

ANEXO 1: DATOS ADICIONALES USANDO LÍPIDOS CATIÓNICOS COMO AGENTES DE TRANSFERENCIA

Protocolo de Formulación General

Materiales: Los lípidos 1,2-dioleoil-3-dimetilammonio-propano (DODAP, Cat No. 890850O), 1,2-dioleoil-3-trimetilammonio-propano (DOTAP sal de cloro, Cat No. 890890P) 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC, Cat No. 850355P0), Colesterol (Chol, Cat. No. 700000P), y N-palmitoil-esfingosina-1-{succinil[metoxi(polietileno glycol)2000]} (PEG2000Cer, Cat. No. 880180P se compraron en Avanti Polar Lipids (Alabaster, Al). Los ARNbc fueron fabricados por IDT o Agilent.

Preparación de soluciones stock de lípido: Se agregó etanol absoluto a mezclas de lípidos que contienen un lípido catiónico (DODAP o DOTAP), DPPC, y colesterol, resultando en una solución a una concentración deseada para cada componente lipídico individual. En las instancias señaladas, se agregó también un lípido pegilado PEG2000Cer incluido en la mezcla de lípidos. Una solución stock de etanol comúnmente usada en formulaciones para la aplicación tópica de ARNbc a plantas se generó agregando 1 mL de etanol absoluto a 7,29 mg de DODAP, 1,18 mg de DPPC, y 2,80 mg de colesterol (56.25% DODAP, 7.5% DPPC, 36.25% Col; % = mol%). También pueden aplicarse otras concentraciones de lípidos.

Preparación de mezclas de lípido + ARNbc: En general, las mezclas de lípidos + ARNbc se preparan por el agregado secuencial de 25mM de buffer acetato de sodio (pH 5,2), ARNbc (de un stock 2mM hidratado en agua libre de nucleasas) y el stock de lípido etanólico en un tubo de centrifuga de polipropileno de un tamaño apropiado con una mezcla suave luego de cada agregado. Para los experimentos de control de malezas *Amaranthus palmeri* R-22 (resistente a glifosato), se agregó adicionalmente glifosato de potasio antes del acetato de sodio 25mM (pH 5.2). Los volúmenes relativos de cada componente pueden ser variados, lo que repercute en la actividad específica del ARNbc (noqueo del ARNm y control de la maleza). Es común ajustar las concentraciones relativas de los ARNbc respecto de los lípidos para optimizar el desempeño de estas formulaciones. A esto se lo llama comúnmente como la optimización de la relación N:P (los equivalentes molares de las aminas aportadas por el lípido catiónico (al cual se hace referencia con una “N”, por ejemplo DODAP tiene una amina) respecto de los equivalentes molares de fosfatos aportados por el ARNbc (un ARNbc de 21 nucleótidos tiene 42 fosfatos). Para las mezclas de lípido + ARNbc a ser aplicadas directamente a la superficie de las hojas, la concentración final de etanol se mantiene a un valor < 10% (v/v%). Cuando la concentración de etanol final es > 10% puede usarse diálisis de diafiltración para reducir la concentración de etanol. Las mezclas lípido + ARNbc se usan típicamente entre 15 y 60 minutos después de la preparación. Sin embargo, estas mezclas han demostrado que retienen la bioactividad (control de la maleza *Amaranthus palmeri* R-22) por al menos 96 horas luego de la preparación. Un ejemplo de una preparación lípido + ARNbc que demostró actividad para el control de malezas se preparó mezclando secuencialmente 0,6 mL de glifosato de potasio, 18,985 mL de buffer acetato de sodio (25 mM, pH 5,2), 0,2 mL de ARNbc contra EPSPS y 0,215 mL del stock de lípido etanólico en un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL con una suave agitación luego de cada agregado. La mezcla resultante se mantuvo típicamente a temperatura ambiente (y no más frío que 4 °C) hasta su uso.

Evaluación de la eficacia en el control de la maleza palmer resistente a glifosato: Las formulaciones de ARNbc que contienen lípidos catiónicos se aplicaron a esquejes propagados vegetativamente de *Amaranthus palmeri* a partir de una única planta resistente a glifosato (R-22). Se cultivaron las plantas en macetas de 4 x 4 en un medio comercial (Redi-Earth) que contiene fertilizante Osmocote 14-14-14 y se regaron por irrigación desde abajo. Se aplicaron los oligos de ARNbc formulados mediante spray a plantas de aproximadamente 3 pulgadas de alto usando un pulverizador hecho a medida calibrado para administrar 10 galones por acre usando una punta de boquilla 9501E y se transfirieron inmediatamente a un invernadero. Luego de 14 días, se evaluaron las plantas individualmente usando una escala de puntaje de fitotoxicidad

visual de 0% (no hay daño en comparación con las plantas no tratadas) a 100% (muerte total de la planta).

Resultados:

Como se muestra en la Figura 1 y en la Figura 2, las formulaciones de glifosato con o sin el ARNbc contra EPSPS (a concentraciones de 0,2, 10 y 20 µM) se aplicaron tópicamente a las plantas de *Amaranthus palmeri* R-22 resistentes a glifosato y se evaluó su actividad de control de malezas luego de 19 días. Cuando se compararon con las formulaciones sin el ARNbc o con las plantas no tratadas, las formulaciones que contenían el lípido catiónico DOTAP o DODAP promovieron un control de malezas significativo cuando se les aplicó 20 µM de ARNbc contra EPSPS, lo que indica que los lípidos catiónicos de la formulación fueron capaces de permitir que el ARNbc contra EPSPS permeara dentro de las plantas.

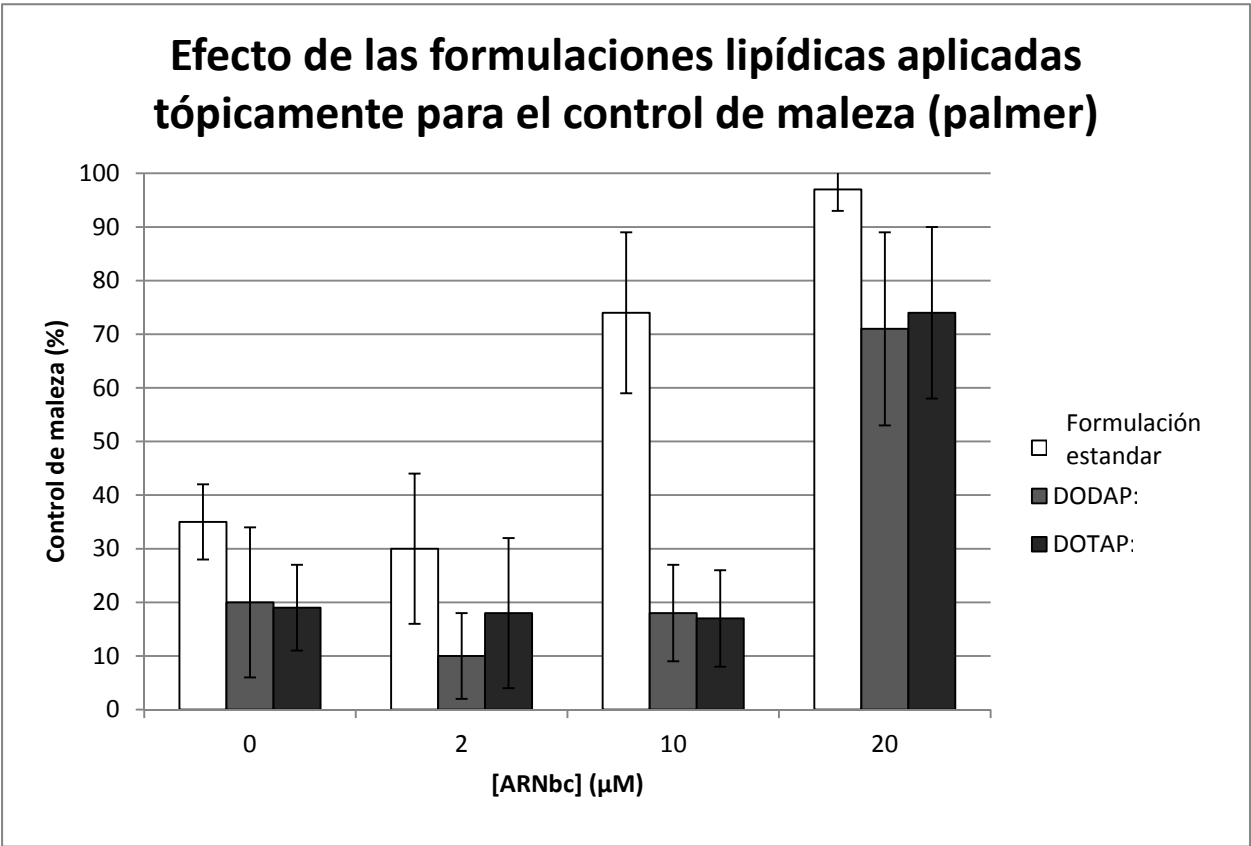


Figura 1. Se aplicaron (t = 0 días) las formulaciones de glifosato (1.5 lb/ac) +/- ARNbc (a las concentraciones indicadas en la figura – eje x) tópicamente mediante un pulverizador a plantas de amaranto palmer R-22 resistentes a glifosato y se evaluó la actividad para el control de malezas luego de 19 días. Las formulaciones que contienen el lípido catiónico DOTAP o DODAP promovieron un control de malezas significativo cuando se les aplicó el ARNbc contra EPSPS a una concentración de 20 µM en comparación con las formulaciones sin el ARNbc o las plantas no tratadas (UTC). Los datos anteriores representan el control de malezas promedio por formulación (n=6). Las barras de error son 2x el error estándar. La formulación estándar (Std) contiene 1% Silwet L-77, 20 mM buffer fosfato de sodio pH 5.3, 2% sulfato de amonio y 1.5 lb/ac de glifosato +/- el ARNbc.

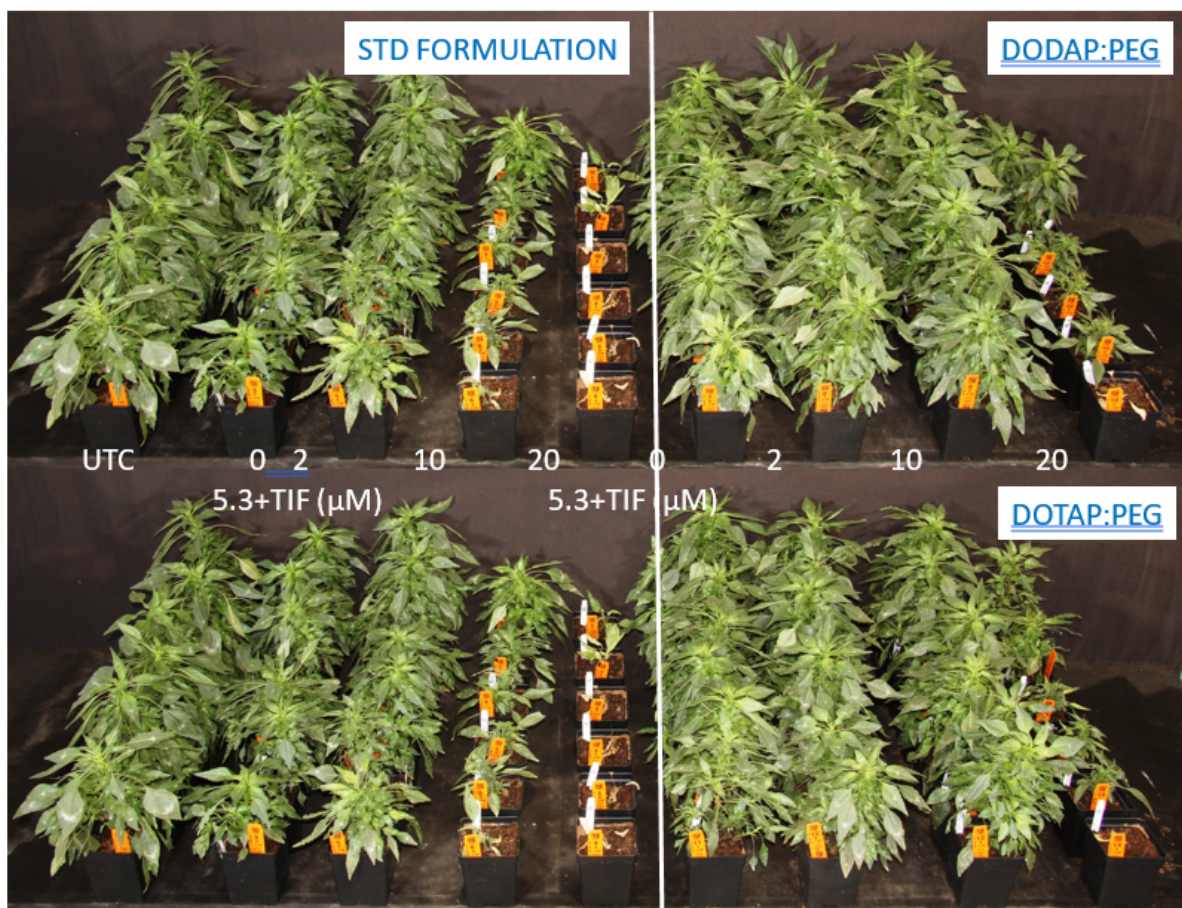


Figura 2. Se aplicaron ($t = 0$ días) las formulaciones de glifosato (1.5 lb/ac) +/- ARNbc (a las concentraciones indicadas en el medio de la figura) tópicamente mediante un pulverizador a plantas de amaranto palmer R-22 resistentes a glifosato y se evaluó la actividad para el control de malezas luego de 19 días. Las formulaciones que contienen lípido catiónico DOTAP o DODAP promovieron un control de malezas significativo cuando se les aplicó el ARNbc contra EPSPS a una concentración de 20 μM en comparación con las formulaciones sin el ARNbc o las plantas no tratadas (UTC). Formulación estándar (Std) = 1% Silwet L-77, 20 mM buffer fosfato de sodio pH 5.3, 2% sulfato de amonio y 1.5 lb/ac de glifosato +/- el ARNbc.