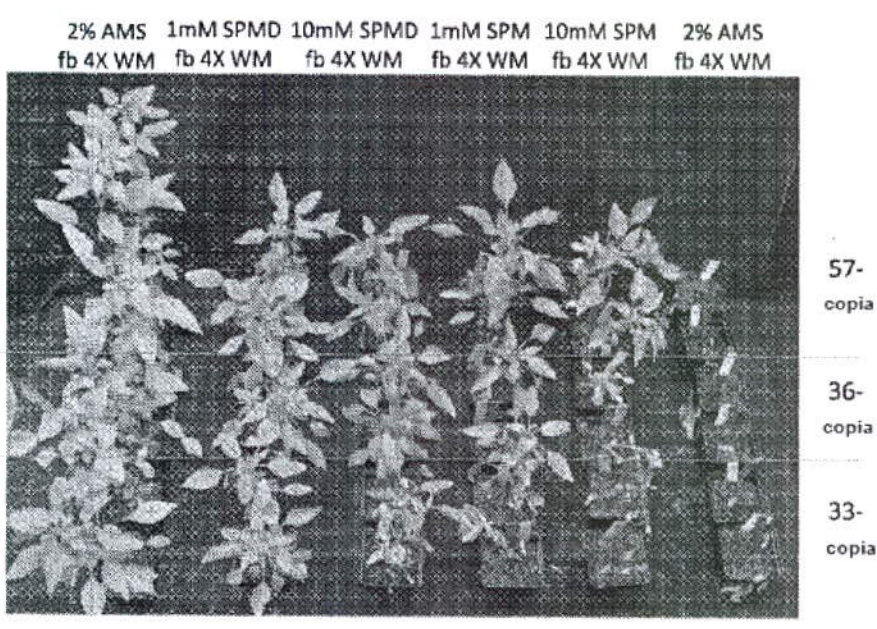
5

10

15



42/42
Figura 39



Comparación de espumina (SPM), espírmidina (SPMD), sulfato de amonio (AMS)