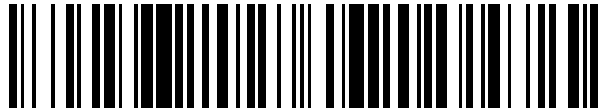


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 642**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/34** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2011 PCT/US2011/027528**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2011 WO11112570**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2011 E 11753916 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2545182**

54 Título: **Moléculas de polinucleótido para regulación génica en plantas**

30 Prioridad:

**08.03.2010 US 311762 P**

**28.05.2010 US 349807 P**

**10.09.2010 US 381556 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**10.11.2017**

73 Titular/es:

**MONSANTO TECHNOLOGY LLC (100.0%)  
800 North Lindbergh Boulevard Mail Zone E1NA  
St. Louis, MO 63167, US**

72 Inventor/es:

**SAMMONS, ROBERT, D.;  
IVASHUTA, SERGEY, I.;  
LIU, HONG;  
WANG, DAFU;  
FENG, PAUL, C.C.;  
KOURANOV, ANDREI, Y. y  
ANDERSEN, SCOTT, E.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 641 642 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Moléculas de polinucleótido para regulación génica en plantas

### Campo de la invención

5 En el presente documento se divulgan moléculas de polinucleótido para regular genes en plantas y procedimientos para producir y usar dichas moléculas.

### Antecedentes

10 La incapacidad de los herbicidas para controlar malas hierbas resistentes es un problema, especialmente cuando dichas malas hierbas están en campos de cultivos resistentes a los herbicidas que puedan tener una menor resistencia a los herbicidas que la mala hierba. Las malas hierbas resistentes a los herbicidas se identifican con una serie de modos de acción. Se ha comunicado la resistencia resultante de la selección de múltiples copias de genes que producen proteínas dirigidas a los herbicidas en el almizcle por Gaines y col. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107(3):1029-1034. Se ha comunicado resistencia resultante de mutaciones en genes que producen proteínas resistentes a los herbicidas en el amor del hortelano, achicorias y centeno por Baerson y col. (2002) Plant Physiol., 129(3): 1265-1275; Preston y col. (2006) Pesticide Biochem. Physiol., 84(3):227-235; y Wakelin y col. (2006) Weed Res. (Oxford), 46(5):432-440. El secuestro vacuolar del glifosato es un mecanismo observado en la achicoria resistente al glifosato; véase Ge y col (2010) Pest Management Sci., 66:576-576. Se ha comunicado resistencia resultante de la expresión de enzimas que metabolizan herbicidas hasta una forma química inactiva en la grama sanguina por Hidayat y col. (1997) Pesticide Biochem. Physiol., 57(2):137-146. Reddy y col. (2008) J. Agric. Food Chem., 56(6):2125-2130 comunicaron la acumulación de ácido aminometilfosfónico en especies de plantas tratadas con glifosato.

### Sumario de la invención

La invención proporciona un procedimiento para regular la expresión de un gen diana endógeno en una planta en crecimiento que comprende: aplicar tópicamente sobre la superficie de dicha planta en crecimiento:

- 25 (a) al menos un polinucleótido de ARN bicatenario (ARNbc) que comprende una secuencia que es al menos esencialmente idéntica a o esencialmente complementaria a, 18 o más nucleótidos contiguos de dicho gen diana o una secuencia de nucleótidos de un ARN transcrito a partir de dicho gen diana; y
- (b) una cantidad eficaz de un agente de transferencia, en el que dicho agente de transferencia permite que dicho al menos un polinucleótido de ARNbc permee directamente el interior de dicha planta en crecimiento, mediante lo cual dicho al menos un polinucleótido de ARNbc induce la supresión de dicho gen diana endógeno en dicha planta en crecimiento

30 en el que el gen diana codifica una proteína que proporciona resistencia a los herbicidas a la planta en crecimiento.

En un aspecto adicional de la invención, una planta que comprende ARNbc exógeno para suprimir un gen endógeno, en la que dicho ARNbc exógeno no se transcribe a partir del ADN integrado en un cromosoma de dicha planta y en la que dicho gen endógeno se suprime por la aplicación tópica de un polinucleótido de ARNbc a dicha planta después de que dicha planta haya emergido a partir de una semilla, en el que el gen diana codifica una proteína que proporciona resistencia a los herbicidas a la planta en crecimiento.

En una realización adicional, la presente invención proporciona una composición que comprende:

- 40 (a) una solución de uno o más polinucleótidos de ARNbc no transcribibles que comprenden una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a una secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir de dicho gen endógeno; en la que dichos polinucleótidos de ARNbc son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de dicha planta con dicho ARN transcrito a partir de dicho gen endógeno para efectuar el silenciamiento de dicho gen endógeno; y
- (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de dichos uno o más polinucleótidos de ARNbc del exterior de dicha célula vegetal al interior de dicha célula vegetal

45 en el que el gen diana codifica una proteína que proporciona resistencia a los herbicidas a la planta en crecimiento.

Se considera que las composiciones y los procedimientos de la presente invención funcionan a través de una o más de las diversas vías celulares naturales implicadas en la supresión génica mediada por ARN, tal como se describe de manera general en las revisiones 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 y col. (2005) Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 21:297-318; y Jones-Rhoades y col. (2006) Annu. Rev. Plant Biol., 57:19-53. La supresión génica mediada por ARN implica generalmente un intermedio de ARN bicatenario (ARNbc) que se forma intramolecularmente dentro de una sola molécula de ARN o intermolecularmente entre dos moléculas de ARN. Este intermedio de ARNbc más largo se procesa por una ribonucleasa de la familia de RNasa III (Dicer o ribonucleasa similar a Dicer) en uno o más ARN bicatenarios más cortos, incorporándose una hebra de estos al complejo de

silenciamiento inducido por ARN ("RISC"). Por ejemplo, la vía de ARNpi implica la escisión de un intermedio de ARN bicatenario más largo en ARN pequeños de interferencia ("ARNpi"). Se cree que el tamaño de los ARNpi oscila entre aproximadamente 19 y aproximadamente 25 pares de bases, pero en las plantas, las clases más comunes de ARNpi incluyen aquellas que contienen 21 pares de bases o 24 pares de bases. Véase, Hamilton y col. (2002) EMBO J., 21:4671-4679. Tal como se usa en el presente documento, "oligonucleótido" significa una molécula de polinucleótido que tiene una longitud de 18-25 nucleótidos, similar al tamaño de moléculas pequeñas de ARN procesadas en los mecanismos de silenciamiento génico.

### **Breve descripción de los dibujos**

La **figura 1** representa la **SEQ ID NO: 1**, una secuencia de nucleótido que codifica EPSPS de almizcle.

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

**11) La figura 3** ilustra la morbilidad de las plantas de almizcle tratadas con un ARNbc. La **figura 3A** presenta a las plantas 7 días después del tratamiento con glifosato. La **figura 3B** presenta plantas tratadas con tensioactivo que se trataron con la solución de ARNbc largo seguida de tratamiento con glifosato tras 72 horas. La **figura 3C** presenta plantas tratadas con tensioactivo que se trataron con la solución de ARNbc corto seguido de tratamiento con glifosato tras 72 horas.

**12) La figura 4** representa el blanqueamiento de plantas de *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 ADNss antisentido marcados en 5' con Alexa Fluor 488 (**SEQ ID NO: 15**) que permean hojas de almizcle resistentes al glifosato como se describe en el **ejemplo 9**.

**15) La figura 7** ilustra los resultados del ARNm de EPSPS medidos en hojas de almizcle resistentes al glifosato tratadas con oligonucleótidos de ADNss antisentido para EPSPS como se describe en el **ejemplo 9**. Las barras representan experimentos duplicados para cada uno de los tratamientos n.º 1 - n.º 4 (indicados por los números dentro de los círculos y en referencia a la **tabla 2**) y para los controles (hojas permeadas con oligonucleótidos de ADNss antisentido para una proteína de grano de cebada, **SEQ ID NO: 14**, tratadas con o sin glifosato).

**16) La figura 8** ilustra los resultados de la proteína EPSPS medido en hojas de almizcle resistentes al glifosato tratadas por vía tópica con oligonucleótidos de ADNss antisentido para EPSPS como se describe en el **ejemplo 9**; los tratamientos se indican por los números dentro de los círculos y por referencia a la **tabla 2**.

**17) La figura 9** ilustra los resultados de la acumulación de shikimato medida en hojas de almizcle resistentes al glifosato tratadas con oligonucleótidos de ADNss antisentido para EPSPS en dos experimentos como se describe en el **ejemplo 9**; los tratamientos se indican por los números dentro de los círculos y por referencia a la **tabla 2**.

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

**19) La figura 11** ilustra esquemáticamente la ubicación de las secuencias de los oligonucleótidos y los polinucleótidos ensayados (véase la **tabla 3**) en relación con la secuencia de fitoeno sintasa (**SEQ ID NO: 16**) como se describe en el **ejemplo 10**.

**20) Figure 12A** ilustra el blanqueamiento de hojas apicales en plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas por vía tópica con tampón ("Control"), un polinucleótido 200-mero de ARNbc con una secuencia de ARN correspondiente al segmento que consiste en los nucleótidos 914 - 1113 de la **SEQ ID NO: 2** ("ARNbc de 200 nt") y una combinación de oligonucleótidos y polinucleótidos de ADN monocatenario (**SEQ ID NO: 16, 17, 20, 21, 24, 25 y 26**) ("oligos de ADNss") como se describe en el **ejemplo 10**. La **figura 12B** ilustra los resultados del análisis de transferencia de Northern de ARN aislado de plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas con tampón (control), el polinucleótido de 200-mero de ARNbc y los oligonucleótidos de ADNss. También se muestra ARN aislado de plantas que se han sometido a estrés manteniéndolas a 4 grados centígrados y en la oscuridad durante una noche antes del tratamiento con los polinucleótidos 200-meros de ARNbc.

**21) La figura 13** ilustra el blanqueamiento de las hojas apicales de plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas por vía tópica por duplicado con varias combinaciones de polinucleótidos u oligonucleótidos (los números se refieren a los tratamientos listados en la **tabla 4**) como se describe en el **ejemplo 10**. No se muestran las plantas de control (tratamiento 13 en la **tabla 4**).

**22) La figura 14** ilustra el blanqueamiento de las hojas apicales en plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas por vía tópica con los polinucleótidos listados en la **tabla 5** como se describe en el **ejemplo 10**.

**23) La figura 15** ilustra el blanqueamiento de las hojas apicales en plantas de *Nicotiana benthamiana* después del tratamiento tópico con ADNss antisentido 21-mero de PDS (**SEQ ID NO:34**, "PDS antisentido de 21 nt") o con oligonucleótidos 22-meros antisentido de PDS sin un promotor de T7 (**SEQ ID NO: 22 y 23**) ("antisentido de PDS"). Se observó un blanqueamiento de las hojas apicales escaso o nulo después del tratamiento tópico con solo tampón o después del tratamiento con el ADNss con sentido 21-mero de PDS (**SEQ ID NO: 36**, "con sentido de PDS de 21 nt") como se describe en el **ejemplo 10**.

**24) La figura 16** ilustra un alineamiento de las secuencias de ADN de PDS de almizcle y de *Nicotiana benthamiana* que muestran aproximadamente un 71% de identidad (1252/1762) como se describe en el **ejemplo 11**.

**25) La figura 17** ilustra el blanqueamiento de hojas apicales observado en plantas de almizcle tratadas por vía tópica con ARNbc de PDS de palma de 678 pb o 198 pb pero no en plantas de almizcle tratadas por vía tópica

con un ARNbc de 260 pares de bases de gen de gusano de la raíz del maíz como se describe en el **ejemplo 11**.

**26) La figura 18A** ilustra el blanqueamiento de las hojas apicales, los tallos y las flores de plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas por vía tópica en primer lugar con una solución de tensioactivo con un oligonucleótido de ADNss de PDS para inducir el silenciamiento sistémico de la fitoeno desaturasa, tal como se describe en el **ejemplo 12**. **La figura 18A** ilustra el blanqueamiento de las hojas apicales, los tallos y las flores de plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas por vía tópica con un oligonucleótido de ADNss de PDS para inducir el silenciamiento sistémico de la fitoeno desaturasa, con o sin condicionamiento con una solución de tensioactivo, como se describe en el **ejemplo 12**.

**27) La figura 19** ilustra los resultados de ensayos en diferentes líneas de almizcle resistentes al glifosato (3 plantas por replicado) tratadas con las condiciones listadas en la tabla 6, como se describe en el **ejemplo 13**. Se tomaron fotografías 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 plantas de almizcle tratadas con ARNbc de EPSPS y que se muestran como nucleótidos subrayados en cursiva en las posiciones 564-588 y 743 - 767 de la EPSPS de longitud completa (**SEQ ID NO: 40**), como se describe en el **ejemplo 14**. La secuencia de EPSPS también muestra la ubicación de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS con un tamaño de nucleótidos "corto" (texto subrayado sin cursiva) y los tres polinucleótidos de ARN bicatenarios "largos" (texto en negrita, como se describe en el **ejemplo 1**).

**29) La figura 21A** ilustra los resultados del tratamiento de plantas de almizcle con tensioactivo seguido de ARNbc en una de tres cantidades de aplicación, seguido de herbicida, como se describe en el **ejemplo 17**. **La figura 21B** ilustra los resultados del ensayo 1 llevado a cabo en almizcle resistente al glifosato cultivado de semillas procedentes del campo como se describe en el **ejemplo 17**; las plantas se muestran a los 8 días y a los 30 días después del tratamiento con herbicida.

**30) La figura 22** ilustra los resultados obtenidos del tratamiento de almizcle con tensioactivo de amina de sebo y sulfato de amonio o con reactivos de transfección, como se describe en el **ejemplo 18**.

**31) La figura 23** ilustra los resultados de tratar plantas de almizcle resistentes al glifosato con ARNbc de EPSPS o híbridos de ADN/ARN de EPSPS, como se describe en el **ejemplo 19**.

**32) La figura 24** ilustra los resultados de tratar plantas de almizcle resistentes al glifosato con ARNbc de EPSPS o polinucleótidos de ADNss de EPSPS, como se describe en el **ejemplo 20**. La fotografía superior se tomó a los 8 días después de rociar el herbicida y el diagrama (de barras) inferior presenta los resultados como una lesión por glifosato (GI) puntuada 8 días después de rociar el herbicida.

**33) La figura 25A** ilustra doce polinucleótidos de ARNbc correspondientes a segmentos de ADN de aproximadamente 250 pb cada uno que abarcan de manera solapada la secuencia codificante completa y parte de las regiones 5' y 3' no traducidas del gen de EPSPS de palma, como se describe en el **ejemplo 21**; las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS con un tamaño de nucleótidos "corto" descritas en el **ejemplo 1** y en la **figura 1** están ubicadas en los segmentos solapados 2, 3, 4 y 8, respectivamente y se muestran como barras en color gris claro entre esos segmentos. **La figura 25B** y **la figura 25C** ilustran los resultados del tratamiento de plantas de almizcle resistentes al glifosato con ARNbc diseñados a partir de estos segmentos solapantes o as cuatro moléculas de ARNbc "cortas" o tampón.

**34) La figura 26** ilustra los resultados del tratamiento de plantas de almizcle resistentes al glifosato con glifosato seguido de rociado con Silwet L-77 al 1% seguido de aplicación de ARNbc de EPSPS en tampón que contiene sulfato de amonio al 2%, como se describe en el **ejemplo 22**. Las plantas de control no tratadas ("UT") se trataron únicamente con el pulverizador de Silwet L-77 al 1% pero no con herbicida o ARNbc. Las plantas fueron fotografiadas y puntuadas a los 16 días después del tratamiento.

**35) La figura 27** ilustra los resultados de tratar una población de campo de almizcle resistente a glifosato con alto número de copias con una composición que contiene una cantidad 20X o 100X de polinucleótidos de ARNbc de EPSPS, tensioactivo, sulfato de amonio y herbicida o con una composición que contiene tensioactivo, sulfato de amonio y herbicida, como se describe en el **ejemplo 23**. Para cada tratamiento, se trataron dos tramos replicados de 0,3 m por 1,5 m (1 pie por 5 pies).

**36) La figura 28** representa el progreso del blanqueamiento y la muerte de las plantas de lechuga tratadas con 1 nanomol de ADNss por planta a los (de arriba hacia abajo) 37, 46 y 60 días después del tratamiento, como se describe en el **ejemplo 24**.

**37) La figura 29A** ilustra el silenciamiento sistémico en plantas de lechuga evidenciado por el blanqueamiento observado a los 4 o 12 días después del tratamiento tópico con polinucleótidos, como se describe en el **ejemplo 24**. **La figura 29B** ilustra el silenciamiento sistémico evidenciado por blanqueamiento observado a los 4 días después del tratamiento tópico con los cuatro ADNss 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.

**38) La figura 30** ilustra el blanqueamiento de las hojas (panel superior derecho) y las flores (panel intermedio derecho) de plantas de tomate tratadas con polinucleótidos de fitoeno desaturasa de tomate, como se describe en el **ejemplo 25**. **La figura 30** también ilustra el retraso en el crecimiento de las plantas de tomate tratadas con polinucleótidos de PDS (panel inferior).

**39) La figura 31** ilustra el potenciamiento de la actividad herbicida del glifosato en almizcle con bajo número de copias de los polinucleótidos de EPSPS por polinucleótidos de TIF y que los polinucleótidos de TIF tienen actividad herbicida por sí mismos, como se describe en el **ejemplo 26**. Los polinucleótidos de EPSPS "1, 3, 4" se refieren a ARNbc "cortos" que tienen una hebra antisentido que es capaz de hibridar con el ARNm transcrito del gen de EPSPS de almizcle (**SEQ ID NO: 1**) en las posiciones 14-38 (ARNbc corto-1), 345-369 (ARNbc corto-3) y

1105-1129 (ARNbc corto-4), respectivamente, como se indica por los nucleótidos subrayados en la **figura 1** (véase el **ejemplo 1**). EPSPS "5" se refiere a IDT [5] (**SEQ ID NO: 91-92** como se describe en la **tabla 11**).

**40) La figura 32** ilustra el potenciamiento de la actividad herbicida del glifosato en almizcle con alto número de copias de los polinucleótidos de EPSPS por polinucleótidos de TIF y que los polinucleótidos de TIF tienen actividad herbicida por sí mismos, como se describe en el **ejemplo 26**. Los polinucleótidos de EPSPS "1, 3, 4" se refieren a ARNbc "cortos" que tienen una hebra antisentido que es capaz de hibridar con el ARNm transcrito del gen de EPSPS de almizcle (**SEQ ID NO: 1**) en las posiciones 14-38 (ARNbc corto-1), 345-369 (ARNbc corto-3) y 1105-1129 (ARNbc corto-4), respectivamente, como se indica por los nucleótidos subrayados en la **figura 1** (véase el **ejemplo 1**). EPSPS "5" se refiere a IDT [5] (**SEQ ID NO: 91-92** como se describe en la **tabla 11**).

**41) La figura 33** ilustra el efecto herbicida en almizcle después del tratamiento con las combinaciones indicadas de herbicidas no polinucleotídicos y polinucleótidos, como se describe en el **ejemplo 28**.

**42) La figura 34** ilustra un alineamiento del promotor del locus 1 de PDS de *Nicotiana benthamiana* (**SEQ ID NO: 319**) y del promotor del locus 2 de PDS (**SEQ ID NO: 320**), como se describe en el **ejemplo 30**.

**43) La figura 35** ilustra de manera esquemática los promotores del locus 1 y del locus 2 de PDS de *Nicotiana benthamiana* y las regiones diana de mezclas de polinucleótidos, como se describe en el **ejemplo 30**.

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

**45) La figura 37** ilustra el efecto en plantas monocotiledóneas de *Zea mays* (Gaspe) por tratamiento tópico con polinucleótidos de ARNbc ("oligo de ADN de EPSPS") que se dirige al gen endógeno de EPSPS o solo con tampón como control, como se describe en el **ejemplo 34**.

**46) La figura 38** ilustra el efecto de diferentes concentraciones de glifosato en la actividad herbicida en plantas de almizcle resistentes al glifosato, como se describe en el **ejemplo 35**.

**47) La figura 39** ilustra el efecto de las poliaminas esperima ("SPM") y espermidina ("SPMD") o sulfato de amonio ("AMS") en el almizcle resistente al glifosato que contiene 33, 36 o 57 copias de EPSPS, como se describe en el **ejemplo 35**. "fb 4X WM" significa "seguido de tratamiento con glifosato (3360 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®)".

#### Descripción detallada de la invención

**48)** A menos que se indique de otro modo, las secuencias de ácido nucleico en el texto de la presente memoria descriptiva se proporcionan, cuando se leen de izquierda a derecha, en la dirección 5' a 3'. Las secuencias de ácido nucleico pueden proporcionarse como ADN o como ARN, según se especifique; la divulgación de una define necesariamente a la otra, como es sabido por un experto en la materia. Cuando se proporciona un término en singular, los inventores también contemplan aspectos de la invención descritos por la forma plural de ese término. Por polinucleótidos "no transcribibles" se entiende que los polinucleótidos no comprenden una unidad de transcripción de polimerasa II completa. Tal como se usa en el presente documento, "solución" se refiere a mezclas homogéneas y a mezclas no homogéneas, tales como suspensiones, coloides, micelas y emulsiones.

#### **Polinucleótidos**

**49)** Tal como se usa en el presente documento, "polinucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que contiene múltiples oligonucleótidos y se refiere generalmente tanto a "oligonucleótidos" (una molécula de polinucleótido de 18-25 nucleótidos de longitud) y a polinucleótidos de 26 o más nucleótidos. Las realizaciones de la presente invención incluyen composiciones que incluyen oligonucleótidos que tienen una longitud de 18-25 nucleótidos (por ejemplo, 18-meros, 19-meros, 20-meros, 21-meros, 22-meros, 23-meros, 24-meros o 25-meros) o polinucleótidos de longitud media que tienen una longitud de 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 de aproximadamente 300 nucleótidos (por ejemplo, polinucleótidos de entre aproximadamente 300 a aproximadamente 400 nucleótidos, entre aproximadamente 400 y aproximadamente 500 nucleótidos, entre aproximadamente 500 y aproximadamente 600 nucleótidos, entre aproximadamente 600 y aproximadamente 700 nucleótidos, entre aproximadamente 700 y aproximadamente 800 nucleótidos, entre aproximadamente 800 y aproximadamente 900 nucleótidos, entre aproximadamente 900 y aproximadamente 1000 nucleótidos, entre aproximadamente 300 y aproximadamente 500 nucleótidos, entre aproximadamente 300 y aproximadamente 600 nucleótidos, entre aproximadamente 300 y aproximadamente 700 nucleótidos, entre aproximadamente 300 y aproximadamente 800 nucleótidos, entre aproximadamente 300 y aproximadamente 900 nucleótidos o de aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud o incluso mayores de 1000 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de hasta la longitud completa del gen diana que incluye porciones codificantes o no codificantes o tanto codificantes como no codificantes del gen diana). En los casos donde un polinucleótido es bicatenario, su longitud puede definirse de manera similar en pares de bases.

50) Las composiciones de polinucleótidos usadas en las diversas realizaciones de la presente invención incluyen composiciones que incluyen oligonucleótidos o polinucleótidos o una mezcla de ambos, incluyendo ARNbc. En algunas realizaciones, los polinucleótidos incluyen nucleótidos no canónicos, tales como inosina, tiouridina o pseudouridina. En algunas realizaciones, el polinucleótido incluye nucleótidos modificados químicamente. Los ejemplos de oligonucleótidos o polinucleótidos modificados químicamente se conocen bien en la técnica; véase, *por ejemplo*, Verma y Eckstein (1998) Annu. Rev. Biochem., 67:99-134. Por ejemplo, puede modificarse completa o parcialmente el armazón de fosfodiéster de origen natural de un oligonucleótido o polinucleótido con modificaciones de enlace internucleótido de fosforotioato, fosforoditioato o metilfosfonato, pueden usarse bases de nucleósido modificadas o azúcares modificados en la síntesis de oligonucleótidos o polinucleótidos y pueden marcarse los oligonucleótidos o polinucleótidos con un resto fluorescente (por ejemplo, fluoresceína o rodamina) u otro marcador (por ejemplo, biotina).

51) Los polinucleótidos son ARN bicatenario. En algunas realizaciones, estos polinucleótidos incluyen nucleótidos modificados químicamente o nucleótidos no canónicos. En las realizaciones del procedimiento, los polinucleótidos incluyen ARN bicatenario formado por hibridación intramolecular o ARN bicatenario formado por hibridación intermolecular. En determinadas otras realizaciones, los polinucleótidos incluyen además 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 que se sabe que se asocian con moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, iones de tetraalquilamonio, iones de trialquilamonio, iones sulfonio, iones de litio y poliaminas, tales como espermina, esperimidina o putrescina. En algunas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos se formulan con un herbicida no polinucleotídico (por ejemplo, los herbicidas químicos divulgados en el presente documento en la sección titulada "Proteínas de tolerancia a los herbicidas") o con un agente de transferencia o un agente potenciador de la permeabilidad (véase la sección titulada "Agentes y tratamientos potenciadores de la permeabilidad").

53) Los polinucleótidos se diseñan para inducir la supresión de un gen endógeno en una planta y se diseñan para que tengan una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a la secuencia (que puede ser secuencia codificante o secuencia no codificante) de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir de un gen endógeno de una planta. Por "esencialmente idéntica" o "esencialmente complementaria" se entiende que los polinucleótidos (o al menos una hebra de un polinucleótido bicatenario) se diseñan para que hibriden en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con ARN transcrito a partir del gen endógeno para efectuar la regulación o la supresión del gen endógeno.

54) Los polinucleótidos monocatenarios pueden tener una complementariedad de secuencia que no es necesariamente del 100% pero que es al menos suficiente para permitir la hibridación a ARN transcrito a partir del gen diana para formar un dúplex en condiciones fisiológicas en una célula vegetal para permitir la escisión por un mecanismo de silenciamiento génico. Por lo tanto, en algunas realizaciones el segmento se diseña para que sea esencialmente idéntico a o esencialmente complementario a, una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen diana o en el ARN mensajero transcrito a partir del gen diana. Por "esencialmente idéntico" se entiende que tiene una identidad de secuencia del 100% o al menos aproximadamente un 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia cuando se compara con la secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen diana o en el ARN transcrito a partir del gen diana; por "esencialmente complementario" se entiende que tiene una complementariedad de secuencia del 100% o al menos un aproximadamente un 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de complementariedad de secuencia cuando se compara con la secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen diana o en el ARN transcrito a partir del gen diana. En algunas realizaciones de la presente invención, las moléculas de polinucleótido se diseñan para que tengan una identidad o complementariedad de secuencia del 100% con un alelo de un gen diana dado (por ejemplo, la secuencia codificante o no codificante para una proteína de tolerancia a los herbicidas, una proteína inactivante de herbicidas, un gen de respuesta al estrés o un gen esencial); en otras realizaciones, las moléculas de polinucleótido se diseñan para que tengan una identidad o complementariedad de secuencia del 100% con múltiples alelos de un gen diana dado.

55) En un aspecto de la invención, los polinucleótidos son genes de ARN polimerasa III modificados, *por ejemplo*, genes que transcriben la partícula de ARN de reconocimiento de la señal 7SL o ARN de espliceosoma de U6 (genes de Pol III) o polinucleótidos que contienen una secuencia promotora de Pol III funcional. En una realización, los polinucleótidos son genes de Pol III modificados que contienen ADN sentido y antisentido correspondiente al ARN del gen diana identificado para la regulación que reemplazan la secuencia de ADN transcrito originariamente por el gen de Pol III.

56) Los polinucleótidos útiles en la presente invención efectúan la regulación o la modulación (por ejemplo, supresión) de la expresión génica durante un periodo durante la vida de la planta tratada de al menos 1 semana o más y típicamente de un modo sistémico. Por ejemplo, a los pocos días de tratar una hoja de planta con una composición de polinucleótido de la presente invención, pueden detectarse ARNpi primarios y transitorios en otras hojas laterales a y por encima de la hoja tratada y en el tejido apical.

57) Se conocen bien en la técnica procedimientos para producir polinucleótidos. La preparación comercial de oligonucleótidos proporciona normalmente 2 desoxirribonucleótidos en el extremo 3' de la hebra sentido. Pueden sintetizarse moléculas de polinucleótido largas mediante kits disponibles comercialmente, *por ejemplo*, los kits de Ambion tienen ADN ligado al extremo 5' que codifica un promotor de polimerasa T7 bacteriana que produce hebras de ARN que pueden ensamblarse en un ARNbc. Como alternativa, pueden producirse moléculas de ARNbc a partir de casetes de expresión en células bacterianas que tienen actividad enzimática de RNasa III regulada o deficiente. También pueden ensamblarse moléculas de polinucleótido largas a partir de múltiples fragmentos de ARN o ADN. En algunas realizaciones, se emplean parámetros de diseño tales como la puntuación de Reynolds y las reglas de Tuschl, conocidos en la técnica, para seleccionar secuencias de polinucleótido eficaces en el silenciamiento génico. En algunas realizaciones, se emplea diseño aleatorio o selección empírica de secuencias de polinucleótidos para seleccionar secuencias de polinucleótido eficaces para el silenciamiento génico. En algunas realizaciones, se explora la secuencia de un polinucleótido contra el ADN genómico de la planta prevista para minimizar el silenciamiento no intencionado de otros genes.

58) Las composiciones de polinucleótido de la presente invención son útiles en composiciones, tales como soluciones de moléculas de polinucleótido, a bajas concentraciones, solas o en combinación con otros componentes (por ejemplo, tensioactivos, sales y herbicidas no polinucleotídicos) ya sea en la misma solución o en soluciones aplicadas por separadas. Aunque no hay un límite superior acerca de las concentraciones y dosis de las moléculas de polinucleótido que pueden ser útiles en los procedimientos de la presente invención, se perseguirán por motivos de eficacia concentraciones y dosificaciones eficaces menores. Las concentraciones pueden ajustarse teniendo en consideración el volumen de pulverizador aplicado a las hojas de plantas. En una realización, un tratamiento útil para plantas herbáceas usando moléculas de oligonucleótido 25-meros es de 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 intervalos útiles de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 100 nanomoles o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 nanomoles o de aproximadamente 1 nanomol a aproximadamente 10 nanomoles de polinucleótidos por planta. Las plantas muy grandes, árboles o viñas pueden necesitar cantidades correspondientemente mayores de polinucleótidos. Cuando se usan moléculas de ARNbc largas que pueden procesarse en múltiples oligonucleótidos, pueden usarse concentraciones menores. En los ejemplos más adelante para ilustrar las realizaciones de la invención, cuando se aplica el factor 1X a moléculas de oligonucleótido, este se usa de manera arbitraria para indicar un tratamiento de 0,8 nanomoles de moléculas de polinucleótido por planta; 10X, 8 nanomoles de moléculas de polinucleótido por planta; y 100X, 80 nanomoles de moléculas de polinucleótido por planta. Por ejemplo, en el ejemplo 23, se trató a las plantas con una solución acuosa que comprende un tratamiento 100X de ARNbc de EPSPS (264 microgramos u 80 nanomoles) por planta.

#### Moléculas de ARN monocatenario

59) Puede usarse ARN monocatenario para la regulación sistémica de genes en una célula vegetal como alternativa a la presente invención. Más específicamente, pueden usarse las composiciones y los procedimientos para inducir la regulación sistémica (por ejemplo, supresión o silenciamiento sistémico) de un gen diana en una planta mediante aplicación tópica a la planta de una molécula de polinucleótido con un segmento en una secuencia de nucleótidos esencialmente idéntica a o esencialmente complementaria a, una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen diana o en el ARN transcrito a partir del gen diana, mediante lo cual la composición permea al interior de la planta e induce la regulación sistémica del gen diana por la acción de ARN monocatenario que hibrida con el ARN transcrito, *por ejemplo*, ARN mensajero. La molécula de polinucleótido puede ser una o más moléculas de polinucleótido con un solo segmento de este tipo, múltiples segmentos de este tipo, múltiples segmentos de este tipo diferentes o combinaciones de los mismos.

#### Agentes de transferencia, agentes potenciadores de la permeabilidad y tratamientos

60) Las composiciones y procedimientos de la presente invención pueden comprender agentes de transferencia o agentes potenciadores de la permeabilidad y tratamientos para condicionar la superficie del tejido vegetal, *por ejemplo*, hojas, tallos, raíces, flores o frutos, a la permeación por parte de las moléculas de polinucleótido al interior de las células vegetales. La transferencia de polinucleótidos al interior de células vegetales puede estar facilitada por la aplicación previa o contemporánea de un agente de transferencia de polinucleótidos al tejido vegetal. En algunas realizaciones, el agente de transferencia se aplica después de la aplicación de la composición de polinucleótido. El agente de transferencia de polinucleótidos habilita una vía para los polinucleótidos a través de las barreras de cera de la cutícula, estomas y/o la pared celular o las barreras membranosas y al interior de las células vegetales. Los agentes adecuados para facilitar la transferencia de la composición al interior de una célula vegetal incluyen agentes que aumentan la permeabilidad del exterior de la planta o que aumentan la permeabilidad de las células vegetales a los oligonucleótidos o polinucleótidos. Dichos agentes para facilitar la transferencia de la composición al interior de una célula vegetal incluyen un agente químico o un agente físico o combinaciones de los mismos. Los agentes químicos para el condicionamiento incluyen (a) tensioactivos, (b) disolventes orgánicos o soluciones acuosas o mezclas de disolventes orgánicos, (c) agentes oxidantes, (e) ácidos, (f) bases, (g) aceites, (h) enzimas o combinaciones de los mismos. Las realizaciones del procedimiento pueden incluir opcionalmente una etapa de incubación, una etapa de neutralización (por ejemplo, para neutralizar un ácido, base o agente oxidante o para inactivar una enzima), una etapa de enjuagado o combinaciones de las mismas. Las realizaciones de agentes o tratamientos para condicionar una planta a la permeación por polinucleótidos incluyen emulsiones, emulsiones

inversas, liposomas y otras composiciones de tipo micelar. Las realizaciones de agentes o tratamientos para condicionar una planta a la permeación por polinucleótidos incluyen contraiones u otras moléculas que se sabe que se asocian con moléculas de ácido nucleico, *por ejemplo*, iones inorgánicos de amonio, iones de alquilamonio, iones de litio, poliaminas, tales como espermina, espermidina o putrescina y otros cationes. Los disolventes orgánicos útiles para condicionar una planta a la permeación por polinucleótido incluyen DMSO, DMF, piridina, *N*-pirrolidina, hexametilfosforamida, acetonitrilo, dioxano, polipropilenglicol, otros disolventes miscibles en agua o que disolverán fosfonucleótidos en sistemas no acuosos (tales como los usados en las reacciones sintéticas). Pueden usarse aceites de origen natural o sintéticos o sin tensioactivos o emulsionantes, *por ejemplo*, aceites de origen vegetal, aceites de cultivos (tales como aquellas listadas en el 9<sup>th</sup> Compendium of Herbicide Adjuvants, disponible públicamente en línea en [www.herbicide.adjuvants.com](http://www.herbicide.adjuvants.com)), *por ejemplo*, aceites parafínicos, ésteres de ácidos grasos de polioliol o aceites con moléculas de cadena corta modificadas con amidas o poliaminas, tales como polietilenimina o *N*-pirrolidina.

**61)** Dichos agentes para el condicionamiento de una planta a la permeación por polinucleótidos se aplican a la planta mediante cualquier procedimiento conveniente, *por ejemplo*, rociando o recubriendo con un polvo, emulsión, suspensión o solución; de manera similar, las moléculas de polinucleótido se aplican a la planta mediante cualquier procedimiento conveniente, *por ejemplo*, rociando o enjuagando con una solución, emulsión o suspensión.

**62)** Los ejemplos de tensioactivos útiles incluyen sales de sodio o litio de ácidos grasos (tales como sebo o aminas de sebo o fosfolípidos) y tensioactivos de organosilicona. Otros tensioactivos útiles incluyen tensioactivos de organosilicona que incluyen tensioactivos de organosilicona no iónicos, *por ejemplo*, tensioactivos de etoxilato de trisiloxano o un copolímero de silicona y poliéter, tal como un copolímero de heptametil trisiloxano modificado con óxido de polialquileño y metiléter de aliloxipolipropilenglicol (disponible comercialmente como tensioactivo Silwet® L-77, que tiene el número CAS 27306-78-1 y el número EPA: CAL.REG.NO. 5905-50073-AA, disponible en la actualidad de Momentive Performance Materials, Albany, Nueva York). Cuando se usa el tensioactivo Silwet L-77 como tratamiento previo al pulverizado de las hojas de plantas u otras superficies, las concentraciones en el intervalo de aproximadamente un 0,015 a aproximadamente un 2 por ciento en peso (% en peso) (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035, 0,04, 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% en peso) son eficaces para preparar una superficie foliar u otra superficie vegetal para la transferencia de moléculas de polinucleótido al interior de células vegetales a partir de una aplicación tópica sobre la superficie.

**63)** Los agentes físicos adecuados pueden incluir (a) abrasivos, tales como carborundo, corundo, arena, calcita, pumita, granate y similares, (b) nanopartículas, tales como nanotubos de carbono o (c) una fuerza física. Los nanotubos de carbono se desvelan por Kam y col. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (22):6850-6851, Liu y col. (2009) *Nano Lett.*, 9(3):1007-1010 y Khodakovskaya y col. (2009) *ACS Nano*, 3(10):3221-3227. Los agentes de fuerza física pueden incluir calentamiento, enfriamiento, la aplicación de presión positiva o tratamiento con ultrasonidos. Las realizaciones del procedimiento pueden incluir opcionalmente una etapa de incubación, una etapa de neutralización (por ejemplo, para neutralizar un ácido, base o agente oxidante o para inactivar una enzima), una etapa de enjuagado o combinaciones de las mismas. Los procedimientos de la invención pueden incluir además la aplicación de otros agentes que tendrán un efecto mejorado debido al silenciamiento de determinados genes. Por ejemplo, cuando se diseña un polinucleótido para regular genes que proporcionan resistencia a los herbicidas, la posterior aplicación del herbicida puede tener un efecto dramático en la eficacia herbicida.

**64)** Los agentes para condicionar una planta en el laboratorio a la permeación por polinucleótidos incluyen, *por ejemplo*, la aplicación de un agente químico, tratamiento enzimático, calentamiento o enfriamiento, tratamiento con presión positiva o negativa o tratamiento con ultrasonidos. Los agentes para condicionar plantas en el campo incluyen agentes químicos, tales como tensioactivos y sales.

#### **45 Genes diana y genes esenciales**

**65)** Las composiciones y procedimientos de la invención son útiles para modular la expresión de un gen diana endógeno o transgénico en una célula vegetal. En diversas realizaciones, un gen diana incluye secuencia codificante (codificante de proteína o traducible), secuencia no codificante (no traducible) o secuencia tanto codificante como no codificante. Las 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 diana puede incluir múltiples segmentos consecutivos de un gen diana, múltiples segmentos no consecutivos de un gen diana, múltiples alelos de un gen diana o múltiples genes diana de una o más especies. Los ejemplos de genes diana incluyen genes vegetales endógenos y transgenes expresados en células vegetales. Otros ejemplos de genes diana incluyen genes endógenos de patógenos víricos de plantas o genes endógenos de plagas de invertebrados de plantas.

**66)** Los genes diana pueden incluir genes que codifican proteínas de tolerancia a los herbicidas, secuencias no codificantes que incluyen ARN reguladores y genes esenciales, que son genes necesarios para mantener la vida celular o para soportar la reproducción de un organismo. Las realizaciones de genes esenciales incluyen genes implicados en la replicación del ADN o ARN, transcripción génica, regulación génica mediada por ARN, síntesis de proteínas, producción de energía y división celular. Se describe un ejemplo de un compendio de genes esenciales en Zhang y col. (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32:D271-D272 y se encuentra disponible en [tubic.tju.edu.cn/deg/](http://tubic.tju.edu.cn/deg/); la



versión DEG 5.4 lista 777 genes esenciales para *Arabidopsis thaliana*. Los ejemplos de genes esenciales incluyen factor iniciador de la traducción (TIF) y ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO). Los genes diana pueden incluir genes que codifican factores de transcripción y genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis o el catabolismo de moléculas en plantas tales como, pero sin limitación, aminoácidos, ácidos grasos y otros lípidos, azúcares y otros carbohidratos, polímeros biológicos y metabolitos secundarios, incluyendo alcaloides, terpenoides, policétidos, péptidos no ribosómicos y metabolitos secundarios de origen biosintético mixto.

### Composiciones y procedimientos

**67)** Pueden proporcionarse moléculas de ARN monocatenario como alternativa a la presente invención directamente en la célula vegetal en forma de ARN o proporcionarse indirectamente, *por ejemplo*, en los casos donde una molécula de polinucleótido en la composición de tratamiento provoca en las células de una planta la producción del ARN monocatenario que es capaz de hibridar con el transcrito del gen diana. En muchas realizaciones, las composiciones de moléculas de polinucleótidos incluyen además uno o más agentes potenciadores de la permeabilidad para facilitar la transferencia de las moléculas de polinucleótido en una célula vegetal, tales como agentes para condicionar una planta a la permeación por polinucleótidos. En aspectos de la invención, los procedimientos incluyen una o más aplicaciones de la composición de polinucleótido y una o más aplicaciones de un agente potenciador de la permeabilidad para el condicionamiento de una planta a la permeación por polinucleótidos. Cuando el agente para el condicionamiento a la permeación es un tensioactivo de organosilicona, las realizaciones de las moléculas de polinucleótido son oligonucleótidos de ARN bicatenarios, polinucleótidos de ARN bicatenarios o mezclas de los mismos.

**68)** Además se divulga un procedimiento para inducir el silenciamiento sistémico de un gen diana en una planta que incluye (a) el condicionamiento de una planta a la permeación por polinucleótidos y (b) la aplicación tópica de moléculas de polinucleótido a la planta, donde las moléculas de polinucleótidos incluyen al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos clonado a partir de o identificado de otro modo a partir del gen diana en orientación con sentido o antisentido, mediante el cual las moléculas de polinucleótido permean el interior de la planta e inducen el silenciamiento sistémico del gen diana. El condicionamiento y la aplicación del pueden efectuarse por separado o en una sola etapa. Cuando el condicionamiento y la aplicación del polinucleótido se efectúan en etapas separadas, el condicionamiento puede preceder o ir a continuación de la aplicación del polinucleótido por unos minutos, horas o días. En algunas realizaciones, pueden efectuarse más de una etapa de condicionamiento o más de una aplicación de molécula de polinucleótido en la misma planta. En las realizaciones del procedimiento, el segmento puede clonarse o identificarse a partir de partes (a) codificantes (es decir, codificantes de proteínas), (b) no codificantes o (c) tanto codificantes como no codificantes del gen diana. Las partes no codificantes incluyen ADN (o el ARN codificado por el ADN) que codifica secuencias reguladoras de ARN (por ejemplo, promotores, intrones, regiones 5' o 3' no traducidas y microARN, ARNpi que actúan en *trans*, ARNpi antisentido naturales y otros ARN pequeños con función reguladora) o ARN codificantes que tienen función estructural o enzimática (por ejemplo, ribozimas, ARN ribosómicos, ARN-t, aptámeros y ribointerruptores).

**69)** En diversas realizaciones del procedimiento para inducir el silenciamiento sistémico de un gen diana en una planta, el gen diana es (a) un gen endógeno de la planta, (b) un gen endógeno de un patógeno vírico de la planta, (c) un gen endógeno de una plaga de invertebrados de la planta, (d) un gen endógeno de un simbiote o una plaga de invertebrado de la planta o (e) un gen producido por el hombre insertado en una planta transgénica. En realizaciones donde el gen endógeno es endógeno para una planta, el gen diana (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 los herbicidas a la planta o (c) se transcribe en una molécula reguladora del ARN. En realizaciones del procedimiento para inducir el silenciamiento sistémico de un gen diana en una planta, el condicionamiento incluye la aplicación de un agente químico, abrasión, lesión, tratamiento enzimático, calentamiento o enfriamiento, tratamiento con presión positiva o negativa, tratamiento con ultrasonidos o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el condicionamiento incluye la aplicación de un tensioactivo, tal como tensioactivos de organosilicona, por ejemplo, un copolímero de silicona y poliéter, tal como un copolímero de heptametil trisiloxano modificado con óxido de polialquileño y metiléter de aliloxipolipropilenglicol (disponible comercialmente como tensioactivo Silwet® L-77). En las realizaciones del procedimiento, el condicionamiento incluye la aplicación de (a) un tensioactivo, (b) un disolvente orgánico o una solución acuosa o una mezcla acuosa de un disolvente orgánico, (c) un polipropilenglicol o una solución acuosa o una mezcla acuosa de polipropilenglicol, (d) nanopartículas, (e) un agente oxidante, (f) un ácido o una base o (g) un aceite o una combinación de los mismos. Las realizaciones del procedimiento pueden incluir opcionalmente una etapa de incubación, una etapa de neutralización (por ejemplo, para neutralizar un ácido, base o agente oxidante o para inactivar una enzima), una etapa de enjuagado o combinaciones de las mismas.

**70)** Además, se desvelan composiciones tópicas para inducir el silenciamiento sistémico de un gen diana en una planta que incluyen (a) un agente para condicionar una planta a la permeación por polinucleótidos y (b) moléculas de polinucleótido con al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos esencialmente idénticos o complementarios a la secuencia de nucleótidos del gen diana en orientación con sentido o antisentido. Dichas composiciones pueden usarse para los diversos procedimientos desvelados en el presente documento que incluyen procedimientos para investigar la genética inversa modulando un gen endógeno en una planta y como composiciones herbicidas para los procedimientos divulgados de control de las malas hierbas y el control de plantas a voluntad. Otro aspecto de la invención proporciona una planta que incluye ARNbc exógeno para suprimir un gen

endógeno, en el que el ARN exógeno no se transcribe a partir de ADN integrado en un cromosoma de la planta y en el que el gen endógeno se suprime mediante la aplicación tópica de un polinucleótido a la planta. Como alternativa, el ARN puede diseñarse para suprimir un gen endógeno de la planta en respuesta a una plaga o patógeno para proporcionar control sobre las plagas o enfermedades de la planta. Dicha planta puede cultivarse a partir de una semilla o producirse mediante un esqueje, clonación o proceso de injerto (es decir, una planta no cultivada a partir de una semilla). Dicha planta es una planta de cultivo en hilera, un frutal, una hortaliza, un árbol o una planta ornamental. Por ejemplo, en las realizaciones de la invención desvelada en el presente documento, 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 hortaliza (por ejemplo, tomate, pimiento dulce, pimiento picante, melón, sandía, pepino, berenjena, coliflor, brécol, lechuga, espinaca, cebolla, guisantes, zanahorias, maíz dulce, col china, puerro, hinojo, calabaza, calabaza alargada o calabaza ornamental, rábano, coles de Bruselas, tomatillo, frijoles de jardín, frijoles secos u oca) o es una planta culinaria (por ejemplo, albahaca, perejil, café o té) o es un fruto (por ejemplo, manzana, pera, cereza, melocotón, ciruela, melocotón, banana, plátano, uva de mesa, uva de vino, cítricos, aguacate, mango o bayas) o es un árbol cultivado para uso ornamental o comercial (por ejemplo, un frutal o un árbol que dé frutos secos o es una planta ornamental (por ejemplo, una planta o arbusto de flor ornamental o hierba de césped). Las realizaciones de una planta producida a partir de un esqueje, clonación o proceso de injerto (es decir, una planta no cultivada a partir de una semilla) incluyen árboles frutales y plantas que incluyen cítricos, manzanas, aguacates, tomates, berenjena, pepino, melones, sandías y uvas, así como diversas plantas ornamentales.

#### Procedimientos para investigar la genética inversa

71) Adicionalmente, se divulga un procedimiento para investigar la genética inversa mediante la regulación o modulación de un gen diana endógeno en una planta; dicho procedimiento incluye la aplicación sobre el tejido de una planta en crecimiento de una composición para proporcionar (directa o indirectamente) el ARN monocatenario de la presente invención para la regulación sistémica de genes en una célula vegetal. En las realizaciones de dicho procedimiento, se usa como diana de un polinucleótido de la invención el ARN mensajero que codifica una proteína o el gen de ARN regulador, efectuando la modulación del gen durante un periodo de al menos 1 semana durante la vida de la planta, por ejemplo, para identificar rasgos que puedan conferirse por la aplicación tópica de polinucleótidos. El procedimiento puede incluir etapas adicionales, por ejemplo, la exposición de la planta a una serie de compuestos para identificar interacciones herbicidas o exponer 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, exposición a una plaga de insectos o nematodos o a un patógeno vírico, fúngico o bacteriano o exposición a un compuesto químico o un tratamiento biológico) para identificar respuestas de la planta al estrés o el tratamiento. En otro aspecto de la invención, se exploran bibliotecas de plantas con una variedad de genes silenciados transitoriamente frente a bibliotecas de compuestos (por ejemplo, herbicidas, fitohormonas, desencadenantes de la defensa endógenos o exógenos, tales como el ácido salicílico o las harpinas, deficiencias de moléculas que proporcionan un nutriente para las plantas, tal como nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio, magnesio, hierro y zinc) para identificar interacciones con dichos compuestos. Los ejemplos de plantas útiles en dichas exploraciones incluyen *Amaranthus palmeri* y *Nicotiana benthamiana*.

#### Procedimientos para el silenciamiento de transgenes

72) En otro aspecto más de la invención, los procedimientos anteriores pueden usarse para silenciar un transgén que se esté expresando en una planta, proporcionando de este modo un control negativo que es una medición independiente de eventos de la contribución de un transgén al rendimiento de una planta o su efecto en un rasgo. El conferir un efecto de control negativo puede requerir múltiples tratamientos sucesivos con las moléculas de polinucleótido de la presente invención durante el ciclo de vida de una planta.

#### Aplicaciones específicas

73) En un aspecto relacionado, las composiciones y procedimientos de la invención también son útiles para silenciar de manera transitoria uno o más genes en una célula vegetal o una planta completa en crecimiento para efectuar un fenotipo deseado en respuesta a las condiciones de cultivo, el estrés ambiental o abiótico o biótico o al cambio en la demanda comercial durante la estación de crecimiento o en el ambiente de después de la cosecha. Por ejemplo, las composiciones y procedimientos de la invención son útiles para suprimir de manera transitoria un gen biosintético o catabólico para producir una planta o producto de planta con un fenotipo deseado, tal como una composición nutricional deseada de un producto de planta de cultivo, por ejemplo, suprimiendo un gen de FAD2 para obtener un perfil de ácidos grasos deseado en la soja o la colza u otra oleaginosa o suprimir genes biosintéticos de lignina, tales como COMT y CCOMT para proporcionar plantas forrajeras más fácilmente digeribles. De forma análoga, las composiciones y procedimientos 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, precursor de miARN o señuelo de miARN, tal como se desvela en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2009/0070898. Las realizaciones de la invención son útiles para suprimir un gen endógeno de la planta implicado en la respuesta a una plaga o patógeno, proporcionando de este modo el control de plagas o enfermedades de la planta. Los polinucleótidos, composiciones y procedimientos de suministro desvelados en el presente documento son útiles además para suprimir un gen diana endógeno de una plaga de invertebrados de una planta, por ejemplo, plagas de lepidópteros o coleópteros que pueden ingerir ARN de la planta, proporcionando de

este modo el control de plagas o enfermedades de la planta inducidas por plagas, *por ejemplo*, mediante el uso de un pulverizador tópico para plantas de cultivo, hortalizas o árboles frutales con moléculas de ADN o ARN que se dirigen a un gen esencial del invertebrado o a un gen de un simbiote de la plaga de invertebrado. Los polinucleótidos, composiciones y procedimientos de suministro desvelados en el presente documento son útiles además para proporcionar control sobre un patógeno vírico, *por ejemplo*, mediante el uso de un pulverizador tópico antivírico para plantas de cultivo, hortalizas o árboles frutales con moléculas de ADN o ARN que se dirigen a un gen vírico.

### Composiciones y procedimientos herbicidas

**74)**Adicionalmente, se desvela una composición herbicida líquida que comprende moléculas de polinucleótidos 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 genes endógenos en la célula vegetal. En algunas realizaciones, el gen diana codifica una proteína que proporciona tolerancia a un herbicida o codifica un gen para mantener el crecimiento o la vida de la planta. Las composiciones herbicidas líquidas pueden incluir además agentes potenciadores de la permeabilidad, herbicidas no nucleotídicos o combinaciones de los mismos y pueden usarse en un tratamiento en múltiples etapas con el herbicida no nucleotídico y/o los agentes potenciadores de la 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 agentes letales 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 diana en la célula vegetal para efectuar el silenciamiento del gen diana. En una realización, una composición herbicida líquida eficaz contra plantas resistentes al glifosato incluye un tensioactivo de organosilicona, tal como el tensioactivo Silwet® L-77 y moléculas de polinucleótido para proporcionar ARN monocatenario capaz de hibridar en condiciones fisiológicas en las células vegetales con el transcrito de ARN de un gen de EPSPS endógeno o transgénico que codifica una proteína EPSPS que proporciona tolerancia al glifosato. Cuando se diseña la molécula de polinucleótido para que hibride en condiciones fisiológicas en una célula vegetal con ARNm que codifica un ARN codificante o no codificante de proteínas que es esencial para mantener el crecimiento o la vida y para efectuar el silenciamiento génico y la reducción de la proteína esencial, la molécula de polinucleótido puede funcionar como un agente letal para plantas, es *decir*, un herbicida de nucleótidos. Estas composiciones herbicidas que incluyen moléculas de polinucleótido pueden adaptarse como recubrimiento tópico sobre las hojas de una planta en crecimiento o para la aplicación sobre las raíces o tallos cortados, por ejemplo, de plantas de cultivo hidropónico o en macetas.

**75)**Además, se desvela una composición adaptada para recubrir tópicamente hojas u otras superficies de una planta viva que incluyen un agente potenciador de la permeabilidad, *por ejemplo*, un tensioactivo, tal como un tensioactivo de organosilicona y oligonucleótidos o polinucleótidos que proporcionan (directa o indirectamente) ARN monocatenario que puede hibridar en condiciones fisiológicas en una célula vegetal con ARN transcrito a partir de un gen endógeno de la planta en la célula. En una realización, el gen de planta endógeno es un gen de planta endógeno que codifica una proteína que proporciona tolerancia herbicida a herbicidas tales como glifosato, dicamba o sulfonilurea. Los ejemplos de dichas proteínas que proporcionan tolerancia a los herbicidas se divulgan más adelante en la sección "proteínas de tolerancia a los herbicidas".

**76)**Además, se divulga un procedimiento para controlar plantas voluntarias resistentes a los herbicidas en un campo de plantas de cultivo resistentes a los herbicidas que incluyen aplicar sobre las hojas u otra superficie de las plantas voluntarias una composición que proporciona a o que permite la producción en, células de las plantas voluntarias una molécula de ARN monocatenario que es capaz de hibridar en condiciones fisiológicas en las células de las plantas voluntarias con ARN que se transcribe a partir de un gen endógeno en las células, en los que el gen endógeno (i) es un gen esencial para mantener el crecimiento o la vida de la planta voluntaria, (ii) codifica una proteína que proporciona resistencia a los herbicidas a la planta voluntaria o (iii) se transcribe en un agente regulador de ARN (por ejemplo, promotores, también precursores de miARN, miARN, ARNpi que actúan en *trans* y otros ARN no codificantes que tienen función reguladora, tales como aptámeros y ribointerruptores). La composición que proporciona a o que permite la producción en, células de las plantas voluntarias una molécula de ARN monocatenario que es capaz de hibridar en condiciones fisiológicas en las células de las plantas voluntarias con ARN que se transcribe a partir de un gen endógeno en las células incluye al menos una molécula de polinucleótido seleccionada entre el grupo que consiste en (a) una molécula de ARN monocatenario, (b) una molécula de ARN monocatenario que auto-hibrida para formar una molécula de ARN bicatenario, (c) una molécula de ARN bicatenario, (d) una molécula de ADN monocatenario, (e) una molécula de ADN monocatenario que autohibrida para formar una molécula de ADN bicatenario y (f) una molécula de ADN monocatenario que incluye un gen de Pol III modificado que se transcribe en una molécula de ARN, (g) una molécula de ADN bicatenario, (h) una molécula de ADN bicatenario que incluye un gen de Pol III modificado que se transcribe en una molécula de ARN e (i) una molécula híbrida de ARN/ADN bicatenaria; En las realizaciones para silenciar o suprimir un gen endógeno de una planta voluntaria que codifica una proteína que proporciona resistencia a los herbicidas a la planta voluntaria, el procedimiento puede incluir aplicar sobre la planta voluntaria una cantidad del herbicida para el cual la proteína proporciona resistencia. Las composiciones y procedimientos de la invención son útiles para controlar malas hierbas tolerantes a los herbicidas (resistentes) o plantas transgénicas voluntarias tolerantes a los herbicidas (resistentes) que puede crecer en campos de cultivo, *por ejemplo*, un campo de plantas de cultivo resistentes a herbicidas, tales como maíz, soja, algodón, colza, remolacha azucarera, alfalfa, caña de azúcar, arroz, trigo, así como cultivos frutales y de hortalizas.

En algunas de dichas realizaciones, la hierba o la planta voluntaria es almizcle (por ejemplo, almizcle) y otras especies de amaranto, cola de caballo (achicoria), bledo, ambrosía gigante, ambrosía común, sorgo de Alepo, amor del hortelano, centeno, grama sanguina, achicoria, yute chino, alfalfa, maíz, soja, colza, algodón, remolacha azucarera, caña de azúcar, arroz o trigo. En algunas de dichas realizaciones, el gen endógeno codifica una proteína que proporciona tolerancia a los herbicidas; los ejemplos de dichas proteínas se desvelan en el presente documento en la sección "Proteínas de tolerancia a los herbicidas". En otras realizaciones similares, el ARN monocatenario suprime de manera selectiva un gen en una especie de planta específica, pero no en otras, para permitir el control selectivo de esa especie de planta. En otras realizaciones similares más, una molécula de ARN monocatenario no selectiva suprime un gen común en múltiples especies de plantas, permitiendo un mayor control a lo largo de un grupo o taxón de plantas. En realizaciones más específicas, el procedimiento incluye además aplicar a la mala hierba o a la planta voluntaria una cantidad de herbicida no nucleotídico (por ejemplo, glifosato, dicamba, glufosinato o sulfonilurea) para el cual la proteína diana de una molécula de ARN proporciona resistencia, permitiendo modos de acción duales mediante la reducción de la protección de la proteína diana por la acción de la molécula de ARN y la inhibición de la función de la proteína que se produce por la acción del herbicida no nucleotídico; el herbicida puede aplicarse en una etapa separada (anterior o posterior) de, o junto con, la composición de nucleótido. La aplicación de una composición de polinucleótido de manera concurrente con o seguida de, la aplicación de un herbicida no nucleotídico convencional proporciona en algunos casos control de las malas hierbas o las plantas voluntarias con un efecto sinérgico (es decir, donde el efecto combinado es mayor que la suma de los efectos de los tratamientos efectuados por separado).

## 20 **Proteínas de tolerancia a los herbicidas**

77) Las plantas naturales (no transgénicas) y transgénicas que muestran tolerancia (resistencia) a los herbicidas normalmente tienen un gen que codifica una proteína que es responsable de la tolerancia a los herbicidas, *por ejemplo*, un transgén que proporciona la tolerancia, un gen endógeno mutado que proporciona la tolerancia o múltiples copias de un gen endógeno que normalmente es diana de un herbicida. Una estrategia para el control de dichas plantas es aplicar un agente que suprime o que al menos reduce la expresión del gen que codifica la proteína que confiere tolerancia a los herbicidas. Los ejemplos de una proteína que proporciona tolerancia a un herbicida incluyen, por ejemplo, una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una glifosato oxidoreductasa (GOX), una glifosato descarboxilasa, una glifosato-*N*-acetil transferasa (GAT), una dicamba monooxigenasa, una fosfinotricin acetiltransferasa, un ácido 2,2-dicloropropiónico deshalogenasa, un acetohidroxiácido sintasa, un acetolactato sintasa, un haloarilnitrilasa, un acetil-coenzima A carboxilasa, un dihidropteroato sintasa, un fitoeno desaturasa, un protoporfirina IX oxigenasa, un hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, un para-aminobenzoato sintasa, un glutamina sintasa, un celulosa sintasa, un *beta*-tubulina y una serina hidroximetiltransferasa.

78) Los ejemplos de ácidos nucleicos que codifican proteínas que confieren tolerancia a los herbicidas incluyen 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasas (EPSPS; véase, *por ejemplo*, las Patentes de los Estados Unidos número 5.627.061, 5.633.435 RE39247, 6.040.497 y 5.094.945 y las Publicaciones de Solicitud Internacional PCT WO04074443 y WO04009761), glifosato oxidoreductasa (GOX, Patente de los Estados Unidos número 5.463.175), glifosato descarboxilasa (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 confiere tolerancia a los herbicidas similares a auxina, tales como dicamba (Patente de los Estados Unidos número 7.105.724); fosfinotricin acetiltransferasa (pat o bar) que confiere tolerancia a la fosfinotricina o el glufosinato (Patente de los Estados Unidos número 5.646.024); ácido 2,2-dicloropropiónico deshalogenasa, que confiere tolerancia al ácido 2,2-dicloropropiónico (Dalapon) (Publicación de Solicitud Internacional PCT WO9927116); acetohidroxiácido 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 al bromoxinil (Patente de los Estados Unidos número 4.810.648); acetil-coenzima A carboxilasa modificada para conferir tolerancia a la ciclohexanodiona (setoxidim) y ariloxifenoxipropionato (haloxifop) (Patente de los Estados Unidos n.º 6.414.222); dihidropteroato sintasa (sul I) para conferir tolerancia a herbicidas de sulfonamida (Patente de los Estados Unidos número 5.719.046); polipéptido de fotosistema II de 32 kDa (psbA) para conferir tolerancia a herbicidas de triazina (Hirschberg y col., 1983, Science, 222:1346-1349); antranilato sintasa para conferir tolerancia al 5-metiltriptófano (Patente de los Estados Unidos número 4.581.847); ácido dihidrodipicolínico sintasa (dap A) para conferir tolerancia a la aminoetil cisteína (Publicación de la Solicitud Internacional PCT WO8911789); fitoeno desaturasa (crtI) para conferir tolerancia a los herbicidas de piridazinona, tales como norflurazon (Patente de Japón JP06343473); hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, un ácido 4-hidroxifenilacético oxidasa y una 4-hidroxifenilacético 1-hidrolasa (Patente de los Estados Unidos número 7.304.209) para conferir tolerancia a herbicidas de ciclopropilisoxazol, tales como isoxaflutol (Patentes 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); arilalcanoato dioxigenasa (AAD-1) para conferir tolerancia a un herbicida que contiene un resto de ariloxialcanoato (documento WO05107437); una serina hidroximetiltransferasa (Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2008/0155716), una glutamina sintasa tolerante al glufosinato (Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2009/0018016). Los ejemplos de dichos herbicidas incluyen fenoxi auxinas (tales como 2,4-D y dicloroprop), piridiloxi auxinas (tales como fluroxipir y triclopir),

ariloxifenoxipropionatos (AOPP), inhibidores de acetilcoenzima A carboxilasa (ACCasa) (tales como haloxifop, quizalofop y diclofop) e inhibidores de fenoxiacetato protoporfirinógeno oxidasa IX 5-sustituídos (tales como piraflufen y flumiclorac).

5 **79)** Los aspectos de la presente invención proporcionan polinucleótidos y procedimientos que proporcionan directa o indirectamente a una célula vegetal ARNbc que hibridan con el ARN que codifica dichas proteínas de tolerancia a los herbicidas a un nivel que sea letal para la planta o al menos a un nivel que reduzca la tolerancia a los herbicidas. Debido a la degeneración de secuencia del ADN que codifica las proteínas de tolerancia a los herbicidas, es posible diseñar un polinucleótido para su uso en la presente invención que sea eficaz específicamente en una planta concreta. Debido a la conservación de dominios del ADN entre una multitud de plantas, es posible diseñar un polinucleótido para su uso en la presente invención que sea eficaz entre una serie de plantas.

10 **80)** En una realización, el polinucleótido se encuentra mezclado con el herbicida correspondiente para potenciar la actividad del herbicida proporcionando una actividad herbicida mejorada. En una realización, el polinucleótido se utiliza por separado del herbicida pero en combinación con una aplicación del herbicida como tratamiento previo o posterior. En algunas realizaciones, el tensioactivo de organosilicona se combina ventajosamente con el herbicida y el polinucleótido o se combina con uno o el otro cuando se aplican las composiciones de manera secuencial. Puede tratarse a plantas en un ambiente de invernadero usando un pulverizador de campo o un pulverizador de laboratorio con una boquilla de pulverizado 11001XR para suministrar la solución de muestra a una velocidad determinada (por ejemplo, 140 l/ha) a una presión de 0,25 MPa. En el campo, la solución de tratamiento puede aplicarse con un pulverizador de mochila presurizado con CO<sub>2</sub> calibrado para suministrar la cantidad adecuada de la composición con una boquilla de pulverizador de ventilador plana 11015 con un conjunto de boquilla única personalizado (para minimizar las pérdidas) con una presión de pulverizado de 0,25 MPa; el pulverizador de boquilla única proporciona una hilera de pulverizado eficaz de 60 cm por encima de la cubierta de plantas en crecimiento de 7,6 a 30,5 cm (3 a 12 pulgadas).

#### Ejemplo 1

25 **82)** Este ejemplo ilustra la utilidad de las moléculas de polinucleótido de la presente invención para controlar malas hierbas resistentes a los herbicidas. Se identificaron genotipos de almizcle resistente al glifosato al tener múltiples copias, *por ejemplo*, de 4 a más de 100 copias, del gen que codifica 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) que es la diana de los compuestos de glifosato en tratamientos herbicidas.

30 **83)** En referencia a la **SEQ ID NO: 1**, tal como se muestra en la figura 1, se diseñaron cuatro moléculas de ARNbc "cortas" con un tamaño de oligonucleótido con una hebra antisentido que es capaz de hibridar con el ARNm transcrito del gen de EPSPS del almizcle en las posiciones 14-38 (ARNbc corto-1), las posiciones 153-177 (ARNbc corto-2), 345-369 (ARNbc corto-3) y 1105-1129 (ARNbc corto-4), como se indica por los nucleótidos subrayados en la **figura 1**. Los cuatro ARNbc cortos diseñados se adquirieron de Integrated DNA Technologies (IDT); los ARNbc tenían dos salientes de nucleótidos en el extremo 3' de la hebra sentido y tenían dos desoxinucleótidos en los nucleótidos terminales en el extremo 3' de la hebra sentido.

35 **84)** En referencia a la **SEQ ID NO: 1** y la **figura 1**, se diseñaron tres polinucleótidos de ARN bicatenarios "largos" con una hebra que es capaz de hibridar con el ARNm transcrito a partir del gen EPSPS del almizcle en las posiciones 16-170 (ARNbc largo-1), 451-722 (ARNbc largo-2) y 1109-1328 (ARNbc largo-3) según se indica por los nucleótidos en negrita en la **figura 1**. Los tres ARNbc largos diseñados se produjeron usando un kit para iARN Ambion MEGAscript®, n.º de cat. 1626.

40 **85)** Los clones vegetativos de almizcle resistente al glifosato con 16 copias del gen endógeno que codifica EPSPS (Gaines y col. (2010) Proceedings of the National Academy of Sciences 107(3): 1029-1034) se cultivaron en macetas de 22,5 centímetros cuadrados (3,5 pulgadas cuadradas) con mezcla de tierra de siembra SunGro® Redi que contenía 3,5 kg/metro cúbico de fertilizador Osmocote® 14-14-14 en un invernadero con un fotoperiodo 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 fuese necesario.

45 **86)** Se preparó una solución de tensioactivo de pretratamiento para inmersión de las hojas diluyendo tensioactivo de organosilicona de la marca Silwet L-77 con agua destilada al 0,1 % (v/v). Se preparó un pretratamiento de solución de carborundo al 5% (p/v) mezclando 2 g de carborundo (400 granos) en 40 ml de agua destilada. Se preparó una solución de tampón de tratamiento con fosfato sódico 10 mM y tensioactivo de organosilicona Silwet L-77 al 0,01 % (v/v) en agua DEPC (Omega Bio-Tek) y se ajustó el pH a 6,8. Se preparó una solución de ARNbc corto con cantidades equimolares de cada uno de los cuatro ARNbc cortos (identificados anteriormente) en solución de tampón 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 tampón de tratamiento a una concentración de 0,0006 nanomoles de cada uno de los ARNbc largos 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.

55 **87)** Se pretrató a clones vegetativos de almizcle resistente al glifosato con 16 copias del gen endógeno que codifica

EPSPS con solución de carborundo o solución de tensioactivo para condicionar las hojas a la transferencia o permeación de ARNbc. Para el pretratamiento con solución de carborundo, la abrasión foliar se efectuó frotando suavemente 0,5 ml de la solución de carborundo sobre la superficie superior de una hoja, enjuagando con agua y secando. Para el pretratamiento con solución de tensioactivo, se empaparon cuatro hojas maduras completamente expandidas de la fuente en la solución de tensioactivo y se dejaron secar. Después del pretratamiento de las hojas con solución de carborundo o solución de tensioactivo, se trataron las hojas condicionadas con solución de tampón (como control) o 40 microlitros de una solución de ARNbc (aplicando 10 microlitros de solución de ARNbc en cada una de las 4 horas por planta). El tratamiento con la solución de ARNbc corto aplicó aproximadamente 0,8 nanomoles de moléculas de ARNbc corto (0,2 nanomoles de cada ARNbc corto) a cada planta tratada. El tratamiento con la solución de ARNbc largo aplicó aproximadamente 0,072 nanomoles de moléculas de ARNbc largo (0,024 nanomoles de cada ARNbc largo) a cada planta tratada. El tratamiento con la solución de ARNbc mixto (largo/corto) aplicó 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 para los controles, se roció a todas las plantas con una solución herbicida de glifosato (1682 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®) de manera inmediata, 48 o 72 horas después del tratamiento con el ARNbc y se evaluó al menos 7 días después del tratamiento con glifosato. Resultados:

**88)** Seis plantas de control tratadas con tensioactivo (sin tratamiento con moléculas de ARNbc) sobrevivieron al tratamiento con glifosato. Véase la **figura 3A** para ver una foto de las plantas 7 días después del tratamiento con glifosato.

**89)** Dos de las cuatro plantas de control tratadas con abrasivo de carborundo (sin tratamiento con molécula de ARNbc) fueron eliminadas por el tratamiento con glifosato.

**90)** Seis plantas tratadas con tensioactivo que fueron tratadas con glifosato inmediatamente después de la aplicación de la solución mixta de ARNbc (corto/largo) sobrevivieron, pero tenían retraso en el crecimiento.

**91)** Seis plantas tratadas con tensioactivo que se trataron únicamente con la solución mixta de ARNbc (corto/largo) y sin glifosato, sobrevivieron. Cinco de las seis plantas tratadas con tensioactivo que se trataron con las soluciones mixtas de ARNbc (corto/largo) seguido de tratamiento con glifosato fueron eliminadas.

**92)** Cinco de las seis plantas tratadas con tensioactivo que fueron tratadas con glifosato 48 horas después de la aplicación de la solución mixta de ARNbc (corto/largo) fueron eliminadas.

**93)** Tres de las cuatro plantas tratadas con carborundo que fueron tratadas con glifosato 48 horas después de la aplicación de la solución mixta de ARNbc (corto/largo) fueron eliminadas.

**94)** Cinco de las seis plantas tratadas con tensioactivo, que fueron tratadas con la solución de ARNbc largo, seguido de tratamiento con glifosato después de 72 horas, fueron eliminadas; véase la **figura 3B**. Seis de las seis plantas tratadas con tensioactivo, que fueron tratadas con la solución de ARNbc corto, seguido de tratamiento con glifosato después de 72 horas, fueron eliminadas; véase la **figura 3C**.

### 35 Ejemplo 2

**95)** Este ejemplo ilustra la utilidad de las moléculas de polinucleótido de la presente invención para mejorar el control de las malas hierbas sensibles al herbicida glifosato. Las soluciones mixtas de ARNbc (corto/largo) preparadas en el ejemplo 1 se aplicaron a plantas de yute chino sensibles al glifosato (un total de 40 microlitros aplicados a dos hojas) que se habían pretratado con la solución de tensioactivo usada en el ejemplo 1. Las plantas de control se trataron solo con tampón seguido de pretratamiento con la solución de tensioactivo. 48 horas después del tratamiento con ARNbc, se trató a las plantas con solución herbicida de glifosato (53 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida glifosato de la marca Roundup® WeatherMAX®). Se observó un aumento del doble en la actividad de glifosato estimada observando el crecimiento de las plantas (medido como altura de las plantas) en las plantas tratadas con la composición de polinucleótido y herbicida en comparación con las plantas de control tratadas con tampón y herbicida. Las plantas tratadas con la composición de polinucleótido y herbicida sobrevivieron con un retraso en el crecimiento grave; las plantas de control tratadas con tampón y herbicida sobrevivieron y se recuperaron completamente. Se obtuvieron resultados similares con otras malas hierbas sensibles al glifosato, es decir, bledo, almizcle de raíz roja, ambrosía gigante, achicoria, tabaco y diente de león sensibles al herbicida glifosato.

### 50 Ejemplo 3

**96)** Este ejemplo ilustra la utilidad de las moléculas de polinucleótido de la presente invención para controlar malas hierbas en cultivos transgénicos resistentes al glifosato. Se tratan plantas transgénicas de alfalfa, colza, maíz, algodón, arroz, soja, caña de azúcar, remolacha azucarera y trigo que tienen ADN recombinante para expresar una EPSPS bacteriana (véase la Patente de los Estados Unidos RE39.247 para una descripción de los genes EPSPS de "clase II" resistentes al glifosato) con (a) la solución de tensioactivo usada en el **ejemplo 1**, (b) la solución mixta de ARNbc (corto/largo) preparada en el **ejemplo 1**, y (c) solución de herbicida glifosato (1682 g de equivalente de ácido por hectárea de Roundup® WeatherMAX®) 48 horas después del tratamiento con ARNbc. Después de 30 días,

todas las plantas de cultivo transgénicas resistentes al glifosato sobrevivieron y no mostraron retraso en el crecimiento.

#### Ejemplo 4

5 **97)** Este ejemplo ilustra la utilidad de las moléculas de polinucleótido de la invención como agentes herbicidas. Se diseñaron dos moléculas de polinucleótido de ARNbc para dirigirse a segmentos solapantes del ARNm que codifica fitoeno desaturasa en el tabaco (*Nicotiana benthamiana*). En referencia a la **SEQ ID NO: 2** y la **figura 5**, se produjeron un ARNbc que se dirige a un segmento de 192 nt (mostrados en negrita en la **figura 5**) y un segmento de 685 nt (mostrados subrayados en la **figura 5**) del ARNm usando un kit Ambion® MEGAscript®. Se prepararon soluciones de ARNbc separadas. Las hojas de la planta del tabaco se pretrataron con solución de tensioactivo preparada como en el **ejemplo 1** y después se trataron con una de las dos soluciones de ARNbc aplicando aproximadamente 0,6 micromoles de ARNbc por planta. En el día 9 después del tratamiento con ARNbc, el silenciamiento de la fitoeno desaturasa fue evidente a partir de un blanqueamiento visible de las hojas apicales; véase la **figura 4**. A los 15 días después del tratamiento con ARNbc, la mitad de las plantas tratadas parecían estar muertas y la otra mitad de las plantas tenía la mayor parte de los tejidos por encima del suelo blanqueados. El análisis de transferencia de Northern indicó la presencia de ARNpi correspondientes a los ARNbc usados en el tratamiento.

#### Ejemplo 5

20 **98)** Este ejemplo ilustra adicionalmente la utilidad de las moléculas de polinucleótido de la invención como agentes herbicidas. Se diseñaron moléculas de oligonucleótidos de ARNbc para que se dirigieran al ARN que codifica EPSPS para cada una de las siguientes plantas: ambrosía (*Ambrosia artemisiifolia*), ambrosía gigante (*Ambrosia trifida*), sorgo de Alepo (*Sorghum halepense*), mata negra (*Conyza bonariensis*), hierba verde (*Digitaria insularis*), pasto verde (*Urochloa panicoides*), euphorbia (*Euphorbia heterophylla*), armilán (*Echinochloa colona*), cenizo (*Chenopodium album*), almorejo (*Setaria viridis*), mijo (*Setaria italic*), pasto dentado (*Echinochloa crus-galli*), grama sanguina (*Digitaria sanguinalis*), bardana común (*Xanthium strumarium*), hierba negra (*Alopecurus myosuroides*), avena silvestre (*Avena fatua*), senna de china (*Senna obtusifolia*), gloria de la mañana (*Ipomoea* sp.), correhuela (*Convolvulus arvensis*), zahina (*Sorghum bicolor*), comelina (*Commelina*), siempreviva (*Tradescantia* sp.), centeno (*Lolium* sp.), amor del hortelano (*Eleusine indica*), achicoria (*Conyza canadensis*), siete venas (*Plantago lanceolata*), almizcle (*Amaranthus palmeri*), amaranto de fruto duro (*Amaranthus tuberculatus*), bledo blanco (*Amaranthus albus*), cenizo (*Amaranthus hybridus*), abrebujó (*Amaranthus retroflexus*), bledo (*Amaranthus rudis/tuberculatus*), amaranto verde (*Amaranthus viridis*), amaranto de Thunberg (*Amaranthus thubergii*), amaranto espinoso (*Amaranthus spinosus*), (*Amaranthus rubra*), (*Amaranthus lividus*), amaranto mediterráneo (*Amaranthus graecizans*), amaranto duro (*Amaranthus chlorostachys*), amaranto de Powell (*Amaranthus powellii*), breo (*Amaranthus blitoides*), Kochia (*Kochia scoparia*), abrepuña amarillo (*Centaurea solstitialis*) y yute chino (*Abutilon theophrasti*). Las hojas de las plantas se pretrataron con solución de tensioactivo preparada como en el **ejemplo 1** y se trataron con soluciones de ARNbc con un tratamiento de aproximadamente 1 nanomol por planta. Después de 15 días, las plantas tratadas estaban muertas, muriéndose o con retraso en el crecimiento.

#### Ejemplo 6

40 **99)** Este ejemplo ilustra adicionalmente la utilidad de las moléculas de polinucleótido de la invención como agentes herbicidas. Se diseñaron moléculas de oligonucleótidos de ARNbc para que se dirigieran al ARN que codifica acetolactato sintasa y fitoeno desaturasa para cada una de las plantas listadas en el **ejemplo 5**. Las hojas de las plantas se pretrataron con solución de tensioactivo preparada como en el **ejemplo 1** y se trataron con soluciones de ARNbc con un tratamiento de aproximadamente 1 nanomol por planta. Después de 15 días, las plantas tratadas estaban muertas, muriéndose o con retraso en el crecimiento.

#### Ejemplo 7

45 **100)** Este ejemplo ilustra adicionalmente la utilidad de las moléculas de polinucleótido de la invención como agentes herbicidas. Se repitió el procedimiento del **ejemplo 4** para proporcionar oligonucleótidos de ARNbc cortos que están diseñados para dirigirse al ARN que codifica cada una de las siguientes proteínas en almizcle: una 5-enolpiruvilshikimato-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 la traducción (TIF), una ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO) y una ATPasa dependiente de ADN (ddATPasa). Se trataron las hojas de plantas de almizcle separadas resistentes al glifosato con la solución de tensioactivo preparada como en el **ejemplo 1** y por separado, con cada una de las moléculas de oligonucleótido de ARNbc del mismo modo que en el **ejemplo 1** con un tratamiento de 1 nanomol de ARNbc por planta. Después de 30 días, las plantas tratadas estaban muertas, muriéndose o con retraso en el crecimiento.

#### Ejemplo 8

**101)** Este ejemplo ilustra la utilidad de emplear un gen de Pol III sintético en las composiciones y procedimientos de la presente invención. En referencia a la **SEQ ID NO: 3** y la **figura 2**, se creó un gen de Pol III sintético usando elementos de un gen de ARNsn 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 aguas arriba (USE) que tiene la secuencia "TCCCACATCG" (**SEQ ID NO: 4**, en negrita y subrayado), una caja de TATA (en negrita y subrayado), un nucleótido de "G" (en negrita y subrayado), ADN antisentido (en cursiva) correspondiente aun ADN bacteriano que codifica una proteína EPSPS véase la Patente de los Estados Unidos RE39.247) que confiere 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 de ADN sentido (en minúsculas) y un elemento terminador "TTTTTT" (**SEQ ID NO: 7**, en negrita y subrayado). Se rociaron una solución de tensioactivo de organosilicona de la marca Silwet L-77 al 0,1 % en peso y una solución de múltiples copias de la molécula de ADNbc sobre las hojas de cuatro plantas voluntarias de maíz resistentes al glifosato que crecían en un campo de plantas de soja resistentes al glifosato, seguido 7 días después de tratamiento con herbicida glifosato de la marca Roundup WeatherMAX®. 15 días después, las plantas de maíz estaban muertas y las plantas de soja estaban florecientes; las plantas de maíz resistentes al glifosato de control tratadas únicamente con tensioactivo y herbicida glifosato estaban florecientes.

### Ejemplo 9

**102)** Este ejemplo ilustra un aspecto de la invención. En este ejemplo, se aplicaron moléculas de polinucleótido sobre y se permearon en tejido vegetal, induciendo de este modo una regulación sistémica, es decir, silenciamiento, de un gen diana (un EPSPS endógeno). Más específicamente, una composición que incluía oligonucleótidos de ADN monocatenario (ADNss) suprimió la expresión de un EPSPS endógeno en almizcle (*Amaranthus palmeri*) tolerante al glifosato.

**103)** Los oligonucleótidos de ADNss antisentido se diseñaron usando el programa informático IDT SciTools (disponible en [idtdna.com/Scitools/Applications/Anti-sense/Anti-sense.aspx](http://idtdna.com/Scitools/Applications/Anti-sense/Anti-sense.aspx)). Los oligonucleótidos incluían cuatro oligonucleótidos de ADNss antisentido para EPSPS de *Amaranthus palmeri* (**SEQ ID NO: 8, 9, 10 y 11**), dos oligonucleótidos de ADNss modificados químicamente (modificados con fosforotioato) antisentido para EPSPS de *Amaranthus palmeri* (**SEQ ID NO: 12 y 13**), un oligonucleótido de ADNss antisentido para un gen de control, proteína de semilla de la cebada (*Hordeum vulgare*), GenBank ID X97636 (**SEQ ID NO: 14**) y un oligonucleótido de ADNss modificado químicamente (marcado en 5' con Alexa Fluor 488 de Invitrogen) antisentido para EPSPS de *Amaranthus palmeri* (**SEQ ID NO: 15**), tal como se indica en la **tabla 1**.

**Tabla 1: Oligonucleótidos de ADNss antisentido**

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia (5' a 3')	Nota
Antisentido_PO1	<b>8</b>	ACCCCTCCACGACTGCCCTTT	
Antisentido_PO2	<b>9</b>	GTTTCCTTCACTCTCCAGC	
Antisentido_PO3	<b>10</b>	GTAGCTTGAGCCATTATTGT	
Antisentido_PO4	<b>11</b>	GTTGATGGTAGTAGCTTGAG	
Antisentido_PS1	<b>12</b>	ACCCCTCCACGACTGCCCTTT	modificación de fosforotioato de los tres nucleótidos 5'-terminales y los tres nucleótidos 3'-terminales
Antisentido_PS2	<b>13</b>	GTTTCCTTCACTCTCCAGC	modificación de fosforotioato de los tres nucleótidos 5'-terminales y los tres nucleótidos 3'-terminales
Antisentido_ck	<b>14</b>	AAGCGTTGAGCACTGAA	Secuencia de control, proteína de semilla de la cebada, GenBank ID X97636
Antisentido_PO1_488	<b>15</b>	ACCCCTCCACGACTGCCCTTT	Marcado en 5' con Alexa Fluor 488

**104)** La captación del oligonucleótido se demostró con los oligonucleótidos de ADNss marcados fluorescentemente (**SEQ ID NO: 15**), lo que confirma que los oligonucleótidos de ADNss permearon el tejido foliar. Se colocaron los peciolo de hojas desprendidas de almizcle resistente al glifosato en solución de sacarosa 200 mM con oligonucleótidos de ADNss marcados fluorescentemente (**SEQ ID NO: 15**). Se tomaron imágenes de las hojas mediante el dispositivo de obtención de imágenes Bio-Rad PharosFX equipado con un láser de 488 nm desde las 4 h hasta las 48 h después de la captación a través del peciolo. Las hojas incubadas solo con sacarosa 200 mM sirvieron como control. Se observó una ligera captación vascular dependiente del tiempo de los oligonucleótidos de ADNss marcados fluorescentemente (véase la **figura 6**). Los oligonucleótidos de ADNss marcados fluorescentemente se liberaron del tejido vascular a las células tan pronto como a las 8 h después del tratamiento y



se observó que se acumulaban en el borde de la hoja a las 24 h y las 48 h, lo que sugiere un efecto de transpiración.

5 **105)** Se demostró la supresión de EPSPS con hojas desprendidas de almizcle resistente al glifosato usando la técnica de captación del peciolo. Se colocaron peciolos de hojas de almizcle resistentes al glifosato en solución de sacarosa 200 mM con oligonucleótidos de acuerdo con los tratamientos listados en la **tabla 2**. Las hojas de control se permearon con el control antisentido (**SEQ ID NO: 14**) y se trataron adicionalmente con o sin 50 microgramos/ml de glifosato. El ARNm de EPSPS, la proteína EPSPS y los niveles de shikimato se midieron después de 48 h de incubación. Para evaluar los efectos de los oligonucleótidos antisentido de ADNss en el ARNm de EPSPS, se aisló el ARN total de la hoja y se llevó a cabo una RT-PCR en tiempo real cuantitativa para comparar los niveles de ARNm de EPSPS. Para evaluar los efectos de los oligonucleótidos antisentido de ADNss en 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 de Western usando anticuerpos contra EPSPS\_TIPA de maíz. Los efectos de los oligonucleótidos antisentido de ADNss en la acumulación de shikimato como indicación de la supresión de EPSPS se evaluaron en dos experimentos: en el experimento 1, las hojas tratadas con oligonucleótido se incubaron con 50 microgramos/ml de glifosato durante 48 h adicionales mediante captación de peciolo (las hojas de control se permearon con el control antisentido (**SEQ ID NO: 14**) y se trataron adicionalmente con o sin 50 microgramos/ml de glifosato); en el experimento 2, se llevaron a cabo ensayos de disco foliar en las hojas tratadas con oligonucleótido y se midieron los niveles de shikimato mediante HPLC (los controles en este caso fueron hojas que no se habían tratado con oligonucleótidos pero que se habían incubado con 50 microgramos/ml de glifosato).

**Tabla 2: Lista de tratamientos que usan oligonucleótidos antisentido de ADNss**

Tratamiento	ADNss antisentido	Concentración final
n.º 1	Antisentido_PO1 ( <b>SEQ ID NO: 8</b> )	5 microM
n.º 2	Antisentido_PO2 ( <b>SEQ ID NO: 9</b> )	5 microM
n.º 3	Antisentido_PS1 ( <b>SEQ ID NO: 12</b> )	5 microM
n.º 4	Antisentido_PS2 ( <b>SEQ ID NO: 13</b> )	5 microM
n.º 5	Antisentido_PS1, PS2 ( <b>SEQ ID NO: 12, 13</b> )	10 microM cada uno (20 microM en total)
n.º 6	Antisentido_PO1, PO2, PO3, PO4 ( <b>SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11</b> )	5 microM cada uno (20 microM en total)
Control	Antisentido_ck ( <b>SEQ ID NO: 14</b> )	5 microM o 20 microM

20 **106)** Los resultados para la expresión de ARNm de EPSPS, los niveles de proteína EPSPS y los niveles de shikimato se muestran en las **figuras 7, 8 y 9**, respectivamente. Estos resultados demuestran que el tratamiento con los oligonucleótidos antisentido de ADNss regularon o suprimieron de manera sistémica el gen diana reduciendo los niveles del transcrito del gen diana (ARNm de EPSPS) o de la proteína (EPSPS) codificada por el gen diana en el tejido vegetal. En este experimento concreto, los tratamientos n.º 1 y n.º 6 parecieron ser más eficaces para suprimir los niveles de ARNm y de proteína EPSPS y para aumentar la eficacia del glifosato, evidenciada por el aumento de la acumulación de shikimato. Estos resultados también indican que se mejoró la eficacia del glifosato suprimiendo el ARNm y la proteína EPSPS en el almizcle resistente al glifosato.

### Ejemplo 10

30 **107)** Este ejemplo ilustra un aspecto de la invención. En este ejemplo, se trató a plantas en crecimiento con una composición aplicada por vía tópica para inducir el silenciamiento sistémico de un gen diana en una planta que incluye (a) un agente para condicionar una planta a la permeación por polinucleótidos y (b) polinucleótidos que incluyen al menos una hebra de polinucleótido que incluye al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos del gen diana en orientación con sentido o antisentido. Más específicamente, se trataron plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) con (a) una solución de tensioactivo aplicada por vía tópica para condicionar la planta a la permeación por polinucleótidos y (b) una composición que incluye oligonucleótidos o polinucleótidos de ADN aplicados por vía tópica que tienen al menos una hebra que incluye al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos del gen diana en orientación con sentido o antisentido, mediante lo cual se logró la regulación o supresión sistémica del gen diana (una fitoeno desaturasa, "PDS").

40 **108)** El gen diana usado fue una fitoeno desaturasa de *Nicotiana benthamiana* (**SEQ ID NO: 2**), mostrado en la **figura 10**; se usó el segmento consistente en los nucleótidos 421 - 1120 de la **SEQ ID NO: 2** (texto subrayado en la **figura 10**) para diseñar un polinucleótido de ARNbc 700-mero ("700-mero de PDS") y se usó el segmento consistente en los nucleótidos 914 - 1113 de la **SEQ ID NO: 2** (texto subrayado en negrita en la **figura 10**) para diseñar un polinucleótido de ARNbc 200-mero ("200-mero de PDS"). Las secuencias de otros polinucleótidos u

5 oligonucleótidos usados en los tratamientos se listan en la **tabla 3**. La **figura 11** ilustra esquemáticamente la ubicación de las secuencias de estos oligonucleótidos y los polinucleótidos en relación con la secuencia de fitoeno sintasa (**SEQ ID NO: 2**). Las secuencias no vegetales obtenidas del gusano de la raíz del maíz ("CRW"), **SEQ ID NO: 27, 28, 29** y **30** se usaron como controles no homólogos. Algunos de los polinucleótidos incluían una secuencia promotora de T7 (indicada por texto en minúsculas en la **tabla 3**) que es un promotor reconocido por una ARN polimerasa de bacteriófago T7.

Tabla 3

Descripción	sentido/antisentido	secuencia	Número de nucleótidos	SEQ ID NO:
oligo 1 con promotor de T7	s	taatacgcactactataggGCAAGAGATGTCCTAGGTGGG	40	16
oligo 2 con promotor de T7	s	taatacgcactactataggACAGATTTCTTCAGGAGAAAACATGG	44	17
oligo 1 sin promotor de T7	s	GCAAGAGATGTCCTAGGTGGG	21	18
oligo 2 sin promotor de T7	s	ACAGATTTCTTCAGGAGAAAACATGG	25	19
mezcla de oligo 3 con promotor de T7	AS	taatacgcactactataggCATCTCCTTAAATTGACTGCC (SEQ ID NO: 20) taatacgcactactataggTTTAAATTGACTGCCATTATTC (SEQ ID NO: 21)	41 (SEQ ID NO: 20), 41 (SEQ ID NO: 21)	20, 21
mezcla de oligo 3 sin promotor de T7	AS	CATCTCCTTAAATTGACTGCC (SEQ ID NO:22) and TTTAATTGACTGCCATTATTC (SEQ ID NO:23)	22 (SEQ ID NO: 22), 22 (SEQ ID NO: 23)	22, 23
oligo 4 sin promotor de T7	AS	CACTTCCATCCTCATTAGCTCGAT	25	24
oligo 5 sin promotor de T7	AS	ACACCTCATCTGTACCCTATCAG	24	25
oligo 6 sin promotor de T7	AS	CAGTCTCGTACCAATCTCCATCAT	24	26
mezcla de oligo de CRW con promotor de T7	S y AS	taatacgcactactataggATCCATGATATCGTGAAACATC (SEQ ID NO: 27) taatacgcactactataggGCAAAAGAAAAATGCGTCG (SEQ ID NO: 28)	41 (SEQ ID NO: 27), 38 (SEQ ID NO: 28)	27, 28
mezcla de oligo de CRW sin promotor de T7	S y AS	ATCCATGATATCGTGAAACATC (SEQ ID NO:29) and GCAAAAGAAAAATGCGTCG (SEQ ID NO:29)	21 (SEQ ID NO: 29), 18 (SEQ ID NO: 30)	29, 30

- 5 **109)** Se usó el siguiente procedimiento para todos los ensayos descritos en este ejemplo. Se usaron plantas de *Nicotiana benthamiana* de cuatro semanas de edad en todos los ensayos. Las plantas se trataron con solución recientemente preparada de Silwet L-77 al 0,1 % con ddH<sub>2</sub>O. Se empaparon dos hojas completamente extendidas por planta (un cotiledón, una hoja auténtica) en la solución de Silwet L-77 durante unos pocos segundos y se dejaron secar durante 15-30 minutos antes de la aplicación de la composición de polinucleótido. La concentración final para cada oligonucleótido o polinucleótido fue de 25 microM (en Silwet L-77 al 0,01 %, tampón de fosfato de sodio 5 mM, pH 6,8) a menos que se indique de otro modo. 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) por cada planta. Se observó blanqueamiento de las hojas 3 días después del tratamiento.
- 10 **110)** La figura 12A ilustra los resultados de un ensayo donde se aplicaron por separado en plantas de tabaco un polinucleótido ARNbc 200-mero con una secuencia de ARN correspondiente al segmento "200-mero de PDS" (nucleótidos 914 - 1113 de la SEQ ID NO: 2) y una combinación de oligonucleótidos y polinucleótidos de ADN monocatenario (SEQ ID NO: 16, 17, 20, 21, 24, 25 y 26). El polinucleótido de ARNbc 200-mero se aplicó a una concentración de 0,6 microM. Se observó blanqueamiento de las hojas apicales después del tratamiento tópico con los polinucleótidos y oligonucleótidos, indicando una regulación o supresión sistémica del gen diana de fitoeno desaturasa.
- 15 **111 )** La figura 12B ilustra los resultados del análisis de transferencia de Northern de ARN aislado de plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas con tampón (control), el polinucleótido de 200-mero de ARNbc y los oligonucleótidos de ADNss. También se muestra ARN aislado de plantas que se han sometido a estrés manteniéndolas a 4 grados centígrados y en la oscuridad durante una noche antes del tratamiento con los polinucleótidos 200-meros de ARNbc.
- 20 **112)** La figura 13 ilustra los fenotipos observados en el día 12 después del tratamiento en otro ensayo del efecto de doce combinaciones de polinucleótidos u oligonucleótidos (véase la tabla 4). La tabla 4 también lista observaciones de blanqueamiento visible de las plantas en el día 5 después del tratamiento y los resultados de las mediciones de clorofila tomadas en los días 7 y 12 después del tratamiento. Las mediciones de clorofila son una indicación de la supresión del gen diana, fitoeno desaturasa y las mediciones se tomaron en 6 puntos de la zona apical, centrándose en hojas visiblemente blanqueadas o (en plantas sin blanqueamiento visible) en hojas en ubicaciones equivalentes en las plantas; un menor valor de la medición de clorofila indica 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 de manera sistémica (suprimir) el gen diana en las plantas tratadas; el tratamiento 1 también efectuó una regulación sistémica (supresión) del gen diana en un grado menor. El polinucleótido de ARNbc 200-mero también fue eficaz para regular de manera sistémica (suprimir) el gen diana en las partes tratadas. Los oligonucleótidos de un gen no homólogo (gusano de la raíz del maíz) (tratamientos 5 y 6) no suprimieron al gen diana de fitoeno desaturasa. Estos resultados demuestran que los oligonucleótidos y polinucleótidos de ADN monocatenario tanto sentido como antisentido fueron eficaces para regular de manera sistémica (suprimir) el gen diana en las plantas tratadas. En este ejemplo concreto, los oligonucleótidos sentido con el promotor de T7 (tratamiento 1) efectuaron una supresión sistémica débil del gen de fitoeno desaturasa, mientras que los oligonucleótidos sentido sin el promotor de T7 (tratamiento 7) no suprimieron el gen de fitoeno desaturasa. En este ejemplo concreto, los oligonucleótidos antisentido con el promotor de T7 (tratamiento 2) así como los oligonucleótidos antisentido con el promotor de T7 (tratamiento 8) proporcionaron un fuerte blanqueamiento, lo que indica una fuerte regulación sistémica del gen diana de fitoeno desaturasa.
- 25
- 30
- 35
- 40

Tabla 4

Tratamiento	Descripción	SEQ ID NO:	Comentario	Blanqueamiento (día 5)	Clorofila (día 7)	Clorofila (día 12)
1	Oligos 1 y 2	16, 17	Oligos con sentido con promotor de T7	débil	18,6	17,5
2	Oligo 3	20, 21	Oligos antisentido con promotor de T7	fuerte	12,7	1,6
3	Oligos 1, 2 y 3	16, 17, 20, 21	Oligos sentido y antisentido con promotor de T7	fuerte	11,5	2,6

(continuación)

Tratamiento	Descripción	SEQ ID NO:	Comentario	Blanqueamiento (día 5)	Clorofila (día 7)	Clorofila (día 12)
4	Oligos 1, 2, 3, 4, 5 y 6	<b>16, 17, 20, 21, 24, 25, 26</b>	Oligos sentido y antisentido con promotor de T7, más oligos antisentido sin promotor de T7	fuerte	15,1	2,5
5	mezcla de oligo de CRW con promotor de T7	<b>27, 28</b>	Oligos sentido y antisentido con promotor de T7	aún no	30,8	37,3
6	mezcla de oligo de CRW sin promotor de T7	<b>29, 30</b>	Oligos sentido y antisentido sin promotor de T7	aún no	34,2	38,2
7	Oligos 1 y 2 sin promotor de T7	<b>18, 19</b>	Oligos con sentido sin promotor de T7	aún no	32,0	41,1
8	Oligo 3 sin promotor de T7	<b>22, 23</b>	Oligos antisentido sin promotor de T7	fuerte	11,3	3,2
9	Oligos 1, 2 y 3 sin promotor de T7 y oligos 4, 5, y 6	<b>18, 19, 22, 23, 24, 25, 26</b>	Oligos sentido y antisentido sin promotor de T7	aún no	30,2	34,4
10	polinucleótido de ARNbc 200-mero	Secuencia de ARN correspondiente al segmento "200-mero de PDS" que consiste en los nucleótidos 914-1113 de la <b>SEQ ID NO: 2</b>	Polinucleótido de ARNbc sentido y antisentido	fuerte	11,3	4,0
11	1/10° de la mezcla de oligonucleótidos del experimento 4	<b>16, 17, 20, 21, 24, 25, 26</b>	Oligos sentido y antisentido con promotor de T7, más oligos antisentido sin promotor de T7	fuerte	11,4	4,5
12	1/100° de la mezcla de oligonucleótidos del experimento 4	<b>16, 17, 20, 21, 24, 25, 26</b>	Oligos sentido y antisentido con promotor de T7, más oligos antisentido sin promotor de T7	aún no	31,0	38,0
13	Control	(ninguno)	Solo tampón	aún no	31,2	38,4

5 **113)**La **tabla 5** muestra seis polinucleótidos: un segmento 40-mero ("ADNss sentido 40-mero de PDS", **SEQ ID NO: 31**) que consiste en los 40 nucleótidos más próximos al extremo 5' del "700-mero de PDS" (nucleótidos 1081 - 1120 de la **SEQ ID NO: 2**) y cuatro polinucleótidos de ADN monocatenarios antisentido y un polinucleótido de ADN monocatenario sentido sintetizados basándose en la secuencia del "ADNss sentido 40-mero de PDS" (**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 fuerte blanqueamiento de las hojas apicales, lo que indica la regulación o supresión sistémica del gen diana de fitoeno desaturasa, después del tratamiento tópico con el ADNss antisentido 21-mero de PDS y el ADNss antisentido 33-mero de PDS, así como después del tratamiento tópico con el polinucleótido de ARNbc 700-mero amplificado por la PCR y purificado en columna ("ARNbc 700-mero de PDS"), oligonucleótidos 22-meros antisentido de PDS ensayados previamente con o sin un promotor de T7 (**SEQ ID NO: 20 y 21**) ("antisentido T7 de PDS") u oligonucleótidos 22-meros antisentido de PDS ensayados previamente sin un promotor de T7 (**SEQ ID NO: 22 y 23**) ("PDS antisentido"). Se observó un blanqueamiento de las hojas apicales escaso o nulo después del tratamiento con solo tampón ("Tampón") o después del tratamiento tópico con polinucleótido de ARNbc 700-mero desnaturalizado por calor (5 minutos a 95 grados centígrados, después almacenado sobre hielo) ("ARNbc 700-mero de PDS calentado"), el ADNss antisentido 15-mero de PDS o el ADNss antisentido 18-mero de PDS.

Tabla 5

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO:
ADNss sentido 40-mero de PDS	TGTTTTATACTGAATAATGGCAGTACAATTAAAGGAGATG	<b>31</b>
ADNss antisentido 15-mero de PDS	CATCTCCTTTAATTG	<b>32</b>
ADNss antisentido 18-mero de PDS	CATCTCCTTTAATTGTAC	<b>33</b>
ADNss antisentido 21-mero de PDS	CATCTCCTTTAATTGACTGC	<b>34</b>
ADNss antisentido 33-mero de PDS	CATCTCCTTTAATTGACTGCCATTATTCAGTA	<b>35</b>
ADNss sentido 21-mero de PDS	GCAGTACAATTAAAGGAGATG	<b>36</b>

20 **114)**Se muestran los resultados de otro ensayo en la **figura 15**, se observó un fuerte blanqueamiento de las hojas apicales, lo que indica la regulación o supresión sistémica del gen diana de fitoeno desaturasa, después del tratamiento tópico con el ADNss antisentido 21-mero de PDS (**SEQ ID NO: 34**, "PDS antisentido de 21 nt") o con oligonucleótidos 22-meros antisentido de PDS sin un promotor de T7 (**SEQ ID NO: 22 y 23**) ("antisentido de PDS"). Se observó un blanqueamiento de las hojas apicales escaso o nulo después del tratamiento tópico con solo tampón ("control: tampón") o después del tratamiento tópico con ADNss sentido 21-mero de PDS (**SEQ ID NO: 36**, "PDS sentido de 21 nt").

#### Ejemplo 11

25 **115)**Este ejemplo ilustra el tratamiento de plantas en crecimiento con una composición aplicada por vía tópica para inducir el silenciamiento sistémico de un gen diana en una planta que incluye (a) un agente para condicionar una planta a la permeación por polinucleótidos y (b) polinucleótidos que incluyen al menos una hebra de polinucleótido que incluye al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos del gen diana en orientación con sentido o antisentido. Más específicamente, este ejemplo demuestra la especificidad por la diana (especificidad de secuencia) de los polinucleótidos.

30 **116)**La fitoeno desaturasa (PDS) del almizcle tiene la secuencia

TCAATTCATCTATTGGAAGTGATTTTTTGGGTCATTCTGTGAGAAATTCAGTGTAGTAAAGTTT  
 ATGGAGCAAAGCAAAGAAATGGGCACTGCCCTTTAAAGGTTGTTTGTATAGATTATCCTAGGCCA  
 GAGCTTGAAAGTACATCCAATTTCTTGGGAAGCCGCTACTTATCTTC TACTTTTCGGAATTCGCCTC  
 GTCCFCAGAAAGCCATTAGAAAGTTGFAATTCGCTGGAGCAGGTTTGGCTGGTCTATCCACGGCAAAGT  
 ATTTAGCTGATGCAGGTCACAAACCCATATTGTTGGAAGCACGAGATGTTTTAGGAGGAAAGGTT  
GCAGCGTGGAAAGGATGAGGATGGTGACTGGTATGAGACTGGGCTACATATAATCTTTGGGGCATA  
TCCAAATGTCCAAAATCTATTTGGGAGAACTTGGTATAAATGACCGACTGCAATGGAAGGAGCACT  
CTATGATTTTTGCAATGCCCAGCAAAGCCCGTGAATTCAGTCGCTTTGATTTTTCCCGAAAATCCTGCC  
TGCACCATTAALLTGGCATAIGGGCAAATCCTAAGAAAATAATGAAAATGCTAACCTGGCCAGAAAAAA  
TCAAGTTTGCCATTGGCTTGTTCCTGCTATGGCAGGCGGACAGTCATATGTTGAAGCACAAAGATG  
GTTTGAGTGTCCAAGAGTGGATGAGAAAACAAGGAGTACCCGATCGTGTAACCTGATGATGTGTTT  
ATTGCCATGTCAAAGGCACTGAACTTCATAAATCCCAGTGAACTTTCAATGCAGTGCATCTTGATT  
GCCTGMACCGATTCTGCAGGAGMAACATGGTCTAAGATGGCCTTCTAGACGGMAACCTCCAGAG  
AGGCTGTGCATGCCTATTGTTAAACAATCGAGTCACTAGGTGGTGAAGTTAACTTAACTCTCGTATA  
AAAGATTAGTTGGACCAGAGTGGAAAGCGTGAAGAGTTTTTGGCTAAATAACGGGAGGGAAATACGAGGA  
 GATGCCTATGTTTTTGGCACCCAGTTGACATCTTGAAGCTGTTACTACCTGATACTTGGAAAGGAA  
 ATCTCATACTTCAAAAAACTTGAGAAAATTAGTGGGCGTCCCTGFIGATTAATGTTTACATATGGTTTT  
 GACAGAAAAATTAAGAATACATATGACCATCTACTCTTCAGCAGGAGTCCCTCTTTGAGTGTCTAT  
 GCTGATATGTCGGAGACATGCAAGGAATATAAGGATCCAAATAGATCCATGCTGGAATFIGTTTTT  
 GCACCCGCGGAGGAATGGATTTACGAAGCGACACTGATATTATAGAGGCAACAATGAAAGAGCT  
 TGCCAAGCTTTTCCCGGATGAAATCGCTGCCGATGGAAGCAAGGCCAAGATCCCTCAAAATATCATGTT  
 CGTCAAAAATCCAAGGTCGGTTTTATAAGACTGTACCGGATFIGTGAACCTTGTCCGCCGCTGCAAAAG  
 ATCACCAATAGAGGGTTTTCTATTTAGCTGGTGAATTACACAAAAACAAAAATATTTGGCTTCTATGGA  
 AGGTGCTGTCTTATCTGGGAAGCTTTGTGCACAGGCTATCGTACAGGATTATGATCTGCTGAGTTC  
 TCGAGCACAAAGAGAATTGGCG (SEQ ID NO:37).

5 Se sintetizaron un polinucleótido de ARNbc de 678 pares de bases con una hebra antisentido capaz de hibridar con el ARN codificado por los nucleótidos en las posiciones 317 - 994 (mostrados como texto subrayado) en la **SEQ ID NO: 37** y un polinucleótido de ARNbc de 198 pares de bases con una hebra antisentido capaz de hibridar con el ARN codificado por los nucleótidos en las posiciones 797 - 994 (mostrados como texto en cursiva y subrayado) en la **SEQ ID NO: 37**.

117)La fitoeno desaturasa de *Nicotiana benthamiana* tiene la secuencia

ATGCCCCAAATCGGACTTGTATCTGCTGTTAATTTGAGAGTCCAAGGTAATTCAGCTTATCTTTGGA  
 GCTCGAGGTCTTCGTTGGGAACTGAAAGTCAAGATGTTTGGCTTGCAAAGGAATTTGTTATGTTTTG

GTAGTAGCGACTCCATGGGGCATAAGTTAAGGATTCGTAAGTCCAAAGTGCCACGACCCGAAGATTG  
 ACAAAGGACTTTAATCCTTTAAAGGTAGTCTGCATTGATTATCCAAGACCAGAGCTAGACAATACA  
 GTTAACATTTTGGAGGCGGCGTTATTATCATCATCGTTTCGTAAGTCCACGCCCAACTAAACCAT  
 TGGAGATTGTTATTGCTGGTGCAGGTTTGGGTGGTTTGTCTACAGCAAATATCTGGCAGATGCTG  
 GTCACAAACCGATATTGCTGGAGGCAAGAGATGTCCTAGGTGGGAAGGTAGCTGCATGGAAAGAT  
GATGATGGAGATTGGTACGAGACTGGGTTGCACATATTCTTTGGGGCTTACCCAAATATGCAGAAC  
CTGTTTGGAGAACTAGGGATTGATGATCGGTTGCAGTGGAAAGGAACATTCAATGATATTTGCGATG  
CCTAACAAAGCCAGGGGAGTTCAGCCGCTTTGATTTTCTGAAGCTCTTCTGCGCCATTAATGGA  
ATTTTGGCCATACTAAAGAACAACGAAATGCTTACGTGGCCCGAGAAAGTCAAATTTGCTATTGGA  
CTCTTGCCAGCAATGCTTGGAGGGCAATCTTATGTTGAAGCTCAAGACGGTTTAAGTGTAAAGGAC  
TGGATGAGAAAGCAAGGTGTGCCTGATAGGGTGACAGATGAGGTGTTTATTGCCATGTCAAAGGC  
ACTTAACTTCATAAACCCCTGACGAGCTTTCGATGCAGTGCATTTTATTGCTTTGAACAGATTCTTC  
AGGAGAAACATGGTTCAAAAATGGCCITTTTAGATGGTAACCCTCCTGAGAGACTTTCATGCCGATTGTG  
GAACATATTGAGTCAAAAAGGTGGCCAAGTCAGACTAAACTCACGAATAAAAAAGATCGAGCTGAATGAGG  
ATGGAAGTGTCAAATGTTTTATACTGAATAATGGCAGTACAATTAAGGAGATGCTTTTGTGTTTGCCA  
 CTCCAGTGGATATCTTGAAGCTTCTTTTGCTGAAGACTGGAAAGAGATCCCATATTTCCAAAAGT  
 TGGAGAAGCTAGTGGGAGTTCCTGTGATAAATGTCCATATATGGTTTGACAGAAAAGTGAAGAAC  
 ACATCTGATAATCTGCTCTTCAGCAGAAGCCCGTTGCTCAGTGTGTACGCTGACATGTCTGTTACAT  
 GTAAGGAATATTACAACCCCAATCAGTCTATGTTGGAATTGGTATTTGCACCCGCAGAAGAGTGGAA  
 TAAATCGTAGTGACTCAGAAATTATTGATGCTACAATGAAGGAACTAGCGAAGCTTTTCCCTGATG  
 AAATTTCCGCAGATCAGAGCAAAGCAAAAATATTGAAGTATCATGTTGTCAAACCCCAAGGTCT  
 GTTTATAAAACTGTGCCAGGTTGTGAACCCTGTCCGCCCTTGCAAAGATCCCTATAGAGGGTTTT  
 TATTTAGCTGGTACTACACGAAACAGAAGTACTTGGCTTCAATGGAAGGTGCTGTCTTATCAGGA  
 AAGCTTTGTGCACAAGCTATTGTACAGGATTACGAGTTACTTCTTGGCCGGAGCCAGAAGATGTTG  
 GCAGAAGCAAGCGTAGTTAGCATAGTGAAGTAA (**SEQ ID NO:38**).

5 Se sintetizaron un polinucleótido de ARNbc de 685 pares de bases con una hebra antisentido capaz de hibridar con el ARN codificado por los nucleótidos en las posiciones 421 - 1105 (mostrados como texto subrayado) en la **SEQ ID NO: 38** y un polinucleótido de ARNbc de 192 pares de bases con una hebra antisentido capaz de hibridar con el ARN codificado por los nucleótidos en las posiciones 914 - 1105 (mostrados como texto en cursiva y subrayado) en la **SEQ ID NO: 38**.

118) Se llevó a cabo un alineamiento de las secuencias de ADN de PDS del almizcle y de *Nicotiana benthamiana* usando un alineamiento global por pares (tramo) y se ilustra en la **figura 16**; con este procedimiento, las dos secuencias mostraron una identidad de aproximadamente el 71% (1252/1762).

10 119) Se trató a plantas de almizcle que tenían 16 copias de EPSPS y de 12,7 a 20,3 cm (5 - 8 pulgadas) de altura con solución de Silwet L-77 al 0,1 % recientemente preparada con ddH<sub>2</sub>O. Se empaparon cuatro hojas completamente extendidas por planta en la solución de Silwet L-77 durante unos pocos segundos y se dejaron secar durante de 30 minutos a 1 hora antes de la aplicación de la composición de polinucleótido. Se prepararon soluciones de polinucleótidos individuales para cada uno de los ARNbc de PDS de almizcle de 678 pb, ARNbc de PDS de almizcle de 198 pb, el ARNbc de PDS de *Nicotiana benthamiana* de 685 pb y el ARNbc de *Nicotiana benthamiana* de 192 pb (polinucleótido 0,6 micromolar en Silwet L-77 al 0,01%, tampón de fosfato de sodio 5 mM, pH 6,8). Se aplicaron 10 microlitros de solución de polinucleótido (o de tampón como control) a la superficie superior de cada una de las cuatro hojas pretratadas por planta para proporcionar un total de 40 microlitros por cada planta. Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento y se observó blanqueamiento de las hojas 3 días después del tratamiento. Las plantas tratadas por vía tópica con ARNbc de PDS de almizcle de 678 pb o ARNbc de PDS de almizcle de 198 pb, mostraron blanqueamiento de las hojas (lo que indica silenciamiento de la fitoeno desaturasa endógena) pero las plantas de almizcle tratadas por vía tópica con ARNbc de PDS de *Nicotiana benthamiana* de 685 pb o ARNbc de PDS de *Nicotiana benthamiana* de 192 pb no mostraron blanqueamiento de las hojas. Esta especificidad de secuencia demuestra que las composiciones de polinucleótidos y los procedimientos de la invención son útiles para el control selectivo de una especie o taxón dado que tenga una secuencia de gen diana específica,

15  
20  
25



por ejemplo, para controlar plantas voluntarias resistentes a los herbicidas en un campo de plantas de cultivo resistentes al mismo herbicida.

120) En un ensayo separado, las plantas de almizcle tratadas tópicamente con ARNbc de PDS de almizcle de 678 pb (marcado como "ARNbc de PDS de 700 nt") o ARNbc de PDS de almizcle de 198 pb (marcado como "ARNbc de PDS de 200 nt") mostraron blanqueamiento de las hojas (lo que indica silenciamiento de la fitoeno desaturasa endógena) pero las plantas de almizcle tratadas tópicamente con un ARNbc de 260 pares de bases de un gen de invertebrado (marcado como "ARNbc de DV49 de 260 nt", del gusano de la raíz del maíz *Diabrotica virgifera*) no dio como resultado un fenotipo de blanqueamiento, lo que indica ausencia de silenciamiento de la fitoeno desaturasa endógena (figura 17). Esta especificidad de secuencia demuestra que las composiciones de polinucleótidos y los procedimientos de la invención son útiles para el control selectivo de una especie o taxón dado.

### Ejemplo 12

121) Este ejemplo describe el uso de una composición aplicada por vía tópica que incluye al menos una hebra de polinucleótido que incluye al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos de un gen diana en orientación antisentido o sentido para inducir el silenciamiento sistémico de un gen diana en una planta. Más específicamente, este ejemplo demuestra el uso de un solo tratamiento con un oligonucleótido de fitoeno desaturasa (PDS) para inducir el silenciamiento sistémico en diferentes órganos de la planta, incluyendo hojas, tallos y flores.

122) Se usaron plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) de cuatro semanas de edad en todos los tratamientos. Se condicionaron dos hojas completamente expandidas (un cotiledón, una hoja auténtica) sumergiéndolas en solución de tensioactivo recién preparada (Silwet L-77 al 0,1% en agua doble destilada) durante unos pocos segundos y se dejaron secar durante 15 - 30 minutos. Se aplicaron veinte microlitros de oligonucleótido 22-mero de ADN monocatenario (ADNss) con la secuencia GGCAGTACAATTAAGGAGATG (SEQ ID NO: 39), correspondiente a los nucleótidos en las posiciones 1099 - 1120 de la fitoeno desaturasa de *Nicotiana benthamiana* (SEQ ID NO: 2) en forma de una solución 25 micromolar en Silwet L-77 al 0,01 % en tampón de fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8 a la superficie superior de cada hoja condicionada hasta un total de 40 microlitros (1 nanomol de oligonucleótido) por planta. Las plantas de control se trataron con la solución de Silwet sin el oligonucleótido de ADN. Se observó el blanqueamiento de las plantas 3 días después del tratamiento. Las hojas apicales, los tallos y las flores de las plantas tratadas con el oligonucleótido de ADNss mostraron blanqueamiento, lo que indica silenciamiento sistémico de PDS (figura 18A).

123) Se dejó que las flores de las plantas tanto tratadas con control como con ADNss formasen semillas. Las semillas se recogieron de los frutos maduros, se pesaron y se dejaron germinar. Los pesos de las semillas fueron idénticos (aproximadamente 11 mg por cada 100 semillas) y la morfología de las semillas tenía una apariencia similar entre las plantas tratadas con ADNss y las de control. Se observó una reducción de la cantidad de semilla producida por cada fruto y una reducción en la tasa de germinación (germinaron 4 de 100 semillas) en las semillas de las plantas tratadas con ADNss, en comparación con la cantidad de semilla por fruto y la tasa de germinación (germinaron 95 de 100 semillas) de las semillas de las plantas de control.

124) En un ensayo separado usando un procedimiento similar, se condicionaron plantas de tabaco por inmersión en Silwet L-77 al 0,1% en agua doble destilada, se dejaron secar durante 15 - 30 minutos y se trataron con el 22-mero de ADNss de PDS (SEQ ID NO: 39) aplicado en forma de una solución 25 micromolar en Silwet L-77 al 0,01 % en tampón de fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8 a la superficie superior de cada hoja condicionada hasta un total de 40 microlitros (1 nanomol de oligonucleótido) por planta. Otras plantas no se condicionaron con un tratamiento de tensioactivo, sino que se trataron únicamente con 1 nanomol de 22-mero de ADNss de PDS (SEQ ID NO: 39) aplicado mediante infiltración con una jeringa sin aguja (mostrado en la figura 18B) o mediante aplicación manual de gotas a la superficie de la hoja (no mostrado en la figura 18B) y como una solución 25 micromolar en Silwet L-77 al 0,01% en tampón de fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8 o como una solución 25 micromolar en tampón de fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8 (sin tensioactivo). Las plantas de control negativo se trataron con la solución de tampón de Silwet sin el oligonucleótido de ADN. Los resultados se presentan en la figura 18B. Todas las plantas tratadas únicamente con la aplicación directa del ADNss de PDS (sin condicionamiento con tratamiento de tensioactivo Silwet L-77), ya se aplicase por infiltración o por aplicación manual de gotas, mostraron blanqueamiento de las hojas apicales, tallos y flores, lo que indica un silenciamiento sistémico de PDS.

### Ejemplo 13

125) Este ejemplo ilustra procedimientos y composiciones aplicadas por vía tópica para inducir silenciamiento sistémico incluyendo el uso de agentes para condicionar una planta a la permeación por polinucleótidos. Más específicamente, este ejemplo describe el uso de polinucleótidos de la invención para controlar almizcle resistente a herbicidas.

126) Las plantas de almizcle que tienen números de copia pequeños (menos de 30) de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) son susceptibles al tratamiento con ARNbc diseñado para silenciar a EPSPS seguido del tratamiento con glifosato (para más detalles véase el ejemplo 1). Sin embargo, las plantas de almizcle que tienen elevados números de copias de EPSPS (es decir, 30 o más copias de EPSPS) son resistentes al tratamiento con

glifosato y son un problema para el control de la resistencia de las malas hierbas. Por ejemplo, en un ensayo (resultados no mostrados) en almizcle con alto número de copias resistente al glifosato usando tratamientos similares a los descritos en el **ejemplo 1** pero en los que se aumentó la dosis de ARNbc hasta diez veces (es decir, 8 nanomoles de ARNbc corto descrito en el **ejemplo 1** por planta) o en los que se usó una formulación registrada de glifosato ("herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®") combinada con un tensioactivo de amina de sebo, se mejoró la actividad del glifosato (estimada observando el crecimiento de las plantas medido como altura de plantas) pero las plantas resistentes no fueron eliminadas.

**127)** Se trataron tres líneas de almizcle con alto número de copias resistentes al glifosato (3 plantas por replicado) con ARNbc usando las condiciones de tratamiento listadas en la **tabla 6**, en las que el vehículo de suministro de ARNbc, el agente de permeabilización o condicionamiento y el orden de las etapas se variaron. Los resultados se ilustran en la **figura 19**. El tratamiento con glifosato "4X" (es decir, tratamiento con 3360 g equivalentes de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX® es cuatro veces la tasa de aplicación estándar de 840 g de equivalente de ácido por hectárea) solo no eliminó al almizcle con 35 copias (experimento 3) o 57 copias (experimento 6).

**128)** En una serie de experimentos (1 - 3, **tabla 6**), al incluir sulfato de amonio al 2% en un vehículo acuoso de suministro de ARNbc que comprendía tensioactivo de amina de sebo al 0,1% y glicerol al 10% (experimento 2) se mejoró la eficacia de una dosis de factor 10 de ARNbc seguida de una aplicación de glifosato 4X. También se observó una eficacia mejorada de una dosis de factor 10 de ARNbc seguido de aplicación de glifosato cuando se incluyó sulfato de amonio en un vehículo de suministro de ARNbc sin un tensioactivo de amina de sebo (experimento 8).

**129)** En otra serie de experimentos (4 - 6, **tabla 6**), la aplicación del tensioactivo Silwet L-77 antes de aplicar el ARNbc en un vehículo de suministro que contenía sulfato de amonio fue eficaz, mientras que la combinación del tensioactivo Silwet L-77 con el ARNbc en el vehículo de suministro de ARNbc que contenía sulfato de amonio no fue eficaz. La aplicación de glifosato ("herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®") a las 72 horas (experimento 7) fue menos eficaz que aplicar glifosato a las 48 horas (experimento 2) después del tratamiento con ARNbc.

**Tabla 6**

Línea de almizcle	Número de copias de EPSPS	Número de experimento	Etapa 1		Etapa 2	Etapa 3*
			Concentración relativa de ARNbc de EPSPS	Vehículo de suministro de ARNbc		
R31	35	1	10X	tensioactivo de amina de sebo al 0,1% + glicerol al 10%	Silwet L-77 al 1%	WeatherMAX 4x (48 h)
		2	10X	sulfato de amonio al 2% + tensioactivo de amina de sebo al 0,1% + glicerol al 10%	Silwet L-77 al 1%	WeatherMAX 4x (48 h)
		3	Solo tampón (control)	sulfato de amonio al 2% + tensioactivo de amina de sebo al 0,1% + glicerol al 10%	Silwet L-77 al 1%	WeatherMAX 4x (48 h)
R34	57	4		10X	Silwet L-77 al 1% + sulfato de amonio al 2%	WeatherMAX 4x (48 h)
		5	Silwet L-77 al 1%	10X	sulfato de amonio al 2%	WeatherMAX 4x (48 h)

(continuación)

Línea de almizcle	Número de copias de EPSPS	Número de experimento	Etapa 1		Etapa 2	Etapa 3*
			Concentración relativa de ARNbc de EPSPS	Vehículo de suministro de ARNbc		
		6	Silwet L-77 al 1 %	Solo tampón (control)	sulfato de amonio al 2%	WeatherMAX 4x (48 h)
Línea de almizcle	Número de copias de EPSPS	Número de experimento	Etapa 1		Etapa 2	Etapa 3*
			Concentración relativa de ARNbc de EPSPS	Vehículo de suministro de ARNbc		
R28	87	7	10X	sulfato de amonio al 2% + tensioactivo de amina de sebo al 0,1% + glicerol al 10%	Silwet L-77 al 1%	WeatherMAX 4x (72 h)
Línea de almizcle	Número de copias de EPSPS	Número de experimento	Etapa 1	Etapa 2		Etapa 3*
				Concentración relativa de ARNbc de EPSPS	Vehículo de suministro de ARNbc	
R28	87	8	Silwet L-77 al 1 %	10X	sulfato de amonio al 2%	WeatherMAX 4x (72 h)
R28	87	9	Silwet L-77 al 1%	Solo tampón (control)	sulfato de amonio al 2%	WeatherMAX 4x (72 h)

\*glifosato (en forma de la formulación comercial de herbicida de la marca "Roundup® WeatherMAX®", que contiene 660 g/l de sal de K+ de glifosato en un vehículo que incluye el la mezcla de tensioactivo de amina de sebo MON56151 de amina de sebo (16-18C) y cocoamina (12-14C) a una proporción de 55:45) se lista en la cantidad usada (donde 1X = 840 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®, 4X = 3360 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®) y las horas después de la aplicación del ARNbc

**Ejemplo 14**

**130)** Este ejemplo ilustra procedimientos y composiciones aplicadas por vía tópica para inducir silenciamiento sistémico incluyendo el uso de agentes para condicionar una planta a la permeación por polinucleótidos.

5 **131)** Se observó que dos ARN pequeños identificados mediante secuenciación de ARN pequeño eran abundantes y únicos para las plantas de almizcle que se habían tratado con cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "cortas" de tamaño de oligonucleótido, como se describe en el **ejemplo 1**. Estos dos ARN pequeños se mapearon, respectivamente, a las posiciones de nucleótidos 743 - 764 y 566 - 585 del EPSPS de longitud completa que tiene la secuencia mostrada en la **figura 20 (SEQ ID NO: 40)**. Se diseñaron dos moléculas de ARNbc "cortas" con un tamaño de oligonucleótido de 25 nucleótidos con una hebra antisentido que es capaz de hibridar con el ARNm transcrito del gen de EPSPS del almizcle en las posiciones de nucleótido 743 - 767 (ARNbc corto-5) y 564 - 588 (ARNbc corto-6), indicadas por los nucleótidos subrayados y en cursiva en la **SEQ ID NO: 40** mostrada en la **figura 20**, que también muestra las cuatro moléculas de ARNbc de EPSP "cortas" con tamaño de oligonucleótido (texto subrayado sin cursivas) y los tres polinucleótidos de ARN bicatenario "largos" (texto en negrita, como se describe en el **ejemplo 1**).

15 **132)** La aplicación de una mezcla de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "cortas" con tamaño de oligonucleótido (descritas en el **ejemplo 1**) seguida de la aplicación del procedimiento de tratamiento descrito en el **ejemplo 1** dio como resultado la eliminación 4 de 4 plantas de almizcle con 16 copias de EPSPS. El uso del mismo procedimiento de tratamiento pero aplicando el ARNbc corto-5 y el ARNbc corto-6 dio como resultado la eliminación de 0 de 4 plantas de almizcle. La adición de uno de los dos o de ambos ARNbc corto-5 y ARNbc corto-6 a la mezcla de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS corto de tamaño de oligonucleótido (descritas en el **ejemplo 1**) dio como resultado la eliminación de 4 de 4 plantas de almizcle, es decir, no se observó un efecto antagónico del ARNbc

corto-5 y el ARNbc corto-6.

#### Ejemplo 15

5 **133)** Este ejemplo ilustra procedimientos y composiciones aplicadas por vía tópica para inducir silenciamiento sistémico incluyendo el uso de agentes para condicionar una planta a la permeación por polinucleótidos. Más específicamente, este ejemplo describe el uso de ácido salicílico y polinucleótidos.

10 **134)** El ácido salicílico (SA) induce resistencia a virus en el tabaco; véase, *por ejemplo*, Chivasa y col. (1997) Plant Cell, 19:547 - 557. Se pretrataron plantas de almizcle resistentes al glifosato que tenían 49 o 63 copias de EPSPS con SA 15 milimolar. Se aplicó manualmente una solución de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "cortas" de tamaño de oligonucleótido (descritas en el **ejemplo 1**) 1, 5 o 24 horas después del tratamiento con SA, seguido 72 horas después de rociado con glifosato (1682 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®). No se observaron mejoras en los efectos de la actividad de los ARNbc y el glifosato (estimadas observando el crecimiento de las plantas medido como altura de las plantas) para ninguno de los tratamientos con SA a los 7 días después del tratamiento con glifosato.

#### Ejemplo 16

15 **135)** Este ejemplo ilustra procedimientos y composiciones aplicadas por vía tópica para inducir silenciamiento sistémico incluyendo el uso de agentes para condicionar una planta a la permeación por polinucleótidos. Más específicamente, este ejemplo describe variaciones en el orden y la pauta de aplicación de los polinucleótidos y la solución de tensioactivo.

20 **136)** Estos ensayos se llevaron a cabo en plantas de almizcle con altos números de copias (56, 63 o 100 copias) de EPSPS, usando un control que incluía las siguientes etapas: (1) aplicación del ARNbc (una solución de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "cortas" de tamaño de oligonucleótido descritas en el **ejemplo 1**) en una solución que contenía tensioactivo de amina de sebo y glicerol; (2) aplicación de tensioactivo de silicona Silwet L-77 al 1%; y (3) aplicación de glifosato (1682 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®). Se evaluó el espaciado en el tiempo de la aplicación de los polinucleótidos y la aplicación de Silwet, aplicándose la pulverización de Silwet 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 tiempos diferentes de la aplicación de la solución de Silwet produjeron resultados similares, es decir, retraso en el crecimiento de la mayoría de las plantas con alto número de copias que se trataron con la solución de ARNbc, en comparación con las plantas con alto número de copias que se trataron con una solución de control que contenía únicamente tensioactivo de amina de sebo y glicerol.

#### 30 Ejemplo 17

**137)** Este ejemplo ilustra procedimientos y composiciones aplicadas por vía tópica para inducir silenciamiento sistémico incluyendo el uso de agentes para condicionar una planta a la permeación por polinucleótidos. Más específicamente, este ejemplo describe la aplicación de polinucleótidos de la invención mediante rociado de bajo volumen y el uso de un tensioactivo de silicona y sulfato de amonio.

35 **138)** Se aplicó una solución de ARNbc (una solución de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "cotas" de tamaño de oligonucleótido descritas en el **ejemplo 1**) en una solución que contenía sulfato de amonio al 2% mediante rociado de bajo volumen a almizcle que tenía 16 copias de EPSPS, seguido de rociado con glifosato (1682 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®), dando como resultado la eliminación de las plantas de almizcle.

40 **139)** Se trataron seis plantas de almizcle por tratamiento con un procedimiento en tres etapas usando pulverización de bajo volumen: (1) rociado con Silwet L-77 al 1%; (2) rociado de 2 mililitros de una solución de ARNbc que contenía cantidades iguales de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "cortas" de tamaño de oligonucleótido descritas en el **ejemplo 1** a una de las 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) rociando glifosato (1682 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®) a una tasa de 159 litros/acre. Nueve días después de la pulverización del glifosato, las seis plantas rociadas con ARNbc 4X (3,2 nanomoles por planta) fueron eliminadas y las plantas rociadas con ARNbc 2X (1,6 nanomoles por planta) o ARNbc 1X (0,8 nanomoles por planta) tenían retraso en el crecimiento

(figura 21A).

50 **140)** Se llevaron a cabo varios ensayos en almizcle resistente al glifosato cultivado de semillas recogidas del campo. Las plantas se trataron con diversos protocolos descritos a continuación, tratándose algunas plantas por vía tópica con una solución de ARNbc y tratándose a las plantas de control con el tampón (vehículo de ARNbc); la aplicación fue por pulverizado de bajo volumen. A menos que se indique otra cosa, la solución de ARNbc contenía cantidades iguales de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "cortas" de tamaño de oligonucleótido descritas en el **ejemplo 1** en tampón a una dosis "4X" (3,2 nanomoles por planta); el tampón consistía en fosfato de sodio 10 milimolar y tensioactivo de organosilicona Silwet L-77 al 0,01% (v/v) en agua y dietilpirocarbonato (DEPC) (Omega Bio-Tek) y

55

ajustado a pH 6,8; y el herbicida era un herbicida de glifosato aplicado a 840 g equivalentes de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre. Los resultados se proporcionan en la **tabla 7**.

5 **141)**Ensayos 1 y 2: Estos ensayos se llevaron a cabo en almizcle resistente al glifosato cultivado a partir de semillas obtenidas de una muestra de suelo de una ubicación agrícola con matas de almizcle resistentes al glifosato conocidas. Para el ensayo 1, se trataron del siguiente modo diez plantas por tratamiento: (1) rociado de Silwet L-77 al 1%; (2) rociado de 2 mililitros de la solución de ARNbc; y (3) rociado de glifosato. Para el ensayo 2, se trataron dieciocho plantas por tratamiento usando el mismo procedimiento que en el ensayo 1.

10 **142)**Ensayo 3: Este ensayo comparó los tratamientos aplicados en diferentes estadios del desarrollo y se usaron plántulas cultivadas a partir de semillas de almizcle de un sitio en Macon County, GA y seleccionadas respecto de su resistencia al glifosato. El tampón incluía sulfato de amonio al 2%. Se trataron del siguiente modo doce plántulas pequeñas (estadio de 3 hojas) o doce grandes (estadio de 5 hojas) por tratamiento: (1) rociado de Silwet L-77 al 1%; (2) rociado de 2 mililitros de la solución de ARNbc; y (3) rociado de glifosato. Este tratamiento proporcionó un mejor control (eliminó más plantas) en las plántulas pequeñas en comparación con las plántulas más grandes. El tratamiento con ARNbc eliminó o retrasó el crecimiento de más plantas resistentes al glifosato del logrado con el tratamiento con tampón y herbicida, aunque a los 16 días después del tratamiento, no se habían eliminado todas las plantas tratadas con ARNbc.

15 **143)**Ensayos 4 y 5: Estos ensayos usaron plantas de almizcle cultivadas a partir de semillas en suelo de una granja de Pemiscot, MO. El tampón incluía sulfato de amonio al 2%. Se trataron del siguiente modo once plántulas pequeñas (estadio de 3 hojas) por tratamiento: (1) rociado de Silwet L-77 al 1%; (2) rociado de 2 mililitros de la solución de ARNbc; y (3) rociado de glifosato. Para el ensayo 5, se trataron doce plantas por tratamiento usando el mismo procedimiento que en el ensayo 4.

20 **144)**Ensayo 6: Este ensayo usó plantas de almizcle cultivadas a partir de semillas en suelo de la granja "Ivy2". El tampón incluía sulfato de amonio al 2%. Se trataron del siguiente modo dieciocho plántulas pequeñas (estadio de 3 hojas) por tratamiento: (1) rociado de Silwet L-77 al 1%; (2) aplicando de 2 mililitros de la solución de ARNbc, manualmente o por rociado; y (3) rociando glifosato. En este ensayo, el procedimiento de aplicación (deposición manual o rociado) proporcionó resultados similares.

25 **145)**Ensayo 7: Este ensayo usó plántulas de almizcle en estadio de 3 a 4 hojas cultivadas de semillas de F3 seleccionadas respecto de su resistencia al glifosato y más resistentes al glifosato que las plantas en los ensayos 1 - 6. El tampón incluía sulfato de amonio al 2%. Se trataron del siguiente modo dieciocho plantas por tratamiento: (1) rociado de Silwet L-77 al 1%; (2) rociado de 2 mililitros de la solución de ARNbc; y (3) rociado de glifosato.

**Tabla 7**

Número de ensayo	Plantas eliminadas/plantas totales		Comentarios
	tratadas con ARNbc	control	
1	2/10	0/10	supervivientes tratados con ARNbc con retraso en el crecimiento en comparación con los controles (figura 21B)
2	7/18	4/18	supervivientes tratados con ARNbc con retraso en el crecimiento a los 8 y 30 días después del tratamiento, en comparación con los controles
3 (plántulas grandes)	5/12	3/12	supervivientes tratados con ARNbc/sulfato de amonio con más retraso en el crecimiento después del tratamiento, en comparación con los controles
3 (plántulas pequeñas)	9/12	6/12	
4	7/11	2/11	supervivientes tratados con ARNbc/sulfato de amonio con más retraso en el crecimiento después del tratamiento, en comparación con los controles
5	8/12	3/12	

(continuación)

Número de ensayo	Plantas eliminadas/plantas totales		Comentarios
	tratadas con ARNbc	control	
6 (deposición manual)	14/18	--	
6 (pulverizado)	13/18	9/18	
7	8/18	2/18	

**Ejemplo 18**

**146)** Este ejemplo ilustra procedimientos y composiciones aplicadas por vía tópica para inducir silenciamiento sistémico incluyendo el uso de agentes para condicionar una planta a la permeación por polinucleótidos.

- 5 **147)** En estos ensayos, la solución de ARNbc contenía cantidades iguales de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "cortas" de tamaño de oligonucleótido descritas en el **ejemplo 1** en tampón a una dosis "10X" (8 nanomoles por planta) en una solución que contenía tensioactivo de amina de sebo al 0,2% y sulfato de amonio al 2% (identificado en la **figura 22** como "amina de sebo/AMS") o uno de los siguientes reactivos de transfección: (a) una poliamina (JetPRIME™, Polyplus-transfection SA, Illkirch, Francia), (b) una nanopartícula magnética (SilenceMag, OZ Biosciences, Marsella, Francia), (c) un péptido (Nanopartícula N-TER™, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), (d) un lípido (siPORT™ NeoFX™, Ambion, Foster City, CA) o (e) un lípido/polímero catiónico (TransIT®, Mirus Bio, Madison, WI). Las plantas se trataron del siguiente modo: (1) aplicando manualmente solución de ARNbc; (2) pulverizando Silwet L-77 al 1%; y (3) rociando glifosato aplicado a 840 g equivalentes de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa 159 litros/acre. Cuando se usó este protocolo con ARNbc en la solución de tensioactivo de amina de sebo/sulfato de amonio eliminó al almizcle resistente al glifosato que tenía 35 copias de EPSPS. Los resultados se ilustran en la **figura 22**. El retraso en el crecimiento o la muerte de las plantas se observó para plantas tratadas con ARNbc en soluciones que contenían poliamina (JetPRIME™), péptido (Nanopartícula N-TER™), polímero/lípido catiónico (TransIT®) o tensioactivo de amina de sebo/sulfato de amonio.

**Ejemplo 19**

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

- 25 **149)** Los ADN sentido monocatenarios (ADNss) y los ARN monocatenarios antisentido (ARNss) correspondientes al gen EPSPS de almizcle en las posiciones 14-38, las posiciones 153-177, 345-369 y 1105-1129 (indicadas por los nucleótidos subrayados en la figura 1) se adquirieron de Integrated DNA Technologies. Los ADNss sentido y los ARNss antisentido se hibridaron calentando cantidades equimolares de mezclas de ADNss y ARNss a 95 grados centígrados durante 5 minutos y enfriando lentamente durante 1,5 - 2 horas a temperatura ambiente para dar los híbridos de ADN/ARN.

- 30 **150)** En los ensayos que usaron este procedimiento se usaron plantas de almizcle resistentes al glifosato con 16 copias: (1) rociado de Silwet L-77 al 1%; (2) aplicación manual en cuatro hojas maduras de cada planta un total de 0,8 nanomoles de ARNbc de EPSPS de almizcle (como se describe en el **ejemplo 1**) o de los híbridos de ADN/ARN de EPSPS de almizcle; y (3) rociando con glifosato aplicado a 840 g de equivalentes de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre.

- 35 **151)** Los resultados se ilustran en la **figura 23**. Siete días después de rociar el herbicida, 4 de las 6 plantas tratadas con ARNbc estaban muertas y las 2 restantes estaban muriendo, mientras que las plantas rociadas con el híbrido de ADN/ARN presentaban retraso en el crecimiento (lesión por glifosato) en comparación con el control.

**Ejemplo 20**

- 40 **152)** Este ejemplo ilustra procedimientos que usan composiciones que incluyen polinucleótidos aplicadas tópicamente para inducir silenciamiento sistémico en una planta. Más específicamente, este ejemplo describe el uso de diferentes tipos de polinucleótidos para inducir silenciamiento sistémico.

**153)** Se usaron seis plantas de almizcle resistentes al glifosato que tenían 16 copias de EPSPS por cada tratamiento

5 en este ensayo. Se aplicaron 0,8 nanomoles ("1X") por tratamiento de planta de ARNbc, una cantidad diez veces mayor (8 nanomoles por tratamiento de planta, "10X") de polinucleótidos de ADNss (descritos en el **ejemplo 19**) y solo tampón como control, a plantas separadas de manera manual en tampón que contenía sulfato de amonio al 2%, seguido 48 horas después de rociado con glifosato aplicado a 840 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre. La **figura 24** representa los resultados. Ambos tratamientos con polinucleótidos proporcionaron un mejor control del almizcle en comparación con plantas tratadas únicamente con tampón y herbicida. De las plantas tratadas con el tratamiento de ADNss 10X, dos de seis fueron eliminadas y las cuatro restantes presentaban un retraso del crecimiento del 30%. De las plantas tratadas con el tratamiento de ARNbc 1X, las seis plantas fueron eliminadas a los 8 días después de rociar WM o 10 días después del tratamiento con ARNbc.

**Ejemplo 21**

**154)** Este ejemplo ilustra procedimientos que usan composiciones que incluyen polinucleótidos aplicadas tópicamente para inducir silenciamiento sistémico en una planta. Más específicamente, este ejemplo describe la selección de una secuencia de polinucleótido para inducir silenciamiento sistémico en una planta.

15 **155)** Se diseñaron doce ARNbc de aproximadamente 250 pb cada uno y que tenían una hebra del ARNbc correspondiente a las secuencias de ADN solapadas de EPSPS de las **SEQ ID NO: 41-52 (tabla 8)** para abarcar de manera solapada la secuencia codificante completa y parte de las regiones 5' y 3' no traducidas del gen EPSPS de almizcle, tal como se ilustra en la **figura 25A**.

**Tabla 8**

Número de segmento de tiling (véase la figura 25A)	Secuencia	SEQ ID NO.
1	CGCCAGGGCTGCAGACGCGTTACGTANTCGGATCCAGAATTCGTGATTAAC GTCACAGCAIGTCAIGTAAAAACACGCGAATCAGACCCGGTCCACICITIGTIT TAATTTGAGACAATTTTGATGTTGAGTCATCCCACACCAACCCCAAAAAAT TCAACAAACAACTCTTATAATGATTCCTCTACCTACTAGAGTCTACACC AACCCACTTTCTCTTTGCCACCAAAACTTTGGTTTGGTAAGAACT	41
2	CACCAACCCACTTCTCTTTGCCACCAAAACTTTGGTTTGGTAAGAACTA AGCCCTCTTCTTTCCCTTCTCTCTTAAAGCCTAAAATCCACCTAACTTT TTCAGCCAAACAAACAACGCCAAATTCAGAGGAAGAATAATGATGGCTCAA GCTACTACCATCAACAATGGTGTCCATACTGGTCAATTGCACCATACTTTA CCCCAAACCCAGTTACCCAAATCTTCAAAAACCTTTAATT	42
3	CCATACTTTACCCAAAACCCAGTTACCCAAAATCTTCAAAAACCTCTTAAATTTT GGATCAAACCTTGAGAATTTCTCCAAAGTTCATGTCCTTAAACCAATAAAAAGA GTGGTGGGCAATCATCAATIGTTCCCAAGATTCAGCTTCTGTTGCTGCT GCAGCTGAGAAACCTTCATCTGTCCCAGAAATTGTGTTACAACCCATCAAA GAGATCTCTGGTACTGTTCAATTCCTGGGTCAAAGTCTTTATCC	43
4	TCAAAGAGATCTCTGGTACTGTTCAATTGCCTGGGTCAAAGTCTTTATCCA ATCGAATCTCTCTTTAGCTGCTTTGCTGAGGGCACAACAGTGGTTCGACA ACTTGCTGTATAGTGATGATATTCTTTATATGTTGGACGCTCTCAGAACTCT TGGTTTAAAAGTGGAGGATGATAGTACAGCCAAAAGGGCAGTCTGAGAGG GTTGTGGTGGTCTGTTTCTGTTGGTAAAGATGGAAAGGAAGAGAT	44
5	GAGGGTTGTGGTGGTCTGTTTCTGTTGGTAAAGATGGAAAGGAAGAGATT CAACTTTTCTTGGTAATGCAGGAACAGCGATGCGCCATTGACAGCTGCG GTTGCCGTTGCTGGAGGAAATCAAGTTATGTGCTTGATGGAGTACCAAGA ATGAGGGAGCGCCCATTTGGGATCTGGTAGCAGGTCTAAAGCAACTTGG TTCAGATGTAGATTGTTTCTTGGCACAAATTGCCCTCTGTTCCGGG	45

20

(continuación)

Número de segmento de tiling (véase la figura 25A)	Secuencia	SEQ ID NO.
6	TGGTTCAGATGTAGATTGTTTTCTTGGCACAAAATTGCCCTCCTGTTCCGGGTC AATGCTAAAGGAGGCCCTTCCAGGGGGCAAGGTCAAGCTCTCTGGATCGGT TAGTAGCCAAATATTTAACTCACCTTCTCATGGCTACTTCTTTGGGTCTTGGG GACGTGGAGATTGAGATAGTTGATAAATTGATTTCTGTACCGTATGTTGAA ATGACAATAAAGTTGATGGAACGCTTTGGAGTATCCGTAGAACAT	46
7	TTGAAATGACAATAAAGTTGATGGAACGCTTTGGAGTATCCGTAGAACAT AGTGATAGTTGGGACAGGTTCTACATTCGAGGTGGTCAGAAATACAAATCT CCTGGAAAAGGCATATGTTGAGGGTATGCTTCAAGTGCTAGCTACTTCCCTA GCCGGAGCCGCCGTCCTGTTGGGACTGTCACTGTCAAGGGTTGTGGAAC AAGCAGTTTACAGGGTGTATGAAAATTTGCCGAAGTTCTTGAGAAGAT	47
8	ACAAGCAGTTTACAGGGTGTATGAAAATTTGCCGAAGTTCTTGAGAAGAT GGGTTGCAAGGTCACCTGGACAGAGAATAGTGTAACCTGTTACTGGACCAC CCAGGGATTCACTCGGAAAGAAACATCTGCGTGCTATCGACGTCAACATG AACAAAATGCCAGATGTTGCTATGACTCTTGCAGTTGTTGCCTTGTATGCA GATGGGCCACCGCCATCAGAGATGTGGCTAGCTGGAGAGTGAAGGAAA	48
9	AGATGGGGCCACCGCCATCAGAGATGTGGCTAGCTGGAGAGTGAAGGAAA CCGAACGGATGATTGCCATTTGCACAGAACTGAGAAAGCTTGGGGCAACA GTTGAGGAAGGATCTGATTACTGTGTGATCACTCCGCCTGAAAAGCTAAAC CCCACCGCCATTGAAACTTATGACGATCACCGAATGGCCATGGCATTCTCT CTTGCTGCCTGTGCAGATGTTCCCGTCACTATCCTTGATCCGGGATGC	49
10	CTCTTGCTGCCTGTGCAGATGTTCCCGTCACTATCCTTGATCCGGGATGCAC CCGTAACCTTCCCGGACTACTTTGATGTTTTAGAAAAGTTCCGCAAGCA TTGATGAGTAGCTATATACGAGATCCCTTAAATTGTACGCCGAAGTTTTGA TTGAGTCTAATAGTAGATAAAAAGGCTATAAATAAACTGGCTTTCTGCTTG AGTAATTATGAAATTTCTTTGTATTATGTTTGTGAGATTGAAAGTAGCTTATA	50
11	TAATTATGAAATTCCTTTGTATTATGTTTGTGAGATTTGAAAGTAGCTTATAAA TTACAATGTACTAAAGTCTAGAAAATAAGTTATGTATCTTTTAAATCAATGA GAAATGCACTTGGAAAGGCTTGGACCTTGTATTTTGTGACCTAAAGAGTACT AACTTTGGAGTTTCCAACCTCATTTGTTTATCTCATTTTTTTTTAATTTTTGAT TTAAATTGTTTATTTTTATGAGTAATCATGTATCTTTCTTATTCTAACCAA TGTAATACTCCTTC	51
12	TATGAGTAATCATGTATCTTTCTTATTCTAACCAAATGTAATACTCCTTCCA ACTCTCTTTAAACGTCCACACTCTGGGCACAGAGTGAATAGTGTGGTGGT TGGAGTCTTTTAAAGTGATTATAATAATTGTAATGTGGTAGTTAGAATATT TTAAGTAATGTAGGTGGGGTATTATGGTCTTGTGTAACATAGGATATTTAG GTAATAAATCTATGCAAAAAAGGAAAGTAAGCAATAAAGCGAATTGA CCTGAAAAGAAAAGTGGACATGTATAGTGAGTTGGAGGAAGTATTTT	52

5 **156)** Las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS con un tamaño de nucleótidos "corto" descritas en el **ejemplo 1** y en la **figura 1** están ubicadas en los segmentos solapados 2, 3, 4 y 8, respectivamente y se muestran como barras en color gris claro entre esos segmentos. Los polinucleótidos se sintetizaron usando transcripción *in vitro* usando un vector pBR322 con los polinucleótidos de EPSPS insertado en los sitios de clonación EcoRI y BamHI; el ADN plasmídico se aisló con kits Qiagen Maxi prep y se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. La solución de ADN digerido se usó en el tratamiento de las plantas sin purificación adicional.

10 **157)** Se trataron plantas de almizcle resistente al glifosato que tenían 16 copias de EPSPS del modo siguiente: rociando con Silwet L-77 al 1%; (2) aplicando manualmente una solución de ARNbc (que contenía polinucleótidos seleccionados entre los doce segmentos solapantes o las cuatro moléculas de ARNbc "cortas" descritas en el **ejemplo 1** a una tasa de 0,01 nanomol de ADN/planta) o tampón como control; y (3) 48 horas después, rociando con glifosato aplicado a 840 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®



a una tasa de 159 litros/acre. Se observó durante 11 días la altura de las plantas por encima del suelo después del tratamiento con herbicida; a las plantas que estaban muertas o muriéndose se les asignó una altura de cero. Los resultados se presentan en las **figuras 25B y 25C**. Las combinaciones de polinucleótidos de ARNbc que muestran la mayor eficacia en este ensayo incluyeron las cuatro moléculas de ARNbc "cortas" descritas en el **ejemplo 1**, la combinación de los segmentos solapados 2, 5, 8 y 11 y la combinación de los segmentos solapados 7, 8 y 9.

### Ejemplo 22

**158)** Este ejemplo ilustra procedimientos que usan composiciones que incluyen polinucleótidos aplicadas tópicamente para inducir silenciamiento sistémico en una planta. Más específicamente, este ejemplo describe la aplicación tópica de polinucleótidos después de la aplicación de herbicida a una planta.

**159)** En un ensayo, las plantas de almizcle resistentes al glifosato que tenían 16 copias de EPSPS se rociaron con glifosato aplicado a 840 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre. Dos o 24 horas después de la aplicación del herbicida, se trataron las plantas rociando con Silwet L-77 al 1%. De quince a 20 minutos después del tratamiento con Silwet, se trataron las plantas mediante aplicación manual de 0,8 nanomoles ("1X") por planta de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "cortas" de tamaño de oligonucleótido descritas en el **ejemplo 1** en tampón que contenía sulfato de amonio al 2% o tampón que contenía sulfato de amonio al 2%. En este ensayo, las plantas de control no tratadas ("UT") se trataron únicamente con el pulverizador de Silwet L-77 al 1% pero no con herbicida o ARNbc. Los resultados se ilustran en la **figura 26**. En este ensayo, la aplicación de Silwet al 1% dio como resultado una mejora del 60% en la actividad del glifosato cuando se aplicó 2 horas después de rociar el herbicida y del 20% cuando se aplicó 24 horas después de rociar el herbicida. En este ensayo, la aplicación de Silwet al 1% seguida de ARNbc de EPSPS dio como resultado una mejora de al menos el 80% en la actividad del glifosato cuando se aplicó 2 horas después de rociar el herbicida y del 20% cuando se aplicó 24 horas después de rociar el herbicida.

**160)** En otro ensayo, las plantas de almizcle cultivadas a partir de semillas en suelo de una granja en Macon, GA, se rociaron con glifosato aplicado a 840 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre. Tres días después del tratamiento con herbicida, 9 de 40 plantas fueron eliminadas y 3 presentaban un grave retraso del crecimiento. Las plantas supervivientes se rociaron con Silwet L-77 al 1%, seguido de aplicación tópica manual de 8 nanomoles ("10X") por planta de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "cortas" de tamaño de oligonucleótido descritas en el **ejemplo 1** o tampón como control. Tres días después, 3 plantas más en el grupo tratado con ARNbc estaban muertas y 2 plantas más en el grupo tratado con tampón estaban muertas. En este punto (6 días después del tratamiento original con herbicida y 3 días después del tratamiento con Silwet/ARNbc o tampón), se roció a la mitad de las plantas supervivientes en cada grupo con una segunda aplicación de glifosato (aplicada a la misma dosis que en la primera aplicación). Dos semanas después de este segundo tratamiento con herbicida, las demás plantas tratadas con ARNbc mostraron un 80% de lesión y las demás plantas tratadas con tampón mostraron un 40% de lesión.

### Ejemplo 23

**161)** Este ejemplo ilustra procedimientos que usan composiciones que incluyen polinucleótidos aplicadas tópicamente para inducir silenciamiento sistémico en una planta. Más específicamente, este ejemplo describe una aplicación tópica en una sola etapa de una sola composición que incluye polinucleótidos, tensioactivo y herbicida para controlar malas hierbas resistentes a los herbicidas.

**162)** Este ensayo se llevó a cabo en una población de campo de plantas de almizcle resistentes al glifosato que se sabía que tenían altos números de copias de EPSPS (se ha comunicado que las plantas de este sitio de estudio tienen de 5 a más de 160 copias de EPSPS por Gaines y col. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107:1029-1034). Los polinucleótidos usados en este ensayo eran una mezcla equimolar de las cuatro moléculas de ARNbc de EPSPS "cortas" de tamaño de oligonucleótido descritas en el **ejemplo 1**.

**163)** Se roció a plantas de 10 a 15 cm (cuatro a seis pulgadas) de altura en un área de tratamiento de 30 x 152 cm (1 pie x 5 pies) en un solo tratamiento con 264 microgramos ("100X") o 52,8 microgramos ("20X") de los ARNbc de EPSPS en una solución que también contenía tensioactivo Silwet L-77 al 1%, sulfato de amonio al 2% y glifosato (aplicado a 1682 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre). Por comparación, se roció a otras plantas en áreas de 30 x 152 cm (1 pie x 5 pies) con glifosato (en una solución que también contenía tensioactivo Silwet L-77 al 1% y sulfato de amonio al 2%) aplicada a la misma tasa.

**164)** Los resultados se ilustran en la **figura 27**. El tratamiento de las plantas solo con glifosato (aplicado a 1682 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre) en una solución que también contenía Silwet L-77 y sulfato de amonio dio como resultado un control (muerte de plantas) de aproximadamente el 70%. El tratamiento en una etapa usando una composición que contenía los polinucleótidos de ARNbc de EPSPS 20X, tensioactivo, sulfato de amonio y herbicida dio como resultado un control de aproximadamente el 80 - 85% del almizcle resistente al glifosato, que es la tasa aproximada de control lograda rociando con glifosato aplicado a 6720 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup®

5 WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre (es decir, a 8 veces la tasa de aplicación normal de aproximadamente 840 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre). El tratamiento en una etapa usando una composición que contenía los polinucleótidos de ARNbc de EPSPS 100X, tensioactivo, sulfato de amonio y herbicida dio como resultado un control de aproximadamente el 90 - 95% del almizcle resistente al glifosato, que es la tasa aproximada de control lograda rociando con glifosato aplicado a 13440 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre (es decir, a 16 veces la tasa de aplicación normal de aproximadamente 840 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre).

**Ejemplo 24**

10 **165)** Este ejemplo ilustra un procedimiento para inducir la regulación sistémica de un gen diana en una planta de hortaliza mediante aplicación tópica a la hortaliza de una molécula de polinucleótido que incluye un segmento con una secuencia de nucleótido esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a, una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen diana o en el ARN transcrito a partir del gen diana, mediante lo cual la molécula permea el interior de la planta de hortaliza e induce la regulación sistémica del gen diana. En este ejemplo, se trató a plantas de hortalizas en crecimiento con una composición aplicada por vía tópica para inducir el silenciamiento sistémico de un gen diana en una planta de cultivo de hortalizas o frutales que incluye (a) un agente para condicionar una planta a la permeación por polinucleótidos y (b) polinucleótidos que incluyen al menos una hebra de polinucleótido que incluye al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos del gen diana en orientación con sentido o antisentido. Más específicamente, este ejemplo demuestra el uso de polinucleótidos aplicados por vía tópica para inducir el silenciamiento sistémico de un gen de fitoeno desaturasa (PDS) en una planta de cultivo de hortalizas, es decir, lechuga (*Lactuca sativa*).

**166)** PDS de lechuga tiene la secuencia

```

ATGTCCTCTGTTTGGAAATGTTTCTGCCATTAACCTCAAGTGGAAAGTGTATAGTAATGAATCTTTCAA
GCACACAAATCACTTCAAGAGATTGTTTCAAGATTACCTCAGGGCAAAAAGATGTTTTGTCATTTG
GATGCTGTGATGCTATGGGTAACAGATTGCAATTCCTCAAGTGTCTGTTCTTTTACACCAAGATCAA
AGAAGAATGTCTCCCTCTAAAGGTAGTTTGTGTTGATTATCCAAGACCAGATCTTGATAACACAT
CTAATTTCTTGGAAGCTGCTCACTTGTCTTCAACCTTCAGAACTTCCCACGCCCATCTAAGCCATT
GAAGATTGTAATTGCTGGTGCAGGTTTAGCTGGTTTATCAACTGCTAAGTATTTAGCTGATGCAGG
TCACAAGCCAATTTTACTAGAAGCAAGAGATGTTCTTGGTGGAAAGGTGGCAGCTTGAAAGATG
ATGATGGAGATTGGTATGAGACAGGTTTACACATATTCTTTGGAGCTTACCCAAATGTACAAAATT
TATTTGGAGAGCTAGGAATTAATGATAGATTACAGTGGAAAGGAGCATTCTATGATATTTGCAATGC
CAAATAAGCCTGGAGAATTTAGTAGGTTTACTTCCCAGATGTTTTACCTGCACCATTGAATGGAA
TTTTTGCTATATTGAGGAACAATGAAATGCTGACGTGGCCTGAGAAAGTGAAGTTTGCAATTGGGC
TGTTGCCTGCAATGTTAGGTGGACAGGCTTATGTTGAGGCCAAGATGGGCTTAGTGTTTCAGGACT
GGATGAGAAAGCAAGGTATACCTGATCGAGTTACTACTGAAGTGTATTGCAATGTCAAAAAGCA
TTAAACTTTATAAATCCAGATGAACTTTCAATGCAATGTATTCTCATTGCTCTAAACCGTTTTCTTC
AGGAAAAGCATGGTTCCAAGATGGCATTTTTAGATGGGAGCCCACCAGAAAGACTTTGCAAGCCA
ATTGTTGACCACATCGAGTCACTCGGTGGCCAAGTCAGAGTCAACTCACGAATACAAAAAATTGA
GTTAAACAAAGACGGAAGTGTCCGGAAGTTTCTATTGAGTGATGGGAATGTTCTAGAAGCTGATGC
    
```

TTATGTTTTTCGCTACCCCTGTTGACATTCTCAAGCTTCTTTTACCCGAAGAATGGAAACCAATTCCA  
 TATTTCAAAAAATTAGAGAAGTTAGTCGGTGTTCCTGTTATAAACGTTTCATATATGGTTTGACAGA  
 AAGCTGAAAAACACATATGATCACTTACTTTTCAGTAGGTACCTCTGCTGAGTGTGTATGCTGAC  
 ATGTCAGTGACATGTAAGGAATATTATGATCCGAATAAGTCAATGTTGGAGTTGGTTCTTGCTCCA  
 GCTGAGGAATGGATTTCAAGAAGTGACACTGATATTATTGATGCAACAATGAGTGAACTTTCAAG  
 GCTTTTTCTCTGATGAAATTGCAGCTGATCAAAGTAAAGCAAAAATCTTGAAATATAAAGTTGTTAA  
 AACACCAAGGTCTGTTTATAAACTGTTCCAGATTGTGAACCATGTCGACCCCTACAAAGATCTCC  
 AATCAAGGATTTTATTTATCTGGTGATTATACTAAACAAAAGTATTTGGCTTCAATGGGGGGTGC  
 TGTTTTATCTGGAAAAATTTGTGCACAAGCTATTTTACAAGATTATGAGATGCTTGCTACA (**SEQ  
 ID NO:53**).

Se sintetizaron polinucleótidos de ADN monocatenarios de 21 - 45 nucleótidos de longitud con las siguientes secuencias: taatagactcactatagggttggagcttaccCAAATGtac ("HL286", orientación sentido, **SEQ ID NO: 54**), taatagactcactataggaggccacgtcagcatttcattgttc ("HL287", orientación antisentido, **SEQ ID NO: 55**), ccatcaATGgtgcaggtaaaac ("HL288", orientación antisentido, **SEQ ID NO: 56**), catagaATGctcctccactg ("HL289", orientación antisentido, **SEQ ID NO: 57**) y caataaatttgcacattgggtaagctcaa ("HL290", orientación antisentido, **SEQ ID NO: 58**). Se elaboró una solución de ADNss con una mezcla a partes iguales de los cinco polinucleótidos en Silwet L-77 al 0,01% en tampón de fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8.

**167)**En los ensayos se usó lechuga de la variedad LS49 ("Green Tower". Se sumergieron dos hojas completamente expandidas de cada planta en una solución recién preparada de Silwet L-77 al 0,1% durante unos pocos segundos. Se dejaron secar las hojas durante 15-30 minutos. Después, se trató cada planta aplicando 20 microlitros de solución de ADNss a la superficie superior de dos hojas tratadas con Silwet (un total de 40 microlitros por planta). La **tabla 9** lista las condiciones de ensayo usadas y el blanqueamiento observado de las plantas tratadas por vía tópica con polinucleótidos de ADNss. La **figura 28** representa el progreso del blanqueamiento y la muerte de las plantas de lechuga tratadas con 1 nanomol de ADNss por planta a los (de arriba hacia abajo) 37, 46 y 60 días después del tratamiento.

**Tabla 9**

<b>Estadio del desarrollo</b>	<b>Cantidad de cada ADNss aplicado (nanomoles/planta)</b>	<b>Observación más temprana de blanqueamiento</b>
4 semanas después de la germinación, las plantas tienen 2 hojas completamente extendidas	1	3 semanas después del tratamiento
5 semanas después de la germinación, las plantas tienen 4 hojas completamente extendidas	4	4 días después del tratamiento

**168)**Los ensayos se repitieron con 2 o 4 nanomoles de ADNss aplicados por planta. La **figura 29A** ilustra el silenciamiento sistémico evidenciado por el blanqueamiento observado a los 4 o 12 días después del tratamiento tópico con polinucleótidos.

**169)**Los ensayos se repitieron usando cada ADNss antisentido individual ("HL287", **SEQ ID NO: 55**; "HL288", **SEQ ID NO: 56**; "HL289", **SEQ ID NO: 57**; y "HL290", **SEQ ID NO:58**) con 8 nanomoles de polinucleótido aplicados por planta; las plantas de control positivo se trataron con una mezcla de los cuatro ADNss antisentido individuales a 2 nanomoles cada uno (hasta un total de 8 nanomoles de polinucleótido aplicados por planta) y las plantas de control negativo se trataron solo con tampón. La **figura 29B** ilustra el silenciamiento sistémico evidenciado por blanqueamiento observado a el día 4 después del tratamiento tópico con los ADNss antisentido.

**Ejemplo 25**

**170)**Este ejemplo ilustra un aspecto de la invención. En este ejemplo, se trató a plantas en crecimiento con una composición aplicada por vía tópica para inducir el silenciamiento sistémico de un gen diana en una planta que incluye (a) un agente para condicionar una planta a la permeación por polinucleótidos y (b) polinucleótidos que incluyen al menos una hebra de polinucleótido que incluye al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos

del gen diana en orientación con sentido o antisentido. Más específicamente, este ejemplo demuestra el uso de polinucleótidos aplicados por vía tópica para inducir el silenciamiento sistémico de un gen de fitoeno desaturasa (PDS) en un cultivo de hortalizas, es decir, tomate (*Solanum lycopersicum*).

171)PDS de tomate tiene la secuencia

GGGTTTATCTCGCAAGTGTGGCTATGGTGGGACGTGTCAAATTTTGGATTGTAGCCAAACATGAGA  
 TTGATTTAAAGGGAATTGGCCAAATCACCAGAAAGCAGGCATCTTCATCATAAATTAGTTTGTTTA  
 TTTATACAGAATTATACGCTTTTACTAGTTATAGCATTCCGGTATCTTTTTCTGGGTAAGTCCCAAAC  
 CACCACAAATTTCAAGTTTCCATTTAACTCTTCAACTTCAACCCAAACCAAATTTATTTGCTTAATTG  
 TGCAGAACCCTCCCTATATCTTCTAGGTGCTTTCATTCCGTTCCGAGTAAAATGCCTCAAATTTGGAC  
 TTGTTTCGCTGTTAACTTGAGAGTCCAAGGTAGTTCAGCTTATCTTTGGAGCTCGAGGTGCTCTTC  
 TTTGGAACTGAAAGTCGAGATGGTTGCTTGCAAAGGAATTCGTTATGTTTTGCTGGTAGCGAATC  
 AATGGGTGATAAGTTAAAGATTTCGTACTCCCCATGCCACGACCAGAAGATTGGTTAAGGACTTGG  
 GGCCTTTAAAGGTGCTATGCATTGATTATCCAAGACCAGAGCTGGACAATACAGTTAACTATTTGG  
 AGGCTGCATTTTTATCATCAACGTTCCGTGCTTCTCCGCGCCAACTAAACCATTGGAGATTGTTAT  
 TGCTGGTGCAGGTTTGGGTGGTTTGTCTACAGCAAATATTTGGCAGATGCTGGTCACAAACCGAT  
 ACTGCTGGAGGCAAGGGATGTTCTAGGTGGAAAGGTAGCTGCATGGAAAGATGATGATGGAGATT  
 GGTACGAGACTGGTTTGCATATATTCTTTGGGGCTTACCCAAATATTCAGAACCCTGTTTGGAGAAT  
 TAGGGATTAACGATCGATTGCAATGGAAGGAACATTCAATGATATTTGCAATGCCAAGCAAGCCA  
 GGAGAATTCAGCCGCTTTGATTTCTCCGAAGCTTTACCCGCTCCTTTAAATGGAATTTTAGCCATCT

5

TAAAGAATAACGAAATGCTTACATGGCCAGAGAAAGTCAAATTTGCAATTGGACTCTTGCCAGCA  
 ATGCTTGGAGGGCAATCTTATGTTGAAGCTCAAGATGGGATAAGTGTAAAGACTGGATGAGAAA  
 GCAAGGTGTGCCGGACAGGGTGACAGATGAGGTGTTCATTGCTAIGTCAAAGGCATCAACTTTTAT  
 AAACCCGACGAACTTTCAATGCAGTGCATTTTGTATCGCATTGAACAGGTTTCTTCAGGAGAAACA  
 TGGTTCAAAAATGGCCTTTTTAGATGGTAATCCTCCTGAGAGACTTTGCATGCCGATTGTTGAACA  
 CATTGAGTCAAAAAGGTGGCCAAGTCAAGACTGAACTCACGAATAAAAAAGATTGAGCTGAATGAGG  
 ATGGAAGTGTCAAAGAGTTTTATACTGAGTGCAGGTAGTGCATTCGAGGGAGATGCTTTTGTGTTTG  
 CCGCTCCAGTGGATATTTTCAAGCTTCTATTGCCTGAAGACTGGAAAGAGATCCATATTTCCAAA  
 AGTTGGAGAAAGTTAGTCCGGAGTACCCTGIGATAAAATGACATATATGGTTTGGACAGAAAACGGAAG  
 AACACATATGATCATTGCTCTTCAGCAGAAGCTCACTGCTCAGTGTGATGCTGACATGTCTGTTA  
 CATGTAAGGAATATTTACAACCCCAATCAGTCTATGTTGGAAATTTGGTTTTTGCACCTGCAGAAGAGT  
 GGATATCTCGCAGCGACTCAGAAAATTTATGATGCAACGATGAAGGAACATAGCAACGCTTTTTCTG  
 ATGAAATTTTCAGCAGATCAAAGCAAAAGCAAAAATTTGAAGTACCATGTTGTCAAACCTCCGAGG  
 TCTGTTTATAAAACTGTGCCAGGTTGTGAACCCTGTCCGCCCTTACAAAGATCCCCAATAGAGGGG  
 TTTTATTTAGCCGGTACTACACGAAACAGAAATACTTGGCTTCAATGGAAGGCGCTGTCTTATCA  
 GGAAAGCTTTGTGCTCAAGCTATTGTACAGGATTATGAGTTACTTGTGGACGTAGCCAAAAGAAG  
 TTGTCGGAAGCAAGCGTAGTTTTAGCTTTGTGGTTATTAATTTAGCTTCTGTACACTAAAATTTATGATG  
 CAAGAAGCGTTGTACACAACATATAGAAGAAGAGTGCAGAGTGAAGCAAGTAGGAGAAAATGTTA  
 GGAAAGCTCCTATACAAAAGGATGGCATGTTGAAGATTAGCATCTTTTTAATCCCAAGTTTAAATA  
 TAAAGCATATTTTATGTACCCTTTCTTTATCTGGGGTTTGTAAATCCCTTTATATCTTTATGCAATCT  
 TTACGTTAGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGA (SEQ ID NO:59).

172)Un polinucleótido de ARNbc de 201 nucleótidos con una hebra antisentido capaz de hibridar con el ARN codificado por la secuencia

TCGCAGCGACTCAGAAATTATTGATGCAACGATGAAGGAAGTAGCAACGCTTTTTTCTGATGAAAT  
 TTCAGCAGATCAAAGCAAAGCAAAAATATTGAAGTACCATGTTGTCAAAACTCCGAGGTCTGTTTA  
 TAAAAGTGTGCCAGGTTGTGAACCCGTTCGGCCTTTACAAAGATCCCCAATAGAGGGGTTTTATT  
 AG (SEQ ID NO:60)

que corresponde a los nucleótidos en las posiciones 1724 - 1923 del ARNm transcrito a partir de la secuencia del gen PDS de tomate (SEQ ID NO: 59) se sintetizó mediante RT PCR usando cebadores oligonucleotídicos con las secuencias TAATACGACTCACTATAGGGTCGCAGCGACTCAGAAATTATTG (SEQ ID NO: 61, cebador con sentido) y TAATACGACTCACTATAGGGGTTAAAGGCCGACAGGGTTCACAACC (SEQ ID NO: 62, cebador antisentido). Se preparó una solución de ARNbc 2,5 micromolar con el polinucleótido de ARNbc de 201 nucleótidos (SEQ ID NO: 60) en Silwet L-77 al 0,01% en tampón de fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8.

173) Se trataron plántulas de tomate de tres semanas de edad del modo siguiente. Se sumergieron dos hojas completamente expandidas en una solución recién preparada de Silwet L-77 al 0,1 % durante unos pocos segundos. Se dejaron secar las hojas de 30 minutos a 1 hora. Después, se trató cada planta aplicando 20 microlitros de solución de ARNbc a la superficie superior de dos hojas tratadas con Silwet (un total de 40 microlitros por planta). Las plantas de control se trataron con tampón. Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento para su observación. La figura 30 ilustra el silenciamiento sistémico del gen diana PDS evidenciado por el blanqueamiento de las plantas tratadas con ARNbc 30 días después del tratamiento tópico. Las plantas tratadas con ARNbc presentaron un retraso del crecimiento grave, en comparación con las plantas de control.

#### Ejemplo 26

174) Este ejemplo ilustra una mejora de las composiciones herbicidas adaptadas para recubrimiento tópico sobre la superficie exterior de una planta en crecimiento, donde el agente letal para la planta incluye polinucleótidos que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a secuencias de uno o más genes vegetales o secuencia de ADN transcrito a partir de los genes vegetales. Los polinucleótidos efectúan un silenciamiento sistémico del vegetal en los órganos o tejidos vegetales distintos de aquellos que recibieron la aplicación tópica de polinucleótido. Más específicamente, este ejemplo ilustra una composición herbicida adaptada para recubrimiento sobre la superficie exterior de una planta en crecimiento que comprende un tensoactivo y al menos un agente letal para la planta que incluye combinaciones de polinucleótidos que tienen una secuencia que se dirige al gen de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), un factor de iniciación de la transcripción (TIF) y ATPasa dependiente de ADN (ddATPasa) en almizcle.

175) La composición herbicida incluye al menos uno de los siguientes polinucleótidos de ARN bicatenarios de 21 pares de bases:

(1) nDsRNA1: hebra con sentido CUACCAUCAACAAUGGUGUCC (SEQ ID NO: 63) y hebra antisentido GGACACCAUUGUUGAUGGUAG (SEQ ID NO: 64)

(2) nDsRNA3: hebra con sentido GUCGACAACUUGCUGUAUAGU (SEQ ID NO: 65) y hebra antisentido ACUAUACAGCAAGUUGUCGAC (SEQ ID NO: 66)

(3) nDsRNA4: hebra con sentido GGUCACCUGGACAGAGAAUAG (SEQ ID NO: 67) y hebra antisentido CUAUUCUCUGUCCAGGUGACC (SEQ ID NO: 68)

(4) nDsRNA5: hebra con sentido AAUGCCAGAUGUUGCUAUGAC (SEQ ID NO: 69) y hebra 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 anteriores que tienen las SEQ ID NO: 63-70. En otra realización, la composición herbicida incluye polinucleótidos de ADN monocatenario con secuencias de desoxirribonucleótidos correspondientes a una o más de las secuencias de ARNbc de las SEQ ID NO: 63-70. En otra realización, la composición herbicida incluye híbridos de ADN/ARN con secuencias de nucleótidos correspondientes a una o más de las secuencias de ARNbc de las SEQ ID NO: 63-70. En otra realización, la composición herbicida incluye polinucleótidos de ARNbc donde los hidroxilos 2' están metilados para su estabilidad.

177) La composición herbicida incluye un tensoactivo, tal como Silwet L-77 (u otros tensoactivos eficaces, tales como aquellos 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 aquellos proporcionados en el ejemplo 35) para mejorar el rendimiento del herbicida, por ejemplo, potenciando la transferencia del polinucleótido al 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 secuencias esencialmente idénticas o complementarias a la secuencia de un segundo gen o a la secuencia de ARN transcrito a partir del segundo gen, en la que la regulación del segundo gen proporciona una potenciación sistémica 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 de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de almizcle o a la secuencia de ARN transcrito a partir del gen EPSPS endógeno así como polinucleótidos que tienen secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia del gen del factor de iniciación de la traducción (TIF) endógeno del almizcle o a la secuencia de ARN transcrito a partir del gen de TIF endógeno. El factor de iniciación de la traducción (TIF) es una proteína de cloroplastos codificada en el núcleo que es esencial para iniciar la síntesis de proteínas y se expresa por toda la planta. *Arabidopsis thaliana* tiene un ortólogo denominado AT1G17220.1 (descrito en la base de datos disponible al público The Arabidopsis Information Resource que se encuentra en línea en [www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=AT1G17220](http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=AT1G17220)) y con el número de referencia de GenBank asignado GI:186478573, que se ha identificado como una proteína ubicada en cloroplastos con similitud con el factor de iniciación de la traducción 2; véase también Miura y col. (2007) *Plant Cell*, 19:1313-1328 para una descripción de este gen. Las secuencias de TIF se identificaron a partir de almizcle (*Amaranthus palmeri*); se identificó que un gen de TIF tenía la secuencia de la **SEQ ID NO: 71**. Los ejemplos de polinucleótidos para la supresión de este gen de TIF en *Amaranthus palmeri* se listan en la **tabla 10**.

Tabla 10

Polinucleótido	Posición en la secuencia de TIF	Secuencia	SEQ ID NO.
TIF de almizcle	Secuencia completa de la SEQ ID NO: 71	ATGGCAACAATGGCTTCCCTAGTGAGTTTGGGAAGCTCTGGAG CAACTTGGTCAGGGCAATTTGGAGGTTTCCTTTTCATTTGGTTAAG AAAATTACATTTGCCTAGAAGAAAATTGTAGTTGCAATTTTAGGCA ATTAGGAGGGGGGAGGAGATGGCGTTACGTTTCGGTGTGTAGA CTTTCTGTCACTACTGATTATGTTTCTGAGCAAGGAAATGCTGT TTTCTTTGAAAAATGCATATAGTGTAGAGTAAAGAAGAGGGTCTC ATCTTGAAGCCTTCTCCTAAGCCGGTTTTGAAATCCGGGTCTGA TGGAAAATCGGAAATTTGGGGAGAGTTCCGGTGGCGTTTTCGAGT AATGGGAAATTTGGATAATGTAGAGGAGAGGAAGAAGGTTATTG ATTATTTGGAATGAGGTATTAGAAAAGGCCGAGAGATTAGAAAAC GGCGAACTTACAAGCAGATAATAGAAAAGGATAGCACAAATGTA AAATAAACCGTCTCCGAGTGTAAAGTAGTTCAACCAAATGGTAAAC CTGTAATAATTTGAACAAAGGGAAAGCCTAAAGCTGCGAAGAG CGTTTGGAGAAAAGGAAAATCCAGTTTCTACTGTGCAAAAAGTA GTGCAAGAATCTCCGAAGATTGAAAAGGTTGAGAGAGTGGAAAG CTCGAACGACCAGCCAATCGTCTGAAAACGATAAGACCCCCAGT GCCACTACAGAGGCCTGAGATTAAGTTGCAGGCAAAAGCCTTCT ACTGCTCTCCACCCATGCCTAAGAAGCCGGTTTTGAAGGATGT GGGGATGTCTCCAGAGCTGATGGGAAGGACCAGTCTGTGAAA TCTAAAAGAGAGGAAGCCTATTCTTAGTGGACAAAATTTGGCCACA AGAAGGCATCAGTTGATCCGTCGATTGCTCAAGCAGTAATTGC CCCACCAAACCCTGCTAAAATTTCCCTTCTGGAAAAGTTTAAAGATG ATTATCCGAAGAAGGGTCTTGCAGCTGGTGGGCCGAAGAGGCCG TATGGTCAATGATGATGATATTGAAAATGCATGAAGACACTTCA GAGCTCGGTCTTTCTATTCCCTGGTGTGCTACGGCTCGGAAAGG CAGGAAAATGGAGTAAAGCAAGTCCGCAAGGCTGCCAGACCCA AGCAGCTAGAGATGCCGCTCCTGTTAAAGTGAAATCTTAGAG GTTGAAGAAAAGGGCATGTGACCGAAGAATTAGCATACAACCT TGGCTATTAGCGAAGGTGAAAATCTTTGGGTACCTGTATTCTAAG GGGATAAAACCAGATGGTGTGCAAACTCTTGACAAGGCAATGG TAAAGATGATATGTGAAAGATATGACGTGGAGGTTTTTGACGC ACTTTCTGAACAAATGGAAGAAAATGGCTCGAAAAGAAGGAAATT TTGACGAAGATGACCTTGACAAGCTTTGAAGATAGGCCCTCCCTG TGCTTACTATAATGGGTCTATGTAGATCATGGCAAGACGACCCCTT CTGGATTTATATACGGAAGAGCAAGGTTGCTGCTTCTGAAGCTG GTGGGATTACACAAGGTATTGGTGTCTATAAAGTGGAAGTACC GGTGATGGCAAGTTGCTGCTTTGTTCTTTCTTGACACTCCCG GACACGAGGCGTTCCGGGCAATGAGGGCTCGTGGAGCAAGAGT GACAGATAATTGCTATTATAGTTGTAGCTGCTGACGATGGGATCC GTCTCAAACAAATGAAGCCATAGCACATGCAAAAGCAGCTGG TGTACCTATTGTGGTTGCAATTAATAAGATTGACAAGGATGGG GCTAATCCCGACCGTGTGATGCAAGAGCTTTCATCAATTTGGTCT AATGCCAGAGGATTTGGGGTGGTGTATACCCCAATGGTCAAGATA AGTGTCTTAAAAGGTGAAAATGTGGACGAGTTACTCGAGACAG CCAATGCTTGTCCCGAGTTGCAAGAGTTAAAGGCTAATCTTCAG AGGAACGCTAAGGGCACTGTAATTTGAGGCTGGTCTTCATAAAT	71

(continuación)

Polinucleótido	Posición en la secuencia de TIF	Secuencia	SEQ ID NO.
		<p>CAAAAGGACCCATTGCCACTTTTATTGTGCAGAATGGTACCCTC                      AAACAAGGGGATACTGTAGTTTGTGGGAAGCATTGGGAAGG                      TTCGTGCCCTATTTGATCACGGAGGGAATCGCGTTGATGAAGCT                      GGTCCATCTATTTCCCGTGCAGGTTATTGGATTGAATAATGTTCC                      TTTTGCCGGTGATGAGTTCGAGGTAGTGAGTCCCTTGATATAG                      CTCGTGAAAAGGCAGAGGTCCGTGCAGAGTCTTTACGAAATGA                      GCGTATAGCTGCTAAGGCCGAGACGGAAAGGTTACGCTGTCA                      TCCTTGGCATCGGCTGTTTCTTCAGGGAAGATGGCTGGTTTGA                      TTTGCACCAGTTAAATAATCATTTTGAAGGTTGATGTTGAGGAT                      CAATCGAGGCAATGAGGCAAGCTCTAGAAGTTCTTCTCAAGA                      TAACGTCACCTTGAAGTTCTCTTACAAGCGACCGGAGATGTTA                      CTACAAGTGATGTTGATCTTGCAGTTGCTAGTAAAGCTATTATC                      TTGGGGTTCAATGTGAAGGCACCAGGTTCTGTGCGAAAAATTAG                      CAGATAACAAAGGTGTTGAAATTCGGCTTTATAAAGTCATTTAT                      GATCTAATTGACGACATGCGGAGTGCAATGGAAGGAATGCTAG                      ATCCCGTTGAGGAACAAGTTGCAATTGGTTCAGCCGAAGTGCG                      GGCTACATTCAGTAGTGGTAGTGGCCGTGTCGCTGGATGCATG                      GTGACCGAGGGAAAAGATTACCAAAGGCTGTGGGATTCGAGTGA                      TACGGAAGGGAAAACTGTCCACGTTGGAGTTCTTGATTGTTG                      CGTCGAGTAA</p>	
ADN de 200 pb	341-541	<p>TTTCGAGTAATGGGAAATTGGATAATGTAGAGGAGAGGAAGAA                      GGTATTGATTCATTGGATGAGGTATTAGAAAAGGCCGAGAGA                      TTAGAAACGGCGAACTTACAAGCAGATAATAGAAAGGATAGCA                      CAAATGTAATAAACCGTCTCCGAGTGTAAGTAGTTCAACCAA                      TGTAAACCTGTAATAATTTGAACAAA</p>	72
ARNbc de 160 pb	342-501	<p>Sentido:</p> <p>UUCGAGUAAUGGGAAAUUGGAUUAUGUAGAGGAGAGGAAGA                      AGGUUAUUGAUUCAUUGGAUGAGGUAAUAGAAAAGGCCGAG                      AGAUUAGAAACGGCGAACUUACAAGCAGAUAAUAGAAAGGA                      UAGCACAAAUGUAAAUAACCGUCUCCGAGUGUAAAGU</p>	73
		<p>Antisentido:</p> <p>ACUUACACUCGGAGACGGUUUAUUUACAUUUGUGCUAUCCUU                      UCUAUUAUCUGCUUGUAAGTUUCGCCGUTUUCUAAUCUCUCGGC                      CUUUUCUAAUACCUCAUCCAAUGAAUCAAUAAACCUUCUUCU                      CUCCUCUACAUUAUCCAAUUIUCCCAUUAACUCGAA</p>	74
ADN antisentido TIF_AS1	555-576	ATTTCTCCAAACGCTCTTCGCA	75
ADN antisentido TIF_AS2	342-363	ATCCAATTTCCCATTACTCGAA	76
ADN antisentido TIF_AS3	412-433	GTTTCTAATCTCTCGGCCTTTT	77
ADN antisentido TIF_AS4	488-509	TTGAACTACTTACACTCGGAG	78
ADN antisentido TIF_AS5	368-389	TAACCTTCTTCCTCTCCTCTA	79



(continuación)

Polinucleótido	Posición en la secuencia de TIF	Secuencia	SEQ ID NO.
ADN antisentido TIF_AS6	790-811	GTCCTTCCCATCAGCTCTGGA	80
ADN antisentido TIF_AS7	1052-1073	CGTAGCAGCACCAGGAATAG	81
ADN antisentido TIF_AS8	1655-1676	CAGCAGCTACAAC TATAATAG	82

5 180) En una realización, la composición herbicida incluye una mezcla de al menos dos de los polinucleótidos de ARNbc de EPSPS anteriores que tienen las **SEQ ID NO: 63-70** y también al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia del gen de factor de iniciación de la traducción (TIF) endógeno de almizcle o a la secuencia de ARN transcrita a partir del gen de TIF endógeno, tales como aquellas proporcionadas en la tabla 10. En una realización específica, la composición herbicida incluye una mezcla de los cuatro polinucleótidos de ARNbc de EPSPS anteriores que tienen las **SEQ ID NO: 63-70** y un polinucleótido de ARNbc bicatenario de TIF de 160 pares de bases que tiene la secuencia con sentido de

UUCGAGUAAUGGGAAAUUGGAUAAUGUAGAGGAGAGGAAGAAGGUUAUUGAU  
UCAUUGGAUGAGGUAAUAGAAAAGGCCGAGAGAUUAGAAACGGCGAACCUAC  
AAGCAGAUAAUAGAAAGGAUAGCACAAAUGUAAAUAACCGUCUCCGAGUGU  
AAGU (**SEQ ID NO. 73**)

y la secuencia antisentido de

10 ACUACACUCGGAGACGGUUUAUUACAUIUGUGCUAUCCUUCUAUUAUCU  
GCUUGUAAGUUCGCCGUUUCUAAUCUCUCGGCCUUUUCUAAUACCUCAUCCAA  
15 UGAAUCAAUAAACCUUCUUCUCCUCUCCUCUACAUIAUCCAAUUCUCCAUUACUCG  
AA (**SEQ ID NO. 74**).

181) En algunas realizaciones, los polinucleótidos se diseñan para regular múltiples genes diana, dando como resultado un efecto sinérgico en la actividad herbicida. Por ejemplo, se obtuvo un efecto sinérgico en la actividad herbicida por tratamiento de una planta con polinucleótidos diseñados para suprimir un factor de iniciación de la traducción (TIF) y una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) seguido de tratamiento con el herbicida no polinucleotídico glifosato.

182) Los polinucleótidos listados en la **tabla 11** se produjeron mediante síntesis o mediante transcripción *in vitro*.

Tabla 11

Nombre	Comentarios	Secuencias de nucleótidos
IDT [1]		Sentido: CUACCAUCAACAUGGUGUCCAUAC (SEQ ID NO: 83) Antisentido: GUAUGGACACCAUUGUUGAUGGUAGUA (SEQ ID NO: 84)
IDT [2]	ARNbc de Palmer/EPSPS con dos 2-desoxirribonucleótidos (con texto en <b>subrayado y negrita</b> ) en el extremo 3' de la hebra sentido (25-mero) y un 2-nucleótido	Sentido: AGUUGGUGGCAAUCAUAUUGTTI (SEQ ID NO: 85) Antisentido: AACAAUUGAUGAUUGCCCAACACUCU (SEQ ID NO: 86)
IDT [3]		Sentido: GGUCGACAACUUGCUGUAUAGUGAT (SEQ ID NO: 87) Antisentido: AUCACUAUACAGCAAGUUGUCGACCCUC (SEQ ID NO: 88)
IDT [4]	saliente en el extremo 3' de la hebra antisentido (27-mero); sintetizado químicamente por IDT	Sentido: UGCAAGGUCACCUGGACAGAGAATA (SEQ ID NO: 89) Antisentido: UAUUCUCUGUCCAGGUGACCUUGCAAC (SEQ ID NO: 90)
IDT [5]	ARNbc de Palmer/EPSPS (21-mero) con extremos romos; sintetizado químicamente por IDT	Sentido: AACAUAGAAACAAAUGCCAGAU (SEQ ID NO: 91) Antisentido: AUCUGGCAUUUUGUUAUGUU (SEQ ID NO: 92)
IDT romo[1]		1S-Antisentido GUAUGGACACCAUUGUUGAUGGUAGUA (SEQ ID NO: 93) 1S-Sentido UACUACCAUACAACAUGGUGUCCAUAC (SEQ ID NO: 94)
IDT romo[2]		2S-Antisentido AAUAAUUGAUGAUUGCCCAACUCU (SEQ ID NO: 95) 2S-Sentido AGAGUUGGUGGGCAAUCAUCAUUAUU (SEQ ID NO: 96)
IDT romo[3]	ARNbc de Palmer/EPSPS (27-mero) con <b>extremos romos</b> ; sintetizado mediante transcripción de T7 <i>in vitro</i>	3S-Antisentido AUCACUAUACAGCAAGUUGUCGACCCAC (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]		1S-Antisentido gGUAUGGACACCAUUGUUGAUGGUAGUAC (SEQ ID NO: 101) 1S-Sentido GCUACCAUCAACAUGGUGUCCAUACCCAC (SEQ ID NO: 102)
3OH [2]		2S-Antisentido gAAGAAUUGAUGAUUGCCCAACUCAC (SEQ ID NO: 03) 2S-Sentido GAGUUGGUGGGCAAUCAUCAUUAUUCAC (SEQ ID NO: 104)
3OH [3]	ARNbc de Palmer/EPSPS (27-mero) con <b>salientes 3'</b> ; sintetizado mediante transcripción de T7 <i>in vitro</i>	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 GUGCAAGGUCACCUUGGACAGAGAAUACAC (SEQ ID NO: 108)

(continuación)		Secuencias de nucleótidos
Nombre	Comentarios	
IDT HP [1]		1S- GUAUGGACACCAUUGUUGAUGGUAAGAAUAUACUACCAUACA UGGUGUCCAUAC (SEQ ID NO. 109)
IDT HP [2]	hebra única de ARN de Palmer/EPSPS diseñado para que auto-hibride formando una horquilla, que contiene secuencia antisentido en el brazo 5' y secuencia antisentido en el brazo 3', con un bucle de tetranucleótido GAAA intermedio; sintetizado químicamente por IDT	2S- .AUAAUUGAUGAUUGCCACCAACUCUGAAAAGAGUUGGUGGGCAUUC UCAAUUUUU (SEQ ID NO. 110)
IDT HP [3]		3S- AUCACUAUACAGCAAGUUGUGGACCACGAAAGUUGUCGACAAACUUG CUGUUAGUGAU (SEQ ID NO. 111)
IDT HP [4]		4S- UAUUUCUUGUCCAGGUGACCUUGCAACGAAAGUUGCAAGGUCACC UGGACAGAGAAUA (SEQ ID NO. 112)
[TIF]	Palmer/traducción	Sentido:  DUUGAGUAUUGGGAAUUGGAUAUUGUAGAGGAGGAGGAAGAGGUU AUUGAUUCAUUGGAGGUAUUAGAAAAGCCGAGAGAUUAGAAA CGGGAAAUUACAAGCAGAUAAUAGAAAAGGAUAGCACAAAUGUAAA AAACCGUCUCCGAGUGUAAGU (SEQ ID NO. 73) Antisentido: ACUUACACUUGGAGACGGUUUUUUUUACAUUUUGUCUACUUUCUUAU UAUCUGCUUGUAAGUUCGCCGUUUUCUAAUCUCUGGCCUUUUUCUAAU ACCUCAUCCAUAUGAAUCAAAUACCUUUCUCCUCCUACAUUAUC CAUUUCCCCAUUACUCGAA (SEQ ID NO. 74)
[ddATPasa]	ARNbc de Palmer/ATPasa dependiente de ADN (ddATPasa) (168-mero) sintetizado mediante transcripción de T7 <i>in vitro</i>	Sentido: GADCACAAUUUGCCGGUUUUAUGAUCAAAUACGGAACAUAAGACAGA UACACUUUGAACACCAUGAUGGCAUUUGGGUUGUUGUUCUGGUCGU UUGGAGUAUUCUCCUAGUUGAUGCAGGUAAGUAUGACUGCAAUAA AUGUGGGGCUAUCCUUGGGUCCUUUUUU (SEQ ID NO. 113)

(continuación)

Nombre	Comentarios	Secuencias de nucleótidos
		<p>Antisentido:</p> <p>AAAAGGGACCCAGGAUAGCCCCACAUUUUUUUGCCAGUCAUACUUCAC            CUGCAUCAMCUGAGGGAAUACUCCAGAACGACGAGUAACCCACACCCC            CAUUGCGAAUACAUGGGUUAAGUGUAUCUGUCUUUAUGUUCGGUATUU            UGAUCAUAAACCCGGCAAUUUUGAUC (<b>SEQ ID NO. 114</b>)</p>

183) Se prepararon soluciones de los polinucleótidos y se aplicaron a las hojas de amaranto de palma usando los protocolos descritos en la tabla 12.

**Tabla 12**

Número de protocolo (descripción)	Protocolo
<b>1 (1-etapas manual)</b>	1. Aplicar mezcla de polinucleótidos de Silwet L-77 al 1%, sulfato de amonio al 2% en tampón de fosfato de sodio 10 milimolar, pH 6,8 (o solución de control de tampón de Silwet L-77 al 1 %, sulfato de amonio al 2% en tampón de fosfato de sodio 10 milimolar, pH 6,8) mediante pipeteado manual 2. 48 o 72 horas después, se pulveriza glifosato ("Wmax 2X" o 1682 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®) mediante un pulverizador normal (93,53 litros/hectárea, 10 galones/acre)
<b>2 (1-etapa pulverizador)</b>	1. Pulverizar mezcla de polinucleótidos de Silwet L-77 al 1%, sulfato de amonio al 2% en tampón de fosfato de sodio 10 milimolar, pH 6,8 (o solución de control de tampón de Silwet L-77 al 1 %, sulfato de amonio al 2% en tampón de fosfato de sodio 10 milimolar, pH 6,8) mediante pulverizador Milli 2. 48 o 72 horas después, se pulveriza glifosato ("Wmax 2X" o 1682 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®) mediante un pulverizador normal (93,53 litros/hectárea, 10 galones/acre)
<b>3 (2-etapas manual)</b>	1. Pulverizar Silwet al 1% como 1ª etapa mediante un pulverizador normal o un pulverizador Milli; 2. Aplicar mezcla de polinucleótidos de Silwet L-77 al 1%, sulfato de amonio al 2% en tampón de fosfato de sodio 10 milimolar, pH 6,8 (o solución de control de tampón de Silwet L-77 al 1 %, sulfato de amonio al 2% en tampón de fosfato de sodio 10 milimolar, pH 6,8) mediante pipeteado manual 3. 48 o 72 horas después, se pulveriza glifosato ("Wmax 2X" o 1682 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®) mediante un pulverizador normal (93,53 litros/hectárea, 10 galones/acre)
<b>4 (2-etapa pulverizador)</b>	1. Pulverizar Silwet al 1% como 1ª etapa mediante un pulverizador normal o un pulverizador Milli; 2. Pulverizar mezcla de polinucleótidos de Silwet L-77 al 1%, sulfato de amonio al 2% en tampón de fosfato de sodio 10 milimolar, pH 6,8 (o solución de control de tampón de Silwet L-77 al 1 %, sulfato de amonio al 2% en tampón de fosfato de sodio 10 milimolar, pH 6,8) mediante pulverizador Milli 3. 48 o 72 horas después, se pulveriza glifosato ("Wmax 2X" o 1682 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®) mediante un pulverizador normal (93,53 litros/hectárea, 10 galones/acre)
<b>5 (mezcla de tanque)</b>	Pulverizar mezcla de polinucleótidos de Silwet L-77 al 1 %, sulfato de amonio al 2% en tampón de fosfato de sodio 10 milimolar, pH 6,8 que contiene glifosato a 1682 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX® (o solución de tampón de control de Silwet L-77 al 1%, sulfato de amonio al 2% en tampón de fosfato de sodio 10 milimolar, pH 6,8 que contiene glifosato a 1682 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®) mediante pulverizador Milli.

184) Se ensayaron combinaciones de polinucleótidos como se indica en la **tabla 13**.

5

**Tabla 13**

Polinucleótidos aplicados en combinación	SEQ ID NO.	Protocolo	Cantidad aplicada de cada polinucleótido (g/acre)	Polinucleótido total aplicado (g/acre)	Número de copias de EPSPS*	Resultados**
IDT [1]	<b>83,84,</b>	1	0,29	0,87	112	75% eliminadas (27 DAT)
IDT [3]	<b>87,88</b>		0,29			
IDT [4]	<b>89,90</b>		0,29			
IDT [1]	<b>83,84,</b>	1	0,29	1,4	112	100% eliminadas (27 DAT)
IDT [3]	<b>87,88</b>		0,29			

ES 2 641 642 T3

(continuación)

Polinucleótidos aplicados en combinación	SEQ ID NO.	Protocolo	Cantidad aplicada de cada polinucleótido (g/acre)	Polinucleótido total aplicado (g/acre)	Número de copias de EPSPS*	Resultados**
IDT [4]	89,90		0,29			
[TIF]	73,74		0,50			
IDT [1]	83,84,	1	0,29	1,37	112	11,2% con retraso en el crecimiento (27 DAT)
IDT [3]	87,88		0,29			
IDT [4]	89,90		0,29			
[ddATPasa]	113.114		0,50			
IDT [1]	83,84,	1	0,29	1,87	112	100% eliminadas (27 DAT)
IDT [3]	87,88		0,29			
IDT [4]	89,90		0,29			
[TIF]	73,74		0,50			
[ddATPasa]	114.114		0,50			
IDT [1]	83,84,	1	0,29	1,2	112, 36	0% control (11 DAT); 0% control (31 DAT)
IDT [2]	85,86		0,29			
IDT [3]	87,88		0,29			
IDT [4]	89,90		0,29			
IDT [1]	83,84,	1	1,4	5,8	112, 36	0% control (11 DAT); 15% con retraso en el crecimiento (31 DAT)
IDT [2]	85,86		1,4			
IDT [3]	87,88		1,4			
IDT [4]	89,90		1,4			
IDT [1]	83,84,	1	2,9	12	112, 36	0% control (11 DAT); 35% con retraso en el crecimiento (31 DAT)
IDT [2]	85,86		2,9			
IDT [3]	87,88		2,9			
IDT [4]	89,90		2,9			
IDT [1]	83,84,	1	5,8	23	112, 36	51% con retraso en el crecimiento (11 DAT); 100% con retraso en el crecimiento (31 DAT)
IDT [2]	85,86		5,8			
IDT [3]	87,88		5,8			
IDT [4]	89,90		5,8			
IDT [1]	83,84,	2	0,29	1,2	33, 54	9% con retraso en el crecimiento (6 DAT)
IDT [2]	85,86		0,29			
IDT [3]	87,88		0,29			

ES 2 641 642 T3

(continuación)

Polinucleótidos aplicados en combinación	SEQ ID NO.	Protocolo	Cantidad aplicada de cada polinucleótido (g/acre)	Polinucleótido total aplicado (g/acre)	Número de copias de EPSPS*	Resultados**
IDT [4]	<b>89,90</b>		0,29			
IDT [1]	<b>83,84,</b>	2	5,8	23	33, 54	100% eliminadas (6 DAT)
IDT [2]	<b>85,86</b>		5,8			
IDT [3]	<b>87,88</b>		5,8			
IDT [4]	<b>89,90</b>		5,8			
IDT [1]	<b>83,84,</b>	2	0,29	0,87	33, 54	20% con retraso en el crecimiento (6 DAT)
IDT [3]	<b>87,88</b>		0,29			
IDT [4]	<b>89,90</b>		0,29			
IDT [1]	<b>83,84,</b>	2	5,8	17	33, 54	100% eliminadas (6 DAT)
IDT [3]	<b>87,88</b>		5,8			
IDT [4]	<b>89,90</b>		5,8			
IDT [5]	<b>91,92</b>	1	0,29	0,29	34, 36, 54	14,1% con retraso en el crecimiento (22 DAT)
IDT [5]	<b>91,92</b>	1	2,9	2,9	34, 36, 54	100% muertas (22 DAT)
IDT [1]	<b>83,84,</b>	1	2,9	12	34, 36, 54	100% eliminadas (22 DAT)
IDT [2]	<b>85,86</b>		2,9			
IDT [3]	<b>87,88</b>		2,9			
IDT [4]	<b>89,90</b>		2,9			
IDT [1]	<b>83,84,</b>	1	2,9	14	34, 36, 54	100% eliminadas (22 DAT)
IDT [2]	<b>85,86</b>		2,9			
IDT [3]	<b>87,88</b>		2,9			
IDT [4]	<b>89,90</b>		2,9			
IDT [5]	<b>91,92</b>		2,9			
IDT [1]	<b>83,84,</b>	1	2,9	8,7	34, 36, 54	100% eliminadas (22 DAT)
IDT [3]	<b>87,88</b>		2,9			
IDT [4]	<b>89,90</b>		2,9			
IDT [1]	<b>83,84,</b>	1	2,9	12	34, 36, 54	100% eliminadas (22 DAT)
IDT [3]	<b>87,88</b>		2,9			
IDT [4]	<b>89,90</b>		2,9			
IDT [5]	<b>91,92</b>		2,9			

ES 2 641 642 T3

(continuación)

Polinucleótidos aplicados en combinación	SEQ ID NO.	Protocolo	Cantidad aplicada de cada polinucleótido (g/acre)	Polinucleótido total aplicado (g/acre)	Número de copias de EPSPS*	Resultados**
IDT [5]	<b>91,92</b>	1	0,29	0,29	33, 54, 55	71% con retraso en el crecimiento (18 DAT)
IDT [5]	<b>91,92</b>	1	2,9	2,9	33, 54, 55	100% eliminadas (18 DAT)
IDT [1]	<b>83,84,</b>	1	0,29	1,4	33, 54, 55	100% eliminadas (18 DAT)
IDT [2]	<b>85,86</b>		0,29			
IDT [3]	<b>87,88</b>		0,29			
IDT [4]	<b>89,90</b>		0,29			
IDT [5]	<b>91,92</b>		0,29			
IDT [1]	<b>83,84,</b>	1	0,29	1,2	33, 54, 55	
IDT [2]	<b>85,86</b>		0,29			
IDT [3]	<b>87,88</b>		0,29			
IDT [4]	<b>89,90</b>		0,29			
IDT HP [1]	<b>109</b>	3	0,29	1,2	16, 33	100% eliminadas (18 DAT)
IDT HP [2]	<b>110</b>		0,29			
IDT HP [3]	<b>111</b>		0,29			
IDT HP [4]	<b>112</b>		0,29			
IDT [1]	<b>83,84,</b>	3	0,29	1,2	16, 33	100% eliminadas (18 DAT)
IDT [2]	<b>85,86</b>		0,29			
IDT [3]	<b>87,88</b>		0,29			
IDT [4]	<b>89,90</b>		0,29			
IDT [1]	<b>83,84,</b>	3	0,29	0,87	16, 36	100% eliminadas (18 DAT)
IDT [3]	<b>87,88</b>		0,29			
IDT [4]	<b>89,90</b>		0,29			
IDT [1]	<b>83,84,</b>	<b>3</b>	5,8	17	16, 36	100% eliminadas (18 DAT)
IDT [3]	<b>87,88</b>		5,8			
IDT [4]	<b>89,90</b>		5,8			
IDT [1]	<b>83,84,</b>	<b>3</b>	29	87	16, 36	100% eliminadas (18 DAT)
IDT [3]	<b>87,88</b>		29			
IDT [4]	<b>89,90</b>		29			
IDT [1]	<b>83,84,</b>	<b>3</b>	0,29	1,1	16, 36	100% eliminadas (18 DAT)
IDT [2]	<b>85,86</b>		0,29			



ES 2 641 642 T3

(continuación)

Polinucleótidos aplicados en combinación	SEQ ID NO.	Protocolo	Cantidad aplicada de cada polinucleótido (g/acre)	Polinucleótido total aplicado (g/acre)	Número de copias de EPSPS*	Resultados**
IDT [3]	87,88		0,29			
IDT [4]	89,90		0,29			
3'-OH [1]	101.102	3	No aplicable	22-26 microlitros	16	100% eliminadas (10 DAT)
3'-OH [2]	103.104			(en volumen)		
3'-OH [3]	105.106					
3'-OH [4]	107.108					
IDT Romo [1]	93,94	3	0,29	1,1	16	75% eliminadas (10 DAT)
IDT Romo [2]	95,96		0,29			
IDT Romo [3]	97,98		0,29			
IDT Romo [4]	99.100		0,29			
IDT Romo [1]	93,94	3	5,8	23	16	100% eliminadas (10 DAT)
IDT Romo [2]	95,96		5,8			
IDT Romo [3]	97,98		5,8			
IDT Romo [4]	99.100		5,8			
IDT [1]	83,84,	3	29	87	16	34% con retraso en el crecimiento (14 DAT)
IDT [2]	85,86		29			
IDT [3]	87,88		29			
IDT [2]	85,86	3	29	87	16	48% con retraso en el crecimiento (14 DAT)
IDT [3]	87,88		29			
IDT [4]	89,90		29			
IDT [1]	83,84,	3	29	87	16	25% con retraso en el crecimiento (14 DAT)
IDT [2]	85,86		29			
IDT [4]	89,90		29			
IDT [1]	83,84,	3	29	58	16	44% con retraso en el crecimiento (14 DAT)
IDT [4]	89,90		29			
IDT [3]	87,88	3	29	58	16	41% con retraso en el crecimiento (14 DAT)
IDT [4]	89,90		29			
IDT [2]	85,86	3	29	58	16	40% con retraso en el crecimiento (14 DAT)
IDT [4]	89,90		29			
IDT [1]	83,84	3	29	29	16	51% con retraso en el crecimiento (13 DAT)

(continuación)

Polinucleótidos aplicados en combinación	SEQ ID NO.	Protocolo	Cantidad aplicada de cada polinucleótido (g/acre)	Polinucleótido total aplicado (g/acre)	Número de copias de EPSPS*	Resultados**
IDT [2]	<b>85,86</b>	<b>3</b>	29	29	16	0% control (13 DAT)
IDT [3]	<b>87,88</b>	3	29	29	16	51% con retraso en el crecimiento (13 DAT)
IDT [4]	<b>89,90</b>	3	29	29	16	51% con retraso en el crecimiento (13 DAT)
IDT [1]	<b>83,84,</b>	3	29	116	16	75% eliminadas (13 DAT)
IDT [2]	<b>85,86</b>		29			
IDT [3]	<b>87,88</b>		29			
IDT [4]	<b>89,90</b>		29			

\*en los casos donde se lista más de un número de copias, las plantas tratadas tuvieron una mezcla de número de copias  
 \*\*DAT = días después del tratamiento; "0% control" significa que no se observó diferencia entre plantas tratadas y de control; el % de retraso en el crecimiento se calcula como  $[100 - (\text{altura media de las plantas de ensayo} / \text{altura media de las plantas de control}) * 100]$

**185)** Las secuencias de polinucleótido de ARN 25-mero bicatenario para la supresión del gen TIF en *Amaranthus palmeri* se listan en la **tabla 14**.

**Tabla 14**

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
TIF_dsRNA1	antisentido: 5'-UUUUCUAAUACCUCAUCCAAUGAAU-3'	<b>115</b>
	sentido: 5'-AUUCAUUGGAUGAGGUUUAGAAAA-3'	<b>116</b>
TIF_dsRNA2	antisentido: 5'-UAUCUGCUUGUAAGUUCGCCGUUUC-3'	<b>117</b>
	sentido: 5'-GAAACGGCGAACUJACAAGCAGAU-3'	<b>118</b>
TIF_dsRNA3	antisentido: 5'-GGAGACGGUUUUAUUACAUUUGUGC-3'	<b>119</b>
	sentido: 5'-GCACAAAUGUAAAUAACCGUCUCC-3'	<b>120</b>
TIF_dsRNA4	antisentido: 5'-UAUUUACAGGUUUACCAUUGGUUGA-3'	<b>121</b>
	sentido: 5'-UCAACCAAUGGUAACCGUAAAUA-3'	<b>122</b>

5 186) Los polinucleótidos de ARNbc 25-meros de TIF se ensayaron en almizcle resistente al glifosato tanto con alto número de copias (112) como con bajo número de copias (16) de EPSPS.

187)Las plantas con alto número de copias se trataron con una mezcla de 4 ARNbc de EPSPS cortos (ARNbc corto-1, ARNbc corto-3, ARNbc corto-4, tal como se describe en el **ejemplo 1** e IDT [5] (**SEQ ID NO: 91-92** como se describe en la **tabla 11**) a 11,5 gramos/acre y un ARNbc individual de TIF a 5,8 gramos/acre o con cada ARNbc 25-mero de TIF individual a 5,8 gramos/acre; las soluciones de polinucleótido se formularon en tampón de fosfato de sodio 10 milimolar (pH 6,8) que contenía sulfato de amonio al 2% y Silwet L-77 al 1%. Treinta minutos después del tratamiento con polinucleótido, las plantas se rociaron con glifosato (1682 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®) o no.

188)Las plantas con bajo número de copias se trataron con una mezcla de 4 ARNbc de EPSPS cortos (ARNbc corto-1, ARNbc corto-3, ARNbc corto-4, tal como se describe en el **ejemplo 1** e IDT [5] (**SEQ ID NO: 91-92** como se describe en la **tabla 11**) a 0,23 gramos/acre y un ARNbc individual de TIF a 5,8 gramos/acre o con cada ARNbc 25-mero de TIF individual a 5,8 gramos/acre; las soluciones de polinucleótido se formularon en tampón de fosfato de sodio 10 milimolar (pH 6,8) que contenía sulfato de amonio al 2% y Silwet L-77 al 1%. Treinta minutos después del tratamiento con polinucleótido, las plantas se rociaron con glifosato (1682 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®) o no.

189)Los resultados se ilustran en las **figuras 31** y **32** y demuestran que los polinucleótidos de TIF potencian la actividad de los polinucleótidos de EPSPS y que los polinucleótidos de TIF tienen actividad herbicida por si mismos.

**Ejemplo 27**

190)Los aspectos de la invención incluyen composiciones de polinucleótidos y procedimientos de uso para potenciar la actividad de un herbicida no polinucleotídico en una planta. Por ejemplo, se aplica una composición de polinucleótido diseñada para regular un gen diana herbicida o un gen de desactivación de herbicida o un gen de respuesta al estrés o una combinación de dicho genes diana, a una mala hierba o a una planta voluntaria, de manera concurrente con o seguida o precedida de la aplicación de un herbicida no polinucleotídico (típicamente un herbicida químico convencional), dando como resultado la potenciación de la actividad del herbicida no polinucleotídico. La combinación de una composición de polinucleótido 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 de polinucleótido y el efecto herbicida del herbicida no polinucleotídico.

191)Los ejemplos de herbicidas químicos convencionales y sus genes diana del herbicida se proporcionan en la tabla 15.

**Tabla 15**

<b>Ejemplos de herbicida</b>	<b>Gen diana (gen diana del herbicida)</b>
glifosato	5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS)
Lactofen, flumioxazina, etc	protoporfirinógeno oxidasa (PPO)
Mesotriona, isoxaflutol	4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa (HPPD)
Quizalofop, cletodim	acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase)
Norflurazona, clomazona	fitoeno desaturasa (PDS)
glufosinato	glutamina sintasa (GS)
Rimsulfuron, clorsulfuron	acetolactato sintasa (ALS)
Atrazina, diuron, bromoxinil, metribuzin	proteína D1 del fotosistema II (PSII)
Dinitroanilina, pendimetalina	tubulina
Diclobenil, isoxaben	celulosa sintasa

192)Los ejemplos de herbicidas químicos convencionales y sus genes de desactivación del herbicida se proporcionan en la **tabla 16**.

Tabla 16

Ejemplos de herbicida	Gen diana (gen de desactivación del herbicida)
Acetoclor, metolaclor	glutación-s-transferasa (GST)
Muchos, incluyendo herbicidas SU	Monooxigenasa, incluyendo citocromos P450 (véase, por ejemplo, un citocromo P450 para conferir resistencia a inhibidores de HPPD, benzotiadiazinonas, sulfonilureas y otras clases de herbicidas, descritos en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2009/0011936)
Tiazopir	esterasas (por ejemplo, esterasas implicadas en la apoptosis o la senescencia)
2,4-D, metribuzin,	glucosil transferasas; malonil transferasas
Glifosato, paraquat	Genes de compartimentalización y secuestro celular (por ejemplo, transportadores ABC)

## Ejemplo 28

5 **193)** Este ejemplo ilustra un procedimiento para inducir la regulación sistémica de un gen diana endógeno en una planta en crecimiento que incluye recubrir por vía tópica sobre las hojas de la planta en crecimiento polinucleótidos que tienen una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a, una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen diana endógeno o en el ARN mensajero transcrito a partir del gen diana endógeno, mediante el cual los polinucleótidos permean el interior de la planta en crecimiento e inducen la regulación sistémica del gen diana endógeno.

10 **194)** Se diseñaron polinucleótidos de ARN bicatenario o de ADNss antisentido para los genes diana del herbicida 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), fitoeno desaturasa (PDS), protoporfirina IX oxigenasa (PPO), fenilalanina amoniaco liasa (PAL), hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), acetyl-coenzima A carboxilasa (ACCase), acetolactato sintasa (ALS) y glutamina sintasa (GS). Para cada gen diana del herbicida, se aplicó una solución que contiene una mezcla de 8 polinucleótidos de ADNss antisentido en sulfato de amonio al 2% en tampón de fosfato de sodio 10 milimolar, pH 6,8, a una tasa de 2,32 g/acre después de la aplicación de pulverización de Silwet L-77 al  
15 0,5% (93,53 litros/hectárea, 10 galones/acre). Los polinucleótidos ensayados y las observaciones de fenotipo resultantes se listan en la **tabla 17**.

Tabla 17

Gen	Nombre	Tamaño (nt)	Secuencia	SEQ ID NO:	Fenotipo
EPSPS			(Véanse las secuencias proporcionadas en los <b>ejemplos de trabajo 1, 9, 13, 14, 21, 26</b> )		El ARNbc tópico seguido de glifosato eliminó al almizcle resistente al glifosato (hasta 60 copias de EPSPS) en 7-10 días
PDS	PDS sentido	185	GACGGAAACCCUCCAGAGAGGCUGU GCAUGCCUAUUGUUAACACAUCGA GUCACUAGGUGGUGAAGUJAAACUJ AACUCUCGUAUACAAAAGAUUCAGU UGGACCAGAGUGGAAGCGUGAAGAG UUUUUUGCUAAAUAACGGGAGGGAA AUACGAGGAGAUGCCUAUGUUUUUG CCACCCAGU	123	El ARNbc tópico provocó blanqueamiento y un fenotipo de retraso en el crecimiento y es sistémico.

(continuación)

Gen	Nombre	Tamaño (nt)	Secuencia	SEQ ID NO:	Fenotipo
	PDS antisentido	185	ACUGGGGUGGGCAAAAACAUAGGCAU CUCCUCGUUUUUCCCUCUCCGUUUUUU AGCAAAAACUCUUCACGCUUCCAC UCUGGUCCAACUGAAUCUUUUUGUAU ACGAGAGUUAAGUUUAACUUCACCA CCUAGUGACUCGAUGUGUUUAAACA UAGGCAUGCACAGCCUCUCUGGAGG GUUUCCGUC	124	
PPO	PPO_OLIGO1	21	GTGATATTACCTCCAACACGAT	125	Los ADN antisentido tópicos causaron retraso en el crecimiento de la planta.
	PPO_OLIGO2	21	ATAGTAAGCACAGGATCGGAG	126	
	PPO_OLIGO3	21	CTTCAATCCACTGTCAACCG	127	
	PPO_OLIGO4	21	ATCAAGCGTTCGAAGACCTCAT	128	
	PPO_OLIGO5	21	CAGCAATGGCGGTAGGTAACA	129	
	PPO_OLIGO6	21	GCAATTGCCCGAATCCTTTTA	130	
	PPO_OLIGO7	21	TAGCTCAATATCAAGGTCCTA	131	
	PPO_OLIGO8	21	TCATAAGCACCCCTCTATACAC	132	
PAL	PAL_OLIGO1	21	TTCTTAACCTCGTCGAGATG	133	Los ADN antisentido tópicos causaron retraso en el crecimiento de la planta.
	PAL_OLIGO2	21	ATACCCGAGTATCCTTGCAAA	134	
	PAL_OLIGO3	21	TAGGGCCCACGGCCTTGGAGT	135	
	PAL_OLIGO4	21	AGCGGATATAACCTCAGCTAG	136	
	PAL_OLIGO5	21	CTTCGTGGCCCAACGAATGAC	137	
	PAL_OLIGO6	21	CAAGCTCGGGTCCCTGCTTGC	138	
	PAL_OLIGO7	21	GGAAGGTAGATGACATGAGTT	139	
	PAL_OLIGO8	21	GATGGCATAGTTACCACTGTC	140	
HPPD	HPPD_OLIGO1	21	TCCGTAGCTTACATACCGAAG	141	Los ADN antisentido tópicos causaron retraso en el crecimiento de la planta.
	HPPD_OLIGO2	21	TCCAAGTGAATAGGAGAAACA	142	
	HPPD_OLIGO3	21	AGCAGCTTCTGCGTCTTCTAC	143	
	HPPD_OLIGO4	21	ACAGCACGCACGCCAAGACCG	144	
	HPPD_OLIGO5	21	CGATGTAAGGAATTTGGTAAA	145	
	HPPD_OLIGO6	21	CGAGGGGATTGCAGCAGAAGA	146	

(continuación)

Gen	Nombre	Tamaño (nt)	Secuencia	SEQ ID NO:	Fenotipo
	HPPD_OLIGO7	21	GTAGGAGAATACGGTGAAGTA	147	
	HPPD_OLIGO8	21	GACCCCAAGAAAATCGTCTGC	148	
ACCasa	ACCA_OLIGO1	20	GTCTTACAAGGGTTCTCAA	149	Los ADN antisentido tópicos causaron retraso en el crecimiento de la planta.
	ACCA_OLIGO2	21	ATCTATGTTACCTCCCTGTG	150	
	ACCA_OLIGO3	21	ATAAACCATTAGCTTTCCCGG	151	
	ACCA_OLIGO4	21	TTTATTGGAACAAGCGGAGTT	152	
	ACCA_OLIGO5	21	TATAGCACCCTTCCCGATAG	153	
	ACCA_OLIGO6	21	GCACCACGAGGATCACAAGAA	154	
	ACCA_OLIGO7	21	CCACCCGAGAAACCTCTCCAA	155	
	ACCA_OLIGO8	21	CAGTCTTGACGAGTGATTCT	156	
ALS	ALS-OLIGO1	22	GTTCTTCAGGGCTAAATCGGGA	157	Sin fenotipo significativo
	ALS-OLIGO2	22	GTTCAAGAGCTTCAACGAGAAC	158	
	ALS-OLIGO3	22	ATACAACTCCAACGCGTCCAG	159	
	ALS-OLIGO4	22	CTCTTGAAAGCATCAGTACCA	160	
	ALS-OLIGO5	22	CTAGAAAGATACCCACCCAATT	161	
	ALS-OLIGO6	22	ACTAGAATTCAAACACCCACCC	162	
	ALS-OLIGO7	22	TTTCTGCTCATTCAACTCCTCC	163	
	ALS-OLIGO8	22	TATGTATGTGCCCGTTAGCTT	164	
GS (glutamina sintasa)	GS_OLIGO1	21	TCATATCCAAGCCAGATCCTC	165	Sin fenotipo significativo
	GS_OLIGO2	21	TGCATCACACATCACCAAGAT	166	
	GS_OLIGO3	21	GTA CTCTGTTCAATGCCATA	167	
	GS_OLIGO4	21	ATTGATACCAGCATAGAGACA	168	
	GS_OLIGO5	21	AGCAATTCTCTTAGAATGTA	169	
	GS_OLIGO6	21	CATCATTCTCATCGACTTAG	170	
	GS_OLIGO7	21	CTCTCGTTGCCCTCTCCATAA	171	
	GS_OLIGO8	21	CAACGCCCCAGGAGAAAGTTC	172	

195) Se investigó la actividad herbicida de los polinucleótidos de ADNss que se dirigen a las enzimas 4-hidroxifenilpiruvato (HPPD) y protoporfirinógeno oxidasa (PPO) y un factor de iniciación de la transcripción (TIF) y su

efecto en la actividad herbicida cuando se usan en combinación con los herbicidas mesotriona, fomesafen y atrazina en el almizcle. Los polinucleótidos usados en este experimento fueron 8 oligonucleótidos de ADNss antisentido de HPPD (SEQ ID NO: **141-148**), 8 oligonucleótidos antisentido de PPO (SEQ ID NO: **125-132**) y 8 oligonucleótidos de ADNss antisentido de TIF (SEQ ID NO: **75-82**, véase el **ejemplo 26**).

- 5 196) Se cultivaron plantas de almizcle (*Amaranthus palmeri*) sensibles al glifosato en macetas de 25,8 centímetros cuadrados (4 pulgadas cuadradas) con mezcla para siembra 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 y una temperatura diurna de 30 grados centígrados y una temperatura nocturna de 20 grados centígrados. Las plantas se regaron por la parte inferior según fuese necesario.
- 10 197) Las plantas de 10 a 15 cm de altura se pretrataron manualmente con 40 microlitros (se trataron 4 hojas completamente maduras con 10 microlitros de solución por hoja en cada planta) de una solución de tampón-tensioactivo (como control, Silwet L-77 al 0,5% y sulfato de amonio al 2%) o una mezcla de tampón-tensioactivo-ADNss de los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a HPPD, PPO o TIF. Algunas plantas se dejaron sin tratar y se usaron como controles. Veinticuatro horas después, las plantas no tratadas, las plantas tratadas con tampón-tensioactivo y las plantas tratadas con tampón-tensioactivo-ADNss se trataron usando un pulverizador de campo
- 15 equipado con una boquilla 9501E y calibrada para suministrar 93 litros de solución por hectárea con un inhibidor de HPPD, mesotriona (479,3 g de principio activo por litro, 4 libras de principio activo por galón) o con un inhibidor de PPO, fomesafen (239,6 g de principio activo por litro, 2 libras de principio activo por galón) o con un inhibidor del fotosistema II, atrazina (principio activo al 90%) tal como se indica en la **tabla 18**. Se añadió concentrado de aceite de cultivo (COC) al 1% a todos los tratamientos herbicidas. 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 a 1/8X de la tasa de campo recomendada) para poder detectar cualquier mejora de la actividad herbicida por la mezcla de oligonucleótidos.
- 20

**Tabla 18**

Número de tratamiento	Pretratamiento	Principio activo	Tasa (gramos por hectárea de principio activo)
0	Tampón-tensioactivo	--	
1	Sin tratar	Mesotriona	13
2	Tampón-tensioactivo	Mesotriona	13
3	Tampón-tensioactivo-ADNss-HPPD		
4	Tampón-tensioactivo-ADNss-HPPD	Mesotriona	13
5	Sin tratar	Fomesafen	16
6	Tampón-tensioactivo	Fomesafen	16
7	Tampón-tensioactivo-ADNss-PPO		
8	Tampón-tensioactivo-ADNss-PPO	Fomesafen	16
9	Sin tratar	Atrazina	170
10	Tampón-tensioactivo-ADNss-TIF		
11	Tampón-tensioactivo-ADNss-TIF	Atrazina	170

- 25 198) La altura de las plantas se determinó a los cuatro días después del tratamiento con herbicida. Los datos se recogieron de un experimento con cuatro replicados por tratamiento. Los resultados (expresados como altura de las plantas de almizcle afectadas por las combinaciones de tratamiento de solución de tampón-tensioactivo, ADNss y herbicida) se presentan en la **tabla 19** y la **figura 33**. Las plantas tratadas con oligonucleótidos de ADNss antisentido de HPPD, oligonucleótidos de ADNss antisentido de PPO y oligonucleótidos de ADNss antisentido de TIF mostraron
- 30 retraso en el crecimiento, midiendo 125, 153 y 115 mm, respectivamente, mientras que las plantas tratadas con

tampón-tensioactivo (control) midieron 185 mm (**figura 33**). El tratamiento con oligonucleótidos de ADNss antisentido de HPPD, oligonucleótidos de ADNss antisentido de PPO y oligonucleótidos de ADNss antisentido de TIF causaron respectivamente un 32%, 18% y 38% de reducción del crecimiento en relación con el control de tampón-tensioactivo.

5 **199)**No se observaron diferencias importantes en la altura de las plantas entre las plantas tratadas con tampón-tensioactivo seguido de herbicida y las plantas tratadas solo con herbicida. Las plantas tratadas con oligonucleótidos de ADNss antisentido de HPPD seguidos de mesotriona mostraron la mayor reducción en la altura de las plantas, midiendo 100 mm, una reducción del 46% en comparación con las plantas tratadas con tampón-tensioactivo. Las plantas tratadas con oligonucleótidos de ADNss antisentido de PPO seguido de fomesafen midieron 126 mm, una reducción del 32% en comparación con las plantas tratadas con tampón-tensioactivo. Las plantas tratadas con  
10 oligonucleótidos de ADNss antisentido de TIF seguido de atrazina midieron 121 mm, una reducción del 34% en comparación con las plantas tratadas con tampón-tensioactivo.

**Tabla 19**

Número de tratamiento	Pretratamiento	Principio activo	Tasa (gramos por hectárea de principio activo)	Alturas de plantas (mm)	Error estándar
0	Tampón	--	--	185	15
1	Sin tratar	Mesotriona	13	180	18
2	Tampón	Mesotriona	13	179	18
3	ADNss-HPPD			125	19
4	ADNss-HPPD	Mesotriona	13	100	7
5	Sin tratar	Fomesafen	23	158	12
6	Tampón	Fomesafen	23	139	10
7	ADNss-PPO			153	20
8	ADNss-PPO	Fomesafen	23	126	6
9	Sin tratar	Atrazina	170	146	19
10	ADNss-TIF			115	17
11	ADNss-TIF	Atrazina	170	121	16

**Ejemplo 29**

15 200)Este ejemplo ilustra secuencias ensayadas de polinucleótidos de ARN bicatenario diseñadas para diferentes genes esenciales para determinar el efecto de la secuencia ensayada en el fenotipo observable. Para cada gen esencial, se aplicó una solución del polinucleótido de ARNbc en sulfato de amonio al 2% en tampón de fosfato de sodio 10 milimolar, pH 6,8, a almizcle a una tasa de 240 picomoles por planta seguido de la aplicación de pulverización de Silwet L-77 al 0,5% (93,53 litros/hectárea, 10 galones/acre). Los polinucleótidos ensayados y las observaciones de fenotipo resultantes se listan en la **tabla 20**.

20



Tabla 20

Gen	Nombre	Tamaño (nt)	Secuencia	SEQ ID NO:	Fenotipo
Factor de iniciación de la traducción (TIF)	sentido	160	UUUCGAGUAAUUGGAAAUUUGGAUAAUUGA GAGGAGAGGAAGAAGGUUAUUGAUUUCAU UGGAUGAGGUUAUUAGAAAAGGCCGAGAG AUUAGAAAAGCGGAAACUUACAAGCAGAU AAUAGAAAAGGAUAGCACAAAUGUAAAUA AACCGUCCGAGUGUAAGU	73	El ARNbc tópico causó retraso en el crecimiento de la planta.
	antisentido	160	ACUUACACUCCGGAGACGGUUUUUUUACA UUUGUGCUAUCUUUUUUUUUUUUCUGUU GUAAGUUCCGCGUUUUUUUUUUUUUUUUUU UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU UAACUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU AAUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU	74	
ATPasa dependiente de ADN (ddATPasa)	sentido	168	GAUCACAAAUUUGCCGGUUUUUUGAUCAA AUACGGAACAUAAGACAGAUACACUUGA ACACCAUUAUUCGCAUUUGGGGGUGUGGU UACUUGUUGUUCUGGAGUAUUUUUUUUUU UGAUGCAGGUGAAGUAUGACUGCAUUA AUGUGGGGUUAUCCUGGGUCCUUUUUU	113	El ARNbc tópico causó retraso en el crecimiento de la planta.
	antisentido	168	AAAAAGGGACCCAGGAUAGCCCAUUAUU AUUUGCAGUACAUAUUUACUUGCAUUAUUA GAGGAAUUAUCCAGAAACGACGAGUAAC CACACCCCAAUUGGAAUUGAUGGUGUUA AGUUAUUCUUGUUAUUGUCCGUUUUUUG AUCAUAAAACCGGCAAAUUUUUUGAUC	114	
Hidroxi-3-metilbutil-2-enil difosfato sintasa (HMEDS)	sentido	200	CUGAAGCUGGUGAAGGUGAAGAUGGACG AAUGAAAUCUUGGGAUUGGAAUUGGGACC UUUUUCAGGAUGGCUUUGGGAGAUACGA UCAGGGUUGUUAACAGAACCAACAGAA GAGGAGUAGACCCUUGCAGAGGUUGG CAAUUUUGGAAACAAAAGCAGCUGAAAU UCAGCAAGGAGUGGCAUUAUUUGAAG	173	Sin fenotipo significativo.

(continuación)

Gen	Nombre	Tamaño (nt)	Secuencia	SEQ ID NO:	Fenotipo
Endospermo independiente de la fertilización / TF (FIE)	antisentido	200	CUUCAAUUGGUGCCACUCCUUGCUGAAUU UCAGCUGUUUUUUUCCAAAGAUUUUGCCA ACCUUCUGCAAGGUCUAUCUCCUUCUUCU GGUGGUUUCUGUAGAGACACCCUGAUUG UAUCUCCCAAGCCAUCCUGAAGAAGGGUC CCAUUCCAAUCCGAGAUAUUAUUCGUCC ATCTTACCCUCCACCCAGCTTCAG	174	
	sentido	183	UCCCAUCAAAAGUUCUUCAAAAUAUGUG CAGUUCCUAUCUCCUUGCCGCCCAUUCA UACAAACUAUGUUAUGUACAAGGUGG CUUGGUGAUUUUGUUCUUUAAGAGUG UUGACAAUGAGAUUGUACUGUGGAGCC AAUUAUGAAGGAGCAAUCUCCUGGAGAG GGUUCAGUUUGACA	175	Sin fenotipo significativo.
subunidad de ATPasa de proteasoma 26S RPT5B (RPTB)	antisentido	183	UCCUUCATUAAUUGGCTCCACAGUACAAT CUCAUUGUCAACAUCUUAGAAAGAACA AAUUCACCAAGCCACCUUGUACAUAUCAC AUAGUUUGUAUGAAUGCGGCAAGGAAG AUAGGAAAACUGCACAUUUUUUUGUAGGGA ACUUUGAUGGGA	176	
	sentido	143	UUUGUGCUUAAAACAUGGACCAGIACAGAC AAUUAUUUCUUCUUGUUGUUGGACTUAGUU GAUCCUGUAACCGUGAAACCUUGGUGAUU UAGUUGGUGUACAACAAGAUAGUUAUCU UAUCCUGGACACTUUGCCUCCGGAUAUUG AU	177	Sin fenotipo significativo.

(continuación)

Gen	Nombre	Tamaño (nt)	Secuencia	SEQ ID NO:	Fenotipo
	antisentido	143	AUCAUAUCCGACGGCAGAGUUCUCCAGG AUAAGAUAAACUAUCUUUGUUGACACCAA CUAAAUCACCCAGGUUUCAGGGUUAUCAGG AUCAAACUAGUCCAAACACAGGAAGAAU AUUGUCUGUCUGGUGGAUGUUUUAAGCA CAA	178	
ligasa 1 (LIG1)	sentido	159	CGCUGCAGUUGGUGAAGUAGAUCCCGGC AAGGGGAUUUCACUCCGGUUUCCACGUUCU GGUUCGUUUCGGAGAGGAUAAAUUCUCCA GAGGACGCCACAUCAUCUGAGCAGGUGGC GGAUAGUACAGAUUCAAGCAAAACAAU CCACACCGCAAAAAGAG	179	Sin fenotipo significativo.
	anti- sentido	159	CUUUUUUUGGGUGGGAUUUUUUGCUU GAGAUUGUACAUUCCGCCACUUGCUCA GAUGAUUGGGGUGGUGUGGAGAUUUU CCUCUUGGUAACGAAACCAGCGUGGAAC CGGAGUGAAAUCCCUUUGCGGGGAUCUAC UUCACCAACUGCAGCG	180	
ARNi sintetasa (IS)	sentido	159	UAAAGAUUGCGGAAAAAUUGACTUATIGAU AAAUUGAUUGACAAAUUCGGCUGUCAGC GACTUUGAUUUUATUGGCUCAUUCAGAGAATU UGAGCGCAUCACUGGUCGUCUUGCUCAUIG UAUUUUCUUGCGCCCAACGUUUUUCUUGGCTU CACCGUGAUUUUGAATUGA	181	Sin fenotipo significativo.
	antisentido	159	UCAUUCAAAUACGGUGAGCGGAAGAAAA CGUUGCGGGAAGAAAUAACAUGAGCGAGG ACGAGCAGUGAUUGCGCUCAUUCUCUGA AUGAGCGAUAAAUGAAGUCCGUCACAGC CGAAUUUGUCAAUCAAUUUUAUCAUAGUC GAUUUUUCCGGCCAUCUUUA	182	

(continuación)

Gen	Nombre	Tamaño (nt)	Secuencia	SEQ ID NO:	Fenotipo
Proteasa específica de ubiquitina 14 (UBP)	sentido	150	UGAAGCTUGAUGCTTGAAGGAAAGGATUUT GAUUGCUAGUGAAGUAGUUCGCCAAGGG TUGCAUJAGAAAGCTTUGCCUAGCUAGCUAC UCAGCUCGGGAGGAGGUGAUGGACUUCU ACAGCACTGGCAUUGAAGGCAAAAGGCAAC UGCUAACAAA	183	Sin fenotipo significativo.
	antisentido	150	UUUUGAGCAGUUGCCUUUGCCUUUCAUUG CAGUGCTUGUAGAAAGTCCATCACCTTCTCC GGAGCUAGUAGCUAGCUAGGCAAGCUU CTAATGGCACCTTUGGGGAACUACTTICA CUAGCATCAATATCCUUCCTTTCAGCAATC AGCUUCA	184	
Serina hidroximetil transferasa 2 (SHMT)	sentido	155	ACACCUGCCUAAACAUUCGGGGUUUUUCU CGAAGAAGAUUUUGUUAAAGUGGCCGAG UAUUUUUGAUGCUGCUGUUAAAGCUGGCUC UAAAAUCAAAGGCUAGACACAAAAGGAAC AAAGUUGAAGGACUUCGUUGCCACCUUG CAGUCUGGUGUUUUU	185	Sin fenotipo significativo.
	antisentido	155	AAAACACCAGACTUGCAAGGUGGCAACGA AGUCCUUCACACTUUUGUUCUUUUUGUGUC AGCCUUGAUUUUUUAGAGCCAGCUUAACA GCAGCAUCAAAUAUCUGGCCACUUUAAC AAAAUCUUUCUUGGAGAAAACCCCGAGAU GUUUAGGGCAGGUGU	186	
Metionina-ARNt ligasa/sintasa (MtS)	sentido	159	UGAACUACGAAGCAGGCAAAUUCUCCAA AAGUAAAGGCAUUGGAGUUUUUUGGGAAU GACGCCAAGAUAUCUAAUAUACCCUGUAG AAGUUGGAGAUACUUCUGCUAACAACA CAGGCCUAGAGGUAUCAGACACAUUUGUUC ACUUGGGGGGAUCUUUCAAG	187	Sin fenotipo significativo.

(continuación)

Gen	Nombre	Tamaño (nt)	Secuencia	SEQ ID NO:	Fenotipo
	antisentido	159	CUUGAAGA UCCGCCCAAGUGAACAAUGU GUCUGAUACCCUCAGGCCUGUUUGUAGC AGAUAGUACUCCACACUUCUACAGGUA UAUUAGAAUUCUUUGCGUCAUUCCTCAA AACUCCAAUGCCUUUACUUUUGGAGAAU UUGCCUGCUUCGUAGUICA	188	

**Ejemplo 30**

201) Este ejemplo ilustra polinucleótidos que están diseñados para dirigirse a una región de baja homología de secuencia particular y son útiles, por ejemplo, para seleccionar un alelo específico de un gen diana o un gen de una especie específica. Los polinucleótidos diseñados para dirigirse a secuencia no codificante son útiles para regular ARN no codificantes que están implicados en la regulación génica, *por ejemplo*, la regulación de ARN no codificantes que se procesan en ARNi en una vía regulada por ARNi. La **figura 34** ilustra un alineamiento del promotor del locus 1 de PDS de *Nicotiana benthamiana* (**SEQ ID NO: 319**) y del promotor del locus 2 de PDS (**SEQ ID NO: 320**); en el caso del locus 1, que contiene múltiples sitios de inicio de la transcripción, la secuencia promotora usada en este alineamiento es aquella con el sitio de inicio de la transcripción más próximo al extremo 5'. Se observó que los genes PDS1 y PDS2 de *Nicotiana benthamiana* tenían baja homología de secuencia en la región promotora pero alta homología de secuencia en la región codificante.

202) Los polinucleótidos diseñados para dirigirse a diferentes partes de los promotores de PDS1 y PDS2 se listan en la **tabla 21**.

**Tabla 21**

Mezcla	Polinucleótido	diana del promotor	Secuencia	SEQ ID NO.	posición/dir
2	HL419	motivo diana de promotor 1 de PDS	TCCCATCTCCCACATGGGTTACTG	189	590-567
2	HL420	motivo diana de promotor 1 de PDS	CAGTAACCCATGTGGGAGATGGGA	190	567-590
2	HL421	motivo diana de promotor 1 de PDS	GGCTGATGAAATTC AAGTGCTA	191	557-536
2	HL422	motivo diana de promotor 1 de PDS	AAACTGAGCTTGGAATAATC	192	517-497
2	HL423	motivo diana de promotor 1 de PDS	GAACCCAAAATTGCACTTTTT	193	448-427
3	HL424	motivo diana de promotor 1 de PDS	ATGCACTTGTTTATACTCTTGTC A	194	403-438
3	HL425	motivo diana de promotor 1 de PDS	ATTTATTAGTGTTCTAAAGAA	195	357-337
3	HL426	motivo diana de promotor 1 de PDS	TGTAGTAGCTTATAAGATTAGCTT	196	287-264
3	HL427	motivo diana de promotor 1 de PDS	GTTGTCCCTTTTATGGGTCTTT	197	240-183
3	HL428	motivo diana de promotor 1 de PDS	CCCGTGCAATTTCTGGGAAGC	198	86-66

ES 2 641 642 T3

(continuación)

Mezcla	Polinucleótido	diana del promotor	Secuencia	SEQ ID NO.	posición/dir
5	HL429	motivo diana de promotor 2 de PDS	ATTAGTTTTTTATACACGAAAGAT	199	1313-1336
5	HL430	motivo diana de promotor 2 de PDS	ATCTTTTCGTGTATAAAAACTAAT	200	1336-1313
5	HL431	motivo diana de promotor 2 de PDS	TTGGTGGTTTGCCACTTCCGT	201	1291-1270
5	HL432	motivo diana de promotor 2 de PDS	TTTGTTCGCTATTTAGCTGGA	202	1256-1236
5	HL433	motivo diana de promotor 2 de PDS	CAATTTGCAGCAACTCGCACTGGA	203	1205-1182
6	HL434	motivo diana de promotor 2 de PDS	TCCCACCATTGGCTATTCCGAC	204	1156-1135
6	HL435	motivo diana de promotor 2 de PDS	CTGTCTCTCTTTTTAATTCT	205	1105-1085
6	HL436	motivo diana de promotor 2 de PDS	CCACTTTCACACATCTCCCACTT	206	1056-1033
6	HL437	motivo diana de promotor 2 de PDS	GAGGATCCACGTATAGTAGTAG	207	1016-995
6	HL438	motivo diana de promotor 2 de PDS	TTTAAATAAAGAAATTATTTA	208	889-869
1	HL439	Promotor 1 de PDS	TAATACGACTCACTATAGGGCTTGAGTT TATAACGAAGCT	209	
1	HL440	Promotor 1 de PDS	TAATACGACTCACTATAGGGCTTCTAAT TTCAAGGACG	210	
1	HL441	Promotor 1 de PDS	AGCTTCTAATTTTCAAGGACGATA	211	Antisentido
1	HL442	Promotor 1 de PDS	GTCATGTGACTCCACTTTGATTTTG	212	Antisentido
1	HL443	Promotor 1 de PDS	CTCAATTCGATAAAATTTAAGAAAT	213	Antisentido

(continuación)

Mezcla	Polinucleótido	diana del promotor	Secuencia	SEQ ID NO.	posición/dir
1	HL444	Promotor 1 de PDS	CGAAGCTATTGGACCGACCTAATTC	214	Sentido
1	HL445	Promotor 1 de PDS	GGAATTGAGGGCTTCCCAGAAATTGC	215	Sentido
1	HL446	Promotor 1 de PDS	ATGACTTTTTGATTGGTGAACTAA	216	Sentido
4	HL447	Promotor 2 de PDS	TAATACGACTCACTATAGGTGGAAGCTCC AACACACAAAAAATTC	217	Sentido
4	HL448	Promotor 2 de PDS	TAATACGACTCACTATAGGTTGAAAAAT AATCATAATTTTA	218	Antisentido
4	HL449	Promotor 2 de PDS	GCATAATATATTGATCCGGTAT	219	Antisentido
4	HL450	Promotor 2 de PDS	CTGAAAGTTCATACATAGGTACTC	220	Antisentido
4	HL451	Promotor 2 de PDS	GGTACTCCAATTTTCAGTATAT	221	Antisentido
4	HL452	Promotor 2 de PDS	CTGAAAATTGGAGTACCTATGTAT	222	Sentido
4	HL453	Promotor 2 de PDS	ATGTATGAACTTTCAGAATATTATACC	223	Sentido
4	HL454	Promotor 2 de PDS	TACCGGATCAATATATTATGCT	224	Sentido

- 203) Se ensayaron seis combinaciones de polinucleótidos diferentes (1 nanomol/planta de cada polinucleótido aplicado) según se listan en la **tabla 21** e ilustrados en la **figura 35** en plantas de *Nicotiana benthamiana* de 4 semanas de edad usando un procedimiento similar al descrito en el **ejemplo 12**. Se prepararon soluciones de polinucleótidos en Silwet L-77 al 0,01% (v/v) y sulfato de amonio al 2% (p/v) en fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8.
- 5 Se sumergieron dos hojas completamente expandidas en solución de Silwet L-77 al 0,1 % recientemente preparado con ddH<sub>2</sub>O durante unos pocos segundos y se dejaron secar. Aproximadamente 30 minutos después, se aplicaron 20 microlitros de solución de polinucleótidos a cada una de las dos hojas pretratadas. Las plantas de control positivo se trataron de manera similar con un oligonucleótido de ADN que se dirigía a un segmento conservado de la región codificante de PDS1 y PDS2; las plantas de control negativas se trataron de manera similar con un oligonucleótido de ADN diseñado para silenciar la proteína fluorescente verde (GFP). Las seis combinaciones de polinucleótidos diseñadas para dirigirse a las regiones promotoras de PDS1 o PDS2 indujeron silenciamiento sistémico en las plantas tratadas evidenciado por blanqueamiento. El tratamiento con polinucleótidos de ARNbc o ADNbc de aproximadamente 200 pb y que se dirigían a las regiones promotoras de PDS1 o PDS2 también indujeron silenciamiento sistémico en las plantas tratadas, según se evidencia por blanqueamiento.
- 10
- 15 204) Las siguientes secuencias genómicas adicionales (incluyendo la secuencia promotora y la intrónica y exónica transcrita) listadas en la **tabla 22** se identificaron para genes de *Amaranthus palmeri* para su uso en el diseño de polinucleótidos para aplicación tópica:



Tabla 22

Nombre del gen	Secuencia	SEQ ID NO.
ACC1	TTCAAAATGAATTTAAAATTATATAAAAATCAATATGGACACAAGACCCGGAT ATCAAATCCGACCCGAAATAGTTGACTTGAATCAACCIGATGACCCGAAATGA ACACCTCTAGTTATCACTAACAAAGGGTCAGATTGGGTACATCAAACCCCTCA AATCCTGCTTAGGTTGGGAGCTTGTCAATGGCTTAGGGGTAAACGGGAATGTGT GTGCTATGTACATTGTGCATCTATTCTTATGCTTATTTATGTTGAGTTAGTTTT TTTTTGGATCAAAATATAAAGAGCTTAACTTTTGTATTTTCTTIGATGTGGTGT	225
	AGTGGTGATGAAGATCAGGCTGAGAGAATCTAAATTGGCCAAAATTCTGAG AGAACAGAAGTGAGTTCAGCCCTTCGTGCTGCTGGTGTGGTGTGATTAGT TGCATCATAACAGAGAGATGAAGGGCGAACTCCGATGAGGCATTCATTCTATT GGTGAGCAGAAAAACAATATTATAGTGAGGAGCCTTTACTACGTCATTTGGA ACCCCCTCTATCTATGTATCTCGAGCTGGTACTAGTCTCTGAACCGATTGCCT TTCTTCTGCTTTGTTATTTTGTGTGATATTCGACTTAAGTCTAATTTACATCG TTTTGTACATTTGTTATC	
ACC3	TTTTGTCTTTTTACTATTATTTCCCTCTTTTTCAAGGATTTGAGTTGTTTATTGCT GACTGCTTCTATGTATTACCCATATGTCTCTGTATAGGCATTACGGGAGCTG TACCTACATCTAACCCTATACAACGTGTGAATATTGCCCGGCATCCTAATCG CCCCCTTTTTCTTGACCAGTATTACAGCATCACAGAAAAGGTTTCTGATTTAT TATAATTTTTGTCAATTTGTATTCACTCTTCAATAAAGTACATCCATTATCAAT CTTTACGGAGGTTGTTACACAACCTTCTTGTTCATTTGCATAATTAGTTTGT GGAACACATGGAGATCGTGTGTTATGATGACCCTGCTATAGTTACTGGC CTTGGTACGATAGATGGTAGGCGTTATATGTTTCATTGGTCATCAAAAAGGGAA GAAATACGAAGGAAAATATTGCACGGAAATTCGGGATGCCTACTCCTCATGG GTAAATGCTTTACTATAATGTTTTACTTTAATTTAATTACCTATGTTATTTAGG ATGAAAATGAATACTTTTCTTATTACTATTACTTAGGTTTCTAATGCACAAAA ACCGTAATTAATGATACCCTAATGGAATTAACACATGGTAATTAAGCTCT CCGCTTTGTGTAATTAATCCAATTTTTAGAGAGTCAAATAGTTTACGGTTAAA CTAGAGCTTTTTCATACCCAATAATAAAACCAAGGGTAAATTTCCAAAA	226
ACC4	ATGTGATCAATTAAGAAAAAGTCTAATTATATGAGCCCGTCTCACAGTGAC GGAGCTATCATAGAGCCCATGGGGTCACGTGCCCTTCGGGGTTTTAGAAAA AATTCAAAGTATACTTTTCTATTAATAAGAGTAAAAATGAAAATTAATATT AAACCTTTTTGATAATAAATACTCTCTCACTTTAGTAATTTTGTCTTATTTATT TATTTTATCTCATGTGTTAATAAGGTCAGTTGACTTATTTTGTCCATTTTCT TTTATGGTATGCCGATTTAAAATTTTAGCAAGTAAAGATAAAAATAGTTGTT AATCTTACAAAATAAACTCTATCGAAAATTTTCATCCATTAGTTAATGTCCCCAA AAAGTCCGAACTACAAATCGACCACTGTATCACATGGTGAGATAGTCTCAT ATAAAACGAGTTCAGTTATTAAGGAAAAATAGGAAACACGAAACAGTTAAT TTAGGCGGGCCTATGTATTATCCAAATGTGATACTCCAGTCCACATTACTC AGTCCTTCCAATTGAACAGTTGGCTTAATCTACCAAGCGCGTGGCCATAAAT GCCTCTAACACTTTTCAATCTCTCAGATAACTCTCACACCACTTATCATCACA ATTCACAATTACTCTAATCTTTTTATTCCTTTCCATGTGCGTAATTTTCTACT GATTCAGTTTTTATCTCAGCTTTATCAATTTTATTTTCATGCTTTTTATGTCA ATTTCTTGTTCGCATTTTGTCTTCCACTTGCTGTCTGTTTTATTAATCAATTTT GTATGATTGTTGGAATAATTGTATGTATTTTTCATGATTTTCTCTTATGGAG GTTCATAATGTATTGCTAGATTTGTTACTTTTAC	227
ACC5	AATTTGAGCGGGAAAATTTTAATATCATTAAATAGTCTTTGCTTTAGTATATA GAATAGTTAAAATTAATAGTCAAACCTTATTGTAATAGCATGCACTAATCTAT AATAATCTTATCTGAAAGCTATAATAAAAATTATAAAAAAATATATGTGAAA AACTAATTTGAGCGGGAAAATTTAACCAAGGGCTAACACGTATCATTAAAT AGTCTTTACTTTAGTATATAGAATGATAATTAACGATCATAAAAACAAAATTG TCACTTTAGTAGCAAACCTTACAAAATGAGCAGAGTACCTCATATCATAAAA TTGCTTCTTCTCATTGTTGTGTTGCTCTCAATTTTAGGAGTTCATCGTTTATA TCGTCTGCTTACCCTCAATCACTTTTATGATTTTATTAGTAGCACTTCCCTCAAT CTACAGCAGCAATTTCTACAGTTCAACAACCTC	228

(continuación)

Nombre del gen	Secuencia	SEQ ID NO.
ACC6	GGAAAAATTACCTAGAAATAATCCAAATTTATTCGGTGAATTTTTCTACAAAATTCCL ACTTCAAGGGGTATTTGCCIAAAGTAATTAALACITGGATACCCCGATGACCT GCATAGTAGATAAATTTACCAGAAAAATTAALAAATGAAAAATTAATTTAAAAAT AGAGAAAAATTTTGAAATTTTCATATAAAAAATTTTAAATAATAAAAAAATA TAAATTTTTTTGAAACATTTTATTTAATCTATCTTTTTTGAAAAAATAAALACTT AGTTATAGCAAGTGATCTGGTCACCGGGTTTACTCTAGGAAAATATCCCTCA AAGTTGAGATTATTCATGGTTAATAAATAGGTGAGATTATTATAGAAAAAT ACGAATAAATTGGATTATTGTTGGTAATTTTTTTTTTCAAACACTATCCCTAGGA AGGACCTTATTAGTGAATTCCTCCCTCACITTTGGAGGAGTATATTTGGGACTTC CCATCTTCCTTAATTGTATTGTAACTTTTAACTATTGATTCTTTAAAAAAAAG AACITATAAAAATTTGTAGGGTTAATAAATCTAAGATTTTTATCTAATTTCACTT TGATTATCCGATTTTGTATTACATTATTTTAAATGACATTCGTCAAATAAA AAAAAATAGTTTCATTGCATTCCAAATTTTGTGACTAGGGGGATTAAAGAAA	229

(continuación)

Nombre del gen	Secuencia	SEQ ID NO.
	GAATAGTATCAATAATCGTAATGTAGCAAGTGTACAAAAGAAGTATAATTC AATATGTCAAAACTTTGATCTCGTTGTAACTTGTAATTTGTACGATGCGGTGTG AATGACATACCTTACCTTTTTCATTATTTTATACGGTAGTACATGGGATTA TTATTGGGATATTTGCAGTAATGAAAATTTTTTTGGGTTGTTGCTTTTACAAAAC AAAAAATCTACCGAATTTTTTATTAATTTAAATTC AACACCGTTGGTGTACCCA TGATTTATAGGTTCTGGGTCGGCCACTGCTAGCTAACATTAACAATTTAACA AACTC AATACACCAACC TAAAAATAAAAATTTTTTTGGCCATAATTTTATAGAA TTTTAGTTTTTAAACATTAATTTGGGAAITTTTTTCCTTTTATATATAATAAA AAAAAAATAATCCAAAAAAGGGGACACACATTAATACACACTTGAAAGCA TCGATGATATCGAAGAAAAACCAGATGGGGTGGCCAAATATCTTCGTCCT TCGATATTATCGAATTCATTAACAACATTATATCAAAAAACCAACCAAAATAC CAACTTTCGAAAACCAATATTCGCCGTAATTTTCTCTATTTCAACAATCCCTACA ATGGCCGGCATTTGCCAGCTTCTTCTCTCTGCAATTTCCGGAATCACCCACTTG CAATTTTCTTCTTATTTCAAAAAATCAC TACCAC TCGCTTCTAAGGTTTCAAT CGGTTTTACTCCCAAGCCTAAATTTGGCCTTTTCTCCAAGGTTTATTTCTATC TCTTTTTTAATTTGGTTAATCAATTTGGATTCTTGAATTTTTTCAGGGTTTAACGG TATAATATTTGGGGTTTTTTTCGAGTACATTTGGGTTTGTAGTATGGATTT GGCATTGCTTTTTAATTTTGGAGATTGGGTTTTTTGGGTTTTATTTGGTTCTTGT GATTC AAGGTTATTTGATTTGCTGCA TTAAC TGTATTTATGGAA TGTATGCA A TTAAC TGTATACATTACATTTGCTTTATGGTTTTCAATCATGCTGATTAGTGAATTA CTGGTTTTGAATCTCTTGGTTCTCTATGTACTATTTAATCTGATACAACAAGT ACAACCTAGAAAACAGGTTAAAGGGAAATCTATAAGCTTAGTAAATTAACA CTTGAAAAGAAGCTAAATGACGGAGAGAGGGGCTTTTTTTGGAGAAGGCAGTTTT CATATTAATTGCTCAGTTCTCTAGTGCAGCTTTACTTCACTTAGACACTCTTAA GFAGAGGTTATAGGTTTCAAGATAGATCCAAAGACCUGATATTTACCGGAC TTTGTAACAACCTTAACCCGACTTCAAAAATGAATTTACAATCATATAAAAAGC AATATGGACTTAAACCGATTTTGAACCGACC TTGACCCGTTGATCCGAAATGA ATGCCCTCTACTCTTAAGCATGTCAACTGTAAATATGAATAGAAATTAATAAT AAAC TAAAGTTCA TGT TTTCTTCAACTACAAAATGAATTTTATGACCCAAATA ATGTTGTAATACCCCCAGCAATAGGTTGAATGGCAATTTAGTTCAAGTTGATTT AGCAGACCACATCTGCCCTCATAATCCATTGTTTCAGTTTTAGTTGTTAGTACCT GTACATAATAGACTAATTAAGTTGTCATTTTGATCCATGTTATGCTTTGCTGG GTAAACCGGATTTGGAATTTGATAATAAAAAGTTTTGGGTTAGTTTTATTTGCTCT AGGAGGGGTTATGTCATAATGTCACCTCTGTTGGCAACCCGACAATGC AAAAC ATTTTCTACTTTGGTACGTTGTTGGCTGTTTTGGCCCTTCGTATTTTGTAACT GTTGTATGAATGTTGTA AAAATATACTACATGATCATATGCTAGTAGGTTCTCTT CACCTAGTAAAGAAAATTTTTCTAACACGAGAAAGTTCAAAAACATAATCCCATT ACCATTATCCAAACATCAGTACCCGAGTCCAAAGTAAACATAGGGTTGTCCTTTA TGATAGTATAAGAATTTGGTGCATGAAAAACGCTGATTTGTAGCCGAGGATAG TAGCCGGGAGAGGTTACAGGATTTGAAAATTTTGAATTTGCTAAAACGCTATCA GGATCTTGTTTTTCTTACTTTGATGTTGCTTTTTTGAATTTGATCCAAATTTGT TAAATTTATTGAGACTAATTTCTGTTGATCTCTGTTGTAAC TTTGTTAGAATCTT TTAGGGCCGATTTCTACAGTGAAGGCTCAATTAACAAGGTTGAGTCTTTTTTT TGTCTTAACTCTTATGCACTTCTATTAATCTCTTCTACTGATGAGAAAAACACTA TTTGGCCTAATTTCAATTTCTCTTCTTAGGTTGCTTTGGATGGTTCAAAATCATGC TCCATCAGCTTTCGCACGAAAAAATCTGGGCTTACCAGCCCAAGAAAAAGAAGAA CGATGAGCCGCTTACTGAAATCTTCTCTCTGCAGCATCAGTGTCTGAAGAACGA GTCTCCGAATTTCTGAGCC AAGTTGCCGGTCTTGTCAAGTATGTAACATTTCTT TATTTTCAATTTCTCACACACTCGCAATTTGGATAACGAGATCTCTTTAGAGA CGTCTGGGGAAACAAGGGAGAAATGAGTCTAGAGGTTGCTAGAGAGAAACGAG ATAAAATAC TAATATATATGAATATTTGATAATCCACATTA AAAAAAATACAAAT TGAATTTGGATTATGGTGAAC TACC AAAGAATCGAATATTTTTTAATAC TCCA TTTTTTGTGGTCTAGACTTTGTTGATTTTAGAGACATTTAGAGTTTGAATTA AACAACTGGACTTTGAGATATTTGATCTCCG AAGCAGGAAGCTATTTCTCAACC ACAAAATCTAATCTACACATGTTGCTTTGCAATGCAACCACCACCACCTGCT GTAGCGTCTGCCCCAGCTCCCGTCTCTTACCAGCCACTCTCTGCTCTGGCTT ACCTTGCCCCAGCGCTTGTGCCACCTCAGCTAAGCCATCACTTTCCACCTCTC AAGAGCCCTATGTTAGGCACATTTTACCCTAGTCCAGCTCTTGGCGAGCCGCT CTTTCGTGAAGGTAAGTGTATACCCCTTTTTTTAGTGTGATTTCTGTGTTATA TCAATTTTTGCAATTTTGTGAAGCTGAAAATAAATCTTTTCAATTTTCCATAGGTT	

(continuación)

Nombre del gen	Secuencia	SEQ ID NO.
	GGAGATAAAGTTAAGAAAGGACAAGTCATATGCATTATCGAGGCTATGAAGTTGATGAATGAAATCGAGGTACGTATGTTATTGCTTTAAACTTCATGCCTTAGGCCGTGAAGTT	
ALS1	ACAAAAAGCACAAATTCAATAATATACTCTTTAAGTTTGTATCTTCTAATTAGTTCGGTTAAAACGGTTCCTTCTCCGACTCTCACAATTATCTTCCCTATTCATTTTCTTCCACCCTCTCTAATGGCGGCTGTTTCCCTCAATATCAATGGTGGAAAGATTGGAACCTTATGTTCAAGACACGAATTCGTTTGTGGGTTTGTAAGAAAATTTCAATTTAGAACTCATACTTCTATATTTGAAAAACATATGCCAAAACTTCAAGGTTTAAAGCAATGGAAGTTTCTGCAAATGCAACAGTAAATATAGTTCCTGTTTCAAGCTCATTCTAGGTAATTTTATTTCTCGAAAATTTCCGATTACAATTAATTAATCTTGTTTTGTAGGTAATGAATTGCAGAAGAAATAGATGGATTCTTATTTGTTTATTGGTATTTGTTTATAAATTTTGTTTATATTAATTTCTGAATTGTGATTATTCTGATTGTATGTCAAGGTTTAGGTTGTTATTAAATAATGTAAATTGGATTGATTGAAGTTGCAATAAGGTGATGGCGTGATGCTGATTGTTGTAATTTT	230
ALS2	CAACAATGAGAATTTAGAATCCATATCAATCTTGATATTCAAGGGTATTTAAGTAAATAAGAACCAACCATTTGTTAAGCGCCCTCCACTATCTTCTTCCCTTCATCTCCATTCTCGCTTAGCTTTCCCTCTCGCACTAATTACCTCCATTGCAACCTTCAAGCTTTCACAATGGCGTCCACTTCTTCAAACCCACCATTTCCCTCTTTACTAAACCTAACAAAATCCCTAATCTGCAATCATCCATTTACGCTATCCCTTTGTCCTAATTTCTTAAACCCACTTCTTCTTCTTCAAATCCCTCCGCCCCCTTCAATCTCATCATCTTCTTCTCAATCACCTAAACCTAAACCTCCTTCCGCTACTATAACTCAATCACCTTCTTCTTCAACCGATGATAAAACCCCTTCTTCTTTGTTTCCCATTAGCCCTGAAGAACCAGAAAAGGTTGCGATGTTCTCGTTGAAGCTCTGAAACGTGAAGGTTGTTACCGATGTTTTTGTCTTACCTTGGTGGAGCATCCATGGAAATCCATCAAGCTCTTACTCGTCTAATATCATTAGAAATGTTCTTCCCTCGACATGAACAAGGTGGGGTTTTCTGCTGCTGAAGGCTACGCTCGTGCCTACCTGGAACGCTTGGAGTTTGTATTGCCACTTCTGGTCC	231

(continuación)

Nombre del gen	Secuencia	SEQ ID NO.
EPSPS1	<p>ATTTGGATAA CTTTTCC TTTGATT CGAATCGG ATTATTTT TTAATACAGTAT T                      A'GAAAC'IGATTTAATGAAAGTGGAGGAAGTTTCAATTTTTAAAGTTGTAGGT                      GTAATGTTTTCTCATTTTGGATATGAAAGTGGAGGAAGTTTCAATTTTCAATC                      AIGTTTGGCCAGTTGATTCAATGAA'GCT'CTTGGAAATGACCAAGAGTTCAAG                      GCTTCTTTGTTATAAAAACATTTCAATTTTGTACTAAGAATGAACTATTTAGAAC                      T'AAAAGTAAT'AAAAT'ATTAAGTTAATAAC'TTATAAAAAAAAT'CAATTTTAAACCT                      TAAATTTATAAATTATGACCTTAAAAAGATCAAGTATTGAACGCATATTTAG                      AAAAAATTATAATTCGGCTTATCAGTCTCATATTTGAGACGGTCTCCGTCCAAAG                      CAAGTTGTATCATTTATAATAATCAAAATATAATTATGAGTGTATTTCATGTAGGT                      T'CAAC'TT'AAAAGCCTAGGT'GAAAGATATGTT'G'FAGCAT'CTT'GT'GAAAGT                      AGCCTATAACTTGGTTCTAAAATTTTGAAGCATAACCATATAGTCCCTCGAA                      T'CAT'FCAAGT'CT'CCAATTTACTTTTTATACTTGGCCGAGACAACATTTAAA                      CCC'FAAT'ATTT'CAATTAATCTTAATTAAAAAATTA'GAAAAAT'FGATATTA                      TAA'CT'FT'G'AT'FGAAACGAAAT'FAACAAGAT'CT'CACT'GACTA'GT'TT'AACT                      TTATAGATTAAAAAAAATACAAATTAAGAGTGATAAGTGAATAGTGCCCC                      AAAACAATGGGACAACCTTAGATGAATTTGGAGGTAAATATTAGGTAGCAAGT                      GATCAC'TT'AAACATCAAAAT'GAT'CACTTATAGGT'CAAAAT'GAAACTTTTAC                      TTTAATTGATATGTTTAAATACTACTTTAAATTGAAATTGATATTTTTAAGGT                      CAAAAAT'GAAACCTTT'AAAGATTAATAAT'GAAAAAT'GGCAGAAAGAAAAACA                      AGAGAAAGAA'ATAAGACACGCAAAAT'GT'ACCGAT'CT'ACT'CT'ATTT'CAAT                      TTGAGACGGTCTCGCCCAAGACTAGATGTTCCGGTCACTTACACCAACCCCAA                      AAAATCAACAACAAGTCTTATAAATGATTCCCTCTAATCTACTACAGTCTA                      CACCAACCCACTTTCTCTTTGCCCACCAAAAACCTTTGGTTTTGGTAAAGAACTAAG                      CCCCCTTTCTTTCCCTTCTCTCTCTTAAAAGCCTGAAAAATCCACCTAACTTT                      TTTTAAAGCCAACAACAACGCCAAATTCAGAGAAAGAAATAATGGCTCAAG                      CTACTACCATCAACAATGGTGTCCAAACTGGTCAATTGCACCATACTTTACC                      CAAATCCCAGTTACCCAAATCTTCAAAAACCTTFAATTTTGGATCAAACTTTG                      AGAATTTCTCCAAAGTTCATGTCTTTAACCAATAAAAAAGAGTTGGTGGGCA                      ATCAITCAATTTGTTCCCAAGAT'CAAGCT'CT'GT'GTGCTGCTGCAGCTGAGAAA                      CCTTCATCTGTCCCAGAAATTTGTGTTACAACCCATCAAAGAGATCTCTGGTA                      CTGTTCAAITGGCTGGGTCAAAGTCTTATCCAATCGAAATCCCTCTTTTGTAGCT                      GCTTTGTCTGAGGTATTTATTTCTCAACTGCGAAAACAATCTCTATTTGATAT</p>	232
	<p>TGGAA'TTTTATATTACAT'ACT'CCA'CT'FGTT'G'FAAT'FGCATTAGT'AGAT'ACT'FA                      TGTTTTGACC'TTTGTTCA'TTTGTTTGTGTAATTGGTAGTGTGAGAAATTTGAAT                      G'AAIT'ATTT'GTTT'CCAT'GTGAATTTAATCTGAT'FAAATCCACTTCTTATTT                      ATGTTAAGTTGCAATGATGTTTGCCAAATGGTTATCATTGAAGGATAAGTTT                      GCC'ACTTTT'GACCC'TCCAACTT'CGCGGTGGTAGAGCCATTTTATGTTATTTG                      GGGGAAATTAGAAAGATTTATTTGTTTTGCCTTTTCAAAAATAGTAGCGTTCTGT                      GAT'CT'GATTT'GGGTGTCTTTATAGATA'ATGATATATGGGT'ATTT'CAT'G'FAATG                      TGTAGGTTTATGCATTAATGTTGGATGCATGTCTGGTGTATTGCTGTAAATGG                      ATGAA'GT'GT'ATTT'GGAGACA'TTTT'CAT'CT'ATTTT'CCCTTTT'FAATTTG                      GAAC'TGGAAGAGGGAAAAGTTATTTGGGAGTAATTA AAAAGGT'TGTGAGTT'CGA                      TACACTGCATCAAAAGACGAAGAAC'TTGACATAGATGTTGAAAGGCTAATCCTT                      ATCACTGCTTGAATTCATATGTATCTGAAAATTTTACCCCTCTATATGCATC                      TGTTTTGCTAATAAAGTGTTTTTGGACTATCA'GT'TTTT'G'AT'GCTTAAAGAG                      GG'GATATTACTGAGATAAAATGGAAATA'CAAAAATAACA'CT'ATTT'G'GAAGT</p>	

(continuación)

Nombre del gen	Secuencia	SEQ ID NO.
EPSPS2	CAAGCTTCAATTATCGTTTTCAAAAATAAGTATTTCAAAGTCTATAAAGATATF GTATAAGTTTTAGTTCAAATTTAATAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TGA AAAATCCAAAATGAAATAAGTTAATARTTAAAATTAAGACATATAAATAAIG CATATAAATTTGACCATGATATTTTACAATCTAACCTAAATTTTGAACCTAATAT TTTCAATAATTCAAATTAICGTTCTAAAAATAAGTATTTAAAATTTGATAGATATA TTGTATAACATTTAGTTCAAATTTAATTAATTGATAGTTTTATTGACTATTTATT TGGKGTTTGAAAATTCATCCATAGAAATGATAGAAATAACACCATTTTTTATATA ACTTCGTTCTAAAATTTTGAAGCATAACCATATACTCCCTCCAATTCATCCAA GTTGTTCCAAATTTACTTTTTCTACTTTGCGGAGGCCAACATTTAAAACCTTAATA TTTCTAATTAATGTTAATTA AAAATTAATGAAAATTTGATATTAATAATCCTTG TATGAAAACAAAATCTAACAAAGATCCACATGACTATGTTTTAACTTATAGAT TAAGAATAAAAATACAAAATTAAGAGTAATAAGTGAATAGTGTCCCAAAAACAA ATAGGACAACTTTGGATGAAATTTGGAGGTAGTATTAGGTAGCAAAGTATCACTT TAACATCAAAAATTTGATCAGTTACAGGTTCAAATTTGAAAATTTTACTTTAATTG ATATGTTTTAAAATACTACTTTAAAATTTGAAAATTTGATATTTCTTAAAGTCAAAAATTTG AAAACTTTAAGATTATAATTTGAAAATTTGCCAGAAAGATGAAAAAACAGAGA GAAAGCATGTAAGACACGCCAAAATTTGAACCAGTCTACTCTTGTTTCAATTTGA GACGGTCTCGCCCAAGACCAGATGTTTCAATCTACCTACACCAACCCCAAAAA ATTTCAACAACAAAATCTTTAATAATGATTTCCCTCTAATCTACTAGAGTCTACACC AACCCACTTTCTCTTTGCCCACCAAAAATTTGGTTTTGGTGAGAACTTAAGCCCT CTCTTTCCCTTCTCTCTTTAAAAGCCATAAAAACCCACCAACTTTTTCAGCCA AGAAAACAACCGGAAATTTAGAGGAAGAATAATGGCTCAAGCTACTACCATC AACAAATGGTGTCCATACTTGGTCAATTTGCACCACTACTTTTACCCAAAACCCAGT TACCCAAATCTTCAAAAATCTTAATTTTGGATCAAACCTTGAGAATTTCTCCA AAGTTTATGTTTAAACCAATAAAAGAGTTGGTGGGCAATCATCAATTTGTTT CCAAGATTCAAAGCTTCTGTGTGCTGCTGAGAAACCTTCTATCTGTCCCA GAAATTTGTGTTACAAACCCATCAAAAGAGATCTCTGGTACTGTTCAATTTGCCITG GGTCAAAGTCTTTATCCAATCGAATCCTTCTTTTAGCTGCTTTGTCTGAGGGC ACAACAGTGGTCCGACAACCTTGCTGTATAGTGATGATATTTCTTTATATGTTGG ACGCTCTCAGAACTCTTGGTTTTAAAAGTGGAGGATGATAGTACAGCCAAAAG GGCAGTCTGAGAGGGTTGTGGTGGTCTGTTTCTGTTGGTAAAGATGGAAAG GAAGAGATTCAACTTTTCTTGGTAATGCAGGAACAGCGATGCGCCCAATTGA CAGCTGCGGTTGCCGTTGCTGGAGGAAATTCAGTTATGTGCTTGATGGAGT ACCAAGAATGAGGGAGCGCCCAATTTGGGGATCTGGTAGCAGGTCTAAAAGCA ACTTGGTTCAGATGTAGATTTGTTTTCTTGGCACAAATTTGCCCTCCTGTTCCGG TCAAATGCTAAAAGGAGGCCTTCCAGGGGGCAAGGTCAAAGCTCTCTGGATCGGT TAGTAGCCAATATTTAACTGCACCTTCTCATGGCTACTCCTTTGGGTCTTGGAG ACGTGGAGATTTGAGATAGTTGATAAATTTGATTTCTTGTACCGTATGTTGAAAT GACAATAAAGTTGATGGAACGCTTTGGAGTATCCGTAGAACAATAGTGTATAGT TGGGACAGGTCTACATTTGAGGGTGGTTCAGAAATACAAAATCTCTTGGAAAAGG CATATGTTGAGGGTGTGCTTCAAGTGCTAGCTACTTCCTAGCCGGAGCCGC CGTCACTGGTGGGACTGTCACTGTCAAGGGTTGGTGGAAACAAAGCAGTTTACAG GTATAATGTTAACCCTTACCCTTACATTTGTTCTGCTAAAATTTAGAGGACCC TTTCAATTTCTGGGTGGGATAAGCACGGCAATTTGACCCGCAAAAAAATTTGCAA AATTAATCTGCTGATAGAACATCTCGAGATGAGATCATATTGAGTTTTGGCG TCAACATAAAACCTAAATCAATAAATGAAAATAACAAACATATAATGTTTCTT	233

(continuación)

Nombre del gen	Secuencia	SEQ ID NO.
	<p>TTGTCCTTATGACTAGACACTCTCTATTTATTCCTTGGATTTGGATCTTATTTGAA                      ATTGCTGTGTAGCCTACACCTCATGTTCCAGATTTTGTTCGTATACCAGACTTT                      TCTTGGATTTGGGATCTTATTTGTCCTCCCTGGATTTTTCATAGGGTGGATGTAATAAT                      TTGCCGAAGTTCTTGAGAAGATGGGTTGCAAGGTCACCTGGACAGAGAATA                      GTGTAACCTGTTACTGGACCACCCAGGGATTTCACTCTGGAAAAGAAAACATCTGCG                      TGCTATCGACGTCAACATGAACAAAATGCCAGATGTTGCTATGACTCTTGCA                      GTTGTTCCTTTGTTATGCAGATGGGCCACCCGCCATCAGAGATGTGGCTAGCT                      GGAGAGTGAAGGAAACCGAACGGATGATTGCCATTTGCACAGAAGTGGAGAA                      AGCTTGGGGCAACAGTTGAGGAAGGATCTGATTACTGTGTGATCACCTCCGCC                      TGAATAAGCTAAAACCCACCCGCAATTTGAAACTTATGACGATCACCGAATGGCC                      ATGGCATTTCTCTCTTGTGCTGCTGTGCAGATGTTCCCGTCACTATCTCTTGTATCC                      GGGATGCACCCGTAAAACCTTCCCGGACTACTTTGATGTTTTAGAAAAGTTCC                      GCCAAGCATTTGA</p>	
GS3	<p>TCTTAAATTTGTAATTTTATTTATTTAACTATAAAGTTAAAACATAGTCAAAGTGAGA                      TCTTTGTTTGGATTCTGCTCTATGCAAGGATTTTCATATCAACTTTTCATAATTTT                      TGATTTATACACAATTTACAAAATTTAACGAACGAATTAAGTGCATTTAAAAAGA                      GTGCAAAAAGCAAAATGGGACACTTTGTTGTTGAATAGGAGGGAGTATACATTA                      AGATGAATCTAACGAGATCTCACATGGATATAAATTTGTCCTCTATATATGTCT                      AAAAAATCTTGATCAAATTTCTCTTTCCAAAATAGAATATTTCTAAATGGGAA                      GAACATTAAGAAAACGGAGGGAGTACTTATAAAGTTAAAGATAGTTGGGGGTAT                      TTAGGTAATAAAATCTATGCCAAAAGTAGAAAAGTGGACAATTAGAGTGAAT                      TTACTTAAATTAAGGAAAAGTGGACATTTAAAATGAATCGGAGGGAGCATATTA                      ACTTTATTTTCAAAGTGTGAAAACATAATCATATTTAGGTAAAAAAATTATCA                      ATTTAACCTCAAAAATTTGATCACAAAATAGGTTAAAATTTGAAAATTTTTTATGTTA                      ATTGATCTATTGTTCACTTTAAATTTGAAATTTGATATCCTTTAAGGTTAAATTT                      AATACCCTCTAAAATTTAAAATTTAATAAAGGCCAGAAAATAAAAAAGGAA                      AGACAGGCTATTAGTAAAATTTAAGTATGTAAGGTTGATACACGCGCGAA                      TTGAGCCCGGCCACTTTTATGTTTCAAATTTGAAAACAGTCTCAAATCAAGACCAA                      TTATTTATTTATTTTATTTTATTTTATTTTAAAGCTCAATGGGTTGGACTTGATA                      AATTTATTTTGGAGGAGACGGGCTATTAGTAAAATTTAATAGTTGGAACTTTT                      TTTGATATACTATAAAAAGAGGTATCTGGTGGAGCCTTAAATCTGCGCAAT                      GAAGTCCCAATAACACAATCTCGCTCTCTCTTATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT                      TTGATCAAACCTACGCCATGTCTCTCTTAAATGATCTCGTTAACCTTAAATCTCT                      CTGAAACTACCGATAAGATTTATCGCTGAATACATATGGTAATACAACAATCC                      TTCTCTTTTTTCAATTT</p>	234
GS5	<p>AAAAAACCGTCTTATTTGTAGAAAATAAAAACTAAAAAGTAGTATCAACTT                      TTAGACTAGTCATAAAGTGAGTGGCATCAAACCTGTTCTATAAAAAGGGAAGA                      GTTCCCTCAACTTGAGATTCATATTTTGTGATTTCTAAATAGAAGAACATAC                      TCATCTTCCACTTCTCTTATTCATCAAATTTTATTTGTTCCCCAAAAAACAT                      GTCTCTCTTACAGATCTCATCAATCTTAAATCTTTCTGACTCCACTGAGAAGA                      TCATTGCTGAATACATATGGTCAGTTTTTCATCCCTTTTTTTTACCTTTAATCCC                      ACTTTTTGTTTTTACCCACCATTTTTTTCATCTATTTTCTCTTAAAGATTTTTAA                      CTTTTTACTTTTTTGTGTATATAACATTCATTTTTTCAATTGGGTAGGTTAGAA                      AATTTCTATAAATAAATAAATAAATNNNNNNNNNTACCTTAATCCCACTTTTT                      TGTTTCTACCCACCATTTTTTTCATCAATTTTTTCTTAAAGATTTTAACTTTTTT                      AACTTTTCTTGGTTTTTGTGTATATACCAATCATTTATTTTCACTAGTGTAGG                      TAAAAAATATCTAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA                      TTAACCCATGAATTAATTTCCCTTGTTTTTACTCAAACCTTTTTTACCCTTGTAA                      AAAATAATGATATAAATAAATTTTTGAGGGTTTGTAAACCCATATGTAATC                      TATATCGAAAAAATTAGATAGCGGTTTTTGTGTGGACAAACTAAATAACAA                      ATTTAGGAATAAACTTTTTGAGGGTTTATTGAAAAAATAACCCATATTTAATC                      TATATCGAAAAAATGATAGCGAGCTTTGTATAGAT</p>	235

(continuación)

Nombre del gen	Secuencia	SEQ ID NO.
HPPD	CGTCGAAGTAGAAGACGCGGAAGCTGCCTTTTAAACATCAGCGTTTCGCATGGG GCTATTCCCTGTGTTCTCCTATTCAATTGGAAAACGGTGTCTGTTTTATCTGA GGTTCAITTTATAATGGGGATGTTGTCCTTCGGTATGTAAGCTACGGAAATGAA TGTGGGGGATGTGTTTTTCTCCTGGGTTTGAGGAAATGCCGGAGGAATCAT CGTTTAGAGGACTTGATTTTGGCATTCGAAGGTTGGATCATGCTGTAGGGAA TGTCCCTGAGTTGGCTCCTGCAATTGCTTATTTGAAGAAGTTTACTGGGTTTC ATGAGTTTGCCTGAGTTTACAGCTGAAGATGTTGGGACGAGTGAAAATGGATT	236
	GAATTCAGCCGTATTGGCAAACAATGATGAAATGGTGTGTTTCCGATGAAT GAACCTGTGTATGGGACAAAAAGGAAGAGCCAAATTCAAACTTATTTGGAG CATAATGAAGGGGCTGGTGTACAGCATTGGCTTTGATGAGTGAAGACATAT TTTGGACTTTAAGGGAGATGAGGAAGAGAAGTGTCTTGGTGGGTTTGAGTT TATGCCGTCGCCGCCTCCGACTTATTACCGGAATTTGAGGAACAGAGCTGCT GATGTATTGAGTGAGGAGCAGATGAAGGAGTGTGAAGAGTTGGGGATTTTG GTGGATAAAGATGATCAGGGCACTTTGCTTCAAATCTTCACCAAACCTATTG GAGACAGGTAAATTTAATCTTGCTTCAATTGCTTTTGCTTGATGGATTGAC TAGCAAATTTGATCGCATTTTGTGCTTATATGACTTGATGATACTTCCTCTG TTTTCGAAATACTCGCTACATTCCGTACATTTTGTGTTTGTGCACTATTCATCGTT CAAGCTTATTTTACATATTGCGACTAATGTGTAACAAAAATATAGTCAAGT GGGATCTTGTGTTGAATCGTCTAATGGCATACTTTCATCATATTTAAATTTTAT AATTTTAGATTAGTGTAGTTTAAAGATATTTAATGCTCAAAAATTGTGCATTGGA TTGCGTAAAAAAGTGAATGTAGCAAGTATTATGAAA	
PDS	AAAACCAAAGGAAATAAGTTATAGGTAGGAAAAAATTGTTATTGAAGTTAAT GTAGTAAACTAGTAACTTAAACTGTGATACCCCGGATTTAGCTTAAAAAGAG ATTGATAGACTACTCATATCAACAAGGTGCATCTTCTTTTCTAGGGAGCCCAT TTGCTAAGAACTCTACAGTTAAGCGTGCCTTGGTGGGGAGCAATCTTAGGATG GGTGACCTCCTGGGAAGTTTTCTGGGTGCGCACGGGTGAGGCCAAAGTGCG TTAAAAAGACTTGTGTTGGTCTGTGGGGCTTGTCTACAGTCTCCATGAGTAGT CACCGGCGGTACGAGAGGCCGGGGTGTACATAAACAGACTCAAAGGCGCT AAGCCAAGTAGCCAATAGCAACATGTGTGGCCTGCGGACAGTCACAAAAAC ACACAATTTCTTATTTTTACTCTCTTTTATCTCTTTTAGGCTTTAGCCATCAAC AATAAAACAACATGATAAAGCAATTCATTTACTGCTAAATTCCAACAATTTG GTCCCTTTTCTGTTCTTTCAGTTTCACATACCCTTTATCAATCTATATCCA AACTATTTTCAATTTCCAAACTTTTTAAACCCAAAAATCAAACTTTTGATT GAAGAACAAACTTTGGGGGTTTTGGAAAATGAGTCATTTTGGATATGCTTGT GCTACTCAATCCACATCAAGATATGTTCTTTTAGGAAATTCAAATAACCCCA CTTCAATTCATCTATTGGAAGTGAATTTTTGGGTCATTCTGTGAGAAATTC AGT	237



(continuación)

Nombre del gen	Secuencia	SEQ ID NO.
PPOX	<p>TGGTACCTACCCTGTTTACATTTTCAATTTCCCCCTTTTTTCTCTACTACTCCT                      ACTTTATTGATTCTTATCCATGTGTGTTCTATGGGAATTGACATTAATTGTTC                      AGGTGTGTATGCTGGTGATCCTTCTAAGTTGAGTATGAAAGCTGCATTTGGA                      AAGGTCTGGACCTTAGAGCAAAAGGGTGGTAGTATCATTGCCGGTACACTCA                      AACTATTTCAGGAAAGGAAGAATAATCCTCCACCGCCTCGAGACCCGTCGGT                      AATCACCATTACTCATTGCTTTCCTTACCTTGTATCTTACCTTAATATACATG                      TATTTAATTGATAATGTACATTGCCCTCATTGTCAGCCGCTTCTTAAACCTA                      AGGGCCAGACTGTTGGATCCTTTAGGAAAGGGCTCATTATGTTACCTACCGC                      CATTGCTGCTAGGTATCTTTTGACTCTCAAATCTTAAATATTTCTCATCTTCTC                      CTTCTGCTAATACTAGTATGTTTACCATCTTTTTATTTTTTTAGGCTTGGCAGT                      AAAGTCAAACCTACGTGGACACTTTCTAATATTGATAAGTCGCTCAATGGTG                      AATACAATCTCACTTATCAAACACCCGATGGACCGGTTTCTGTTAGGACCAA                      AGCGGTTGTATGACTGTCCCTTCATACATTGCAAGTAGCCTGCTTCGTCCGC                      TCTCAGTGAGTATCATTCTTTCCTTCAATTTCTTTTCGTTTATTGTTGTCCAATG                      TCTTGTTAAACACCAGTTTGGCCTTGTGCTCGTGAATTATGGCTACAATGTTA                      ACTGATTCAGGCACTGTGGGAGATGCCTAAGTTTCTAAAACCTCTGCGCATA                      ATGTTTGTGGATGTTAGGAATTGCATTGAAAAATTGCTTTTGTGATGTTGA                      TGTTAATACCAATTACAAGTGTGTTCTTCAACTTCTGCAATACCTTGTTCGAG                      TGAGCTTGAGGGGTTTAGATTAGTGTCCAATGTGAAACTAGCAAATGAACT                      CCAAGCGCTGGGATAGGCTTGGGATGGAGCCCTGATACCCAAGACAGT                      ATTCAAACCCTCTAAGTAGAGTGAGAGATCAAGGAAAGAAACTGGGTGTT                      CCTCAAATCGTAAAAAATGAATACAGTGTATGATTGCTAATCTTATCACAA                      ATCGTAAAAAATGAATTATGGTTCGATTTTGGACTATTTTTGGGTCATTTTGG                      TGAATCTCGAACTTAAAAAGCGAGTCTTCTAGCAGTTCTTGTACAGCGGGG                      CATAATAGGTAGGAATTTGGTTTTTTACTATTTGAGCCTTTTACTGTTGTG                      GCCGGTAATATGGAATAGTCTAGCACTTCTGCGTGTGTACAACCTAGTATTTA                      TTGTAATTATGTGATCGCACTTAACTCTCAGATAAAAACCTTAAGCACTAACA                      TTTTGTTTTGGTTGAAGGAATCAGGAGGAAAAGAAAATTGAGGGATTTGTTGG                      TATATAGATTCTTTGTTTGGATAACAAAATTGGAGTGGAGAGATTTGGAAG                      GAAGAATTTTATAGGGATTAGTTCCTTACACTTATGTTGATTACAAAATTT</p>	238
	<p>CTCCAAAAGTGGAAAGATTTTGTAGTGAATAATGTTTTTATTTCTCTTCTCCTC                      CCTTCTTTCCCTCTTAAACAACAAGGAAAGTTAATCTTATCATTCGGTACC                      TTCCCCTTCTGTTCTTTTTTTTCTCTCCAAAATTCCTTATCCTAACGTAGTGTTA                      TTGTCAGTGTCTTATGAACGAGAATTTCTTTTCTCCTAATACTGCTTGTGTTGC                      ACAGTCAATGATTTAGCTAGATCATCTTTGGTTAGCTACTCAAAAATATTTACA                      TAAAATACTTGTAGAAATAAATACCAATAGGTCTTGTCAAGAAGTAGTTTCA                      ATGCTATAAGTTTTAAACCAATCCTCAAAATTTACACCATGGAGATATCTGCG                      GATAAGAAGTAACTGTAGCAGCTGTAACCTGTTGCAATCAGTTTTATGGT                      TTGCCCTGCAAATCAAACCTTTGGATGTTGTTTGCCTTACAATTTGTTACTATT                      ACGTGAAGTTTAGTGTTCGCCCCTCACATTGTACTTTGGTTTTTTGTTTTCTTG                      CAATTTGCTCTTTGAAGTATAAAGTGCTGAGTGCTGAGTGCTGAGTGCTGAC                      CTTTCTGCTCAGGATGTTGCTGCAGATTCTCTTTCTCAATTTTACTATCCACC                      AGTCGCAGCAGTGTCCCTTTCTTATCCCAAAGAAGCAATTAGACCAGAATGC                      TTGATCGATGGAGAACTAAAAGGATTCGGGCAATTGCATCCTCGCAGCCAGG                      GTGTGGAAACCTTGGGTATATGCTCCCACTTCAACTATATCTCAATTTTTATGA                      GTATTTTCTTTCTGAAATTATCAATTTGGTGACGTTAAATTTTGATTGTAC                      TCGACAGGAACAATTTATAGTTCATCTTTTTCCCTGGTTCGAGCACCACCTGG                      TAGGACCTTGATCTTGAGCTACATTGGAGGTGCTACAAATGTTGGCATATTA                      CAAAAGGCAAGTCATTTATACAATTATCTGTTGTATCCTCAAATAAGTGG                      GTATCAATCCTGACGACATGCTTGCTTGTATCGATGCAGAGTGAAGATGA</p>	

**Ejemplo 31**

205) Este ejemplo ilustra una secuencia de polinucleótido que regula la expresión génica en más de una especie de plantas. Se identificaron dos regiones altamente conservadas en secuencias de EPSPS y mostradas como secuencias de "Región 1" y de "Región 2" en la **tabla 23**.

Tabla 23

Especie/gen o secuencia consenso	Región 1	SEQ ID NO:	Región 2	SEQ ID NO:
Euphorbia_heterophylla_1Contig1	AGTTTACAGGGAGATG TAAAGTT	239	TCGATGTGAACATGAACAAAA TGCCAGATGTCGCTATGACATT GGCTGTGGTTG	251
Euphorbia_heterophylla_2Contig1	AGTTTGCAGGGAGATG TGAAATT	240	TCGATGTGAATATGAACAAAAT GCCAGATGTTGCTATGACATTA GCTGTGGTTGC	252
Ambrosia_trifida_1Contig1	AGTTTACAGGGGGATG TAAAGTT	241	TCGATGTTAACATGAACAAAAT GCCAGATGTTGCCATGACGCTT GCAGTCGTTGC	253
velvetleaf_1Contig1	AGTTTGCAGGGTGATG TAAAATT	242	TTGATGTCAACATGAACAAAAT GCCAGATGTTGCCATGACTCTC GCTGTTGTTGC	254
Xanthium_strumarium_2Contig1	AGTTTGCAGGGTGATG TGAAATT	243	TTGATGTCAACATGAACAAAAT GCCATGATGTCGCAATGACTCTT GCTGTGGTTGC	255
Ipomoea_hederacea_1Contig1	AGTTTACAGGGGGATG TTAAGTT	244	TTGATGTCAACATGAACAAAAT GCCAGATGTTGCCATGACTCTT GCTGTAGTTGC	256
Chenopodium_album_1Contig 1	AGTTTACAGGGTGATG TAAAATT	245	TTGATGTCAACATGAACAAAAT GCCAGATGTCGCAATGACTCTT GCTGTTGTTGC	257
Digitaria_sanguinalis_1Contig 1	AGTTTGCAGGGTGATG TGAAATT	246	TTGACGTCAACATGAACAAAAT GCCTGATGTCGCAATGACTCTT GCTGTGGTTGC	258
Senna_obtusifolia_1Contig3	AGTTTACAGGGAGATG TAAAATT	247	TTGATGTCAACATGAACAAGAT GCCAGATGTTGCCATGACGCTT GCTGTAGTTGC	259
bledo_EPSPS	AGTTTACAGGGTGATG TAAAATT	248	TCGACGTCAACATGAATAAAAT GCCAGATGTTGCTATGACTCTT GCAGTTGTTGC	260
almizcle_EPSPS	AGTTTACAGGGTGATG TAAAATT	249	TCGACGTCAACATGAACAAAA TGCCAGATGTTGCTATGACTCTT TGCAGTTGTTGC	261
palmer_1Contig1	AGTTTACAGGGTGATG TAAAATT	250	TCGACGTCAACATGAACAAAA TGCCAGATGTTGCTATGACTCTT TGCAGTTGTTGC	262

206) La **tabla 24** lista secuencias de polinucleótidos de ARNbc 21-, 22-, 24-, 35-, 45- y 55-meros diseñados basándose en la secuencia consenso de EPSPS para la región 2, TNGANGTcAAcATGAAcAAaATGCCaGATGTNGCNATGACNcTtGCNGTNGTTGC (**SEQ ID NO: 263**).

Tabla 24

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
ARNbc consenso 21-mero	Sentido: AACAUUGAACAAAAUGCCAGAU	264
	Antisentido: AUCUGGCAUUUUGUUCAUGUU	265
ARNbc consenso 22-mero	Sentido: AACAUUGAACAAAAUGCCAGAUG	266
	Antisentido: CAUCUGGCAUUUUGUUCAUGUU	267
ARNbc consenso 24-mero	Sentido: CAACAUGAACAAAAUGCCAGAUGU	268
	Antisentido: ACAUCUGGCAUUUUGUUCAUGUUG	269
ARNbc consenso 35-mero	Sentido: UCGACGUCAACAUGAACAAAAUGCCAGAUGUUGCU	270
	Antisentido: AGCAACAUCUGGCAUUUUGUUCAUGUUGACGUCGA	271
ARNbc consenso 45-mero	Sentido: UCGACGUCAACAUGAACAAAAUGCCAGAUGUUGCUAUGACUCUUG	272
	Antisentido: CAAGAGUCAUAGCAACAUCUGGCAUUUUGUUCAUGUUGACGUCGA	273
ARNbc consenso 55-mero	Sentido: UCGACGUCAACAUGAACAAAAUGCCAGAUGUUGCUAUGACUCUUGC AGUUGUUGC	274
	Antisentido: GCAACAACUGCAAGAGUCAUAGCAACAUCUGGCAUUUUGUUCAUGU UGACGUCGA	275

207) Los polinucleótidos de ARNbc consenso de EPSPS se sintetizaron mediante transcripción *in vitro* y se aplicaron por vía tópica en forma de preparaciones de ARN en bruto. Se trataron malas hierbas resistentes al glifosato (almizcle y achicoria con 16 copias) con los seis ARNbc consenso individuales (21-, 22-, 24-, 35-, 45-, 55-mero); las malas hierbas no resistentes al glifosato (bledo, senna de china, grama sanguina, enredadera, cenizo, Euphorbia) se trataron con los tres ARNbc consenso individuales más cortos (21-, 22-, 24-meros). Después del tratamiento con polinucleótidos, las plantas resistentes al glifosato se trataron con glifosato (1682 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®) y las plantas no resistentes al glifosato se trataron con glifosato (105 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®). A los 7 días después del tratamiento, se observó que los seis polinucleótidos de ARNbc consenso de región 2 de EPSPS controlaban el 100% (eliminó las plantas) de almizcle resistente al glifosato; las plantas de control de almizcle tratadas solo con glifosato no fueron eliminadas. A los 7 días después del tratamiento, se observó que los tres polinucleótidos de ARNbc consenso de región 2 de EPSPS más cortos (21-, 22-, 24-meros) ensayados individualmente proporcionaban un control del 95%, 80% y 65% (combinando plantas eliminadas y lesionadas), respectivamente, del bledo; el tratamiento solo con glifosato en plantas de bledo proporcionó un control de aproximadamente el 40% (combinando plantas eliminadas y lesionadas); y una mezcla de los tres polinucleótidos de ARNbc consenso más cortos (21-, 22-, 24-meros) proporcionaron aproximadamente el mismo control que solo glifosato. Los polinucleótidos de ARNbc consenso de región 2 de EPSPS no provocaron un efecto observable en las otras especies de malas hierbas (achicoria, grama sanguina, enredadera, cenizo, euphorbia) ensayadas.

#### 20 Ejemplo 32

208) Este ejemplo ilustra el uso de un tratamiento tópico con polinucleótidos para silenciar de manera transitoria un gen en una planta para efectuar un fenotipo deseado. El silenciamiento de polifenol oxidasa en tejidos vegetales inhibe el ennegrecimiento de tejidos vegetales cortados o dañados, un rasgo valioso para frutos y hortalizas donde la resistencia al ennegrecimiento es un rasgo deseable.

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

Tabla 25

Oligonucleótido antisentido	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO.	Longitud
HH07	<u>TAATACGACTCACTATAGGGCTTTATTGAATTTAGCTATGTAATC</u>	276	45
HH09	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTTTATCAACCAAAATGTGCAGC</u>	277	41
HH11	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTTGCTGTACATAATTGTGAGATTTGTGG</u>	278	49

5 **210)** Se trataron plantas de lechuga de tres semanas de edad (variedad SVR3603 L4) del modo siguiente. Se pretrataron dos hojas fuente (hojas que tienen más tiempo y tienen ~60% de su tamaño maduro) en cada planta con Silwet L-77 al 0,1 % (v/v) y se dejaron secar (~15 minutos). A cada hoja se le aplicaron 20 microlitros de una mezcla de los polinucleótidos antisentido de polifenol oxidasa en una solución de Silwet L-77 al 0,01% (v/v) y sulfato de amonio al 2% (p/v) en fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8, en forma de pequeñas gotas; 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). Se trataron plantas de control con un polinucleótido HH02-05 no relacionado (antisentido para fitoeno desaturasa) o con tampón (Silwet L-77 al 0,01% (v/v) y sulfato de amonio al 2% (p/v) en fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8) solo.

10 **211)** Aproximadamente 3 semanas después del tratamiento tópico de polinucleótido, las hojas de lechuga "no tratadas" (es decir, no aquellas tratadas con los polinucleótidos tópicos) se cortaron de la cabeza de lechuga bajo el agua y se incubaron en una copa con jasmonato de metilo 1,33 milimolar en etanol al 5%. Se inspeccionaron las hojas respecto del ennegrecimiento de la costilla central y se tomaron fotografías cada 24 horas. Se tomaron muestras de las plantas restantes y se congelaron para el análisis de ARN pequeño y ARNm.

15 **212)** Las plantas tratadas con los polinucleótidos antisentido de polifenol oxidasa HH07, HH09 y HH11 mostraron una reducción significativa en el ennegrecimiento de la costilla central después del tratamiento con jasmonato de metilo. Las plantas tratadas con HH02-05 (antisentido para fitoeno desaturasa) como control mostraron una pequeña reducción en el ennegrecimiento de la costilla central en comparación con el control tratado con tampón.

### Ejemplo 33

20 **213)** Este ejemplo ilustra una composición herbicida adaptada para recubrimiento tópico sobre la superficie exterior de una planta en crecimiento que comprende tensioactivo y al menos un agente letal para plantas, la mejora en la que el agente letal para plantas incluye polinucleótidos que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un gen de planta o la secuencia del ARN transcrito del gen de la planta, efectuando los polinucleótidos la supresión sistémica del gen vegetal. Más específicamente, este ejemplo ilustra una  
25 composición herbicida adaptada para recubrimiento tópico sobre la superficie exterior de una planta en crecimiento que comprende tensioactivo y al menos un agente letal para plantas, la mejora en la que el agente letal para plantas incluye polinucleótidos que efectúan la supresión de los genes de fitoeno desaturasa (PDS), 5-enolpiruvilshikimato-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 muy altamente expresado (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa) en una planta.

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

ATGCCCAAATCGGACTTGTATCTGCTGTTAATTTGAGAGTCCAAGGTAATTCAGCTTATCTTTTGGAGCTCGAGGTCTTCGTTGGGAACTGAAAAGTCAAGATGTTTGCTTGC AAAGGAATTTGTTATGTTTTGCTAGTAGCGACTCCATGGGGCATAAGTTAAGGATTCGTACTCCAAGTGCCACGACCCGGAAGATTGACAAAAGGACTTTAATCCTTTAAAAGGTAGTCTGCATTGATTATCCAAGACCAGAGCTAGACAATACAGTTAACTATTTGGAGGCGGCGTTATTATCATCATCGTTTCGTACTTCTCACGCCAAC TAAACCATTGGAGATTGTTATTGCTGGTGCAGGTTTTGGGTGGTTTTGCTACAGCAAATATCTGGCAGATGCTGTGCACAAAACCGATATTGCTGGAGGCAAGAGATGTCCTAGGTGGGAAGGTAGCTGCATGGAAAAGATGATGATGGAGATTGGTACGAGACTGGGTTGCACATAATCTTTGGGGCTTACCCAAATATGCAGAACCTGTTTGGAGAAC TAGGGATTGATGATCGGTTGCAGTGGAAAGCAATTC AATGATATTTGCGAIGCCTAACAAAGCCAGGGGAGTTCAGCCGCTTTGATTTTCTGAAGCTCTTCTGCGCCATTAAATGGAAATTTTGGCCATACTAAAGAACAACGAAATGCTTACGTGGCCCGAGAAAAGTCAAATTTGCTATTGGACCTCTTGGCCAGCAATGCTTGGAGGGCAAATCTAATGTTGAAGCTCAAGACGGTTTAAAGTGTAAAGGACTGGATGAGAAAAGCAAGGTTGTTGCTGATAGGGTGCAGATGAGGTGTTTCAATTGCCATGTC AAAAGGCAC TTAACCTCATAAAACCTGACGAGCTTTCGATGTCAGTGCATTTTGAATGCTTTGAACAGATTTCTT CAGGAGAAAACATGGTTCAAAAATGGCCTTTTTAGATGGTAACCCCTCTGAGAGACTTTGCATGCCGATTGTGGAAACATATTGAGTCAAAGGTGGCCAAGTCAAGACTAAACTCACGAATAAAAAAGATCGAGCTGAATGAGGATGGAAAGTGTCAAATGTTTTATACIGAAATAATGGCAGTACAAATTAAGGAGATGCTTTTGTGTTTGGCCACTCCAGTGGATAATCTTGAAGCTTCTTTTGGCTGAAGACTGGAAAAGAGATCCC ATATTTCCAAAAGTTGGAGAAGCTAGTGGGAGTTCTCTGTGATAAATGTCCATATATGGTTTGACAGAAA ACTGAAGAACACATCTGATAATCTGCTCTTACAGCAGAAGCCCGTTGCTCAGTGTGTACGCTGACATGCTGTTACATGTAAGGAATATTAACAACCCCAATCAGTCTAATGTTTGGAAATTTGGTATTTGACCCCGCAGAAAGAGTGGATAAACTGTAGTACTCAGAAAT TATTGATGCTACAATGAAGGAACTAGCGAAGCTTTTCCCTGATGAAAATTCGGCAGATCAGAGCAAAGCAAATAATTGAAGTATCATGTTGTCAA AACCCCAAGGTCTGTTTATAAAAAGTGTGCCAGGTTGTGAACCCGTGTCGGCCCTTGCAAAGATCCCCTATAGAGGGTTTTTATTTAGCTGGTACTACACGAAACAGAAGTACTTGGCTTCAATGGAAGGTGCTGCTTATCAGGAAAAGCTTTGTGCACAAGCTATTGTACAGGATFACGAGTTACTTCTTGGCCGGA GCCAGAAAGATGTTGGCAGAAGCAAAGCTAGTTAGCATAGTGAAC TAA (SEQ ID NO:38).

5 Se diseñaron polinucleótidos antisentido con las secuencias CTGTGATCATCATATGTATCA (SEQ ID NO: 279), CCTTAACTCTCCAGCTAGCAA (SEQ ID NO: 280), CAGCCCGCAAATGTTTCATTC (SEQ ID NO: 281), GCCGTCAATGGCCGATTGCT (SEQ ID NO: 282), TCCTTCCCTCAGAAAGGGCAG (SEQ ID NO: 283) y TTGCCTCATGCTAATCTG (SEQ ID NO: 284) para el gen endógeno de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de *Nicotiana benthamiana*, basándose en la secuencia de ADNc de EPSPS de *Nicotiana benthamiana*

CTTATATGTGCTTAAGCCTAACGTGCACCCGGCCCTTAACCCAGCAGTTTTCAATCTACCTACCGTCTCTACCATTTTCTTCTAGTTGGTGAATAATTTCTAACTTTGAGAAAACAAGCCAAAGTTTTTGTCTAAGAACGCAAATGAGTGAATAATTTTGCAGCAATGGCACAGATTAGCAGCATGAGGCAAGG

ATACAGACCCCTAATCTTAATTCCTATTTTCCCTAAAACCCAAAAGGTTCCCTCTTTTTTCGCATTCTA  
 TCTTCTTTGGATCAAAGAAAATAACCCAAAATTCAGCAAAATCTTTGTGGGTGTGTAAGAAAGATT  
 CAGTTTTGAGGGTGGCAAAGTCACCTTTTAGGATTTGTGCATCAGTGGCCACTGCACAGAAGCCCA  
 ACGAGATTGTGCTGCAACCCATCAAAGATATATCAGGCACTGTTAAATTGCCTGGTTCTAAATCCC  
 TTCCAACCGTATTCTCCTTCTTGCTGCCCTTCTGAGGGAAGGACTGTTGTTGACAATTTACTGAG  
 TAGTGATGACATTCATTACATGCTTGGTGC GTTAAAAACACTTGGACTTCATGTAGAAGATGACAA  
 TGAAAACCAACGAGCAATTGTGGAAGGTTGTGGTGGGCAGTTTCCTGTCCGGCAGAAAGTCTGAGG  
 AAGAAATCCA ACTATTCCCTTGAAAATGCAGGAACAGCAATGCGGCCATTGACGGCAGCAGTTACT  
 GTAGCTGGAGGACATTCAAGATATGTACTTGATGGAGTTCCTAGGATGAGAGAGAGACCGAT

**(SEQ ID NO:285),**

CACTGACGTTGGATTAGAGGTAGGCTCCTTATATGTGCTTAAAGCCTAACGTGCAGCCGGCCCCCAA  
 CCCCAGCAGTTTTCAATCTACCTACCGTCTCTACCATTTTCTTATAGTAGTTGAAAATTTCTAACTTT  
 GAGAAAACAAGCCAAAGTTTTGTTTCTAAGAACACAAAGGGAGTGAAATTTTTTGCAGCAATGGC  
 ACAGATTAGCAGCATGAGGCAAGGGATACAGACCCCTAATCTTAATTCCTATTTTCCTAAAACCCA  
 AAAGGTTCCCTCTTTTTTCGCATTCTATCTTCATTGGATCAAAGAAAATAACCCAAAATTCAGCAAA  
 ATCTTTGTGGGTGTGTAAGAAAGATTCAGTTTTGAGGGTGGCAAAGTCACCTTTTAGGATTTGTGC  
 ATCAGTGGCCACTGCACAGAAGCCTAACGAGATTGTGCTGCAACCTATCAAAGATATATCAGGCA  
 CTGTTAAATTACCTGGTTCTAAATCCCTTTCCAATCGTATTCTCCTTCTTGCTGCCCTTCTGAGGGA  
 AGGACTGTTGTTGACAATTTACTGAGTAGTGATGACATTCATTACATGCTTGGTGCATTGAAAACA  
 CTTGGACTTCATGTAGAAGATGACAATGAAAACCAACGAGCAATCGTAGAAGGTTGTGGTGGGCA  
 GTTTCCTGTCCGCAAGAAGTCTGAGGAAGAAATCCA ACTATTCCCTTGAAAATGCAGGAACAGCAA  
 TGCGGCCATTGACGGCAGCAGTTACTGTAGCTGGTGGACATTCTAGATATGTACTTGATGGAGTTC  
 CTAGGAT

**(SEQ ID NO:286),**

y

AAATTC'TTGGTTCGAGGAGGTCAGAAGTACAAAGTCTCC'IGGAAAAAGCATATGTTGAAGGAGATGC  
 CTCAAGTGCTAGCTACTTTTTGGCGGGTGCAGCTGTACAGGTGGAAGTGTCACTGTTGAAGGTTG  
 TGGAACAAGCAGTTTACAGGGGATGTTAAGTTTGTCTGAGGTCTCGAAAAGATGGGGGCAGAAG  
 TTACATGGACAGAGAACAGTGTACCGTTAAAGGACCTCCAAGGAACCTCTCTGGAATGAAACAT  
 TTGCGGGCTGTTGACGTTAACAATGAAACAAAATGCCAGATGTTGCCATGAC'CT'IGCTGTAGTTGCA  
 CTTTTGCTGATAGTCTACTGCCATAAGAGATGTTGCTAGCTGGAGAGTTAAGGAAACTGAGCCG  
 ATGATTGCCATATGCACAGAACTTAGGAAGTTGGGTGCAACAGTTGTAGAAGGGCCAGACTACTG  
 CATAATCACTCCACCTGAAAAGTTAAAAGTAGCGGAAATTGATACATATGATGATCACAGAATGG  
 CCA'ITGGCTTTCTCTCTTGGGGCTTGTGCTGATGTTCCAGTCA'CCATTAAGGACCCCGTTGTACTCG  
 CAAAACCTTCCCCAACTACTTTGACGTTCTCCAGCAGTATTCCAAGCATTAACCAC'TTCCA'TTAA  
 GAATTTTGA AAAAGAGAGACTTTGACAACTTGGTGTCTATACCGGAAGAGAAAAGCTTTGATCCA  
 AGCTTCAACTCCTTTTCATTTGTATGTGATGATCATTGTATTTGTTGAAGTTGAGCTGCTTTTCTT  
 TTGTCAGAAAGACATGATGGATAC'ATTA'CTATATAGTTAAGGTGAAGTCAAGCA **(SEQ ID**

**NO:287).**

5 Se diseñaron polinucleótidos antisentido con las secuencias CCACATGGTCCAGTATCTGCC (AK195, RBCS\_1-2-3-4, **SEQ ID**

5 **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**), AACTGATGCATTGCACTTGAC (AK200, RBCS\_3-4, **SEQ ID NO: 293**), CAAATCAGGAAGGTATGAGAG (AK201, RBCS\_3-4, **SEQ ID NO: 294**) y TGTC AAGGTTTTGTTTCCTGG (AK202, RBCS\_3-4, **SEQ ID NO: 295**) para el gen de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (RuBisCO) endógeno de *Nicotiana benthamiana*, basándose en fragmentos de secuencia de ADNc de cadena 2A pequeños de RuBisCO cloroplástica de *Nicotiana benthamiana*

GCAATGGCTTCCTCAGTTCTTTCCCTCAGCAGCAGTTGCCACCCGCAGCAATGTTGCTCAAGCTAAC  
 ATGGTTGCACCTTTCACAGGTCTTAAGTCTGCTGCTTCAATCCCIGTTTCAAGAAAGCAAAAACCTTG  
 ACATCACTTCCATTGCCAGCAACGGCGGAAGAGTGC AATGCATGCAGGTGTGGCCACCAATTAAC  
 ATGAAGAAGTATGAGACTCTCTCATACCTTCCCGATTTGAGCCAGGAGCAATTGCTCTCCGAAATT  
 GAGTACCTTTTGAAGAATGGATGGGTTCCCTTGCTTGG AATTTCGAGACTGAGAAAGGATTTGTCTAC  
 CGTGAACACCACAAGTCACCAGGATACTATGATGGCAGATACTGGACCATGTGGAAGCTACCTAT  
 GTTCGGATGCACTGATGCCACCCAAGTGTGGCTGAGGTGGGAGAGGGCGAAGAAGGAATACCCAC  
 AGGCCTGGGTCCGTATCATTGGATTTGACAACGTGCGTCAAGTGCAGTGCATCAGTTTCATTGCCT  
 CCAAGCCTGACGGCTAC (**SEQ ID NO:296**),

ACAATGGCTTCCTCAGTTCTTTCCCTCAGCAGCAGTTGCCACCCGCAGCAATGTTGCTCAAGCTAAC  
 ATGGTTGCACCTTTCACAGGTCTTAAGTCAAGCTGCCTTTTTCCCTGTTTCAAGGAAGCAAAAACCTTG  
 ACATCACTTCCATTGCCAGCAACGGCGGAAGAGTGC AATGCATGCAGGTGTGGCCACCAATTAAC  
 AAGAAGAAGTACGAGACTCTCTCATACCTTCCCTGATCTGAGCGTGGAGCAATTGCTTAGCGAAATT  
 GAGTACCTCTTGA AAAATGGATGGGTTCCCTTGCTTGG AATTTCGAGACTGAGCGCGGATTTGTCTAC  
 CGTGAACACCACAAGTCACCGGGATACTATGACGGCAGATACTGGACCATGTGGAAGTTGCCTAT  
 GTTCGGATGCACTGATGCCACCCAAGTGTGGCCGAGGTGGAAGAGGGCGAAGAAGGCATAACCCAC  
 AGGCCTGGATCCGTATTATTGGATTCGACAACGTGCGTCAAGTGCAGTGCATCAGTTTCATTGCCT  
 ACAAGCCAGAAGGCTAC (**SEQ ID NO:297**),

CAAGCCAACTGGTTGCACCTTTCACCTGGCCTC AAGTCCGCCCTCCCTCCCTGTTACCAGGAAA  
 CAAAACCTTGACATTACCTCCATTGCTAGCAATGGTGG AAGAGTTCAATGCATGCAGGTGTGGCCA  
 CCAATTAACATGAAGAAGTACGAGACACTCTCATACCTTCCCTGATTTGAGCCAGGAGCAATTGCTT  
 AGTGAAGTTGAGTACCTTTTGA AAAATGGATGGGTTCCCTGCTTGG AATTTCGAGACTGAGCGTGG A  
 TTCTGCTTACCGTGAACACCACAACCTCAC CAGGATACTACGATGGCAGATACTGGACCAATGTGGAA  
 GTTGGCCATGTTCCGGTGC ACTGATGCCACTCAGGTGTTGGCTGAGGTCCGAGGAGGCAAAGAAGG  
 CTTACCCACAAGCCTGGGTTAGAATCATTGGATTCGACAACGTCCGTCAAGTGC AATGCATCAGTT  
 TTAATCGCTCCAAGCCAGAAGGCTAC (**SEQ ID NO:298**),

10

y

GGCTCAGTTATGTCCCTCAGCTGCCGCTGTTTCCACCGGCGCC AATGCTGTTCAAGCCAGCATGGTC  
 GCACCTTCACTGGCCTCAAGGCCGCCCTCCCTCCCTCCCGGTTTCCAGGAAACAAAACCTTGACATT  
 ACTTCCATTGCTAGAAATGGTGG AAGAGTCCAATGCATGCAGGTGTGGCCGCCAATTAACAAGAA  
 GAAGTACGAGACACTCTCATACCTTCCCTGATTTGAGCGTGGAGCAATTGCTTACGGA AATTGAGT A



CCTTTTGAAAAATGGATGGGTTCCCTTGCTTGGAATTCGAGACTGAGCATGGATTTCGCTACCCGIGA  
 ACACCACCACTCACCAGGATACTACGATGGCAGATACTGGACGATGTGGAAGTTGCCCATGTTCCG  
 GGTGCACCGATGCCACTCAGGTCTTGGCTGAGGTAGAGGAGGCCAAGAAGGCTTACCCACAAGCC  
 TGGGTCAGAATCATTGGATTTCGACAACGTCCTCAAGTGCATGCATCAGTTTCATCGCCTACAAG  
 CCCGAAGGCTAT (SEQ ID NO:299).

215) Se trataron plantas de *Nicotiana benthamiana* usando un procedimiento similar al descrito en el ejemplo 12. Se prepararon soluciones de polinucleótidos (o polinucleótidos mixtos en el caso de EPSPS y RuBisCO) en Silwet L-77 al 0,01% (v/v) y sulfato de amonio al 2% (p/v) en fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8. Se sumergieron dos hojas completamente expandidas en solución de Silwet L-77 al 0,1 % recientemente preparado con ddH<sub>2</sub>O durante unos pocos segundos y se dejaron secar. Aproximadamente 30 minutos después, se aplicaron 20 microlitros de solución de polinucleótidos a cada una de las dos hojas pretratadas. Para PDS, cada una de las 5 plantas recibieron 25 nanomoles del polinucleótido antisentido de PDS (SEQ ID NO: 34); para EPSPS, cada una de las 5 plantas recibieron 50 nanomoles de cada polinucleótido antisentido de EPSPS (SEQ ID NO: 279-284); y para RuBisCO, cada una de las 5 plantas recibieron 50 nanomoles de cada polinucleótido antisentido de RuBisCO (SEQ ID NO: 288-295). Se trataron plantas de control emparejadas con tampón (Silwet L-77 al 0,01% y sulfato de amonio al 2% (p/v) en fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8). Los resultados, medidos como altura de plantas a los 12 días (PDS y EPSPS) o 10 días (RuBisCO) después del tratamiento, se muestran en las figuras 36A - 36B. Las plantas tratadas con el polinucleótido antisentido de PDS mostraron un retraso grave del crecimiento (figura 36A) y blanqueamiento. Las plantas tratadas con los polinucleótidos antisentido de EPSPS mostraron retraso grave del crecimiento (figura 36B) y daño grave en el meristemo y los tejidos del tallo. Las plantas tratadas con los polinucleótidos antisentido de RuBisCO mostraron un retraso grave del crecimiento (Figura 36C) y tejidos apicales malformados.

216) Se diseñó un segundo conjunto de experimentos para investigar los efectos de silenciar un componente de la vía de silenciamiento de iARN endógena en una planta. Las proteínas argonauta (AGO) son componentes del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) que se une a ARN pequeños en el proceso de silenciamiento de iARN. Podría esperarse que la supresión de argonauta reduzca el efecto fenotípico observado causado por un proceso de silenciamiento de iARN. Se diseñaron polinucleótidos antisentido de AGO1 con las secuencias GGAGGCAAATACGAGCCTCA (HL510, SEQ ID NO: 300), CACTAATCTTAATACCAAAC (HL511, SEQ ID NO: 301), TATGGGTCATTAGCATAGGCATTAT (HL512, SEQ ID NO: 302), TCTCAAGAATATCACGCTCCC (HL513, SEQ ID NO: 303), CCCTTGGGGACGCTGGCAGGTCAC (HL514, SEQ ID NO: 304), TAATACGACTCACTATAGGGGGAGAGAGCTAGATCTTTG (HL515, SEQ ID NO: 305), TAATACGACTCACTATAGGCACAGTATTTCTTCCTCCAACC (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), GACAATTCCAAGTTTCAGTTTC (HL521, SEQ ID NO: 311), CCGTTTTAGATCACCATAAAGAGA (HL522, SEQ ID NO: 312), TTGTCTGGTAATATCACAATC (HL523, SEQ ID NO: 313) para el gen de Argonauta-1 endógeno de *Nicotiana benthamiana*, basándose en dos secuencias parciales de ADNc AGO1-2 de *Nicotiana benthamiana*.

ATGGTGAGGAAGAGGAGAACTGAGTTACCTGGTTCTGGTGAGAGCTCTGGGTCTCAAGAACTGG  
 CGGACAGGGTCGTGGCCAGCATCCACAGCAGCTGCACCAAGCTACCTCCCAGACTCCATATCAAA  
 CTGCAATGACTACTCAGCCAATACCTTATGCAAGACCAACTGAAACATCCTCCGAAGCTGGTTCT  
 CATCTCAGCCACCTGAGCAGGCAGCTCTACAAGTGACACAACAGTTCAGCAACTTGCTTTGCAAC  
 AAGAAGCGGCTACAACGCAAGCAGTTCACCTGCATCAAGCAAATTAAGGTTTCCCCTGCGTC  
 CAGGGAAGGGGAGCAATGGTATGAGATGCATAGTCAAAGCCAATCACTTCTTCGCAGAGCTGCCT  
 GACAAAGACTTGCACCAGTATGATGTCACAATTTCTCCAGAGGTGTCATCACGTGGCGTCAACCGT  
 GCTGTCATGGCGCAACTGGTGAAGCTGTACCAAGAATCTCATCTTGGGAAGAGACTTCCAGCATAT  
 GATGGAAGGAAAAGTCTATACACTGCAGGGCCCCCTCCATTTGTTCAAAAAGACTTCAAAAATACT  
 CTTATTGATGATGAGGATGGGCCTGGTGGTGCTAGAAGGGAAAGGGAATTTAAAGTTGTGATCAA  
 ATTGGCTGCCCGTCTGATCTTCATCACTTGGGAATGTTTTTAGAAGGGAAAACAGGCTGATGCACC  
 TCAAGAGGCGCTTCAAGTTCTGGATATTGTTCTGCGTGAGTTGCCAACATCTAGGTTTTGTCTGTG  
 GGTGCTTTCTTCTATTCCCGTGATTTAGGGCGAAAGCAACCATTGGGTGAAGGTTTAGAAAGTTGG  
 CGTGGGTTCTATCAAAGCATTGCCCCACACAAATGGGCTTATCACTGAACATCGATATGTCTTCC  
 ACTGCATTCAATTGAGCCACTGCCAGTCATTGATTTTGTGACACAGCTTCTGAACCGAGATGTGCCA  
 TCTAGACCACTGTCTGATGCTGGCCGTGTAAAGATAAAAAAGCTCTGAGAGGTGTGAAGGTGGA  
 GGTACTCATCGTGAAATATGCGGAGGAAGTACCGCATTTCGGGTTAACATCTCAAGCAACAA  
 GAGAGTTGACCTTCCCTGTTGATGAAAATGGTACAGTGAAATCTGTAATTGAGTATTTTCGAGAAA  
 CATATGGGTTTGTAAATCAGCATACTCAGTGGCCTTGTCTACAAGTTGGAAATCAGCAGAGACCTA  
 ATTACTTGCCAATGGAAGTCTGCAAGATTGTGGAGGGACAAAGGTACTCAAAGCGCTTGAATGAG  
 AGACAGATTACTGCACTTCTGAAAGTGACCTGCCAGCGTCCCCAAGGGAGGGAGCGTGATATTCTT  
 GAGACCGTACATCATAATGCCTATGCTAATGACCCATATGCCAAGGAGTTTGGTATTAAGATTAGT  
 GACAAGTTGGCACAAGTTGAGGCTCGTATTTTGCCTCCACCTCGGCTTAAATATCATGATAACGGT  
 CGAGAAAAGGACTGCCTGCCACAAGTTGGCCAATGGAATATGATGAATAAGAAAATGGTAAATGG  
 AGGGACGGTGAACAATTGGATCTGCATAAACTTCTCTCCCAATGTGCAAGATAGTGTGCTCATGG  
 GTTTTGCTCTGAGCTTGCACAAATGTGCCAGATATCTGGCATGAATTTCAATCCAAATCCTGTTCTG  
 CCACCTTCGAGTGACGCCCCTGATCAGGTCGAAAGAGTATTGAAAACCTCGATTCATGATGCTATG  
 ACTAAGTTGCAGCTGCATGGGAGAGAGCTTGATTTGCTAGTTGTCATCTTGCCAGACAATAATGGA  
 TCTCTTTATGGTGATCTGAAGCGCATTTGTGAGACTGAACTAGGAGTCGTCTCACAGTGCTGTTTG  
 AAAAAACATGTATTTAAGATGAGCAAACAGTATCTAGCCAATGTAGCGCTGAAAATCAATGTGAA  
 GGTGGGAGGGAGAAAACACTGTGCTTGTGATGCAATATCGAGGCGAATTCCTCTTGTGTCAGCGACC  
 GGCCTACCATCATTTTTGGTGCAGATGTCACCCACCCTACCCTGGGGAGGACTCTAGCCCATCCA

TTGCCGCGGTGGTTGCTTCTCAAGATTGGCCTGAGATTACAAAGTATGCTGGTCTAGTTTCTGCTCA  
 AGCCCATAGGCAAGAGCTTATTCAGGATCTGTACACGACTAGGCAAGATCCTGTAAAGGGGACAG  
 TTGCTGGTGGAAATGATTAAGGACTTACTTATATCCTTCCGAAGAGCTACTGGACAAAAGCCCCAGA  
 GAATAATTTTCTATAGGGATGGTGTAGTGAAGGACAATTTTATCAAGTGCTTCTGTTCGAACTTG  
 ATGCGATCCGCAAAGCATGTGCGTCTTTGGAGCCAAATTATCAGCCCCAGTCACATTTGTTGTGG  
 TTCAGAAACGACATCACACAAGGCTTTTTGGCAATAACCACCGTGACAGAAATGCAGTTGACAGG  
 AGCGGGAACATTATACCTGGTACTGTTGTAGATTCAAAGATATGCCACCCGACAGAGTTTGATTTT  
 TATCTTTGTAGCCATGCCGGCATAACAGGGTACGAGCCGTCCAGCTCACTACCATGTTCTATGGGAC  
 GAGAACAAATTCACAGCCGATGCGCTGCAGTCTTTGACCAACAACCTCTGCTATACATATGCAAGG  
 TGCACGCGTCCGTCTCCATCGTTCCCCCTGCATATTATGCACATTTGGCAGCTTTCCGTGCTCGAT  
 TTTATATGGAGCCGGAGACATCTGACGGTGGTTCAGTAACAAGTGGGGCTGCTGGTGGCAGAGGG  
 GGTGGTGCAGGAGCTGCTGGAAGGAACACCCGAGCCCCAAGTCTGGTGGTGGTGTAGACCTCT  
 TCCTGCGCTCAAGGATAATGTGAAGAGGGTTATGTTCTACTGC (SEQ ID NO:314) and

y

CACCTATCACTCTCTTTCTCTCTCTACAAACATATCGTGCCGTTTCTCTCTCGGCCTCTCTTCGTGTT  
 TTAGGGCACCGTGGTGGTGGTATCCAGGCGGCGGTTTTGAGTTATTACCATGGTGGCGAAGAAGA  
 GGACTGATGTTCCGTGGTGGTGGTGGAGTTTTGGAGTCCCATGAAACGGAGGGGCACGAGGTGGT  
 GCCCAACGCCCATCACAGCAGCAGCAACATCAGCATCAGCAAGGCGGAGGAAGAGGCTGGGCAC  
 CTCAGCATGGAGGACATGGTGGCCGTGGTGGTGGGGGAGCTCCACGTGGTGGAAATGGCCCCTCAA  
 CAATCCTATGGTGGACCTCCTGAATACTACCAACAGGGCAGGGGAACCAACAGTATCAACGAGG  
 TGGAGGACAACCCAGCCCGTGGTGGCATGGGGGGCCGTGGGGCACGGCCACCAGTACCCGAGC  
 TGCACCAAGCAACCCAGACTCCACATCAGCCGTGTAACATATGGAAAGACCATCAGAAACATACTCA  
 GAGGCTGGTTCCTCGTCTCAGCCACCTGAACCAACGACACAGCAAGTGACTCAGCAATTCCAGCA  
 ACTTGTGTGACGCCAGAAGCAGCTGCAACCAAGCAATACAACCAGCATCGAGCAAGTCGATGA  
 GGTTTCCACTCCCGCCAGGAAAGGGTAGTACTGGTATTAGATGCATAGTTAAGGCCAATCACCTCT  
 TTGCCGAGTTACTTGACAAAGATCTGCACCAGTATGATGTTTCAATTACTCCGAGGTCCGCTCTC  
 GGGGTGTCAACCGGGCCGTCATGGAGCAGCTGGTGAAGCTTTATAGAGAATCCCATCTTGGGAAG  
 AGGCTTCCAGCCTATGACGGAAGAAAAGTCTATACACAGCAGGGCCCTCCCTTTTGTCAAAG  
 GATTTTAAATCACTCTAATTGATGATGATGATGGACCTGGTGGTGGCTAGGAGGGAAAGAGAGTTT  
 AAAGTTGTGATCAAGCTGGCGGCTCGTGCATCTTCAATCACCTGGGGATGTTCTTACAAGGGAGA  
 CAGGCTGATGCACCGCAAGAAGCACTTACGGTGCCTGGATATTGTGCTACCTGAGTTGCCAACATCT  
 AGGTATTGTCTGTGGGCCGCTCTTTCTATTCCCTCATTTAGGACGAAGACAACCCTGGGTGAA  
 GGTTTAGAGAGCTGGCGTGGCTTCTATCAAAGTATTCGTCCTACACAGATGGGATTATCCCTGAAT  
 ATTGATATGCTTCCACGGCTTTCAATTGAGCCACTGCCGATTATTGACTTCGTTGAGCCAGCTTCTGA  
 ATCGGGATATCTCTCTAGACCCTGTCTGATGCTGACC GCGTTAAGATAAAGAAGGCACTGAGAG  
 GTGTAAGGTGGGGGTCACTCATCGTGGAAATATGCGGAGGAAGTATCGCATTTTCTGGCTTGACGT  
 CTCAAGCAACAAGAGAGTTGACTTTTCTGTTCGATGAAAGGGGTACGATGAAAGCTGTTGTGGAA  
 TATTTTCGGGAAACCTATGGTTTTGTCAATTCGGCATACCCAGTGGCCTTGTCTTCAAGTTGGAAATA  
 CGCAGAGGCCAAATTACTTGGCAATGGAAGTATGTAAGATTGTAGAGGGACAGAGATACTCAAAG  
 CGCTTGAATGAGAGGCAGATAACAGCACTTCTAAAAGTGACCTGCCAACGTCTCAAGAGAGAGA  
 ACGTGATATCTTCAGACTGTTCAATCAAAATGCTTATGCTGATGACCCATATGCCGAAGGAGTTTGG

TATTAAGATCAGTGAGGAGCTTGCTCAAGTTGAGGCTCGCGTTTTGCTGACCTTGGCTTAAATA  
 CCATGATACAGGTCGAGAGAAAGACTGTCTGCCACAAGTGGGCCAGTGGGAATATGATGAATAAGA  
 AAA'GGTTAAATGGAGGAACAGTGAACAAC'TGGATCT'G'GTAAAC'TTTTCTCGCAA'G'GCAAGAC  
 ACAGTTGCACGTGGATTTTGTCCGAGCTTGCACAAAATGTGCATGATA'CCGGAATGAAC'TCAAT  
 CCCAATCC'TGTTCTACCACC'AGT'GAGT'GCTCGCCCTGATCAAGTTGAGAGAGTCTTGAAAAC'TCGA  
 TTTACGATGCTATGACAAAAGTTGCAGCCAAATGGGAGAGAGCTAGATCTTTTGATTGTGATATTA  
 CCAGACAATAACGGCTCTCTTTA'GGT'GATCT'AAAACGGATTTG'GAAAAC'TGAAC'TGGAAAT'GCT  
 TCACAA'GCT'GCTT'GACAAAACATGTATTTAAGA'GAGCAAGCAGTATTTAGCTAATGTATCCCTG  
 AAGATAAAATGTGAAGGTGGAGGAAGAAATAC'G'GCTGGTTGATGGCTCTCTAGACGAAT'CC  
 CCTTGT'GAGCGACCCGCCAACTATCATTTTTTGGTGCAGATGTCACCCATCCCCACCTGGGGAGGA  
 TTTTAGCCCGTCAAT'GCT'GCGG'GGT'GCTTCTCAAGATTTGGCCTGAAAATTACAAAGTATGCTGG  
 TTTGGTTTCT'GCTCAAGCCCATAGGCAAGAGCTTATACAAGATCT'G'GACAAGACTTGGCAAGATCC  
 AGTTAGAGGACCTGTGACTGGTGGCA'GATAAAAGGAAT'ACTTATTTCCCTCCGTCGAGCAACTGG  
 ACAGAAGCCGCAGAGAATTATATTCTACAGAGATGGTGT'TAGTGAAGGACAATTTTACCAAGTTCT  
 TCTTTTTGAACTTGATGCAATCCGCAAGGCATGTGCATCTTTAGAACCCAACATCAGCCCCCGGTT  
 ACGTTTGT'G'GGTCCAGAAACGGCATCATACTAGGTTGTTTGGCAATAACCACCACGACAGAAAT  
 GCAGTTGATCGGAGTGGGAACATTTTGGCTGGTACC'GTTG'GATTTCAAAGATATGCCACCCTACT  
 GAATTTGATTTCTATCTCTG'GACCA'GCCGGCATACAGGGTACTAGCC'GCCAGCTCATTTATCAT  
 GTTCTGTGGGATGAGAACAATTTTACTGCTGACGCCCTGCAGTCTTTGACTAACAAATCTTTGCTATA  
 CATATGCTAGGTGTACTCGTTCTGTCTCCATTGTTCCACCAGCATATTATGCACATTTGGCAGCTTT  
 CCGTGC'CGGTTTACATGGAGCCAGAGACATCTGATAATGGATCAGTCACAAGCGCAGCTGCTTC  
 AAACAGAGGAGGTTTAGGAGCTATGGGAAGGAGCACCGGAGCACCAAGGTGCTGGTGTCTGTAA  
 GGCCCTTCTGCTCTCAAGGAGAATGTTAAGAGGGTTATGTTTTATTGT (SEQ ID NO:315).

217) Se trataron plantas de *Nicotiana benthamiana* usando un procedimiento similar al descrito en el ejemplo 12. Se prepararon soluciones de polinucleótidos (o polinucleótidos mixtos en el caso de AGO1) en Silwet L-77 al 0,01 % (v/v) y sulfato de amonio al 2% (p/v) en fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8. Se sumergieron dos hojas completamente expandidas en solución de Silwet L-77 al 0,1% recientemente preparado con ddH2O durante unos pocos segundos y se dejaron secar. Aproximadamente 30 minutos después, se aplicaron 20 microlitros de solución de polinucleótidos a cada una de las dos hojas pretratadas. Para PDS, cada una de las 5 plantas recibieron 25 nanomoles del polinucleótido antisentido de PDS (SEQ ID NO: 34); para AGO1, cada una de las 5 plantas recibieron 50 nanomoles de cada uno de los 14 polinucleótidos antisentido de AGO1 (SEQ ID NO: 300-313); para los tratamientos combinados de PDS y AGO, cada una de las 5 plantas recibió 25 nanomoles del polinucleótido antisentido de PDS (SEQ ID NO: 34) y 50 nanomoles de cada uno de los 14 polinucleótidos antisentido de AGO1 (SEQ ID NOS: 300-313) aplicados en hojas separadas. Se trataron plantas de control emparejadas con tampón (Silwet L-77 al 0,01% y sulfato de amonio al 2% (p/v) en fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8). No se observaron diferencias entre las plantas tratadas con los polinucleótidos antisentido de AGO1 y las plantas tratadas solo con tampón. Las plantas tratadas con el polinucleótido antisentido de PDS mostraron blanqueamiento sistémico. Las plantas tratadas con el polinucleótido antisentido de PDS y por separado con los polinucleótidos antisentido de AGO1 no mostraron blanqueamiento sistémico, lo que indica que la supresión de AGO1 bloqueó la diseminación sistémica de la señal de silenciamiento.

**Ejemplo 34**

218) Este ejemplo ilustra un procedimiento para inducir la regulación sistémica de un gen diana endógeno en una planta en crecimiento que comprende recubrir por vía tópica sobre las 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 diana endógeno o en el ARN mensajero transcrito a partir de dicho gen diana endógeno, mediante el cual dichos polinucleótidos permean el interior de dicha planta en crecimiento e inducen la regulación sistémica de dicho gen diana endógeno. Más específicamente, este ejemplo ilustra el uso de una composición que comprende tensioactivo y polinucleótidos para inducir al menos de manera transitoria la regulación sistémica del gen de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) endógeno de *Zea mays*.

219) Se identificó una secuencia genómica del gen de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) endógeno de *Zea mays* como

ACCTACTTCCCCCTCGCCCCTCTCATGGTCTCTCTCGCGCCCAGATCTGCTACTAGACGGCACCGCT  
 GCAGCGCGTCGTGTCGCGGGGGTTGGTGGCAGGCAGCGAGAGCTTGCCGTTCCCTCTCTCAGTTG  
 TCAGGTCCTAGGCTCACCTCACCGGCTCCCAGCCCGCTTCTATTCTTCCTCCCCGACCCCGTGCAG  
 GTGGCAGTCCAGTCCACGCCACCAACCGCGAGGCCGAACCAAACCAACCCACTCTCCCCAACCCCG  
 CGCGCCCAGGCCGCCGCCCTACCAACCATCGGCGTCGGCAATGGCGGCCATGGCGACCAAGGCC  
 GCCGCGGGCACCGTGTGCTGGACCTCGCCGCGCCGCCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGTGCA  
 GGCGGGTGCCGAGGAGATCGTGTGCTGCAGCCCATCAAGGAGATCTCCGGCACCGTCAAGCTGCCGG  
 GGTCCAAGTCGCTTTCCAACCGGATCCTCCTGCTCGCCGCCCTGTCCGAGGTGAGCGATTTTGGTG  
 CTTGCTGCGCTGCCCTGTCTCACTGCTACCTAAATGTTTTGCCTGTGGAATACCATGGATTCTCGGT  
 GTAATCCATCTCACGATCAGATGCACCGCATGTCGCATGCCTAGCTCTCTCTAATTTGTCTAGTAGT  
 TTGTATACGGATTAATATTGATAAATCGGTACCGCAAAAGCTAGGTGTAAATAAACACTAGAAAA  
 TTGGATGTTCCCCTATCGGCCTGTACTCGGCTACTCGTTCTTGTGATGGCATGCTGTCTCTTCTTGGT  
 GTTTGGTGAACAACCTTATGAAATTTGGGCGCAAAGAACTCGCCCTCAAGGGTTGATCTTATGCCA  
 TCGTCATGATAAACAGTGGAGCACGGACGATCCTTTACGTTGTTTTTAACAAACTTTGTCAGAAAA  
 CTAGCATCATTAACCTTCTTAATGACGATTTCAACAACAAAAAAGGTAACCTCGCTACTAACATAAC  
 AAAATACTTGTGCTTATTAATTATATGTTTTTTAATCTTTGATCAGGGGACAACAGTGGTTGATAA  
 CCTGTTGAACAGTGAGGATGTCCACTACATGCTCGGGGCCTTGAGGACTCTTGGTCTCTCTGTCGA  
 AGCGGACAAAGCTGCCAAAAGAGCTGTAGTTGTTGGCTGTGGTGGAAAGTTCCCAGTTGAGGATT

CTAAAGAGGAAGTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGAAGTCAATGCGGCCATTGACAGCAGCT  
 GTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACGTATGTTTCCCTCTCTTTCTCTCTACAACTTGTCTGGAGTT  
 AGTATGAAACCCATGGGTATGTCFAGTGGCTTATGGTGTATTTGGTTTTTGAAGTTCAGTTACGTGGCT  
 TGATGGAGTACCAAGAATGAGGGAGAGACCCATTGGCGACTGGTGTGCGGATTGAAGCAGCTTG  
 GTGCAGATGTTGATTGTTTCCCTTGGCACTGACTGCCACCTGTTCTGTCAATGGAATCGGAGGGC  
 TACCTGGTGGCAAGGTTAGCTACTAAGGGCCACATGTTACATTCCTTCTGTAAATGGTACAACATT  
 GTCGAGCTTTTGCATTTGTAAGGAAAAGCATTTGATTGATCTGAATTTGATGCTACACCACAAAATAT  
 CCTACAAAATGGTCAATCCCTAACTAGCAAAACAATGAAGTAATACTTGGCATGTGTTTTATCAAATTA  
 TTTCCATCTTCTGGGGCATTTGCCGTGTTTTCTAGTCTAATAGCAATTTGTTTTTAGCATTAATTAGCTCT  
 TACAATTGTTATGTTCTACAGGTCAAGCTGTCTGGCTCCATCAGCAGTCAGTACTTGAGTGCCTTGC  
 TGATGGCTGCTCCCTTTGGCTCTTGGGGATGTTGGAGATTGAAAATCATTTGATAAAATTAATCTCCATCC  
 CTACGTCGAAAATGACATTTGAGATTGATGGAGCGTTTTTGGTGTGAAAAGCAGAGCATTCTGATAGCTG  
 GGACAGATTTTACATTTAAGGGAGGTCAAAAATACAAGTAAGCTCTGTAAATGTATTTCACTACTTTG  
 ATGCCAATGTTTCAGTTTTTCAGTTTTCCAAACAGTCGCATCAATATTTGAATAGATGCACTGTAGA  
 AAAAAAATCATTGCAGGGAAAAACTAGTACTGAGTATTTTGACTGTAAATTAATTTACCAGTCCGA  
 ATATAGTCACTCTATTGGAGTCAAGAGCGTGAACCGAAAATAGCCAGTTAATTAATCCATTATAACAG  
 AGGACAACCATGTATACATTTGAAACTTTGGTTTTAATAAGAGAATCTAGGTAGCTGGACTCGTAGCTG  
 CTTGGCATGGATACCTTCTTATCTTTAGGAAAAGACACTTGAATTTTTTTTTTCTGTGGCCCTCTATG  
 ATGTGTGAACCTGCTTCTCTATTGCTTTAGAAGGATATATCTATGTGCGTTATGCAACATGCTTCCCT  
 TAGCCATTTGTAAGTAAATCAGTTTTATAAGTTCGTTAGTGGTTCCCTAAACGAAACCTTGTTTTTT  
 TTTGCAATCAACAGGTCCCTAAAAATGCTTATGTTGAAGGTGATGCCCTCAAGCGCAAGCTATTTCT  
 TTGGCTGGTGTGCAATTACTGGAGGGACTGTGACTGTGGAAGGTTGTGGCACCACCAGTTTGCAG  
 GTAAAGATTTCTTGGCTGGTGTCTACAATAACTGCTTTTTGTCTTTTTGGTTTTCAGCATTGTTCTCAGA  
 GTCACTAAATAACATTATCATCTGCAAATGTCAAATAGACATACTTAGGTGAATTCATGTAACCGT  
 TTCCTTACAAATTTGCTGAAACCTCAGGGTGATGTGAAGTTTGTGAGGTAAGTGGAGATGATGGGA  
 GCGAAGGTTACATGGACCGAGACTAGCGTAACGTGTACTGGCCACCAGCGGGAGCCATTTGGGGAG  
 GAAACACCTCAAGGCGATTGATGTCAACATGAACAAGATGCCCTGATGTGCGCATGACTCTTGGCTGT  
 GGTGGCCCTCTTTGCCGATGGCCGACAGCCATCAGAGACGGTAAAACATTCTCAGCCCTACAACC  
 ATGCCCTTCTACATCACTACTTGAACAAGACTAAAAACTATTGGCTCGTTGGCAGTGGCTTCCCTGG  
 AGAGTAAAGGAGACCCGAGAGGATGGTTGGCGATCCGGACGGAGCTAACCAAGGTAAGGCTACATA  
 CTTTACATGTCCTACCTGCTCTTTTCCATAGCTCGCTGCCCTCTTACCGGCTTGGCTGCGGTGCTCCA  
 TCCTCGGTTGCTGTCTGTGTTTTCCACAGCTGGGAGCATCTGTTGAGGAAGGGCCGGACTACTGCA  
 TCATCACGCCGCCGGAGAAGCTGAACGTGACGGCGATCGACACGTACGACGACCACAGGATGGCC  
 ATGGCCCTTCTCCCTTGGCCGCTGTGCGGAGGTCCTCCGTGACCATCCGGGACCCTGGGTGACCCCGG  
 AAGACCTTCCCGACTACTTTCGATGTGCTGAGCAGTTTCGTCAAGAATTAATAAAGCGTGGGATAC  
 TACCACGCAGCTTGAATTGAAGTGATAGGCTTGTGCTGAGGAAAATACATTTCTTTTTGTCTGTTTTT  
 CTCTTTCACGGGATTAAGTTTTGAGTCTGTAACGTTAGTTGTTTTGTAGCAAGTTTCTATTTCCGGATC  
 TTAAGTTTTGTGCACTGTAAGCCAAATTTCAATTTCAAGAGTGGTTCGTTGGAATAATAAGAATAATA  
 AATTACGTTTTCAGTGGCTGTCAAGCCCTGCTGCTACGTTTTTAGGAGATGGCATTAGACATTCATCAT  
 CAACAAACAATAAAAACCTTTTAGCCCTCAAAACAATAATAGTGAAGTTATTTTTTAGTCCCTAAACAAGT

TGCATTAGGATATAGTTAAAACACAAAAGAAGCTAAAGTTAGGGTTTAGACATGTGGATATTGTTT  
 TCCAT (**SEQ ID NO:316**),

con una región 5' no traducida ubicada en las posiciones de nucleótidos 1 - 306 y una región 3' no traducida  
 ubicadas en las posiciones de nucleótidos 3490 - 3907. Se identificó una secuencia de ADN de EPSPS como

ACCTACTTCCCCCTCGCCCCTCATGGTCTCTCTCGCGCCAGATCTGCTACTAGACGGCACCGCT  
 GCAGCGCGTCGTGTCGCGGGGGTTGGTGGCAGGCAGCGAGAGCTTGCCGTTCTCTCTCAGTTG  
 TCAGGTCCTAGGCTCACCTCACCGGCTCCAGCCCGCTTCTATTTCTTCTCCCGACCCCGTGCAG  
 GTGGCAGTCCAGTCCACGCCACCAACCGCGAGGCCGAACCAAACCAACCCACTCTCCCCAACCCCG  
 CGCGCCAGGCCGCCCCGCCCTACCAACCATCGCGCTCGGCAATGGCGGCCATGGCGACCAAGGCC  
 GCCGCGGGCACCGTGTGCTGGACCTCGCCGCGCCGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGTGCA  
 GGCGGGTGCCGAGGAGATCGTGTGCTGCAGCCATCAAGGAGATCTCCGGCACCGTCAAGCTGCCGG  
 GGTCCAAGTCGCTTTCCAACCGGATCCTCCTGCTCGCCGCCCTGTCCGAGGGGACAACAGTGGTTG  
 ATAACCTGTTGAACAGTGAGGATGTCCACTACATGCTCGGGGCCTTGAGGACTCTTGGTCTCTCTG  
 TCGAAGCGGACAAAGCTGCCAAAAGAGCTGTAGTTGTTGGCTGTGGTGGAAAGTTCCCAGTTGAG  
 GATTCTAAAGAGGAAGTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGAAGTCAATGCGGCCATTGACAGC  
 AGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTACGTGCTTGATGGAGTACCAAGAATGAGGGAGA  
 GACCCATTGGCGACTTGGTTGTCGGATTGAAGCAGCTTGGTGCAGATGTTGATTGTTTCTTGGCA  
 CTGACTGCCACCTGTTCTGTCAATGGAATCGGAGGGCTACCTGGTGGCAAGGTCAAGCTGTCTG  
 GCTCCATCAGCAGTCAGTACTTGAGTGCCTTGCTGATGGCTGCTCCTTTGGCTCTTGGGGATGTGG  
 AGATTGAAATCATTGATAAATTAATCTCCATCCCTACGTGAAAATGACATTGAGATTGATGGAGC  
 GTTTTGGTGTGAAAGCAGAGCATTCTGATAGCTGGGACAGATTCTACATTAAGGGAGGTCAAAAA  
 TACAAGTCCCCTAAAATGCCTATGTTGAAGGTGATGCCTCAAGCGCAAGCTATTTCTTGGCTGGT  
 GCTGCAATTACTGGAGGGACTGTGACTGTGGAAGGTTGTGGCACCACCAGTTTGCAGGGTGATGT  
 GAAGTTTGCTGAGGTACTGGAGATGATGGGAGCGAAGGTTACATGGACCGAGACTAGCGTAACTG  
 TACTGGCCCACCGCGGGAGCCATTTGGGAGGAAACACCTCAAGGCGATTGATGTCAACATGAAC  
 AAGATGCCTGATGTCGCCATGACTCTTGTGTGGTTGCCCTCTTTGCCGATGGCCCGACAGCCATC  
 AGAGACGTGGCTTCTGGAGAGTAAAGGAGACCGAGAGGATGGTTGCGATCCGGACGGAGCTAA  
 CCAAGCTGGGAGCATCTGTTGAGGAAGGGCCGGACTACTGCATCATCACGCCGCGGAGAAGCTG  
 AACGTGACGGCGATCGACACGTACGACGACCACAGGATGGCCATGGCCTTCTCCCTTGCCGCTGT  
 GCCGAGGTCCCCGTGACCATCCGGGACCCTGGGTGCACCCGGAAGACCTTCCCCGACTACTTCGAT  
 GTGCTGAGCACTTCGTCAGAATAATAAAGCGTGCATACTACCACGCAGCTTGATTGAAGTGA  
 TAGGCTTGTGCTGAGGAAATACATTTCTTTTGTCTGTTTTTTCTCTTTACGGGATTAAGTTTTGAG  
 TCTGTAACGTTAGTTGTTGTAGCAAGTTTCTATTTCCGATCTTAAGTTTGTGCACTGTAAGCCAAA  
 TTTCATTTCAAGAGTGGTTCGTTGGAATAATAAGAATAATAAATTACGTTTCAGTGGCTGTCAAGC  
 CTGCTGCTACGTTTTAGGAGATGGCATTAGACATTCATCATCAACAACAATAAAACCTTTTAGCCT  
 CAAACAATAATAGTGAAGTTATTTTTAGTCCTAAACAAGTTGCATTAGGATATAGTTAAAACACA  
 AAAGAAGCTAAAGTTAGGGTTTAGACATGTGGATATTGTTTTCCAT (**SEQ ID NO:317**).

- 5 Se diseñó un polinucleótido de ARN bicatenario de 240 pares de bases con una hebra correspondiente a la secuencia de ADN

TACTTGGAGTGCCTTGGCTGATGGCTGCTCCTTTGGCTCTTGGGGATGTGGAGATTGAAATCATTTGATA  
 AATTAATCTCCATTCCTGACGTCGAAATGACATTTGAGATTGATGGAGCGTTTTGGTGTGAAAGCAG  
 AGCATTCTGATAGCTGGGACAGATTCTACATTAAGGGAGGTCAAAAATACAAGTCCCCTAAAAAT  
 GCCTATGTTGAAGGTGATGCCCTCAAGCGCAAGCTATTTCTTG (SEQ ID NO:318)

que corresponde a un segmento de 240 nucleótidos ubicado en las posiciones de nucleótidos 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 10,1 cm (4 pulgadas) y se cultivaron las plantas en una cámara de crecimiento. Se trataron tópicamente plantas de 17 días de edad con polinucleótidos y se usaron tres plantas como controles. Se marcaron dos hojas inferiores de cada planta y después se pretrataron sumergiéndolas en una solución de Silwet L-77 al 0,1%. Aproximadamente 30 minutos después del pretratamiento con tensioactivo, se aplicaron 20 microlitros de solución de tratamiento a la parte superior de cada una de las dos hojas pretratadas. La solución de tratamiento consistió en una mezcla de 100 microlitros de solución de tampón 2X, 90 microlitros de agua, 10 microlitros de una solución de 4,6 microgramos/microlitro del ARNc de EPSPS (correspondiendo una hebra a la **SEQ ID NO: 318**); la solución de tampón 2X fue una mezcla de 200 microlitros de Silwet L-77 al 0,1%, 200 microlitros de fosfato de sodio 50 milimolar, 146 microlitros de fosfato de amonio al 34% y 454 microlitros de agua. A los 8 días después del tratamiento, dos de las tres plantas tratadas con polinucleótido presentaron retraso en el crecimiento con hojas apicales dañadas o muertas (similar al fenotipo observado en plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas con polinucleótido de EPSPS), mientras que las tres plantas de control tuvieron un crecimiento y una morfología normales (**figura 37**).

**Ejemplo 35**

20 221)Se investigó la eficacia de diferentes sustancias (incluyendo sales, un agente quelante, un humectante y poliaminas) como agentes de transferencia de polinucleótidos o como potenciadores de un agente de transferencia de polinucleótidos conocido. Previamente, se había demostrado que el sulfato de amonio potencia la permeabilidad de las plantas a los polinucleótidos (véase, por ejemplo, el **ejemplo 13**). La **tabla 26** lista el efecto en la actividad herbicida (presentado como porcentaje de control/eliminación de malas hierbas y como altura de las plantas) del sulfato de amonio y EDTA como aditivos para soluciones de rociado de Silwet L-77 al 1% de polinucleótidos (ARN) aplicados tópicamente en plantas de almizcle resistentes al glifosato. En este experimento concreto, se observó que el ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) al 0,004% actúa de manera similar al sulfato de amonio al 2% en la solución de rociado, potenciando la eficacia de los polinucleótidos y potenciando la actividad herbicida del glifosato.

**Tabla 26**

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

30 **222)**La **tabla 27** lista el efecto en la actividad herbicida (presentado como porcentaje de control/eliminación de malas hierbas y de la altura de las plantas) de varias sales que incluyen 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 a soluciones de pulverizado de Silwet L-77 al 1% de polinucleótidos (ARN) aplicados tópicamente sobre plantas de almizcle resistentes al glifosato. En este experimento concreto, se observó que el cloruro de amonio y el bromuro de tetrabutilfosfonio actuaban de manera similar al sulfato de amonio en la solución de pulverizado, potenciando la eficacia de los polinucleótidos y potenciando la actividad herbicida del glifosato.

**Tabla 27**

Tratamiento	Control de almizcle (%)	Altura de almizcle (cm)
Sin adición	0	16,0
+ cloruro sódico al 2%	15	15,0
+ sulfato sódico al 2%	7	17,0



(continuación)

Tratamiento	Control de almizcle (%)	Altura de almizcle (cm)
+ sulfato de amonio al 2%	54	9,3
+ cloruro amónico al 2%	52	10,3
+ cloruro de tetrametilamonio al 2%	19	15,0
+ cloruro de tetraetilamonio al 2%	27	12,0
+ bromuro de tetrapropilamonio al 2%	34	11,0
+ bromuro de tetrabutilfosfonio al 2%	19	13,3
+ bromuro de tetrabutilfosfonio al 2%	55	5,3

5 **223)** La tabla 28 lista el efecto del humectante, glicerina, en la actividad herbicida (presentada como porcentaje de control/eliminación de malas hierbas y como altura de las plantas) de polinucleótidos (ARN) aplicados por vía tópica sobre plantas de almizcle resistentes al glifosato. Se observó que la glicerina potenciaba la eficacia de los polinucleótidos, potenciando la actividad herbicida del glifosato.

Tabla 28

Tratamiento	Control de almizcle (%)	Altura de almizcle (cm)
Sin adición	0	16,0
Silwet L-77/AMS (sin glicerina)	54	9,3
Silwet L-77/AMS + glicerina al 0,5%	57	6,3

10 **224)** La figura 38 ilustra el efecto de diversos contraiones de glifosato en la actividad herbicida (presentada como porcentaje de control/eliminación de malas hierbas y como altura de las plantas) de polinucleótidos (ARN) aplicados por vía tópica sobre plantas de almizcle resistentes al glifosato. 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) e IDT [4] (SEQ ID NO: 89-90)) en Silwet L-77 al 0,5%, sulfato de amonio al 2% en tampón de fosfato de sodio 10 milimolar, pH 6,8 con vehículo de Roundup® WeatherMax® al 0,2% (mezcla de tensioactivo de amina de sebo MON56151 de amina de sebo (16-18C) y cocoamina (12-14C) a una proporción de 55:45) y 1682 g de equivalente de ácido por hectárea de una de las sales de glifosato; K+glifosato, isopropilamonio+glifosato o monometilamonio+glifosato a 215 litros/acre mediante pulverizador Millo en 3 replicados de plantas de almizcle resistente al glifosato de 10,1-15,2 cm (4-6 pulgadas) que contenían 16 copias de EPSPS. La altura de las plantas se puntuó a los 21 días después del tratamiento con glifosato. Los resultados (presentados como porcentaje de control/eliminación de malas hierbas y como altura de las plantas) se proporcionan en la tabla 29. Las sales de glifosato de isopropilamonio y monoetanolamonio proporcionaron una mejor actividad herbicida en comparación con la sal de potasio.

20

Tabla 29

Tratamiento	Control de almizcle (%)	Altura de almizcle (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, espermina (*N,N'*-bis(3-aminopropil)butano-1,4-diamina) y espermidina (*N*-(3-aminopropil)butano-1,4-diamina) en la actividad herbicida de polinucleótidos (ARN) aplicados por vía tópica en plantas de almizcle resistentes al glifosato. Se prepararon soluciones de polinucleótidos usando una

mezcla de cantidades iguales de las cuatro moléculas de ARNbc "cortas" de tamaño de oligonucleótido descritas en el **ejemplo 1**, que tienen una hebra antisentido diseñada para hibridar con el ARNm transcrito a partir del gen EPSPS de almizcle (**SEQ ID NO: 1**) en las posiciones 14-38 (ARNbc corto-1), las posiciones 153-177 (ARNbc corto-2), 345-369 (ARNbc corto-3) y 1105-1129 (ARNbc corto-4), como se indica por los nucleótidos subrayados en la **figura 1**; los ARNbc tenían dos salientes de oligonucleótidos en el extremo 3' de la hebra antisentido y tenían dos desoxinucleótidos en los nucleótidos terminales en el extremo 3' de la hebra con sentido. Las soluciones de polinucleótido de ARNbc se prepararon con espermina o espermidina 1 o 10 milimolar o sulfato de amonio al 2%, en un tampón de fosfato de sodio 10 milimolar (pH 6,8). Las soluciones de control (sin polinucleótidos) se prepararon con espermina o espermidina 1 o 10 milimolar o sulfato de amonio al 2%, en un tampón de fosfato de sodio 10 milimolar (pH 6,8). Las plantas de almizcle resistente al glifosato (33, 36 o 57 copias de EPSPS) se rociaron previamente con Silwet L-77 al 1%. Las soluciones de polinucleótidos de ARNbc (11,6 gramos/acre) o las soluciones de tampón se aplicaron en forma de gotas sobre cuatro hojas inferiores completamente extendidas de almizcle resistente al glifosato mediante pipeteado. Dos días después del tratamiento con polinucleótido, se rociaron las plantas con glifosato (3360 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®). Se tomaron fotografías de las plantas a los 14 días después del tratamiento con glifosato; los resultados se muestran en la **figura 39**. El tratamiento con ARNbc y espermina 10 milimolar seguido de tratamiento con glifosato eliminó al almizcle resistente al glifosato con 33 copias de EPSPS y lesionó y retardó gravemente el crecimiento del almizcle resistente al glifosato con 36 copias de EPSPS. El tratamiento solo con espermidina 10 mM retardó el crecimiento de almizcle resistente al glifosato con 33 copias. En este experimento concreto, ni la espermina ni la espermidina a 1 o 10 milimolar rindieron igual que el sulfato de amonio al 2%.

### Ejemplo 36

226) Se ensayó la eficacia de diferentes tensioactivos como agentes de transferencia de polinucleótidos en soluciones pulverizadas de polinucleótidos a almizcle resistente al glifosato. Se obtuvieron tensioactivos Break-Thru de Evonik Industries; los tensioactivos Silwet se obtuvieron de Momentive. Las soluciones de pulverizado se prepararon el mismo día del rociado. Una mezcla de polinucleótidos de EPSPS (IDT [1] (**SEQ ID NO: 83-84**), Se añadieron IDT [3] (**SEQ ID NO: 87-88**) e IDT [4] (**SEQ ID NO: 89-90**)) a las soluciones de pulverizado de 15 a 50 minutos antes de rociar y se aplicaron de 1 a 2 mililitros usando un pulverizador personalizado de bajo volumen muerto ("milli") a plantas de almizcle resistentes al glifosato (R-22) procedentes de esquejes de 2,5 a 10,1 cm (una a cuatro pulgadas). Se aplicaron entre 10 y 225 microgramos de polinucleótidos totales a cada planta, dependiendo del experimento; normalmente se aplicaron 23 microgramos en total de polinucleótidos por planta. Las plantas tratadas se colocaron en un ambiente de invernadero durante 14/10 horas a 26,7/21,1 grados centígrados o 29,4/21,1 grados centígrados y una pauta de luz complementaria. Después de 2 a 3 días, las plantas se pulverizaron con glifosato ("Wmax 2X" o 1682 g de equivalente de ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®) mediante un pulverizador normal (93,53 litros/hectárea, 10 galones/acre) y se devolvieron al invernadero. La cantidad de control (lesión visual) en relación a los tratamientos sin rociado, la altura de las plantas y las fotos del almizcle se recogieron a diferentes intervalos de tiempo durante hasta 21 días después del tratamiento con glifosato. Se registró el peso fresco del material vegetativo por encima del suelo en el último punto de tiempo. Se asignó a cada tratamiento una puntuación de lesión general de planta de entre 0 y 3 basándose en el análisis combinado de Control, Altura, Peso fresco y Fenotipo visual de la planta, donde "3" es una actividad herbicida fuerte, "2" es una actividad moderada, "1" es una actividad leve y "0" es falta de actividad observada después de corregir respecto de cualquier lesión observada causada por el tratamiento solo con glifosato; los resultados se muestran en la **tabla 30**.

227) También se investigaron las propiedades físicas de los diferentes tensioactivos y se listan en la **tabla 30**. Se prepararon setenta mililitros de solución de tensioactivo (tensioactivo al 0,5% en solución acuosa que contiene sulfato de amonio al 2%, tampón (fosfato potásico 20 milimolar, pH 6,8), con o sin un polinucleótido de EPSPS (IDT [2] (**SEQ ID NO: 85-86**), 0,09 miligramos/militro) añadido, en el mismo día de la medición. La tensión superficial dinámica se midió a temperatura ambiental de la sala (22 a 23 grados centígrados) en un tensiómetro Kruss BP100 usando el procedimiento de máxima presión de la burbuja, representando la tensión superficial frente a la edad de la superficie. Se ajustó el instrumento para detectar automáticamente la superficie y sumergir el capilar hasta una profundidad de 10 mm. Se registraron las mediciones de tensión superficial para tres edades de superficies (aproximadamente 20, 500 y 1250 ms). La tensión superficial en dinas por cm se comunicó en el intervalo de 1250 ms como aproximación a la tensión superficial estática y el cambio entre 20 y 500 ms se comunicó como una estimación de la tensión superficial dinámica. Los valores de equilibrio hidrófilo-lipófilo para los tensioactivos se obtuvieron de referencias de tensioactivos y de la información del producto.

Tabla 30

Nombre del tensioactivo	Número CAS	Química	Tipo de tensioactivo	Clase de tensioactivo	Puntuación de lesión en almizcle	Tensión superficial		HLB	
						referencias	delta 20 - 500 ms		
Break-Thru 321	na	polisiloxano modificado con poliéter	organosilicona	no iónico	3	na	22,7	27,1	40,0
Break-Thru 200	67674-67-3	polisiloxano modificado con poliéter	organosilicona	no iónico	3	22	26,9	23,0	
Break-Thru 441	68937-55-3	polisiloxano modificado con poliéter	organosilicona	no iónico	1	na	43,8	2,9	40,0
Break-Thru 278	27306-78-1	polisiloxano modificado con poliéter	organosilicona	no iónico	2	21	24,2	23,4	
Break-Thru 243	na	polisiloxano modificado con poliéter	organosilicona	no iónico	2	47	50,3	7,7	16,7
Silwet L-77	27306-78-1	trisiloxano; polimetilsiloxano modificado con óxido de polialquileno	organosilicona	no iónico	3	20,5	26,4	23,4	13,5
Silwet HS 429	na	silicona hidrolíticamente estable	organosilicona	no iónico	3	32-40	40,1	12,1	
Silwet HS 312	na	silicona	organosilicona	no iónico	3	26,7	29,5	11,3	
Break-Thru 233	134180-76-0	trisiloxano	organosilicona	no iónico	3	23	26,1	10,0	

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Sammons, Robert D.  
 Ivashuta, Sergey I.  
 Liu, Hong Wang, Dafu Feng, Paul C.C.  
 5 Kouranov, Andrei Y.  
 Andersen, Scott E.  
  
 <120> MOLÉCULAS DE POLINUCLEÓTIDO PARA REGULACIÓN GÉNICA EN PLANTAS  
 <130> 38-21(56855)0000/PCT  
  
 <140> nulo  
 10 <141> 08-03-2011  
  
 <150> 61/311.762  
 <151> 08-03-2010  
  
 <150> 61/349.807  
 <151> 28-05-2010  
  
 15 <150> 61/381.556  
 <151> 10-09-2010  
  
 <160> 320  
 <170> PatentIn version 3.5  
  
 <210> 1  
 20 <211> 1557  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*  
  
 <400> 1

ES 2 641 642 T3

atggctcaag ctactaccat caacaatggt gtccatactg gtcaattgca ccatacttta 60  
 cccaaaaccc agttacccaa atcttcaaaa actcttaatt ttggatcaaa cttgagaatt 120  
 tctccaaagt tcatgtcttt aaccaataaa agagttggtg ggcaatcatc aattgttccc 180  
 aagattcaag cttctgttgc tgctgcagct gagaaacctt catctgtccc agaaattgtg 240  
 ttacaaccca tcaaagagat ctctggtact gttcaattgc ctgggtcaaa gtctttatcc 300  
 aatcgaatcc ttcttttagc tgctttgtct gagggcacia cagtggtcga caacttgctg 360  
 tatagtgatg atattcttta tatgttggac gctctcagaa ctcttggttt aaaagtggag 420  
 gatgatagta cagccaaaag ggcagtcgta gagggttgtg gtggtctggt tcctgttggg 480  
 aaagatggaa aggaagagat tcaacttttc cttggtaatg caggaacagc gatgogccca 540  
 ttgacagctg cggttgccgt tgctggagga aattcaagtt atgtgcttga tggagtacca 600  
 agaatgaggg agcgccccc at tggggatctg gtagcaggtc taaagcaact tggttcagat 660  
 gtagattggt ttcttgccac aaattgccct cctgttcggg tcaatgctaa aggaggcctt 720  
 ccagggggca aggtcaagct ctctggatcg gttagtagcc aatatttaac tgcacttctc 780  
 atggctactc ctttgggtct tggagacgtg gagattgaga tagttgataa attgatttct 840  
 gtaccgtatg ttgaaatgac aataaagttg atggaacgct ttggagtatc cgtagaacat 900  
 agtgatagtt gggacaggtt ctacattcga ggtggtcaga aatacaaatc tcctggaaag 960  
 gcatatggtg aggggtgatg ttcaagtgtc agctacttcc tagccggagc cgccgtcact 1020  
 ggtgggactg tcaactgtcaa gggttgtgga acaagcagtt tacaggggtga tgtaaaattt 1080  
 gccgaagttc ttgagaagat gggttgcaag gtcacctgga cagagaatag tgtaactggt 1140  
 actggaccac ccagggattc atctggaaag aaacatctgc gtgctatcga cgtcaacatg 1200  
 aacaaaatgc cagatgttgc tatgactctt gcagttgttg ccttgtatgc agatgggccc 1260  
 accgccatca gagatgtggc tagctggaga gtgaaggaaa ccgaacggat gattgccatt 1320  
 tgcacagaac tgagaaagct tggggcaaca gttgaggaag gatctgatta ctgtgtgatc 1380  
 actccgcctg aaaagctaaa ccccaccgcc attgaaactt atgacgatca ccgaatggcc 1440  
 atggcattct ctcttgctgc ctgtgcagat gttcccgtca ctatccttga tccgggatgc 1500  
 acccgtaaaa ccttcccgga ctactttgat gttttagaaa agttcgccaa gcattga 1557

<210> 2  
 <211> 1761  
 <212> ADN  
 <213> *Nicotiana benthamiana*  
 <400> 2

ES 2 641 642 T3

atgccccaaa tcggacttgt atctgctggt aatttgagag tccaaggtaa ttcagcttat 60  
 ctttggagct cgaggtcttc gttgggaact gaaagtcaag atgtttgctt gcaaaggaat 120  
 ttgttatggt ttggtagtag cgactccatg gggcataagt taaggattcg tactccaagt 180  
 gccacgaccc gaagattgac aaaggacttt aatcctttaa aggtagtctg cattgattat 240  
 ccaagaccag agctagacaa tacagttaac tatttggagg cggcgttatt atcatcatcg 300  
 tttcgtactt cctcacgccc aactaaacca ttggagattg ttattgctgg tgcaggtttg 360  
 ggtggtttgt ctacagcaaa atatctggca gatgctggtc acaaaccgat attgctggag 420  
 gcaagagatg tcctaggtgg gaaggtagct gcatggaaag atgatgatgg agattggtac 480  
 gagactgggt tgcacatatt ctttggggct taccxaaata tgcagaacct gtttggagaa 540  
 ctagggattg atgatcggtt gcagtggaag gaacattcaa tgatatttgc gatgcctaac 600  
 aagccagggg agttcagccg ctttgatttt cctgaagctc ttctgccc attaaatgga 660  
 attttggcca tactaaagaa caacgaaatg cttacgtggc ccgagaaagt caaatttgct 720  
 attggactct tgccagcaat gcttggaggg caatcttatg ttgaagctca agacggttta 780  
 agtgттаagg actggatgag aaagcaaggt gtgcctgata gggtgacaga tgaggtgttc 840  
 attgccatgt caaaggcact taacttcata aaccctgacg agctttcgat gcagtgcatt 900  
 ttgattgctt tgaacagatt tcttcaggag aaacatggtt caaaaatggc ctttttagat 960  
  
 ggtaaccctc ctgagagact ttgcatgccg attgtggaac atattgagtc aaaaggtggc 1020  
 caagtcagac taaactcacg aataaaaaag atcgagctga atgaggatgg aagtgtcaaa 1080  
 tgttttatac tgaataatgy cagtacaatt aaaggagatg cttttgtggt tgccactcca 1140  
 gtggatatct tgaagcttct tttgcctgaa gactggaaag agatcccata tttccaaaag 1200  
 ttggagaagc tagtgggagt tcctgtgata aatgtccata tatggtttga cagaaaactg 1260  
 aagaacacat ctgataatct gctcttcagc agaagcccgt tgctcagtgt gtacgetgac 1320  
 atgtctgtta catgтаagga atattacaac cccaatcagt ctatgттgga attggtatтт 1380  
 gcacccgcag aagagtggat aaatcgtagt gactcagaaa ttattgatgc tacaatgaag 1440  
 gaactagcga agcttttccc tgatgaaatt tcggcagatc agagcaaagc aaaaatattg 1500  
 aagtatcatg ttgtcaaaac cccaaggtct gtttataaaa ctgtgccagg ttgtgaacct 1560  
 tgteggccct tgcaaagatc ccctatagag ggtttttatt tagctggtga ctacacgaaa 1620  
 cagaagtact tggcttcaat ggaaggtgct gtcttatcag gaaagctttg tgcacaagct 1680  
 attgtacagg attacgagtt acttcttggc cggagccaga agatgттggc agaagcaagc 1740  
 gtagttagca tagtgaacta a 1761

ES 2 641 642 T3

	<210> 3	
	<211> 559	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 3	
	ggcccatagg cctttttcta aaataggccc atttaagcta ttaacaatct tcaaaagtac	60
	cacatcgctt aggtaaagaa agcagctgag tttatatatg gttagagacg aagtagtgat	120
	tgcgacgagc gacgtctcgc cctcatcgca atccacgcca ttgagcttga ggccattggc	180
	gacggccgag aggcggtcgc ttaagattag catgtccttg acgcggagtt cttccagacc	240
	gttcatcacg gtcgcccctt ccgccaaggc ggcggcgaca gcgagaatcg gatattcgtc	300
	gatcatcgaa ggcgcgcggt cttccggcac cgtgacgcat aaacacggtg ccggaagacc	360
	gcgcgccttc gatgatcgac gaatatccga ttctcgctgt cgccgcgcc ttcgcggaag	420
	gggcgaccgt gatgaacggt ctggaagaac tccgcgtcaa ggaaagcgac cgcctctcgg	480
	ccgtcgccaa tggcctcaag ctcaatggcg tggattgcga tgagggcgag acgtcgctcg	540
	tcgttttttt tggcaaaaa	559
10	<210> 4	
	<211> 10	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
15	<400> 4 tcccatcg	10
	<210> 5	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 5	
	aagattagca cgg	13
25	<210> 6	
	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
30	<400> 6	
	acgcataaaa t	11
	<210> 7	
	<211> 6	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	

<220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 7  
 tttttt 6  
  
 5 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*  
  
 10 <400> 8  
 accctccacg actgcccttt 20  
  
 <210> 9  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*  
  
 15 <400> 9  
 gtttcctca ctctccagc 19  
  
 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> *Amaranthus palmeri*  
  
 <400> 10  
 gtagcttgag ccattattgt 20  
  
 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> *Amaranthus palmeri*  
  
 <400> 11  
 gttgatggta gtagcttgag 20  
  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> *Amaranthus palmeri*  
  
 <400> 12  
 accctccacg actgcccttt 20  
  
 35 <210> 13  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*  
  
 <400> 13  
 40 gtttcctca ctctccagc 19  
  
 <210> 14  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> *Hordeum vulgare*  
  
 45 <400> 14  
 aagcgggtga gcactgaa 18  
  
 <210> 15  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> *Amaranthus palmeri*  
  
 <400> 15  
 accctccacg actgcccttt 20



<210> 16  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 16  
 taatacgact cactataggg caagagatgt cctaggtggg 40

10

<210> 17  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

15

<400> 17  
 taatacgact cactatagga cagatttctt caggagaaac atgg 44

20

<210> 18  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 18  
 gcaagagatg tcctaggtgg g 21

25

<210> 19  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 19  
 acagatttct tcaggagaaa catgg 25

35

<210> 20  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

40

<400> 20  
 taatacgact cactataggc atctcctta attgtactgc c 41

<210> 21  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 21  
 taatacgact cactataggt ttaattgtac tgccattatt c 41

50

<210> 22  
 <211> 22  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 22  
 5 catctccttt aattgtactg cc 22  
 <210> 23  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 23  
 ttaattgta ctgccattat tc 22  
 <210> 24  
 15 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 20 <400> 24  
 cactccatc ctcatcagc tcgat 25  
 <210> 25  
 <211> 24  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 25  
 30 acacctcatc tgtcacccta tcag 24  
 <210> 26  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 26  
 cagtctcgta ccaatctcca tcat 24  
 <210> 27  
 40 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 27  
 45 taatacgact cactataggg atccatgata tegtgaacat c 41  
 <210> 28  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>

<223> Construcción sintética  
 <400> 28  
 taatacgact cactataggg gcaaagaaaa atgcgtcg 38  
 5  
 <210> 29  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 10  
 <400> 29  
 atccatgata tcgtgaacat c 21  
 <210> 30  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 15  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 30  
 gcaaagaaaa atgcgtcg 18  
 20  
 <210> 31  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 31  
 tgtttatcac tgaataatgg cagtacaatt aaaggagatg 40  
 <210> 32  
 <211> 15  
 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 32  
 catctccttt aattg 15  
 35  
 <210> 33  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 40  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 33  
 catctccttt aattgtac 18  
 <210> 34  
 45  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 50  
 <400> 34

ES 2 641 642 T3

catctccttt aattgtactg c 21  
 <210> 35  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 35  
 catctccttt aattgtactg ccattattca gta 33  
 10 <210> 36  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Construcción sintética  
 <400> 36  
 gcagtacaat taaaggagat g 21  
 <210> 37  
 <211> 1614  
 20 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*  
 <400> 37  
 tcaatttcat ctattggaag tgattttttg ggtcattctg tgagaaattt cagtgttagt 60  
 aaagtttatg gagcaaagca aagaaatggg cactgccctt taaaggttgt ttgtatagat 120

ES 2 641 642 T3

tatcctaggc cagagcttga aagtacatcc aatttcttgg aagccgcocta cttatcttct 180  
acttttogga attogcctcg tcctcagaag ccattagaag ttgtaattgc tggagcaggt 240  
ttggctggtc tatccacggc aaagtattta gctgatgcag gtcacaaacc catattgttg 300  
gaagcacgag atgttttagg aggaaagggt gcagcgtgga aggatgagga tggtgactgg 360  
tatgagactg ggctacatat attctttggg gcatatccaa atgtccaaaa tctatttggga 420  
gaacttggta taaatgaccg actgcaatgg aaggagcact ctatgatfff tgcaatgccc 480  
agcaagcccg gtgaattcag tcgctttgat tttccogaaa tcctgcctgc accattaaat 540  
ggcatatggg caatcctaag aaataatgaa atgctaacct ggccagaaaa aatcaagfff 600  
gccattggct tgttgccctgc tatggcaggc ggacagtcac atgttgaagc acaagatggt 660  
ttgagtgtcc aagagtggat gagaaaacaa ggagtaccog atcgtgtaac tgatgatgtg 720  
tttattgcca tgtcaaaggc actgaacttc ataaatcccg atgaactttc aatgcagtgc 780  
atcttgattg ctctgaaccg attcctgcag gagaaacatg gttctaagat ggccttccca 840  
gacggaaacc ctccagagag gctgtgcatg cctattgtta aacacatcga gtcactaggt 900  
ggtgaagtta aacttaactc tcgtatacaa aagattcagt tggaccagag tggaaagcgtg 960  
aagagttfff tgctaaataa cgggagggaa atacgaggag atgcctatgt ttttgccacc 1020  
ccagttgaca tcttgaagct gttactacct gatacttggga aggaaatctc atacttcaaa 1080  
aaacttgaga aattagtggg cgttcctgtg attaatgttc acatatggtt tgacagaaaa 1140  
ttaagaata catatgacca tctactcttc agcaggagtc ctcttttgag tgtctatgct 1200  
gatatgtcgg agacatgcaa ggaatataag gatccaaata gatccatgct ggaattggtt 1260  
tttgcacccg cggaggaatg gatttcacga agcgacactg atattataga ggcaacaatg 1320  
aaagagcttg ccaagctfff cccggatgaa atcgtgcccg atggaagcaa ggccaagatc 1380  
ctcaaatatc atgtcgtcaa aactccaagg tcggtttata agactgtacc ggattgtgaa 1440  
ccttgtcggc cgctgcaaag atcaccaata gagggtttct atttagctgg tgattacaca 1500  
aaacaaaaat atttggcttc tatggaagggt gctgtcttat ctgggaagct ttgtgcacag 1560  
gctatcgtac aggattatga tctgctgagt tctcgagcac aaagagaatt ggccg 1614

<210> 38

<211> 1761

<212> ADN

<213> *Nicotiana benthamiana*

<400> 38

ES 2 641 642 T3

atgccccaaa tgggacttgt atctgctggt aatttgagag tccaaggtaa ttcagcttat 60  
 ctttgagct cgaggtcttc gttgggaact gaaagtcaag atgtttgctt gcaaaggaat 120  
 ttgttatggt ttggtagtag cgactccatg gggcataagt taaggattcg tactccaagt 180  
 gccacgacc gaagattgac aaaggacttt aatcctttaa aggtagtctg cattgattat 240  
 ccaagaccag agctagacaa tacagttaac tatttgagg cggcgttatt atcatcatcg 300  
 tttcgtactt cctcagccc aactaaacca ttggagattg ttattgctgg tgcaggtttg 360  
 ggtggtttgt ctacagcaaa atatctggca gatgctggtc acaaaccgat attgctggag 420  
 gcaagagatg tcctaggtgg gaaggtagct gcatggaaag atgatgatgg agattggtac 480  
 gagactgggt tgcacatatt ctttggggct taccxaaata tgcagaacct gtttgagaa 540  
 ctagggattg atgatgggt gcagtggaag gaacattcaa tgatatttgc gatgcctaac 600  
 aagccagggg agttcagccg ctttgatttt cctgaagctc ttctgccc attaaatgga 660  
 attttgcca tactaaagaa caacgaaatg cttacgtggc ccgagaaagt caaatttgct 720  
 attggactct tgccagcaat gcttgagggg caatcttatg ttgaagctca agacggttta 780  
 agtgtaagg actggatgag aaagcaaggt gtgcctgata gggtgacaga tgagggttc 840  
 attgccatgt caaaggcact taacttcata aaccctgacg agctttcgat gcagtgcatt 900  
 ttgattgctt tgaacagatt tcttcaggag aaacatggtt caaaaatggc ctttttagat 960  
 ggtaaccctc ctgagagact ttgcatgccg attgtggaac atattgagtc aaaagggtggc 1020  
 caagtcagac taaactcacg aataaaaaag atcgagctga atgaggatgg aagtgtcaaa 1080  
 tgttttatac tgaataatgg cagtacaatt aaaggagatg cttttgtgtt tgccactcca 1140  
 gtggatatct tgaagcttct tttgcctgaa gactggaaag agatcccata tttccaaaag 1200  
 ttggagaagc tagtgggagt tcctgtgata aatgtccata tatggtttga cagaaaactg 1260  
 aagaacacat ctgataatct gctcttcagc agaagcccgt tgctcagtgt gtacgctgac 1320  
 atgtctgta catgtaagga atattacaac cccaatcagt ctatggttga attggtattt 1380  
 gcaccgcag aagagtggat aaatcgtagt gactcagaaa ttattgatgc tacaatgaag 1440  
 gaactagcga agcttttccc tgatgaaatt tcggcagatc agagcaaagc aaaaatattg 1500  
 aagtatcatg ttgtcaaac cccaaggtct gtttataaaa ctgtgccagg ttgtgaacc 1560  
 tgtcggccct tgcaaagatc ccctatagag ggtttttatt tagctggtga ctacacgaaa 1620  
 cagaagtaact tggcttcaat ggaagggtgt gtcttatcag gaaagcttg tgcacaagct 1680  
 attgtacagg attacgagtt acttcttggc cggagccaga agatggtggc agaagcaagc 1740  
 gtagttagca tagtgaacta a 1761

ES 2 641 642 T3

<210> 39  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> *Nicotiana benthamiana*

5 <400> 39  
ggcagtacaa ttaaaggaga tg 22

<210> 40  
<211> 1557  
10 <212> ADN  
<213> *Amaranthus palmeri*  
<400> 40

ES 2 641 642 T3

atggctcaag ctactaccat caacaatggt gtccatactg gtcaattgca ccataacttta 60  
 cccaaaaccc agttacccaa atcttcaaaa actcttaatt ttggatcaaa cttgagaatt 120  
 tctccaaagt tcatgtcttt aaccaataaa agagttggtg ggcaatcatc aattgttccc 180  
 aagattcaag cttctgttgc tgctgcagct gagaaacctt catctgtccc agaaattgtg 240  
 ttacaacca tcaaagagat ctctggtact gttcaattgc ctgggtcaaa gtctttatcc 300  
 aatcgaatcc ttcttttagc tgctttgtct gagggcacia cagtggcga caacttgctg 360  
 tatagtgatg atattcttta tatggtggac gctctcagaa ctcttggttt aaaagtggag 420  
 gatgatagta cagccaaaag ggcagtcgta gagggttgtg gtggctctgtt tctgtttggt 480  
 aaagatggaa aggaagagat tcaacttttc cttggtaatg caggaacagc gatgcgcccc 540  
 ttgacagctg cggttgccgt tgctggagga aattcaagtt atgtgcttga tggagtacca 600  
 agaatgaggg agcgccccc tgggatctg gtagcaggtc taaagcaact tggttcagat 660  
 gtagattggt ttcttggcac aaattgccct cctgttcggg tcaatgctaa aggaggcctt 720  
 ccagggggca aggtcaagct ctctggatcg gttagtagcc aatatttaac tgcacttctc 780  
 atggctactc ctttgggtct tggagacgtg gagattgaga tagttgataa attgatttct 840  
 gtaccgtatg ttgaaatgac aataaagttg atggaacgct ttggagtatc cgtagaacat 900  
 agtgatagtt gggacaggtt ctacattcga ggtggtcaga aatacaaatc tcttggaaag 960  
 gcatatggtg agggatgatg ttcaagtgtc agctacttcc tagccggagc cgccgtcact 1020  
 ggtgggactg tcaactgtcaa gggttgtgga acaagcagtt tacaggggtga tgtaaaatth 1080  
 gccgaagttc ttgagaagat gggttgcaag gtcacctgga cagagaatag tgtaactggt 1140  
 actggaccac ccagggattc atctggaaag aacatctgc gtgctatcga cgtcaacatg 1200  
 aacaaaatgc cagatgttgc tatgactctt gcagttggtt ccttgtatgc agatgggccc 1260  
 accgccatca gagatgtggc tagctggaga gtgaaggaaa ccgaacggat gattgccatt 1320  
 tgcacagAAC tgagaaagct tggggcaaca gttgaggaag gatctgatta ctgtgtgatc 1380  
 actccgcctg aaaagctaaa ccccaccgcc attgaaactt atgacgatca ccgaatggcc 1440  
 atggcattct ctcttgctgc ctgtgcagat gttcccgta ctatccttga tccgggatgc 1500  
 acccgtaaaa ccttcccgga ctactttgat gttttagaaa agttcgccaa gcattga 1557

<210> 41  
 <211> 250  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*

5

<220>  
 <221>misc\_feature  
 <222>(27) .. (27)  
 <223>n es a, c, g o t



ES 2 641 642 T3

<400> 41  
 cgccagggct gcagacgcgt tacgtantcg gatccagaat tcgtgattaa cgtcacagca 60  
 tgtcatgtaa aacacgcgaa tcagaccggt ccactcttgt ttaatttga gacaattttg 120  
 atgttgagtc atcccacacc aaccccacaaa aattcaacaa caaactctta taatgattcc 180  
 ctctactcta ctagagtcta caccaaccca ctttctcttt gccacacaaa actttggttt 240  
 ggtaagaact 250  
  
 <210> 42  
 <211> 244  
 5 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*  
  
 <400> 42  
 caccaaccca ctttctcttt gccacacaaa actttggttt ggtaagaact aagccctctt 60  
 ctttcccttc tctctcttaa aagcctaaaa tccacctaac ttttccagcc aacaaacaac 120  
 gccaaattca gaggaagaat aatgatggct caagctacta ccatcaacaa tgggtgccat 180  
 actggccaat tgcaccatac tttacccaaa acccagttac ccaaactctt aaaaactctt 240  
 aatt 244  
  
 <210> 43  
 <211> 250  
 10 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*  
  
 <400> 43  
 ccatacttta cccaaaacc agttacccaa atcttcaaaa actcttaatt ttggatcaaa 60  
 cttgagaatt tctccaaagt tcatgtcttt aaccaataaa agagttgggtg ggcaatcatc 120  
 aattgttccc aagattcaag cttctgttgc tgctgcagct gagaaacctt catctgtccc 180  
 agaaattgtg ttacaaccca tcaaagagat ctctggtact gttcaattgc ctgggtcaaa 240  
 gtctttatcc 250  
  
 <210> 44  
 <211> 250  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*  
  
 <400> 44  
 20 tcaaagagat ctctggtact gttcaattgc ctgggtcaaa gtctttatcc aatogaatcc 60  
  
 ttcttttagc tgctttgtct gagggcacaa cagtgggtoga caacttgctg tatagtgatg 120  
 atattcttta tatgttgac gctctcagaa ctcttggttt aaaagtggag gatgatagta 180  
 cagccaaaag ggcagtcgta gagggttgtg gtggtctggt tcctggtggt aaagatggaa 240  
 aggaagagat 250  
  
 <210> 45

ES 2 641 642 T3

<211> 250  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*  
 <400> 45  
**gagggttgtg gtggtctggt tcctgttggt aaagatggaa aggaagagat tcaacttttc 60**  
**ottggtaatg caggaacagc gatgcgccca ttgacagctg cggttgccgt tgctggagga 120**  
**aattcaagtt atgtgcttga tggagtacca agaatgaggg agcgcccat tggggatctg 180**  
**gtagcaggtc taaagcaact tggttcagat gtagattggt ttcttggcac aaattgccct 240**  
**cctgttcggg 250**

5

<210> 46  
 <211> 250  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*  
 <400> 46  
**tggttcagat gtagattggt ttcttggcac aaattgccct cctgttcggg tcaatgctaa 60**  
**aggaggcctt ccagggggca aggtcaagct ctctggatcg gtagtagcc aatatttaac 120**  
**tgcacttctc atggctactc ctttgggtct tggagacgtg gagattgaga tagttgataa 180**  
**attgatttct gtaccgtatg ttgaaatgac aataaagttg atggaacgct ttggagtatc 240**  
**cgtagaacat 250**

10

<210> 47  
 <211> 250  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*  
 <400> 47  
**ttgaaatgac aataaagttg atggaacgct ttggagtatc cgtagaacat agtgatagtt 60**  
**gggacagggt ctacattcga ggtggtcaga aatacaaac tcctggaaag gcatatggtg 120**  
**agggtgatgc ttcaagtget agctacttcc tagccggage cgccgtcact ggtgggactg 180**  
**tcactgtcaa gggttgtgga acaagcagtt tacagggatg tgtaaaattt gccgaagttc 240**  
**ttgagaagat 250**

15

<210> 48  
 <211> 250  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*  
 <400> 48

20

ES 2 641 642 T3

	acaagcagtt tacaggggtga tgtaaaattt gccgaagttc ttgagaagat gggttgcaag	60
	gtcacctgga cagagaatag tgtaactggt actggaccac ccagggattc atctggaaag	120
	aaacatctgc gtgctatcga cgtcaacatg aacaaaatgc cagatgttgc tatgactctt	180
	gcagttgttg ccttgtatgc agatgggcc accgccatca gagatgtggc tagctggaga	240
	<b>gtgaaggaaa</b>	250
	<210> 49	
	<211> 250	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>	
	<400> 49	
	agatgggcc accgccatca gagatgtggc tagctggaga gtgaaggaaa ccgaacggat	60
	gattgccatt tgcacagaac tgagaaagct tggggcaaca gttgaggaag gatctgatta	120
	ctgtgtgatc actccgctg aaaagctaaa cccaccgcc attgaaactt atgacgatca	180
	ccgaatggcc atggcattct ctcttgctgc ctgtgcagat gttcccgtca ctatccttga	240
	<b>tccgggatgc</b>	250
	<210> 50	
	<211> 257	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>	
	<400> 50	
	ctcttgctgc ctgtgcagat gttcccgtca ctatccttga tccgggatgc acccgtaaaa	60
	ccttcccgga ctactttgat gttttagaaa agttcgccaa gcattgatga gtagctatat	120
	acgagatcct taaattgtac gccgaagggt ttgatttgag tctaatagta gataaaaggc	180
	tataaataaa ctggctttct gcttgagtaa ttatgaaatt ctttgtatta tgtttgtgag	240
	<b>atttgaagta gcttata</b>	257
	<210> 51	
	<211> 273	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>	
	<400> 51	
	taattatgaa attctttgta ttatgtttgt gagatttgaa gtagcttata aattacaatg	60
	tactaaagtc tagaaataag ttatgtatct tttaaatcaa tgagaaatgc atacttgaaa	120
	ggcttgacct tgtatttgtg acctaaagag tactaacttt ggagtttcca actcatttgt	180
	ttatctcatt ttttttaaat ttttgattta aattgtttat ttttatgagt aatcatgtat	240
	ctttcttatt ctaaccaaat gtaatactcc ttc	273
	<210> 52	
20	<211> 301	
	<212> ADN	

ES 2 641 642 T3

<213> *Amaranthus palmeri*

<400> 52

tatgagtaat catgtatctt tcttattcta accaaatgta atactccttc caactctctt	60
taaacgtcca cactctgggc acagagtgta atagtgtggt ggttggagtc ttttaagtga	120
ttataataat tgtaaagtgt gtagttagaa tattttaagt aatgtaggtg gggattatg	180
gtcttggtga acataggata tttaggtaaa aaatctatgc aaaaaagga aagtaagcaa	240
ataaagcgaa ttgacctgaa aagaaaagtg gacatgtata gtgagttgga ggaagtattt	300
t	301

5

<210> 53

<211> 1710

<212> ADN

<213> *Lactuca sativa*

<400> 53

ES 2 641 642 T3

atgtctctgt ttggaaatgt ttctgccatt aactcaagtg gaaagtgtat agtaatgaat 60  
 ctttcaagca cacaaatcac ttcaagagat tgtttcaaga ttacctcagg gcaaaaagat 120  
 gttttgtcat ttggatgctg tgatgctatg ggtaacagat tgcaattccc aagtgctcgt 180  
 tcttttacac caagatcaaa gaagaatgtc tcccctctaa aggtagtttg tgttgattat 240  
 ccaagaccag atcttgataa cacatctaat ttcttggaag ctgctcactt gtcttcaacc 300  
 ttcagaactt ccccacgccc atctaagcca ttgaagattg taattgctgg tgcaggttta 360  
 gctggtttat caactgctaa gtatttagct gatgcaggtc acaagccaat tttactagaa 420  
 gcaagagatg ttcttggtgg aaaggtggca gcttggaag atgatgatgg agattggtat 480  
 gagacaggtt tacacatatt ctttgagct taccCAAatg taaaaattt atttgagag 540  
 ctaggaatta atgatagatt acagtggaag gagcattcta tgatatttgc aatgccaaat 600  
 aagcctggag aatttagtag gttgacttc ccagatgttt tacctgcacc attgaatgga 660  
 atttttgcta tattgaggaa caatgaaatg ctgacgtggc ctgagaaagt gaagtttgca 720  
 attgggctgt tgctgcaat gttaggtgga caggcttatg ttgaggcca agatgggctt 780  
 agtgttcagg actggatgag aaagcaaggt atacctgatc gagttactac tgaagtgttt 840  
 attgcaatgt caaaagcatt aaactttata aatccagatg aactttcaat gcaatgtatt 900  
 ctcatgctc taaacogttt tcttcaggaa aagcatgggt ccaagatggc atttttagat 960  
 gggagcccac cagaaagact ttgcaagcca attgttgacc acatcgagtc actcggtggc 1020  
 caagtcaag tcaactcacg aatacaaaa attgagttaa acaaagacgg aactgtccgg 1080  
 aactttctat tgagtgatgg gaatgttcta gaagctgatg cttatgtttt cgtaccct 1140  
 gttgacattc tcaagcttct tttaccgaa gaatggaac caattcata tttcaaaaa 1200  
 ttagagaagt tagtCGgtgt tcctgttata aacgttcata tatggtttga cagaaagctg 1260  
 aaaaacacat atgatcactt acttttcagt aggtcacctc tgctgagtgt gtatgctgac 1320  
 atgtcagtga catgtaagga atattatgat ccgaataagt caatgttgga gttggttctt 1380  
 gctccagctg aggaatggat ttcaagaagt gacactgata ttattgatgc aacaatgagt 1440  
 gaactttcaa ggctttttcc tgatgaaatt gcagctgatc aaagtaaagc aaaaatcttg 1500  
 aatataaag ttgttaaac accaaggtct gtttataaaa ctgttcaga ttgtgaacca 1560  
 tgtcgacccc tacaagatc tccaattcaa ggattttatt tatctggtga ttatactaaa 1620  
 caaaagtatt tggcttcaat ggggggtgct gttttatctg gaaaaatttg tgcacaagct 1680  
 attttacaag attatgagat gcttgctaca 1710

<210> 54  
 <211> 42  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 54  
 5 taatacgact cactataggg ttggagctt acccaaatgt ac 42  
 <210> 55  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 55  
 10 taatacgact cactataggg aggccacgtc agcatttcat tgttc45  
 <210> 56  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 56  
 20 ccattcaatg gtgcaggtaa aac 23  
 <210> 57  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 57  
 30 catagaatgc tcctccact g21  
 <210> 58  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 58  
 35 caaataaatt ttgtacattt ggtaagctc caa 33  
 <210> 59  
 <211> 2349  
 <212> ADN  
 <213> *Solanum lycopersicum*  
 <400> 59

ES 2 641 642 T3

gggtttatct	cgcaagtgtg	gctatggtgg	gacgtgtcaa	atdddggatt	gtagccaaac	60
atgagatttg	attdaaagg	aattggccaa	atcaccgaaa	gcaggcatct	tcatcataaa	120
ttagtttggt	tattataca	gaattatacg	ctttactag	ttatagcatt	cggtatcttt	180
ttctgggtaa	ctgcccacc	accacaaatt	tcaagtttc	attdaactct	tcaacttcaa	240
cccaaccaa	tttatttgc	taattgtgca	gaaccactcc	ctatatcttc	taggtgcttt	300
cattcgttcc	gagtaaatg	cctcaaattg	gacttgtttc	tgctgttaac	ttgagagtcc	360
aaggtagttc	agcttatctt	tggagctcga	ggtcgtcttc	tttgggaact	gaaagtcgag	420
atggttgctt	gcaaaggaat	tcgttatggt	ttgctggtag	cgaatcaatg	ggtcataagt	480
taaagattcg	tactcccat	gccacgacca	gaagattggt	taaggacttg	gggcctttaa	540
aggtcgtatg	cattgattat	ccaagaccag	agctggacaa	tacagttaac	tatttggagg	600
ctgcattttt	atcatcaacg	ttcctgtgctt	ctccgcgcc	aactaaacca	ttggagattg	660
ttattgctgg	tgcaggtttg	ggtggtttgt	ctacagcaaa	atatttggca	gatgctggtc	720
acaaaccgat	actgctggag	gcaagggatg	ttctaggtgg	aaaggtagct	gcatggaaag	780
atgatgatgg	agattggtac	gagactggtt	tgcatatatt	ctttggggct	taccxaaata	840
ttcagaacct	gtttggagaa	ttagggatta	acgatcgatt	gcaatggaag	gaacattcaa	900
tgatatttgc	aatgccaagc	aagccaggag	aattcagccg	ctttgatttc	tccgaagctt	960
taccgctcc	tttaaattga	attdtagcca	tcttaaagaa	taacgaaatg	cttacctggc	1020
cagagaaagt	caaatttgc	attggactct	tgccagcaat	gcttggaggg	caatcttatg	1080
ttgaagctca	agatgggata	agtgttaagg	actggatgag	aaagcaaggt	gtgccggaca	1140

ES 2 641 642 T3

gggtgacaga tgaggtgttc attgctatgt caaaggcact caactttata aaccctgacg 1200  
aactttcaat gcagtgcat ttgatgcat tgaacaggtt tcttcaggag aaacatggtt 1260  
caaaaatggc ctttttagat ggtaatcctc ctgagagact ttgcatgccg attggtgaac 1320  
acattgagtc aaaaggtggc caagtcagac tgaactcacg aataaaaaag attgagctga 1380  
atgaggatgg aagtgtcaag agttttatac tgagtgcagg tagtgcaatc gagggagatg 1440  
cttttgtgtt tgccgctcca gtggatattt tcaagcttct attgcctgaa gactggaaag 1500  
agattccata tttccaaaag ttggagaagt tagtcggagt acctgtgata aatgtacata 1560  
tatggtttga cagaaaactg aagaacacat atgatcattt gctcttcagc agaagctcac 1620  
tgctcagtgt gtatgctgac atgtctgtta catgtaagga atattacaac cccaatcagt 1680  
ctatgttgga attggttttt gcacctgcag aagagtggat atctcgcagc gactcagaaa 1740  
ttattgatgc aacgatgaag gaactagcaa cgctttttcc tgatgaaatt tcagcagatc 1800  
aaagcaaagc aaaaatattg aagtaccatg ttgtcaaac tccgaggtct gtttataaaa 1860  
ctgtgccagg ttgtgaacc tgtcggcctt tacaagatc cccaatagag gggttttatt 1920  
tagccggtga ctacacgaaa cagaaatact tggcttcaat ggaaggcgcct gtcttatcag 1980  
gaaagctttg tgctcaagct attgtacagc attatgagtt acttgttgga cgtagccaaa 2040  
agaagttgtc ggaagcaagc gtagtttagc tttgtggtta ttatttagct tctgtacact 2100  
aaatttatga tgcaagaagc gttgtacaca acatatagaa gaagagtgcg aggtgaagca 2160  
agtaggagaa atgttaggaa agctcctata caaaaggatg gcatggtgaa gattagcatc 2220  
tttttaatcc caagtttaaa tataaagcat attttatgta ccaactttctt tatctggggt 2280  
ttgtaatccc tttatatctt tatgcaatct ttacgttagt taaaaaaaa aaaaaaaaaa 2340  
aaaactcga 2349

<210> 60  
<211> 200  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Construcción sintética

<400> 60

tcgcagcgcac tcagaaatta ttgatgcaac gatgaaggaa ctagcaacgc tttttcctga 60  
tgaaatttca gcagatcaaa gcaaagcaaa aatattgaag taccatggtg tcaaaaactcc 120  
gaggtctgtt tataaaaactg tgccagggtg tgaaccctgt cggcctttac aaagatcccc 180  
aatagagggg ttttatattag 200

10 <210> 61



<211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5  
 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 61  
 taatacgact cactataggg tgcagcgac tcagaaatta ttg 43

10  
 <210> 62  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

15  
 <400> 62  
 taatacgact cactataggg gtaaaggccg acaggggtca caacc 45

<210> 63  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

20  
 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 63  
 cuaccauca caaugguguc c 21

25  
 <210> 64  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

30  
 <400> 64  
 ggacaccuu guugauggua g 21

<210> 65  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

35  
 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 65  
 gucgacaacu ugcuguauag u 21

40  
 <210> 66  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

45  
 <400> 66  
 acuauacagc aaguugucga c 21

<210> 67  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

50

ES 2 641 642 T3

<220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 67  
 ggucaccugg acagagaaua g 21  
 5 <210> 68  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 10 <400> 68  
 cuauucucug uccaggugac c 21  
  
 <210> 69  
 <211> 21  
 15 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 20 <400> 69  
 aaugccagau guugcuauga c 21  
  
 <210> 70  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 70  
 gucauagcaa caucuggcau u 21  
  
 <210> 71  
 <211> 2827  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*  
 30 <400> 71  
  
**atggcaacaa tggcttcct agtgagtttg ggaagctctg gagcaacttg ctcagggcaa 60**

ES 2 641 642 T3

ttggaggttt ccttttcatt ggttaagaaa attacattgc ctagaagaaa ttgtagttgc 120  
 aatttttaggc aattaggagg ggggaggaga tggcgttacg tttcgggtgtg tagactttct 180  
 gtcactactg attatgtttc tgagcaagga aatgctgttt ctcttgaaaa tgcatatagt 240  
 gagagtaaag aagagggctc catcttgaag ccttctccta agccggtttt gaaatccggg 300  
 tctgatggaa atcggaaatt tggggagagt tccgtggcgt tttcgagtaa tgggaaattg 360  
 gataatgtag aggagaggaa gaaggttatt gattcattgg atgaggtatt agaaaaggcc 420  
 gagagattag aaacggcgaa cttacaagca gataatagaa aggatagcac aaatgtaaat 480  
 aaaccgtctc cgagtgtaag tagttcaacc aatggtaaac ctgtaaataa tttgaacaaa 540  
 gggaagccta aagctgcgaa gagcgtttgg agaaaggaa atccagtttc tactgtgcaa 600  
 aaagtagtgc aagaatctcc gaagattgaa aaggttgaga gagtggaagc tcgaacgacc 660  
 agccaatcgt ctgaaacgat aagaccccca gtgccactac agaggcctga gattaagttg 720  
 caggcaaagc cttctactgc tectccacc atgcctaaga agccggtttt gaaggatgtg 780  
 gggatgtcct ccagagctga tgggaaggac cagtctgtga aatctaaaga gaggaagcct 840  
 attctagtgg acaaatttgc caccaagaag gcatcagttg atccgtcgat tgctcaagca 900  
 gtaattgccc caccaaaaacc tgctaaattt ccttctggaa agtttaaaga tgattatcgg 960  
 aagaagggtc ttgcagctgg tgggccgaag aggcgtatgg tcaatgatga tgatattgaa 1020  
 atgcatgaag acacttcaga gctcggctct tctattcctg gtgctgctac ggctcggaaa 1080  
 ggcaggaaat ggagtaaggc aagtcgcaag gctgccagac gccaaagcagc tagagatgcc 1140  
 gctcctgtta aagtggaaat cttagaggtt gaagaaaagg gcatgtcgac cgaagaatta 1200  
 gcatacaact tggctattag cgaagggtgaa attcttgggt acctgtattc taaggggata 1260  
 aaaccagatg gtgtgcaaac tcttgacaag gcaatggtaa agatgatatg tgaaagatat 1320  
 gacgtggagg ttttggacgc actttctgaa caaatggaag aatggctcg aaagaaggaa 1380  
 attttcgacg aagatgacct tgacaagctt gaagataggc ctctgtgct tactataatg 1440  
 ggtcatgtag atcatggcaa gacgaccctt ctggattata tacggaagag caaggttgct 1500  
 gcttctgaag ctggtgggat tacacaaggt attggtgctt ataaagtga agtaccggtt 1560  
 gatggcaagt tgctgccttg tgtctttctt gacactcccg gacacgaggc gttcggggca 1620  
 atgagggctc gtggagcaag agtgacagat attgctatta tagttgtagc tgctgacgat 1680  
 gggatccgtc ctcaaacaaa tgaagccata gcacatgcaa aagcagctgg tgtacctatt 1740  
 gtggttgcaa ttaataagat tgacaaggat ggggctaata cggaccgtgt gatgcaagag 1800  
 ctttcatcaa ttggtctaata gccagaggat tgggggtgtg atacccaat ggtcaagata 1860  
 agtgctctaa aaggtgaaaa tgtggacgag ttactcgaga cagccatgct tgtcgcgag 1920

ES 2 641 642 T3

ttgcaagagt taaaggctaa tcctcagagg aacgctaagg gcactgtaat tgaggctggt 1980  
 cttcataaat caaaaggacc cattgccact tttattgtgc agaatggtac cctcaaacia 2040  
 ggggatactg tagtttgtgg ggaagcattt ggggaaggttc gtgccctatt tgatcacgga 2100  
 gggaatcgcg ttgatgaagc tgggccatct attcccgtgc aggttattgg attgaataat 2160  
 gttccttttg ccggtgatga gttcgaggta gtgagttccc ttgatatagc tcgtgaaaag 2220  
 gcagaggtcc gtgcagagtc tttacgaaat gagcgtatag ctgctaaggc cggagacgga 2280  
 aaggttacgc tgtcatcctt ggcatcggct gtttcttcag ggaagatggc tggtttggat 2340  
 ttgcaccagt taaatatcat tttgaaggtt gatgttcagg gatcaatcga ggcattgagg 2400  
 caagctctag aagttcttcc tcaagataac gtcactttga agtttctctt acaagcgacc 2460  
 ggagatgta ctacaagtga tgttgatctt gcagttgcta gtaaagctat tatcttgggg 2520  
 ttcaatgtga aggcaccagg ttctgtcgaa aaattagcag ataaciaaagg tgttgaaatt 2580  
 cggctttata aagtcattta tgatctaatt gacgacatgc ggagtgcaat ggaaggaatg 2640  
 ctagatcccg ttgaggaaca agttgcaatt ggttcagccg aagtgcgggc tacattcagt 2700  
 agtggtagtg gccgtgtcgc tggatgcatg gtgaccgagg gaaagattac caaaggctgt 2760  
 gggattcagag tgatacggaa gggaaaaact gtccacgttg gagttcttga ttcggtgcgt 2820  
 cgagtaa 2827

<210> 72  
 <211> 200  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 72

tttcagataa tgggaaattg gataatgtag aggagaggaa gaaggttatt gattcattgg 60  
 atgaggtatt agaaaaggcc gagagattag aaacggcgaa cttacaagca gataatagaa 120  
 aggatagcac aatgtaaat aaaccgtctc cgagtgtaag tagttcaacc aatggtaaac 180  
 ctgtaaataa tttgaacaaa 200

10 <210> 73  
 <211> 160  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 73

ES 2 641 642 T3

uucgaguaau gggaaaauugg auaauguaga ggagaggaag aagguuauug auucauugga 60  
 ugagguauua gaaaaggccg agagauuaga aacggcgaac uuacaagcag auaauagaaa 120

ggauagcaca aauguaaaua aaccgucucc gaguguaagu 160

5 <210> 74  
 <211> 160  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 74  
 acuuacacuc ggagacgguu uuuuacauu ugugcuaucc uuucuauuau cugcuuguaa 60  
 guucgccguu ucuaaucucu cggccuuuuc uaauaccuca uccaaugaa caauaacuu 120  
 cuuccucucc ucuaauuau ccauuuucc auuacucgaa 160

10 <210> 75  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Construcción sintética  
 <400> 75  
 attctcaa acgctctcg ca 22

20 <210> 76  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 76  
 25 atccaattc ccattactcg aa 22

<210> 77  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 77  
 gttctaate tctcgccctt tt 22

35 <210> 78  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética

	<400> 78 ttgaactact tacactcgga g	21
5	<210> 79 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Construcción sintética	
10	<400> 79 taaccttctt cctctcctct a	21
15	<210> 80 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Construcción sintética	
20	<400> 80 gtccttccca tcagctctgg a21	
25	<210> 81 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Construcción sintética	
30	<400> 81 cgtagcagca ccaggaatag	20
35	<210> 82 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Construcción sintética	
40	<400> 82 cagcagctac aactataata g	21
45	<210> 83 <211> 25 <212> ARN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Construcción sintética	
50	<400> 83 cuaccacaa caaugguguc cauac25	
	<210> 84 <211> 27 <212> ARN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Construcción sintética	
	<400> 84 guauggacac cauguugau gguagua	27

<210> 85  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 85  
 aguugguggg caucaucaaa uug 23  
 10 <210> 86  
 <211> 27  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 15 <400> 86  
 aacaaugau gauugcccac caacucu 27  
 <210> 87  
 <211> 24  
 <212> ARN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 87  
 ggucgacaac uugcuguaua guga 24  
 25 <210> 88  
 <211> 27  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Construcción sintética  
 <400> 88  
 aucacuauc agcaaguugu cgaccuc 27  
 <210> 89  
 <211> 24  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 89  
 40 ugcaagguca ccuggacaga gaaa 24  
 <210> 90  
 <211> 27  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 90  
 uauucucugu ccaggugacc uugcaac 27  
 50 <210> 91  
 <211> 21  
 <212> ARN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
5	<400> 91 aacaugaaca aaaugccaga u	21
	<210> 92	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 92 aucuggcauu uugucaugu u	21
	<210> 93	
15	<211> 27	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
20	<400> 93 guauggacac cauuguugau gguagua	27
	<210> 94	
	<211> 27	
	<212> ARN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 94 uacuaccauc aacauggug uccauc	27
30	<210> 95	
	<211> 27	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Construcción sintética	
	<400> 95 aauaaugau gauugccac caacucu	27
	<210> 96	
40	<211> 27	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
45	<400> 96 agaguuggug ggcaucauc aauuau	27
	<210> 97	
	<211> 27	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	



	<223> Construcción sintética	
	<400> 97	
	aucacuauc agcaaguugu cgaccac	27
5	<210> 98 <211> 27 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
10	<400> 98	
	guggucgaca acuugcugua uagugau	27
	<210> 99 <211> 27 <212> ARN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 99	
	uauucucugu ccaggugacc uugcaac	27
20	<210> 100 <211> 27 <212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Construcción sintética	
	<400> 100	
	guugcaaggu caccuggaca gagaaua	27
	<210> 101 <211> 29 <212> ARN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 101	
35	gguauaggaca ccauuguuga ugguguac	29
	<210> 102 <211> 29 <212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 102	
	gcuaccauca acauggugu ccuaccac	29
	<210> 103 <211> 29 <212> ARN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
50	<400> 103	

gaagaauga ugauugccca ccaacucac 29  
 <210> 104  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 104  
 gaguuggugg gcaaucauca auuauucac 29  
 <210> 105  
 <211> 27  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 105  
 gaucacuaua cagcaaguug ucgacac 27  
 <210> 106  
 <211> 27  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 106  
 gucgacaacu ugcuguauag ugaucac 27  
 <210> 107  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 107  
 guauucucug uccaggugac cuugcacac 29  
 <210> 108  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 108  
 gugcaagguc accuggacag agaauacac 29  
 <210> 109  
 <211> 58  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 109  
 gauaggacac cauuguugau gguaguagaa auacuaccau caacauggu guccauac 58  
 <210> 110

ES 2 641 642 T3

<211> 58  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 110  
 aaauuugau gauugcccac caacucugaa aagaguuggu gggcaucau caauuuu 58

10 <210> 111  
 <211> 58  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

15 <400> 111  
 aucacuauc agcaaguugu cgaccacgaa aguggucgac aacuugcugu auagugau 58

<210> 112  
 <211> 58  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 112  
 uauucucugu ccaggugacc uugcaacgaa aguugcaagg ucaccuggac agagaaua 58

25 <210> 113  
 <211> 168  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

30 <400> 113

**gaucacaaa uugccgguuu augaucaau acggaacaua agacagauac acuugaacac 60**

**caugauucgc auugggggug ugguuacucg ucguucugga guauucccuc aguugaugca 120**

**ggugaaguau gacugcaaua aauguggggc uauccugggu cccuuuuu 168**

<210> 114  
 <211> 168  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 114

**aaaaagggac ccaggauagc cccacauuaa uugcagucan acuucaccug caucaacuga 60**

**gggaauacuc cagaacgacg aguaaccaca cccccaaugc gaaucauggu guucaagugu 120**

**aucugucuaa uguuccguau uugaucauaa accggcaauu uugugauc 168**

40 <210> 115

<211> 25  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 115  
 uuuucuaaua ccucauccaa ugaaau 25  
  
 <210> 116  
 <211> 25  
 10 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 116  
 15 auucauugga ugagguauua gaaaa 25  
  
 <210> 117  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 117  
 uaucugcuug uaaguucgcc guuuc 25  
  
 <210> 118  
 <211> 25  
 25 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 118  
 30 gaaacggcga acuuacaagc agaua 25  
  
 <210> 119  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 119  
 ggagacgguu uauuuacauu ugugc 25  
  
 <210> 120  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 45 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 120  
 gcacaaaugu aaauaaaccg ucucc 25  
  
 <210> 121  
 <211> 25  
 50 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 641 642 T3

	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 121		
	uauuuacagg uuuaccuug guuga	25	
5	<210> 122		
	<211> 25		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Construcción sintética		
	<400> 122		
	ucaaccaug guaaaccugu aaaua	25	
	<210> 123		
	<211> 185		
15	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 123		
	<b>gacggaaacc cuccagagag gcugugcaug ccuauuguaa aacacaucga gucacuaggu</b>		<b>60</b>
	<b>ggugaaguua aacuuaacuc ucguauacaa aagauucagu uggaccagag uggagcgug</b>		<b>120</b>
	<b>aagaguuuuu ugcuaaaaua cgggagggaa auacgaggag augccuaugu uuuugccacc</b>		<b>180</b>
	<b>ccagu</b>		<b>185</b>
20			
	<210> 124		
	<211> 185		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 124		
	<b>acuggggugg caaaaacaua ggcaucuccu cguauuuccc ucccguaauu uagcaaaaaa</b>		<b>60</b>
	<b>cucuucacgc uuccacucug guccaacuga aucuuuugua uacgagaguu aaguuuaacu</b>		<b>120</b>
	<b>ucaccaccua gugacucgau guguuuaaca auaggcaugc acagccucuc uggaggguuu</b>		<b>180</b>
	<b>ccguc</b>		<b>185</b>
30	<210> 125		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
35	<400> 125		
	gtgatattac ctccaacag at	22	
	<210> 126		
	<211> 21		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia artificial		

<220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 126  
 atagtaagca caggatcgga g 21  
 5 <210> 127  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 10 <400> 127  
 cttcaatcc actgtcaacc g21  
  
 <210> 128  
 <211> 22  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 20 <400> 128  
 atcaagcgtt cgaagacctc at 22  
  
 <210> 129  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 129  
 cagcaatggc gtaggtaac a 21  
 30 <210> 130  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 35 <400> 130  
 gcaattgcc gaatccttt a 21  
  
 <210> 131  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 131  
 tagctcaata tcaagtcct a 21  
 45 <210> 132  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 50 <223> Construcción sintética

<400> 132  
 tcataagcac cctctataca c 21  
  
 <210> 133  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 133  
 ttcttaacct cgtcgagatg 20  
  
 <210> 134  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 134  
 atacccgagt atccttgcaa a 21  
  
 <210> 135  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 135  
 tagggccac ggccttgag t 21  
  
 <210> 136  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 136  
 agcggatata acctcagcta g 21  
  
 <210> 137  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 137  
 cttcgtggcc caacgaatga c 21  
  
 <210> 138  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 138  
 caagctcggg tcctgcttg c 21

<210> 139  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 139  
 ggaaggtaga tgacatgagt t 21  
 10 <210> 140  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 15 <400> 140  
 gatggcatag ttaccactgt c 21  
 <210> 141  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 141  
 tccgtagctt acataccgaa g 21  
 25 <210> 142  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Construcción sintética  
 <400> 142  
 tccaagtгаа taggagaaac a 21  
 <210> 143  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 143  
 40 agcagcttct gcgtttcta c 21  
 <210> 144  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 144  
 acagcagca cgccaagacc g 21  
 50 <210> 145  
 <211> 21  
 <212> ADN



<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 145  
 5 cgatgtaagg aatttgtaa a 21  
 <210> 146  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 146  
 cgaggggatt gcagcagaag a 21  
 <210> 147  
 15 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 20 <400> 147  
 gtaggagaat acgtgaagt a 21  
 <210> 148  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 148  
 gacccaaga aaatcgctg c 21  
 30 <210> 149  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> Construcción sintética  
 <400> 149  
 gtctacaag ggttctaa 19  
 <210> 150  
 <211> 21  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 150  
 45 atctatgttc acctcctgt g 21  
 <210> 151  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>

<223> Construcción sintética  
 <400> 151  
 ataaaccatt agcttcccg g 21  
 5  
 <210> 152  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 10  
 <400> 152  
 ttattggaa caagcggagt t 21  
 <210> 153  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 15  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 153  
 tatagcacca ctcccgata g 21  
 20  
 <210> 154  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 25  
 <400> 154  
 gcaccacgag gatcacaaga a 21  
 <210> 155  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 30  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 155  
 ccacccgaga aacctctcca a 21  
 35  
 <210> 156  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 156  
 cagtcttgac gattgattcc t 21  
 <210> 157  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 157

gttcttcagg gctaaatcgg ga 22  
 <210> 158  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 158  
 gttcaagagc tcaacgaga ac 22  
 <210> 159  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 159  
 atacaaactc caacgctcc ag 22  
 <210> 160  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 160  
 ctcttgaaa gcatcagtac ca 22  
 <210> 161  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 161  
 ctagaaagat acccaccxaa tt 22  
 <210> 162  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 162  
 actagaattc aaacaccac cc 22  
 <210> 163  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 163  
 ttctgctca ttcaactct cc 22  
 <210> 164

<211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 164  
 tatgtatgtg cccggtagc tt 22

10

<210> 165  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

15

<400> 165  
 tcatatcaa gccagatcct c 21

<210> 166  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 166  
 tgcacacac atcaccaaga t 21

25

<210> 167  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

30

<400> 167  
 gtactcctgt tcaatgcat a 21

35

<210> 168  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 168  
 attgatacca gcatagagac a 21

40

<210> 169  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 169  
 agcaattctc tctagaatgt a 21

50

<210> 170  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 641 642 T3

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 170  
 catcattcct catcgactta g 21

5 <210> 171  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 171  
 ctctcgttgc cctctccata a 21

15 <210> 172  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

20 <400> 172  
 caacgccccca ggagaaagt c 21

<210> 173  
 <211> 195  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 173  
**cugaagcugg ugaaggugaa gauggacgaa ugaaaucugc gauuggaauu gggacccuuc 60**  
**uucaggaugg cuugggagau acgaucaggg ugucucuaac agaaccacca gaagaggaga 120**  
**uagacccuug cagaagguug gcaaaucuuug gaacaaaagc agcugaaaau cagcaaggag 180**  
**uggcaccuu ugaag 195**

30 <210> 174  
 <211> 195  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

35 <400> 174  
**cuucaaaugg ugccacuccu ugcugaauuu cagcugcuuu uguuccaaga uuugccaacc 60**  
**uucugcaagg gucuaucucc ucuucuggug guucuguuag agacaccucg aucguaucuc 120**  
**ccaagccauc cugaagaagg gucccaauuc caaucgcaga uuucauuogu ccaucuuac 180**  
**cuucaccagc uucag 195**

<210> 175  
 <211> 183  
 <212> ARN

ES 2 641 642 T3

	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 175		
	ucccaucaaa guucccuaca aaauaugugc aguuuccuau cuuccuugcc gccauucaua	60	
	caaacuaugu ugauuguaca agguggcuug gugauuuugu uuuuucuaag aguguugaca	120	
	augagauugu acugugggag ccauuuuga aggagcaauc uccuggagag gguucaguug	180	
5	aca	183	
	<210> 176		
	<211> 183		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 176		
	ugucaacuga acccucucca ggagauugcu ccuucuaau uggcucccac aguacaaucu	60	
	cauugucaac acucuugaa agaacaaaau caccaagcca ccuuguaca ucaacauagu	120	
	uuguaugaau ggcggcaagg aagauaggaa acugcacaau uuuuguaggg aacuuugaug	180	
	gga	183	
	<210> 177		
	<211> 143		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
20	<400> 177		
	uugugcuuaa aacaucgacc agacagacaa uauuuuuucc uguuguugga cuaguugauc	60	
	cugauacgcu gaaaccuggu gauuuaguug gugucaaca agauaguau cuuauccugg	120	
	acacucugcc gucggaauau gau	143	
	<210> 178		
	<211> 143		
	<212> ARN		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 178		
	aucuuuuucc gacggcagag uguccaggau aagauaacua uuuuuuguuga caccaacuaa	60	
	aucaccaggu uucagcguau caggaucaac uaguccaaca acaggaagaa auuuugucug	120	
	ucuggucgau guuuuaagca caa	143	

ES 2 641 642 T3

	<210> 179		
	<211> 159		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 179		
	<b>cgcgucaguu ggugaaguag aucccgcaa ggggauuucacuccgguuc cacgucuggu</b>		<b>60</b>
	<b>ucguauccga gaggauaaau cuccagagga cgccacaucacugagcagg uggcggauau</b>		<b>120</b>
	<b>guacagauuc caagcaaaaca auccacaccg caaaaagag</b>		<b>159</b>
10	<210> 180		
	<211> 159		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
15	<400> 180		
	<b>cucuuuuugc gguguggauu guuugcuuga gaucuguaca uauccgccac cugcucagau</b>		<b>60</b>
	<b>gauguggcgu ccucuggaga uuuauccucu cggauacgaa ccagacgugg aaaccggagu</b>		<b>120</b>
	<b>gaaaucccu ugccgggauc uacuucacca acugcagcg</b>		<b>159</b>
20	<210> 181		
	<211> 159		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 181		
	<b>uaaagauggc ggaaaaaucg acuaugauaa auugaauugac aaauucggcu gucagcgacu</b>		<b>60</b>
	<b>ugauuuuauugc cucauucaga gaaauugagcg caucacugcu cguccugcuc auguauuuu</b>		<b>120</b>
	<b>ucgccgcaac guuuucuuugc cucaccguga uuugaauga</b>		<b>159</b>
25	<210> 182		
	<211> 159		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 182		
	<b>ucauucaaaucacggugagc gaagaaaacg uugcggcgaa gaaauacaug agcaggacga</b>		<b>60</b>
	<b>gcagugaugc gcucaauucu cugaauagc gauaaaucacgucgacac gccgaauuug</b>		<b>120</b>
	<b>ucaaucaauu uaucauaguc gauuuuuuccg ccaucuuua</b>		<b>159</b>
	<210> 183		

ES 2 641 642 T3

	<211> 150		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 183		
	<b>ugaagcugau gcugaaggaa aggauauuga ugcuagugaa guaguucgcc caagggugcc</b>		<b>60</b>
	<b>auuagaagcu ugccuagcua gcuacucagc uccggaggag gugauggacu ucuacagcac</b>		<b>120</b>
	<b>ugcauugaag gcaaaggcaa cugcuacaaa</b>		<b>150</b>
10	<210> 184		
	<211> 150		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 184		
	<b>uuuguagcag uugccuuugc cuucaaugca gugcuquaga aguccaucac cuccuccgga</b>		<b>60</b>
	<b>gcugaguagc uagcuaggca agcuucuaau ggcacccuug ggcgaacuac uucacuagca</b>		<b>120</b>
	<b>ucaauauccu uuccuucagc aucagcuuca</b>		<b>150</b>
15	<210> 185		
	<211> 155		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 185		
	<b>acaccugccc uaacaucucg ggguuuucuc gaagaagauu uuguuaaagu ggccgaguau</b>		<b>60</b>
	<b>uuugaugcug cuguuaagcu ggcucuaaaa aucaaggcug acacaaaagg aacaaaguug</b>		<b>120</b>
	<b>aaggacuucg uugccaccuu gcagucuggu guuuu</b>		<b>155</b>
25	<210> 186		
	<211> 155		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
30	<400> 186		
	<b>aaaacaccag acugcaaggu ggcaacgaag uccuuaacu uuguuccuuu ugugucagcc</b>		<b>60</b>
	<b>uugauuuua gagccagcuu aacagcagca ucaaaaauacu cggccacuuu aacaaaaacu</b>		<b>120</b>
	<b>ucuucgagaa aaccccgaga uguuagggca ggugu</b>		<b>155</b>
35	<210> 187		
	<211> 159		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		



ES 2 641 642 T3

	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 187		
	<b>ugaac<u>uacga</u> agcag<u>gcaaa</u> uuc<u>uccaaaa</u> guaaag<u>gc<u>au</u></u> uggag<u>uuuuu</u> gggaa<u>ugacg</u></b>		<b>60</b>
	<b>ccaaga<u>uuu</u> uaa<u>uauaccu</u> guaga<u>agugu</u> ggagau<u>acua</u> ucugc<u>uaaca</u> aacag<u>gccug</u></b>		<b>120</b>
	<b>agguau<u>caga</u> cacau<u>uguuc</u> acuug<u>ggcgg</u> auc<u>u</u>caag</b>		<b>159</b>
5	<210> 188		
	<211> 159		
	<212> ARN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 188		
	<b>cuugaag<u>auc</u> cgcccaag<u>ug</u> aacaau<u>gugu</u> cugau<u>accuc</u> aggcc<u>uguuu</u> guuagcag<u>au</u></b>		<b>60</b>
	<b>aguauc<u>ucca</u> cacuuc<u>uaca</u> gguau<u>uuag</u> aauuc<u>uuggc</u> gucau<u>ucca</u> aaaac<u>uccaa</u></b>		<b>120</b>
	<b>ugccu<u>uuacu</u> uuuggag<u>aa</u> uugcc<u>ugcuu</u> cguagu<u>uca</u></b>		<b>159</b>
15	<210> 189		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
20	<400> 189		
	tcccatctcc cacatgggtt actg	24	
	<210> 190		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 190		
	cagtaacc <u>ca</u> tgtgggagat ggga	24	
30	<210> 191		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
35	<400> 191		
	ggctgatgaa attcaagtgc ta	22	
	<210> 192		
	<211> 21		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		

	<400> 192 aaactgagct tggaaataat c	21
5	<210> 193 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Construcción sintética	
10	<400> 193 gaacccaaaa ttgtcacttt tt	22
15	<210> 194 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Construcción sintética	
20	<400> 194 atgcacttgt ttatactctt gtca	24
25	<210> 195 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Construcción sintética	
30	<400> 195 atttattagt gttctaaaga a	21
35	<210> 196 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Construcción sintética	
40	<400> 196 tgtagtagct tataagatta gctt	24
45	<210> 197 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Construcción sintética	
50	<400> 197 gttgtccctt ttatgggtct tt	22
	<210> 198 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Construcción sintética	
	<400> 198 cccgtgcaat ttctgggaag c	21

<210> 199  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 199  
 attagtttt tatacacgaa agat 24

10

<210> 200  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

15

<400> 200  
 atcttctgtg tataaaaaac taat 24

20

<210> 201  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 201  
 ttggtggtt ggccactcc gt 22

25

<210> 202  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 202  
 ttgtttgct atttagctgg a 21

35

<210> 203  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

40

<400> 203  
 caatttcag caactcgac tgga 24

<210> 204  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 204  
 tcccaccatt ggctattccg ac 22

50

<210> 205  
 <211> 21  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 205  
 5 ctgtctctct ttttaatttc t 21  
 <210> 206  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 206  
 10 ccactttgca cacatctccc act 24  
 <210> 207  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 207  
 20 gaggatccac gtatagtagt ag 22  
 <210> 208  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 208  
 30 ttaaataaa gaaattatt a 21  
 <210> 209  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 209  
 35 taatacgact cactataggg cttgagtta taacgaagct 40  
 <210> 210  
 <211> 39  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 210  
 45 taatacgact cactataggg cttctaattt tcaaggacg 39  
 <210> 211  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>

<223> Construcción sintética  
 <400> 211  
 agcttctaatttcaaggac gata 24  
 5  
 <210> 212  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 10  
 <400> 212  
 gtcattgtgac tccacttga ttttg 25  
 <210> 213  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 15  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 213  
 ctcaattccg ataaattta gaaat 25  
 20  
 <210> 214  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 25  
 <400> 214  
 cgaagctatt ggaccgacct aattc 26  
 <210> 215  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 215  
 ggaattgagg gctcccaga aattgc 26  
 <210> 216  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 216  
 atgactttt gattggtgaa actaa 25  
 <210> 217  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 50  
 <400> 217

taatagcact cactataggt ggaactccaa cacacaaaaa atttc 45  
 <210> 218  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 218  
 taatagcact cactataggt tgaaaaataa tcataattt a 41  
 10 <210> 219  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Construcción sintética  
 <400> 219  
 gcataatata ttgatccggt at 22  
 <210> 220  
 <211> 24  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 220  
 25 ctgaaagttc atacataggt actc 24  
 <210> 221  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 221  
 ggtactccaa tttcagtat at22  
 <210> 222  
 <211> 24  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 222  
 40 ctgaaaattg gaggacat gtagt 24  
 <210> 223  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 223  
 atgtatgaac tttcagaata ttatacc 27  
 50 <210> 224

ES 2 641 642 T3

	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 224		
	taccggatca atatattatg ct	22	
10	<210> 225		
	<211> 647		
	<212> ADN		
	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>		
	<400> 225		
	ttcaaaatga attttaaatt atataaaaat caatatggac acaagaccgg atatcaatcc		60
	gacccgaaat agttgacttg aatcaacct gatgaccoga atgaacacct ctagttatca		120
	ctaacaaggg tcagattgcg tacatcaaac cctcaaate ctgcttaggt gggagcttgt		180
	caatggctta ggggtaacgg gaatgtgtgt gctatgtaca ttgtgcatct attcttatgc		240
	ttatttatgt tgagttagtt ttttttttgg atcaaatata aagagcttaa cttttgtatt		300
	ttcttgatgt ggtgtagtgg tgatgaagat caggctgaga gaatctaaat tggccaaaat		360
	tctgagagaa caagaagtga gttcagccct tcgtgctgct ggtgttggtg tgattagttg		420
	catcatacag agagatgaag ggcgaactcc gatgaggcat tcattctatt ggtcagcaga		480
	aaaacaatat tatagtgagg agcctttact acgtcatttg gaaccccctc tatctatgta		540
	tctcgagctg gtactagtct ctgaaccgat tgcctttctt ctgctttggt attttgtgtg		600
	atatttcgac ttaagtctaa tttacatcgt tttgtacatt tgttatc		647
15	<210> 226		
	<211> 738		
	<212> ADN		
	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>		
	<400> 226		

ES 2 641 642 T3

ttttgctttt ttactattat ttccttcttt tcaaggattt gagttgttta ttgctgactg	60
cttctatgt attacccata tgtctctgta taggcattac gggagctgta cctacatcta	120
actcctatac aacgtgtgaa tattgcccgg catcctaate gcccacttt tcttgaccac	180
gtattcagca tcacagaaaa ggtttctgat ttattataat tttgtcatt tgtattcact	240
cttcaataaa gtacatccat tatcaatctt tacggagggt gttcacacaa cttcttgttt	300
cattttgcat aattagtttg tggaactaca tggagatcgt gctggttatg atgaccctgc	360
tatagttact ggccttggtg cgatagatgg taggcgttat atgttcattg gtcacaaaa	420
gggaagaaat acgaaggaaa atattgcacg gaatttcggg atgcctactc ctcattggta	480
aatgctttac tataatgttt tactttaatt taattaccta tgttatttag gatgaaaatg	540
aatacttttc ttattactat tacttaggtt cctaatacac aaaaaccgta attattaatg	600
taccctaata gaattaacac atggtaatta agctctccgc tttgtgtaat taatccaatt	660
ttttagagag tcaaatagtt caggtaaac tagagctttt catacccaaa taataaaacc	720
aagggtaaat ttccaaaa	738

<210> 227

<211> 880

<212> ADN

5 <213> *Amaranthus palmeri*

<400> 227



ES 2 641 642 T3

atgtgatcaa ttaaagaaaa agtctaatta tatgagcccg tctcacagtg acggagctat 60  
 catagagccc atgggggtcac gtgcccttcg ggggttttag aaaaaattca aagtatactt 120  
 ttctattaat aagagtaaaa atgtaaaatt aatattaaac tcttttgata ataaatactc 180  
 tctcacttta gtaattttgt cttatttatt tattttatct catgtgttta ataaggtcag 240  
 ttgacttatt ttgttccatt ttcttttatg gtatgccgta tttaaaattt tagcaagtaa 300  
 agataaaaata gttgttaatc ttacaaataa aactctatcg aaatttcac ctagttaa 360  
 tgtcccaaaa aagtcogaac tacaaatcga ccactgtcat cacatggtga gatagtctca 420  
 tataaaacga gttcagttat taaaggaaaa taggaaacac gaaacagtta atttaggcgg 480  
 ggcctatgta ttatccaaat gtgatactcc agtccacatt actcagtcct tccaattgaa 540  
 cagttggctt aatctaccaa gcgcgtggcc ataatgcct ctaacacttt tcaatctctc 600  
 agataactct cacaccactt atcatcacia ttcacaatta ctctaattct ttttattcct 660  
 ttccatgtcg ctaattttct actgattcag gttttattct cagcttttat caattttatt 720  
 tcatgctttt tatgtcaatt tcttgtttcg cattttgtct tccacttget gtctgtttta 780  
 ttaatcaatt ttgtatgatt gttggaataa ttgtatgtat ttttcatgat tttcctctta 840  
 tggaggttca taatgtattg ctagatttgt ttactttcac 880

<210> 228  
 <211> 453  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*

5

<400> 228  
 aatttgagcg ggaaaatttt aatatcatta aatagtcttt gcttttagtat atagaatagt 60  
 taaaattaat agtcaaactt attgtaatag catgcactaa tctataataa tcttatcctg 120  
 aaagctataa taaaattata aaaaaatata tgtgaaaaac taatttgagc gggaaaattt 180  
 taaccaaggg ctaacacgta tcattaaata gtctttactt tagtatatag aatgataatt 240  
 aacgatcata aaacaaaatt gtcactttca gtagcaaact tacaaaatga gcagagtacc 300  
 tcatatcata aaattgcttc tttctcattt gttgtgttgc tctcatttta ggagttcatc 360  
 gtttatatcg tcgtcttacc actcaatcac ttttagattt attagtagca ctctctcaat 420  
 ctacagcagc aatttctaca gttcaacaac etc 453

<210> 229  
 <211> 3953  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*

10

<400> 229

ES 2 641 642 T3

ggaaaattta cctagaataa tccaatttat tctgattttt tctacaaatt ccaacttcaa	60
ggggtatttg cctaaagtaa ttaaacttgg ataccccgat gacctgctat agtagataat	120
ttaccagaaa attaaaaatg aaaattaatt taaaattaga gaaaaatttt gaaatttcat	180
ataaaaaatt ttaaataata aaaaaaatat aaattttttt gaacatttta ttttaatot	240
tcttttttga aaaaataaaa cttagttata gcaagtgate tggtcaccgg gtttactota	300
ggaaaatata cctcaaagtt gagattattc atggttaata aataggtgag attattatag	360
aaaaattacg aataaattgg attattgttg gtaatttttt tttcaaaact atccctagga	420
aggacottat tagtgattct cctctactt tggaggagta tattgtggac ttcccatctt	480
ccttaattgt attgtaactt ttaactattg attccttaaa aaaaagaact tataaaattg	540
tagggttaat aaaatotaag attttatcta atttcacttt gattattcog attttgtatt	600
cacattattt taaatgacat tctgcaata aaaaaaata gtttcattgc attocaattt	660
tgttgactag ggggattaaa gaaagaatag tatcaataat cgtaatgtag caagtagtac	720
aaaagaagta tatttcaata tgcmaaactt tgatctcgtt gtaacttcta atttgtacga	780
tgcggtgtga atgacatact tcaccttttt cattatttta tactggtagt gacatgggat	840
tattattgcg atatttgcag taatgaaaat ttttttggtt gttgctttta caaacaaaaa	900
ttotaccgaa ttttttatta atttaattca acacgttggg gttacccatg atttataggt	960
ctgggtccgc cactgctagc taacattaaa caatttaaca aactcaatac accaacctaa	1020
aaataaaatt tttttggcca taatttttag aatttttagtt tttaaacatt atatttggga	1080
attttttttc cttttatata tataaaataa aaaaaaatcc aaaaaagggg acacacatta	1140
atacacactt gaaagcatcg atgatatcga agaaaaacca gatgggggtgc ccaattatct	1200

ES 2 641 642 T3

tcgtctcctt	cgatattatc	gaattcatta	acaacattat	atcaaaaacc	aaccaaaatta	1260
ccaactttcg	aaaccaatat	tcgccgtatt	tttctctatt	caacaatccc	tacaatggcg	1320
gcattgccag	cttcttcttc	tcctgcaatt	tcggaatcac	ccacttgcaa	tttctctcct	1380
attcaaaaaa	tcactaccac	tcgctttcta	aggtttcatt	cggttttact	cccaagccta	1440
aatttggcct	tttctccaag	gtttattttc	tatctctttt	ttaattgggt	aatcaattgg	1500
attgttgaat	ttttcagggg	ttaacgggat	aatatttgtg	ggttttttcg	agtacattct	1560
gggtttgtag	tattggattt	ggcattgctt	ttaatttttg	agattggggt	ttttggggtt	1620
tatttggttc	ttgtgattca	aggttattga	tttgctgcat	taaactgtat	ttatggaatg	1680
atgtcaatta	actgttacat	tacattgctt	tatggttttc	atcatgctga	ttagtgatta	1740
ctgtgtttga	atctcttgct	tctctatgta	ctatttaatc	tgatacaaca	agtacaacct	1800
agaaaacagg	ttaaagggaa	atctataagc	ttagtaaatt	aacacttgaa	agaagctaata	1860
gacggagaga	ggggcttttt	tggagaaggc	agttttcata	ttattgctca	gttctctagt	1920
gcagctttac	ttcacttaga	cactcttaag	tagaggctcat	agggtttcag	aatagatcca	1980
aagacccgat	atttaccgga	ctttgtaaac	aacttaacct	gacttcaaaa	tgaatttaca	2040
atcatataaa	agcaatatgg	acttaaaccg	attttgaacc	gaccttgacc	ggttgatccg	2100
aatgaatgcc	tctactctta	agcatgtcaa	ctgtaatatg	aatagaatt	ataatataaa	2160
ctaagttcat	gttttcttca	actacaaatg	aaattttatg	acccaaataa	tgtgtgaata	2220
ccccagcaa	taggttgaat	ggcatttagt	tcagttgatt	ttagcagacc	acatctgccc	2280
tcatattcca	ttgttcagtt	tagttgttag	tagctgtaca	taatagacta	attaagttgt	2340
cattttgatc	catgttatgg	ttgtctggga	taaacggatt	ggaattgtat	aataaaaagt	2400
tgggttagtt	tattttgctc	taggaggggt	tatgtcatat	gtgcaactctg	ttggcaacct	2460
gacaatgcaa	aacattttca	tacttggtag	gttgttgctg	gttttctgcc	cttctgattt	2520
tgtaactggt	gatgaatgtg	taaaaatata	ctacatgatc	atagctagt	aggcttctct	2580
cacctagtaa	agaaattttt	ctaacacgag	aagttcaaaa	catattccca	ttaccattat	2640
ccaacatcag	tacccgagtc	caagtaacat	agggtgtccc	tttatgatag	tataagaatt	2700
ggtgcatgaa	aaacgcgtga	ttgtagcgag	gatagtaggc	gggagaggta	caggatttga	2760
aaattttgaa	ttgctaaaac	gctatcagga	tcttgttttt	cttactttga	tgttgctttt	2820
ttgaaatttg	atccaaattg	ttaaattatt	gagactaatt	cctgttgatc	ctgtcgtgaa	2880
ctttgtagaa	tctttcaggc	cgcattctca	cagtgaaggc	tcaattaaac	aaggtgagtc	2940
tttttttgtc	ttaactctta	tgcagttcat	tatctcttct	actgatgaga	aaaccactat	3000
ttggcctaata	tctaatttcc	ttctaggttg	ctttggatgg	ttcaaatcat	gctccatcac	3060

ES 2 641 642 T3

cttcgcacga aaaatctggg ctaccagccc aagaaaagaa gaacgatgag ccgtctagtg 3120  
 aatctttctcc tgcagcatca gtgtctgaag aacgagtctc cgaattcttg agccaagttg 3180  
 ccggtcttgt caagtatgta acattcttta ttttcattct tccacacact cgcaatttgg 3240  
 ataacgagat gtcttttagag acgtctgggg aacaagggag aaatgagtct agaggttgct 3300  
 agagagaacg agataaatac taatatatat gaatatttca taatccacat taaaaaata 3360  
 caattgaatt tgcattatgg tgaactacca aagaatcgaa ttttttttaa tactccatgt 3420  
 tttgtggtct agacttgtgg attctagaga cattgtagag ttgcaattaa aacaactgga 3480  
 ctgtgagata ttgatccgca agcaggaagc tattcctcaa ccacaaattc ctaatcctac 3540  
 acatgtcggt gcaatgcaac caccaccacc tgetgtagcg tctgccccag ctcccgtctc 3600  
 ttcaccagcc actcctcgtc ctgctgtacc tgccccagcg cctgctgcca cgtcagctaa 3660  
 gccatcaactt ccacctctca agagccctat gtcaggcaca ttctaccgta gtccagctcc 3720  
 tggcgagccg cctttcgtga aggtaagtgt atacccttt ttagtgttg ttttctgtg 3780  
 ttatatcaat ttttgcattt tgtgaagctg aaaataaatc tttcattttc cataggttgg 3840  
 agataaagtt aagaaaggac aagtcatatg cattatcgag gctatgaagt tgatgaatga 3900  
 aatcgaggta cgtatggtat tgctttaaac ttcatgcctt aggccgtgaa gtt 3953

<210> 230  
 <211> 595  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*

5

<400> 230  
 acaaaaagca caaattcaat aatatactct ttaagtttgt ttatcttcta attagttcgg 60  
 ttaaaaagggt tcccacttt cttctcogac tctcacaatt atcttcccct attcattttt 120  
 cttccaccct ctctaattggc ggctgtttcc ttcaatatca atggtggaag gattggaact 180  
 ttatgttcaa gacacgaatt cgtttgtggg tttgtaagaa aatttcattt tagaactcat 240  
 acttctatat ttgaaaaaca tatgccaaaa acttcaaggt ttaaagcaat ggaagtttct 300  
 gcaaatgcaa cagtaaatac agttcctggt tcagctcatt ctaggtaatt ttatttctcg 360  
 aaaatttccg atttacaatt aaattaatct tgtttttag gtaatgaatt gcagaagaaa 420  
 tagatggatt cttatttgtt tattggatt tgtttataaa tttttgtta tattagtttc 480  
 tgaattgtga ttattctgat tgtatgtcaa ggtttaggtt gttattaata aatgtaaatt 540  
 ggattgattg aagttgcaat aaggtgatgg cgtgatgctg attggtgtaa atttt 595

<210> 231  
 <211> 667  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*

10

<400> 231

ES 2 641 642 T3

caacaatgag aatttagaat ccatatcaat cttgatattc aagggtattt aagtaattaa 60  
 agaacaacca ttgttaagogy cctocactat cttcttcoctt ctcattctcc attctcgcctt 120  
 agctttcctc tcgcactaat tacctocatt tgcaacottt caagctttca acaatggcgt 180  
 ccactttctc aaaccaccca ttttctctt ttactaaacc taacaaaatc cctaactctgc 240  
 aatcatccat ttaogctatc cctttgtcca attctcttaa acccacttct tcttcttcaa 300  
 tcctcgcgcy ccccttcaa atctcatcat cttcttctca atcacctaaa cctaaacctc 360  
 cttcgcgtac tataactcaa tcaccttcat ctctcaocga tgataaaacc tcttcttttg 420  
 tttcogcatt tagcoctgaa gaaccagaa aaggttgcyga tgttctcgtt gaagctcttg 480  
 aacgtgaagg tgttaccgat gtttttgctt acctggtggy agcatccatg gaaatccatc 540  
 aagctcttac tcgcttctaat atcattagaa atgttcttcc tcgacatgaa caaggtgggy 600  
 ttttgcgtgc tgaaggctac gctcgtgcta ctggacgcgt tggagtttgt attgccactt 660  
 ctggtcc 667

<210> 232  
 <211> 2415  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*

5

<400> 232  
 atttggataa ctttttctt tgattcgaat cggattattt ttaatacagt attatgaact 60  
 gatttaatga aagtggagga agtttcaatt tttaaagttg taggtgtaat gttttctcat 120  
 tttggatatg aaagtggagg aagtttcaat ttcgaatcat gtttgccagt tgattcaatg 180  
 aatgctcttg gaaatgacca agagttcaag gcttcttggt ataaaacatt tcaattttga 240  
 tctaagaatg aactatthag aacttaaagt aattaaatta ttagttataa cttataaaaa 300  
 aattcaattt taaccttaaa tttataaatt atgaccttaa aaagatcaag tattgaacgc 360  
 atatttagaa aaattataat tcggcttctc agtctcatat tgagacggtc tcgtccaaga 420  
 caagttgat catttatata atcaaatata attatgagtg tattcatgta ggtttcaact 480  
 ttaaagccta ggtgaaagat atgttgtagc atctttgtga aagtcagcct ataacttggc 540  
 tctaaaattt tgaagcataa ccatatagtc cctcgaattc attcaagttg tccaatttac 600  
 tttttatac ttgccgagac aacatttaaa ccttaatat ttctaattaa tcttaattaa 660  
 aaattatgaa aatttgatat taataatctt tgtattgaaa cgaatttaac aagatctcac 720  
 atgactatgt tttaacttat agattaaaaa aaaatacaaa ttaagagtga taagtgaata 780  
 gtgccccaaa acaaatggga caacttagat gaattggagg taatattagg tagcaagtga 840  
 tcactttaac atcaaaattg atcacttata ggttcaaatt gaaactttta ctttaattga 900  
 tatgtttaa tactacttta aattgaaatt gatattttta aggtcaaaat tgaaaccttt 960

ES 2 641 642 T3

aagattataa ttgaaaattg gcagaagaaa aacaaagaga aagaatataa gacacgcaaa 1020  
ttgtaccgat ctactcttat ttcaatttga gacggtctcg cccaagacta gatgttcggt 1080  
catcctacac caaccccaaa aaattcaaca acaaagtctt ataatgattc cctctaattct 1140  
actacagtct acaccaaccc actttctctt tgcccaccaa aactttgggt ttgtaagaac 1200  
taagccctct tctttccctt ctctctctct taaaagcctg aaaaatccac ctaacttttt 1260  
ttaaagccaa caaacaacgc caaattcaga gaaagaataa tggctcaagc tactaccatc 1320  
aacaatgggtg tccaaactgg tcaattgcac catactttac ccaaatccca gttacccaaa 1380  
tcttcaaaaa ctcttaattt tggatcaaac ttgagaattt ctccaaagtt catgtcttta 1440  
accaataaaa aagagttggt gggcaatcat tcaattgttc ccaagattca agcttctggt 1500  
gctgctgcag ctgagaaacc ttcatctgtc ccagaaattg tgttacaacc catcaaagag 1560  
atctctggta ctgttcaatt gcctgggtca aagtctttat ccaatcgaat ccttctttta 1620  
gctgctttgt ctgaggtatt tatttctcaa ctgogaaaac aatctctatt tgatattgga 1680  
atttatatta catactccat cttggtgtaa ttgcattagt agatacttat gttttgacct 1740  
ttgttcattt gtttgttgaa ttggtagtgt tgagaatttg aatgtaatta tttgtttttc 1800  
catgtgaatt taatctgatt aaatccactt cttatttatg ttaagttgca atgatgtttg 1860  
ccaaatgggt atcattgaag gataagtttg cctacttttg accctcccaa ctctcgggtg 1920  
gtagagccat tttatggtat tgggggaaat tagaaagatt tatttgtttt gcctttcgaa 1980  
atagtagcgt tcgtgattct gatttgggtg tctttataga tatgatatat gggttattca 2040  
tgtaatgtgt aggtttatgc attatgttgg atgcatgtct ggtgttattg ctgtaaattg 2100  
atgaatgttg ttatttggag acattttttc attcattttt tcccttttta attggaactg 2160  
gaagagggaa agttattggg agtaattaa aggttgtgag ttcgatacac tgcacaaag 2220  
acgaagaact tgacatagat gttgaaggct aatccttatc actgcttgaa ttcaatatgt 2280  
atctgaaaat tttaccctc tatatgcac tgtttttgct aataaagtgt ttttgacta 2340  
tcatgttttg tgatgcttaa gagggtgata ttactgagat aatggaaat atcaaaataa 2400  
catctattgt gaagt 2415

<210> 233  
<211> 3049  
<212> ADN  
<213> *Amaranthus palmeri*  
<400> 233

5

ES 2 641 642 T3

caagcttcaa ttatogtttt caaataagt atttcaaagt ctataaagat attgtataag	60
ttttagttca aatttaataa gttttttttt tttttttttt tttttttttg aaaatccaaa	120
ttgaataagt taatarntaa attatgacat ataattatga catataattt gaccatgata	180

ES 2 641 642 T3

ttttacaatc taacttaatt ttgaacttat tatttctaata attcaattat cgttctaaaa 240  
 ataagtattt aaattgtata gatataattgt ataacattta gttcaaattt aattattgat 300  
 agttttattg actatttatt tggkgtttga aattcatcca tagaatgata gaataacacc 360  
 attttttata taacttcggt ctaaaatfff gaagcataac catatactcc ctccaattca 420  
 tccaagttgt ccaatttact ttttcatact tgccgaggca acatttaaac ccttaatatt 480  
 tctaattaat gttaattaaa aattatgaaa atttgatatt aataatcctt gtattgaaac 540  
 aaatctaaca agatcccaca tgactatggt ttaacttata gattaagaat aaaatacaaa 600  
 ttaagagtaa taagtgaata gtgtcccaa acaaatagga caacttggat gaattggagg 660  
 tagtattagg tagcaagtga tcactttaac atcaaaattg atcagttaca ggttcaaatt 720  
 gaaactttta ctttaattga tatgtttaaa tactacttta aattgaaatt gatattctta 780  
 aggtcaaaat tgaaaacttt aagattataa ttgaaaaatg ccagaagat gaaaaaacag 840  
 agagaaagca tgtaagacac gcaaattgaa ccagtctact cttgtttcaa ttgagacgg 900  
 tctcgcccaa gaccagatgt tcagtcatcc tacaccaacc ccaaaaaatt caacaacaaa 960  
 ctcttataat gattccctct aatctactag agtctacacc aaccacttt ctctttgcc 1020  
 accaaaactt tggtttggtg agaactaagc cctcttcttt ccttctctc tcttaaaagc 1080  
 ctaaaaccca ccaacttttt cagccaagaa acaacgcgaa attcagagga agaataatgg 1140  
 ctcaagctac taccatcaac aatggtgtcc atactggtca attgcacat actttacca 1200  
 aaaccagtt acccaaactc tcaaaaactc ttaattttgg atcaaactg agaatttctc 1260  
 caaagttcat gtctttaacc aataaaagag ttggtgggca atcatcaatt gtcccaaga 1320  
 ttcaagcttc tgttgctgct gcagctgaga aaccttcac tgtcccagaa attgtgttac 1380  
 aaccatcaa agagatctct ggtactgtc aattgcctgg gtcaaagtct ttatccaatc 1440  
 gaatccttct tttagctgct ttgtctgagg gcacaacagt ggtcgacaac ttgctgtata 1500  
 gtgatgatat tctttatatg ttggacgctc tcagaactct tggtttaaaa gtggaggatg 1560  
 atagtacagc caaaagggca gtcgtagagg gttgtggtgg tctgtttcct gttggtaaag 1620  
 atggaaagga agagattcaa cttttccttg gtaatgcagg aacagcgatg cgccattga 1680  
 cagctgcggt tgccgttget ggaggaaatt caagttatgt gcttgatgga gtaccaagaa 1740  
 tgagggagcg cccattggg gatctggtag caggtctaaa gcaacttgg tccagatgtag 1800  
 attgttttct tggcacaat tgccctcctg ttccgggtcaa tgctaaagga ggccttcag 1860  
 ggggcaaggt caagctctct ggatcgggta gtagccaata ttaactgca cttctcatgg 1920  
 ctactccttt gggctctgga gacgtggaga ttgagatagt tgataaattg atttctgtac 1980  
 cgtatgttga aatgacaata aagttgatgg aacgctttgg agtatccgta gaacatagtg 2040



ES 2 641 642 T3

atagttggga caggttctac attogaggtg gtcagaaata caaatctoct ggaaaggcat 2100  
 atggtgaggg tgatgcttca agtgctagct acttctagc cggagccgcc gtcactggtg 2160  
 ggactgtcac tgtcaaggtt tgtggaacaa gcagtttaca ggtataatgt taacccttac 2220  
 ccttcacatt gttctgctaa attctagagg accctttcaa ttctgggtgg gataagcacg 2280  
 gcaatttgac cgcaaaaaa ttgcaaaatt attctgctga tagaacatct cgagatgaga 2340  
 tcatattgag ttttggcgtc aacataaacc taatcaaata atgaaaaata caaacatcat 2400  
 atggtttctt ttgtctttat gactagacac tctctattat tocttgattg ggatottatt 2460  
 tgaaattgct gtgtagccta cacctcatgt tcagattttg ttctgtatacc agacttttct 2520  
 tgattgggat cttatttgtc ccttgattt tgcatagggg gatgtaaaat ttgcogaagt 2580  
 tcttgagaag atgggttgca aggtcacctg gacagagaat agtgtaactg ttactggacc 2640  
 acccagggat tcatctggaa agaaacatct gcgtgctatc gacgtcaaca tgaacaaaat 2700  
 gccagatggt gctatgactc ttgcagttgt tgccttgat gcagatgggc ccaccgccat 2760  
 cagagatgtg gctagctgga gagtgaagga aaccgaacgg atgattgcca tttgcacaga 2820  
 actgagaaaag cttggggcaa cagttgagga aggatctgat tactgtgtga tcaactccgcc 2880  
 tgaaaagcta aaccocaccg ccattgaaac ttatgaogat cacogaatgg ccatggcatt 2940  
 ctctcttgct gcctgtgcag atgttcccgt cactatcctt gatccgggat gcaccogtaa 3000  
 aacctcccg gactactttg atgttttaga aaagttccgc aagcattga 3049

<210> 234

<211> 1113

<212> ADN

<213> *Amaranthus palmeri*

5

<400> 234

ES 2 641 642 T3

```

tcttaatttg tattttatta ttaatctata agttaaaca tagtcaagtg agatcttggt      60
tgattcgtct ctatgcaagg attttcatat caacttttca taatttttga ttatacacia      120
ttacaaatat taacgaacga ataagtgcac taaaaagagt gcaaaaagca aatgggacac      180
ttgtgttgaa taggagggag tatacattaa gatgaatcta acgagatctc acatggatat      240
aatttgcctt ctatatatgt ctaaaaaatc ttgatcaaat ttctctttcc aaaatagaat      300
attctaaatg ggaagaacat taagaaacgg agggagtact tataagttaa gatagttggg      360
ggtatttagg taaaaaaatc tatgccaaaa gtagaaagtg gacaattaga gtgactttac      420
taaataagga aagtggacat ttaaaatgaa tgggagggag catattaact ttattttcaa      480
agtgtgaaac ataatcatat ttaggtaaaa aaattatcaa ttaacgtca aaattgatca      540
caaataggtt aaaattgaaa ttttttatgt taattgatct attgttcaact ttaaattgaa      600
attgatatcc ttaaggta aaattaatac ctctaaaatt aaaattatta aaggcccaga      660

aaataaaaaa aaaagaagac aggctattag taaaattatt aagtatgtaa ggttgataca      720
cgcgcgaatt gagccggccc acttttagtt tcaatttgaa acagtctcaa tcaagaccaa      780
ttatttatta ttttattatt ttattgtttt aagctcaatg ggttggactt gataaattat      840
attttgagga gacgggctat tagtaaaatt aatagttgga atcttttttg atatactata      900
aaaagaggta tctggtggag ccttaaactc ggcgaattga agtcctcaat acacatctcg      960
ctcttcttat tctctttcat ctatttctc ctttgatcaa actacgcat gtctctctta     1020
aatgatctcg ttaaccttaa tctctctgaa actaccgata agattatcgc tgaatacata     1080
tgtaataca acaatccttc ctctttttca ttt                                     1113

```

5 <210> 235  
 <211> 882  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222>(451)..(459)  
 <223>n es a, c, g o t  
 10 <400> 235

ES 2 641 642 T3

aaaaaaccgt cttatttgta gaaaataaaa aactaaaaag tagtatcaac ttttagacta 60  
 gtcataagtg agtggcatca aacttgttct ataaaaaggg aagagttcct caacttgaga 120  
 ttcatatfff ttgtgatttc taaatagaag aacatactca tcttccactt ctcttattca 180  
 tcaaatttta tttgttcccc aaaaaaacat gtctcttctt acagatctca tcaatcttaa 240  
 tctttctgac tccactgaga agatcattgc tgaatacata tggtcagttt tcatcccttt 300  
 tttttacctt taatcccact ttttgttttt acccaccatt tttttcatct attttctctt 360  
 aaagatttta actttttact tttttgtgta tataacattc attttttcaa ttgggtaggt 420  
 tagaaaattt ctataaataa ataaataaat nnnnnnnnt accttaatcc cactttttgt 480  
 ttctaccac catttttttc atcaattttt cttaaagatt ttaacttttt ttaacttttt 540  
 cttggttttt gtgtatatac caatcattta ttttactag tgtaggtaa aaaatatcta 600  
 aaaataaata aaatagaata aaaatgtaat cactagatta acccatgaat tatttccctt 660  
 gtttttactc aaacttttta cccttgtaa aaaaataatg atataaataa atttttgagg 720  
 gtttgttaaa cccatatgta atctatatcg aaaaaattag atagcgggtt ttgttggtga 780  
 caaactaaat aacaaattta ggaataaact tttgaggggt tattgaaaaa ataaccata 840  
 tttaatctat atcgaaaaaa tgatagcgag ctttgtatag at 882

<210> 236

<211> 1083

<212> ADN

<213> *Amaranthus palmeri*

5

<400> 236

ES 2 641 642 T3

cgtcgaagta gaagacgcgg aagctgcttt taacatcagc gtttcgcatg gggctattcc 60  
 ctgtgtttct cctattcaat tggaaaacgg tgctgtttta tctgaggttc atttatatgg 120  
 ggatgttggtg cttcgggatg taagctacgg aatgaatgt ggggatgtgt tttttcttc 180  
 tgggtttgag gaaatgccgg aggaatcacc gtttagagga cttgattttg gcattcgaag 240  
 gttggatcat gctgtagga atgtccctga gttggctcct gcaattgctt atttgaagaa 300  
 gtttactggg tttcatgagt ttgctgagtt tacagctgaa gatgttggga cgagtgaag 360  
 tggattgaat tcagccgat tggcaaacia tgatgaaatg gtgttgtttc cgatgaatga 420  
 acctgtgat gggacaaaaa ggaagagcca aattcaaact tatttggagc ataatgaag 480  
 ggctggtgta cagcatttgg ctttgatgag tgaagacata ttttggactt taaggagat 540  
 gaggaagaga agtgttcttg gtgggtttga gtttatgcog tgcgcgctc cgacttatta 600  
 ccggaatttg aggaacagag ctgctgatgt attgagtgag gagcagatga aggagtgtga 660  
 agagttgggg attttgggtg ataaagatga tcagggcact ttgcttcaaa tcttcaccaa 720  
 acctattgga gacaggtaa ttttaactct gctttcaatt gcttttgctt gatggattga 780  
 ctagcaaatt tgatcgcatt ttgttgotta tatgacttga tgatacttcc tctgtttcga 840  
 aatactcgct acattcgcta cttttgttt tgtgcactat tcatcgttca agcttatttt 900  
 acatattgag actaatgtgt aactaaaaat atagtcaagt gggatcttgt ttgaatcgtc 960  
 taatggcata ctttcatcat attaaatfff tataatfff agattagtgt agtttaagat 1020  
 attaatgctc aaaattgtgc attggattgc gtaaaaaagt gaaatgtagc aagtattatg 1080  
 aaa 1083

<210> 237  
 <211> 788  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*

5

<400> 237  
 aaaocaaag gaaataagtt ataggtagga aaaattgtta ttgaagttaa thtagtaaac 60  
 tagtaactta aactgtgata ccccgattt agcttaaaaa gagattgata gactactcat 120  
 atcaacaagg tgcactctct tttctagga gccatttgc taagaactct acagttaagc 180  
 gtgcttggtg gggagcaatc ttaggatggg tgacctcctg ggaagtttc ctgggtgctc 240  
 acgggtgagg ccaaagtgcg ttaaaaagac ttgtgttggc ctgtggggct tgtctacagt 300  
 ctccatgagt agtcaccggc ggtacgagag gccgggggtgt tacataaaca gactcaaagg 360  
 cgctaagcca agtagccaat agcaacatgt gtggcctgag gacagtcaca aaaacacaca 420  
 atttcttatt tttactctct tttatctctt ttaggcttta gccatcaaca ataaaacaac 480

ES 2 641 642 T3

atgataaagc aattcattta ctgctaaatt ccaacaatth ggccctttt tctgttctt	540
tcagtttcac ataccctctt atcaatctat atccaaaact atttcatttt ccaaactctt	600
ttaaacccaa aaatcaaaac ttttgattga agaacaaact ttgggggttt tggaaaatga	660
gtcattttgg atatgcttgt gctactcaat ccacatcaag atatgttctt ttaggaaatt	720
caaataacco cacttcaatt tcatctattg gaagtgattt tttgggtcat tctgtgagaa	780
atttcagt	788

<210> 238

<211> 2631

<212> ADN

<213> *Amaranthus palmeri*

<400> 238

5

ES 2 641 642 T3

tggtacctac cctgtttaca ttttcaattt cccccttttt tctctactac tcctacttta	60
ttgattctta tccatgtgtg ttctatggga attgacatta attgttcagg tgtgtatgct	120
ggtgatcctt ctaagttgag tatgaaagct gcatttggaa aggtctggac cttagagcaa	180
aaggggtgga gtatcattgc cggtaacctc aaaactattc aggaaaggaa gaataatcct	240
ccaccgcctc gagaccgcgc cgtaatcacc attactcatt gctttccttc accttgtatc	300
ttaccttaat atacatgtat ttaattgata atgtcacatt gcctcatttg cagccgcctt	360
cctaaacctc agggccagac tgttggatcc tttaggaaag ggctcattat gttacctacc	420
gccattgctg ctaggtatct tttgactctc aaatcttaa tatttctcat cttctccttc	480
tgctaatact agtatgttta ccatcttttt attttttttag gcttggcagt aaagtcaaac	540
tatcgtggac actttctaata attgataagt cgctcaatgg tgaatacaat ctcaactatc	600
aaacaccoga tggaccggtt tctgttagga ccaaagcggg tgtcatgact gtcccttcat	660
acattgcaag tagcctgctt cgtccgctct cagtgagtat cattctttcc ttcatttctt	720
ttcgtttatt gttgtccaat gtcttgtaa acaccagttt ggccctgtgc tctggaatta	780
tggctacaat gtaactgat tcaggcactg tgggagatgc ctaagtttct aaaacctctg	840
cgcataatgt ttgtttggat gttaggaatt gcattgaaaa attgcttttg tgatgttgat	900
gtaataacca attacaagtg tgttcttcaa cttctgcaat accttgttcg agtgagcttg	960
aggggggtta gattagtgtc caatgtgaaa ctagcaaatg aactccaagc gctgggatag	1020
gtccttggga tggagcccct gataccaag acagtattca aaccctctaa gtagagtgag	1080
agatcaagga aagaaactgg gtggttcctc aaatcgtaaa aatgaatac agtgtcatga	1140
ttgctaactc tatcaciaat cgtaaaaaat gaattatggt cgattttgga ctatttttgg	1200
gtcattttga gtgaatctcg aacttaaaaa gcgagtcttc tagcagttct tgttacagcg	1260
gggcatacat aggtaggaat ttggtttttt actatttgag ccttttgact gttgtggccg	1320

ES 2 641 642 T3

gtaatatgga atagtctagc acttctgcgt gtgtacaact agtatttatt gtaattatgt 1380  
gatcgcaact aactctcaga taaaacctta agcactaaca ttttgttttg gttgaaggaa 1440  
tcaggaggaa agaaaattga gggatttggt ggtatataga ttcctttggt tggataacaa 1500  
aattggagtg gagagatttg gaaggaagaa ttttataggg attagtccc attacactta 1560  
tgttgattac aaaatttctc caaaagtgga aagattttga gtgaaaatgt tttttatttc 1620  
tcttctctc ctttctttc cctcttaaac aaacaaggaa agttaatctt atcattccgt 1680  
accttccct tctgttctt ttttctctc caaaattctt atcctaact agtggtattg 1740  
tcactgtctt atgaacgaga attcttttct tctaataact gcttgtgttg cacagtcaat 1800  
gatttagcta gatcatctt ggtagctac tcaaatatt tacataaat actttagtaa 1860  
ataaatacca ataggtcttg tcaagaagta gtttcaatgc tataagttt aaccaatcct 1920  
caaaatttac acctggaga tatctgcgga taagaactag taactgtagc agctgtaact 1980  
gttgcaatca gttttatggt ttgccttgca aatcaactt tggatgttgt ttgccttaca 2040  
atttgttact attacgtgaa gtttagtggt cgccctcac attgtactt ggtttttgtt 2100  
ttccttgcaa ttgctctt gaagtataaa gtgctgagtg ctgagtgctg agtgctgacc 2160  
ttcctgctc aggatgttg tgcagattct ctttctcaat ttactatcc accagtcgca 2220  
gcagtgtccc tttcttatcc caaagaagca attagaccag aatgcttgat cgatggagaa 2280  
ctaaaaggat tcgggcaatt gcatcctcgc agccagggtg tggaaacctt ggtatatgc 2340  
tcccattcaa ctatatctca atttttatga gtattttct ttctctgaat tattcaattt 2400  
ggtgacgta aattttgatt gtactcgaca ggaacaattt atagttcatc tcttttccct 2460  
ggtcgagcac cacctggtag gacctgatc ttgagctaca ttggaggtgc tacaatggt 2520  
ggcatattac aaaaggcaag tcatttatac aattatatct gttgtatcct caaataagtg 2580  
ggtatcaatc ctgacgacat gcttgccttg atcgatgcag agtgaagatg a 2631

<210> 239

<211> 23

<212> ADN

5 <213> *Euphorbia heterophylla*

<400> 239

agtttacagg gagatgtaa gtt 23

<210> 240

<211> 23

10 <212> ADN

<213> *Euphorbia heterophylla*

<400> 240

agtttcagg gagatgtaa att 23

<210> 241

<211> 23

15 <212> ADN

	<213> <i>Ambrosia trifida</i>	
	<400> 241	
	agtttacagg gggatgtaa gtt	23
5	<210> 242	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Abutilon theophrasti</i>	
	<400> 242	
	agtttcagg gtgatgtaa att	23
10	<210> 243	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Xanthium strumarium</i>	
	<400> 243	
15	agtttcagg gtgatgtgaa att	23
	<210> 244	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Ipomoea hederacea</i>	
20	<400> 244	
	agtttacagg gggatgttaa gtt	23
	<210> 245	
	<211> 23	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Chenopodium album</i>	
	<400> 245	
	agtttacagg gtgatgtaa att	23
	<210> 246	
	<211> 23	
	<212> ADN	
30	<213> <i>Digitaria sanguinalis</i>	
	<400> 246	
	agtttcagg gtgatgtgaa att	23
	<210> 247	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Senna obtusifolia</i>	
	<400> 247	
	agtttacagg gagatgtaa att	23
40	<210> 248	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Amaranthus rudis/tuberculatus</i>	
	<400> 248	
45	agtttacagg gtgatgtaa att	23
	<210> 249	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>	
50	<400> 249	
	agtttacagg gtgatgtaa att	23
	<210> 250	



ES 2 641 642 T3

<211> 23  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*  
 <400> 250  
 5 agtttacagg gtgatgtaaa att 23  
 <210> 251  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> *Euphorbia heterophylla*  
 10 <400> 251  
 tcgatgtgaa catgaacaaa atgccagatg tcgctatgac attggctgtg gttg 54  
 <210> 252  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 15 <213> *Euphorbia heterophylla*  
 <400> 252  
 tcgatgtgaa tatgaacaaa atgccagatg ttgctatgac attagctgtg gttgc 55  
 <210> 253  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 20 <213> *Ambrosia trifida*  
 <400> 253  
 tcgatgttaa catgaacaaa atgccagatg ttgcatgac gcttcagtc gttgc 55  
 <210> 254  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 25 <213> *Abutilon theophrasti*  
 <400> 254  
 ttgatgtcaa catgaacaaa atgccagatg ttgcatgac tctcgctgtt gttgc 55  
 <210> 255  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 30 <213> *Xanthium strumarium*  
 <400> 255  
 35 ttgatgtcaa catgaacaaa atgcctgatg tcgcaatgac tcttgctgtg gttgc 55  
 <210> 256  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> *Ipomoea hederacea*  
 40 <400> 256  
 ttgatgtcaa catgaacaaa atgccagatg ttgcatgac tcttgctgta gttgc 55  
 <210> 257  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 45 <213> *Chenopodium album*  
 <400> 257  
 ttgatgtcaa catgaacaaa atgccagatg tcgcaatgac tcttgctgtt gttgc 55  
 <210> 258  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 50 <213> *Digitaria sanguinalis*  
 <400> 258

ttgacgtcaa catgaacaaa atgccgatg tcgcaatgac tcttgctgtg gttgc 55  
 <210> 259  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 5 <213> *Senna obtusifolia*  
 <400> 259  
 ttgatgtcaa catgaacaag atgccagatg ttgcatgac gcttgctgta gttgc 55  
 <210> 260  
 <211> 55  
 10 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus rudis/tuberculatus*  
 <400> 260  
 tcgacgtcaa catgaataaa atgccagatg ttgctatgac tcttgagtt gttgc 55  
 <210> 261  
 <211> 55  
 15 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*  
 <400> 261  
 tcgacgtcaa catgaacaaa atgccagatg ttgctatgac tcttgagtt gttgc 55  
 20 <210> 262  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> *Amaranthus palmeri*  
 <400> 262  
 25 tcgacgtcaa catgaacaaa atgccagatg ttgctatgac tcttgagtt gttgc 55  
 <210> 263  
 <211> 55  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222>(2)..(2)  
 35 <223>n es a, c, g o t  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222>(5)..(5)  
 <223>n es a, c, g o t  
 40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222>(32)..(32)  
 <223>n es a, c, g o t  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222>(35)..(35)  
 <223>n es a, c, g o t  
 45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222>(41)..(41)  
 50 <223>n es a, c, g o t  
 <220>  
 <221> misc\_feature

<222>(47)..(47)  
 <223>n es a, c, g o t  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222>(50)..(50)  
 <223>n es a, c, g o t  
  
 <400> 263  
 tngangcaa catgaacaaa atgccagatg tngcnatgac ncttgcngrn gttgc 55  
  
 <210> 264  
 10 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 15 <400> 264  
 aacaugaaca aaaugccaga u 21  
  
 <210> 265  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 265  
 aucuggcauu uuguucaugu u 21  
  
 25 <210> 266  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 30 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 266  
 aacaugaaca aaaugccaga ug 22  
  
 <210> 267  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 267  
 40 caucuggcau uuuguucaug uu 22  
  
 <210> 268  
 <211> 24  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 45 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 268  
 caacaugaac aaaaugccag augu 24  
  
 <210> 269  
 50 <211> 24  
 <212> ARN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 269  
 5 acaucuggca uuuuguucau guug 24  
 <210> 270  
 <211> 35  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 270  
 10 ucgacgucaa caugaacaaa augccagaug uugcu 35  
 <210> 271  
 <211> 35  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 271  
 20 agcaacaucu ggcauuuugu ucauguugac gucga 35  
 <210> 272  
 <211> 45  
 <212> ARN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 272  
 ucgacgucaa caugaacaaa augccagaug uugcuaugac ucuug 45  
 30 <210> 273  
 <211> 45  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 273  
 caagagucáu agcaacaucu ggcauuuugu ucauguugac gucga 45  
 <210> 274  
 <211> 55  
 40 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 274  
 45 ucgacgucaa caugaacaaa augccagaug uugcuaugac ucuugcaguu guugc 55  
 <210> 275  
 <211> 55  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> Construcción sintética

	<223> Construcción sintética	
	<400> 275	
	gcaacaacug caagaguc <u>au</u> agcaaca <u>ucu</u> ggcauuu <u>ugu</u> ucauguugac gu <u>ca</u>	55
5	<210> 276 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
10	<400> 276	
	taatacgact cactataggg ctttattgaa ttagctatg taatc	45
	<210> 277 <211> 41 <212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 277	
	taatacgact cactataggg tttatcaacc aaatgtgcag c	41
20	<210> 278 <211> 49 <212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
25	<400> 278	
	taatacgact cactataggg ttgtctgtac ataattgtga gatttgtgg	49
	<210> 279 <211> 21 <212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 279	
35	ctgtgatcat catatgtatc a	21
	<210> 280 <211> 21 <212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 280	
	ccttaactct ccagctagca a	21
45	<210> 281 <211> 21 <212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
50	<400> 281	

cagcccgcaa atgtttcatt c21

5 <210> 282  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 282  
 gccgtcaatg gccgcattgc t 21

10 <210> 283  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 283  
 tccttcctc agaaaggga g 21

20 <210> 284  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

25 <400> 284  
 ttgcctcatg ctgctaact g 21

<210> 285  
 <211> 789  
 <212> ADN  
 <213> *Nicotiana benthamiana*

30 <400> 285

ES 2 641 642 T3

cttatatgtg cttaagccta acgtgcaccc ggccccttaa ccccagcagt tttcaatcta 60  
 cctaccgtct ctaccatfff cttctagttg gtgaaaattt ctaactttga gaaaacaagc 120  
 caaagttfff gtttctaaga acgcaaaatg agtgaaaattt tttgcagcaa tggcacagat 180  
 tagcagcatg aggcaagggg tacagacccc taatcttaat tcctatfff ctaaaaccca 240  
 aaaggttcct cttttttcgc attctatcct ctttgatca aagaaaataa cccaaaattc 300  
 agcaaaatct ttgtgggtgt gtaagaaaga ttcagttttg aggggtggcaa agtcaccttt 360  
 taggattttg gcatcagtgg ccactgcaca gaagcccaac gagattgtgc tgcaacccat 420  
 caaagatata tcaggcactg ttaaattgcc tggttctaaa tccctttcca accgtattct 480  
 ccttcttgct gccctttctg agggaaggac tgttggtgac aatttactga gtagtgatga 540  
 cattcattac atgcttggtg cgttgaaaac acttgactt catgtagaag atgacaatga 600  
 aaaccaacga gcaattgtgg aaggttgtgg tgggcagttt cctgtcggcg agaagtctga 660  
 ggaagaaatc caactattcc ttggaaatgc aggaacagca atgcggccat tgacggcagc 720  
 agttactgta gctggaggac attcaagata tgtacttgat ggagttccta ggatgagaga 780  
 gagaccgat 789

<210> 286

<211> 799

<212> ADN

<213> *Nicotiana benthamiana*

5

<400> 286

ES 2 641 642 T3

cactgacggt ggattagagg taggctcctt atatgtgctt aagcctaacg tgcagccggc 60  
 ccccaacccc agcagttttc aatctaccta ccgtctctac cattttctta tagtagttga 120  
 aaatttctaa ctttgagaaa acaagccaaa gttttgtttc taagaacaca aagggagtga 180  
 aattttttgc agcaatggca cagattagca gcatgaggca agggatacag acccctaate 240  
 ttaattccta ttttctaaa acccaaaagg ttctctttt ttgcattct atcttcattg 300  
 gatcaaagaa aataacccaa aattcagcaa aatctttgtg ggtgtgtaag aaagattcag 360  
 ttttgagggt ggcaaagtca ctttttagga tttgtgcctc agtggccact gcacagaagc 420  
 ctaacgagat tgtgctgcaa cctatcaaag atatatcagg cactgttaaa ttacctggtt 480  
 ctaaatccct ttccaatcgt attctccttc ttgctgcctt ttctgagga aggactgttg 540  
 ttgacaattt actgagtagt gatgacattc attacatgct tggtgattg aaaacacttg 600  
 gacttcatgt agaagatgac aatgaaaacc aacgagcaat cgtagaagg tgtgggtggc 660  
 agtttctgt cggcaagaag tctgaggaag aatccaact attccttga aatgcaggaa 720  
 cagcaatgog gccattgacg gcagcagtta ctgtagctgg tggacattct agatatgtac 780  
 ttgatggagt tcctaggat 799

<210> 287

<211> 845

<212> ADN

<213> *Nicotiana benthamiana*

5

<400> 287



ES 2 641 642 T3

aaattcttgg ttcgaggagg tcagaagtac aagtctcctg gaaaagcata tgttgaagga 60  
gatgcctcaa gtgctagcta ctttttggcg ggtgcagctg tcacaggtgg aactgtcact 120  
gttgaagggt gtggaacaag cagtttacag ggggatgta agtttgctga ggtcctcgaa 180  
aagatggggg cagaagttac atggacagag aacagtgtca cggttaaagg acctccaagg 240  
aactcttctg gaatgaaaca tttgcgggct gttgacgta acatgaacaa aatgccagat 300  
gttgccatga ctcttgctgt agttgcactt tttgctgata gtcctactgc cataagagat 360  
gttgctagct ggagagttaa ggaaactgag cggatgattg ccatatgcac agaacttagg 420  
aagttgggtg caacagttgt agaagggcca gactactgca taatcactcc acctgaaaag 480  
ttaaagtag cggaaattga tacatatgat gatcacagaa tggccatggc tttctctctt 540  
gcggcttgtg ctgatgttcc agtcaccatt aaggaccccg gttgtactcg caaaaccttc 600  
cccaactact ttgacgttct ccagcagtat tccaagcatt aaaccacttt ccattaagaa 660  
ttttgaaaaa gagagacttt gacaacaatg gtgtcatacc ggaagagaaa agctttgatc 720  
caagctttca actccttttc atttgtcatg tgatgatcat tgtatttggt gaagttgagc 780  
tgcttttctt ttgtccagaa gacatgtatg gatactatta ctatatagtt aaggtgaact 840  
cagca 845

5 <210> 288  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Construcción sintética

<400> 288  
ccacatggtc cagtatctgc c 21

10 <210> 289  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Construcción sintética

<400> 289  
caagcaagga accatccat t 21

20 <210> 290  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Construcción sintética

25 <400> 290  
ggccacacct gcatgcattg c 21

<210> 291  
<211> 21

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 5 <400> 291  
 gtgttcacgg tagacaaatc c 21  
  
 <210> 292  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 292  
 tgactgcac ttgacgcacg t 21  
  
 15 <210> 293  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 293  
 aactgatgca tgcactga c 21  
  
 <210> 294  
 <211> 21  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 294  
 30 caaatcagga aggtatgaga g 21  
  
 <210> 295  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 35 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 295  
 tgcaagggt ttgttcctg g 21  
  
 <210> 296  
 <211> 543  
 <212> ADN  
 <213> *Nicotiana benthamiana*  
  
 <400> 296

ES 2 641 642 T3

gcaatggctt cctcagttct ttcoctcagca gcagttgcc aacgcagcaa tgttgctcaa 60  
gctaacatgg ttgcaccttt cacaggtctt aagtctgctg cctcattccc tgtttcaaga 120  
aagcaaaaacc ttgacatcac ttccattgcc agcaacggcg gaagagtgca atgcatgcag 180  
gtgtggccac caattaacat gaagaagtat gagactctct cataccttcc cgatttgagc 240  
caggagcaat tgctctcoga aattgagtac cttttgaaga atggatgggt tccttgcttg 300  
gaattcgaga ctgagaaagg atttgtctac cgtgaacacc acaagtcacc aggatactat 360  
gatggcagat actggaccat gtggaagcta cctatgttcg gatgcactga tgccacccaa 420  
gtgttggctg aggtgggaga ggcgaagaag gaatacccac aggcctgggt ccgtatcatt 480  
ggatttgaca acgtgcgtca agtgcagtgc atcagtttca ttgcctcaa gcctgacggc 540  
tac 543

<210> 297

<211> 543

<212> ADN

5 <213> *Nicotiana benthamiana*

<400> 297

acaatggctt cctcagttct ttcoctcagca gcagttgcc aacgcagcaa tgttgctcaa 60  
gctaacatgg ttgcaccttt cactggctctt aagtcagctg cctttttccc tgtttcaagg 120  
aagcaaaaacc ttgacatcac ttccattgcc agcaacggcg gaagagtgca atgcatgcag 180  
gtgtggccac caattaacaa gaagaagtac gagactctct cataccttcc tgatctgagc 240  
gtggagcaat tgcttagcga aattgagtac ctcttgaaaa atggatgggt tccttgcttg 300  
gaattcgaga ctgagcgcgg atttgtctac cgtgaacacc acaagtcacc gggatactat 360  
gacggcagat actggaccat gtggaagttg cctatgttcg gatgcactga tgccacccaa 420  
gtgttggccg aggtggaaga ggcgaagaag gcatacccac aggcctggat ccgtattatt 480  
ggattcgaca acgtgcgtca agtgcagtgc atcagtttca ttgcctaaa gccagaaggc 540  
tac 543

<210> 298

<211> 486

<212> ADN

10 <213> *Nicotiana benthamiana*

<400> 298

ES 2 641 642 T3

caagccaaca tggttgcacc cttcactggc ctcaagtcog cctcctcctt cctgttacc 60  
 aggaacaaaa accttgacat tacctccatt gctagcaatg gtggaagagt tcaatgcatg 120  
 caggtgtggc caccaattaa catgaagaag tacgagacac tctcatacct tectgatttg 180  
 agccaggagc aattgcttag tgaagttgag taccttttga aaaatggatg ggttccttgc 240  
 ttggaattcg agactgagcg tggattcgtc taccgtgaac accacaactc accaggatac 300  
 tacgatggca gatactggac catgtggaag ttgccatgt tcgggtgcac tgatgccact 360  
 caggtgttgg ctgaggtcga ggaggcaaaag aaggcttacc cacaagcctg ggttagaatc 420  
 attggattcg acaacgtcog tcaagtgcaa tgcacagtt ttatcgctc caagccagaa 480  
 ggctac 486

<210> 299  
 <211> 537  
 <212> ADN  
 <213> *Nicotiana benthamiana*

5

<400> 299  
 ggctcagtta tgtcctcagc tgccgctggt tccaccggcg ccaatgctgt tcaagccagc 60  
 atggctgcac ccttcaactgg cctcaaggcc gctcctcctt tccgggttc caggaaacaa 120  
 aaocttgaca ttacttccat tgctagaaat ggtggaagag tccaatgcat gcaggtgtgg 180  
 ccgccaatta acaagaagaa gtacgagaca ctctcatacc ttctgattt gagcgtggag 240  
 caattgctta gcgaaattga gtaccttttg aaaaatggat gggttccttg cttggaattc 300  
 gagactgagc atggattcgt ctaccgtgaa caccaccact caccaggata ctacgatggc 360  
 agatactgga cgatgtgga gttgccatg ttcgggtgca ccgatgccac tcaggtcttg 420  
 gctgaggtag aggaggccaa gaaggcttac ccacaagcct gggtcagaat cattggattc 480  
 gacaacgtcc gtcaagtgca atgcatcagt ttcacogcct acaagccoga aggctat 537

<210> 300  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 300  
 ggaggcaaaa tacgagcctc a 21

15

<210> 301  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 301  
 cactaatctt aatacacaac t 21

<210> 302  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 302  
 tatgggtcat tagcataggc attat 25  
 10 <210> 303  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 15 <400> 303  
 tctcaagaat atcacgctcc c 21  
 <210> 304  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 304  
 cccttgggga cgctggcagg tcac 24  
 25 <210> 305  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Construcción sintética  
 <400> 305  
 taatacgact cactataggg ggagagagct agatcttttg 40  
 <210> 306  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 306  
 40 taatacgact cactataggc acagtatttc ttctccaac c 41  
 <210> 307  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 307  
 ttgctcatct taaatacatg t 21  
 50 <210> 308  
 <211> 24  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 308  
 5 tcatcttaaa tacatgttt gtca 24  
 <210> 309  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 309  
 ttatcttcag ggatacatta gc 22  
 <210> 310  
 15 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 20 <400> 310  
 aatactgctt gctcatctta aata 24  
 <210> 311  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 311  
 gacaattcca agttcagttt c 21  
 30 <210> 312  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> Construcción sintética  
 <400> 312  
 ccgttttaga tcaccataaa gaga 24  
 <210> 313  
 <211> 21  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 313  
 45 ttgtctggta atatcacaat c 21  
 <210> 314  
 <211> 2937  
 <212> ADN  
 <213> *Nicotiana benthamiana*  
 50 <400> 314

ES 2 641 642 T3

atggtgagga agaggagaac tgagttacct ggttctggtg agagctctgg gtctcaagaa	60
actggcggac agggtcgtgg ccagcatcca cagcagctgc accaagctac ctcccagact	120
ccatatcaaa ctgcaatgac tactcagcca ataccttatg caagaccaac tgaaacatcc	180
tccgaagctg gttcctcatc tcagccacct gagcaggcag ctctacaagt gacacaacag	240
ttccagcaac ttgctttgca acaagaagcg gctacaacgc aagcagttcc acctgcatca	300
agcaaattac taaggtttcc cctgcgtcca ggaagggga gcaatggtat gagatgcata	360
gtcaaagcca atcaacttctt cgcagagctg cctgacaaaag acttgcacca gtatgatgtc	420
acaatttctc cagaggtgtc atcacgtggc gtcaaccgtg ctgtcatggc gcaactggtg	480
aagctgtacc aagaatctca tcttgggaag agacttccag catatgatgg aaggaaaagt	540
ctatacactg cagggcccct tccatttggt caaaaagact tcaaaataac tcttattgat	600
gatgaggatg ggcctggtgg tgctagaagg gaaagggaaat ttaaagttgt gatcaaattg	660
gctgcccgtg ctgatcttca tcaactggga atgttttttag aagggaaca ggctgatgca	720
cctcaagagg cgcttcaagt tctggatatt gttctgcgtg agttgccaac atctaggttt	780
tgtcctgtgg gtcgttcttt ctattcccgt gatttagggc gaaagcaacc attgggtgaa	840

ES 2 641 642 T3

ggtttagaaa gttggcgtgg gttctatcaa agcattcgcc ccacacaaat gggcttatca 900  
 ctgaacatcg atatgtcttc cactgcattc attgagccac tgccagtcac tgattttgtg 960  
 acacagcttc tgaaccgaga tgtgccatct agaccactgt ctgatgctgg ccgtgtaaag 1020  
 ataaaaaaag ctctgagagg tgtgaagggtg gaggttactc atcgtggaaa tatgaggagg 1080  
 aagtaccgca tttcggggtt aacatctcaa gcaacaagag agttgacctt ccctgttgat 1140  
 gaaaaatggta cagtgaaatc tgtaattgag tattttcgag aaacatatgg gtttghtaatt 1200  
 cagcactctc agtggccttg tctacaagtt ggaaatcagc agagacctaa ttacttgcca 1260  
 atggaagtct gcaagattgt ggagggacaa aggtactcaa agcgttgaa tgagagacag 1320  
 attactgcac ttctgaaagt gacctgccag cgtccccaag ggagggagcg tgatattctt 1380  
 gagaccgtac atcataatgc ctatgctaata gaccatatac ccaaggagtt tggattaag 1440  
 attagtgaca agttggcaca agttgaggct cgtattttgc ctccacctcg gcttaaatat 1500  
 catgataacg gtcgagaaaa ggactgcctg ccacaagttg gccaatggaa tatgatgaat 1560  
 aagaaaatgg taaatggagg gacggtgaac aattggatct gcataaactt ctctcgcaat 1620  
 gtgcaagata gtgttgctca tgggttttgc tctgagcttg cacaaatgtg ccagatatct 1680  
 ggcataaatt tcaatccaaa tcctgttctg ccacctcga gtgcacgccc tgatcaggtc 1740  
 gaaagagtat tgaaaactcg atttcatgat gctatgacta agttgcagct gcatgggaga 1800  
 gagcttgatt tgctagttgt catcttgcca gacaataatg gatctcttta tgggtgatctg 1860  
 aagcgcattt gtgagactga actaggagtc gtctcacagt gctgtttgac aaaacatgta 1920  
 ttttaagatga gcaaacagta tctagccaat gtagcgtga aatcaatgt gaagggtgga 1980  
 gggagaaaca ctgtgcttgt tgatgcaata tcgaggcgaa ttctcttctg cagcgaccgg 2040  
 cctaccatca tttttggtgc agatgtcacc caccctcacc ctggggagga ctctagcca 2100  
 tccattgccg cgggtggttc ttctcaagat tggcctgaga ttacaaagta tgctggtcta 2160  
 gtttctgctc aagcccatag gcaagagctt attcaggatc tgtacacgac taggcaagat 2220  
 cctgttaagg ggacagttgc tgggtggaatg attaaggact tacttatatc cttccgaaga 2280  
 gctactggac aaaagcccca gagaataatt ttctataggg atggtgtag tgaaggacaa 2340  
 ttttatcaag tgcttctgtt cgaacttgat gcgatccgca aagcatgtgc gtctttggag 2400  
 ccaaattatc agccccagt cacatttgtt gtggttcaga aacgacatca cacaaggctt 2460  
 tttgccaata accaccgtga cagaaatgca gttgacagga gcgggaacat tatacctggt 2520  
 actgtttag attcaaagat atgccaccog acagagtttg atttctatct ttgtagccat 2580  
 gccggcatac agggtagag ccgtccagct cactaccatg ttctatggga cgagaacaaa 2640  
 ttcacagccg atgcgctgca gtctttgacc aacaacctct gctatacata tgcaagggtc 2700  
 acgcgttccg tctccatcgt tccccctgca tattatgcac atttggcage tttccgtgct 2760



ES 2 641 642 T3

cgatTTtata tggagccgga gacatctgac ggtggttcag taacaagtgg ggctgctggt 2820  
ggcagagggg gtggtgcagg agctgctgga aggaacaccc gagccccaag tgctggtgct 2880  
gctgtagac ctcttcctgc gctcaaggat aatgtgaaga gggttatggt ctactgc 2937

<210> 315

<211> 3274

<212> ADN

5 <213> *Nicotiana benthamiana*

<400> 315

ES 2 641 642 T3

cacctatcac	tctctttctc	tctctacaaa	catatcgtgc	cgtttctctc	tggcctctc	60
ttcgtgtttt	agggcacogt	ggtggttggt	atccaggcgg	cggttttgag	ttattaccat	120
ggtgcggaag	aagaggactg	atgttcctgg	tggtgctgag	agttttgagt	cccatgaaac	180
tggaggggca	cgaggtggtg	cccaacgccc	atcacagcag	cagcaacatc	agcatcagca	240
agggcgagga	agaggctggg	cacctcagca	tggaggacat	ggtggccgtg	gtggtggggg	300
agctccacgt	ggtggaatgg	cccctcaaca	atcctatggt	ggacctcctg	aatactacca	360
acagggcagg	ggaactcaac	agtatcaacg	aggtggagga	caaccccagc	gccgtggtgg	420
catggggggc	cgtggggcac	ggccaccagt	acccgagctg	caccaagcaa	cccagactcc	480
acatcagcct	gtaccataty	gaagaccatc	agaaacatac	tcagaggctg	gttcctcgtc	540
tcagccacct	gaaccaacga	cacagcaagt	gactcagcaa	ttccagcaac	ttggtgtgca	600
gccagaagca	gctgcaacc	aagcaataca	accagcatcg	agcaagtcga	tgaggtttcc	660
actccggcca	ggaaagggtg	gtactggtat	tagatgcata	gttaaggcca	atcacttctt	720
tgccgagtta	cctgacaaaag	atctgcacca	gtatgatggt	tcaattactc	ctgaggtegc	780
ctctcgggg	gtcaaccggg	ccgtcatgga	gcagctgggt	aagctttata	gagaatccca	840
tcttggaag	aggcttccag	cctatgacgg	aagaaaaagt	ctatacacag	cagggccct	900
cccttttgtt	caaaaggatt	ttaaaatcac	tctaattgat	gatgatgatg	gacctggtgg	960
tgctaggagg	gaaagagagt	ttaaagttgt	gatcaagctg	gcggctcgtg	ctgatcttca	1020
tcacttgggg	atgttcttac	aaggagaca	ggctgatgca	ccgcaagaag	cacttcaggt	1080
gctggatatt	gtgctacgtg	agttgccaac	atctaggtat	tgtcctgtgg	gccgctcttt	1140
ctattcccct	catttaggac	gaagacaacc	actgggtgaa	ggtttagaga	gctggcgtgg	1200
cttctatcaa	agtattcgtc	ctacacagat	gggattatcc	ctgaatattg	atatgtcttc	1260
cacggctttc	attgagccac	tgccgattat	tgacttcgtg	agccagcttc	tgaatcggga	1320
tatctcttct	agaccactgt	ctgatgctga	ccgcgttaag	ataaagaagg	cactgagagg	1380
tgtaaagggtg	ggggtcactc	atcgtggaaa	tatgcggagg	aagtatcgca	tttctggctt	1440
gacgtctcaa	gcaacaagag	agttgacttt	tcctgtcgat	gaaaggggta	cgatgaaagc	1500

ES 2 641 642 T3

tgttgtggaa tattttcggg aaacctatgg ttttgtcatt cggcataccc agtggccttg 1560  
 tcttcaagtt ggaaatacgc agaggccaaa ttacttgcca atggaagtat gtaagattgt 1620  
 agagggacag agatactcaa agcgcttgaa tgagaggcag ataacagcac ttctaaaagt 1680  
 gacctgccaa cgtcctcaag agagagaacg tgatattctt cagactgttc atcacaatgc 1740  
 ttatgctgat gacccatatg cgaaggagtt tggattaaag atcagtgagg agcttgctca 1800  
 agttgaggct cgcgttttgc ctgcaccttg gcttaaatac catgatacag gtcgagagaa 1860  
 agactgtctg ccacaagtgg gccagtgga tatgatgaat aagaaaatgg ttaatggagg 1920  
 aacagtgaac aactggatct gtgtaaactt ttctcgcaat gtgcaagaca cagttgcacg 1980  
 tggattttgt tccgagcttg cacaaatgtg catgatatcc ggaatgaact tcaatcccaa 2040  
 tctgttcta ccaccagtga gtgctcgccc tgatcaagtt gagagagtct tgaaaactcg 2100  
 atttcacgat gctatgacaa agttgcagcc aaatgggaga gagctagatc ttttgattgt 2160  
 gatattacca gacaataacg gctctcttta tggatgacta aaacggattt gtgaaactga 2220  
 acttggaaat gtctcacaat gctgcttgac aaaacatgta ttttaagatga gcaagcagta 2280  
 tttagcta atgtatccctga agataaatgt gaaggttgga ggaagaaata ctgtgctggt 2340  
 tgatgcgctc tctagacgaa ttccccttgt cagcgaccgc ccaactatca tttttggtgc 2400  
 agatgtcacc catccccacc ctggggagga ttctagcccg tcaattgctg cgggtggttc 2460  
 ttctcaagat tggcctgaaa ttacaaagta tgctggtttg gtttctgctc aagcgcatag 2520  
 gcaagagctt atacaagatc tgtacaagac ttggcaagat ccagttagag gacctgtgac 2580  
 tgggtggcatg ataaaggaat tacttatttc cttccgtcga gcaactggac agaagccgca 2640  
 gagaattata ttctacagag atggtgttag tgaaggacaa ttttaccaag ttcttctttt 2700  
 tgaacttgat gcaatccgca aggcattgtgc atctttagaa cccaactatc agcccccggt 2760  
 tacgtttggt gtgggtccaga aacggcatca tactaggttg tttgccaata accaccacga 2820  
 cagaaatgca gttgatcgga gtgggaacat tttgcctggt accgttgtag attcaaagat 2880  
 atgccaccct actgaatttg atttctatct ctgtagccat gccggcatac agggtagtag 2940  
 ccgcccagct cattatcatg ttctgtggga tgagaacaat tttactgctg acgccctgca 3000  
 gtctttgact aacaatcttt gctatacata tgctaggtgt actcgttctg tctccattgt 3060  
 tccaccagca tattatgcac atttggcagc tttccgtgct cggttttaca tggagccaga 3120  
 gacatctgat aatggatcag tcacaagcgc agctgcttca aacagaggag gtttaggagc 3180  
 tatgggaagg agcacgcgag caccaggtgc tgggtgctgct gtaaggcccc ttctgctct 3240  
 caaggagaat gttaagaggg ttatgtttta ttgt 3274

<210> 316

## ES 2 641 642 T3

<211> 3907  
<212> ADN  
<213> *Zea mays*  
<400> 316

ES 2 641 642 T3

acctacttcc cctcgcgcc tctcatggtc tctctcgcgc ccagatctgc tactagacgg 60  
 caccgctgca gcgcgtcgtg tcgcgggggt tggcggcagg cagcgagagc ttgccgttcc 120  
 tctctctcag ttgtcaggtc ctaggetcac ctcaccgget cccagccccg ttctatttct 180  
 tcctccccga ccccgctcag gtggcagtc agtccacgcc accaaccgcg aggcgaacca 240  
 aaccaacca ctctcccaa cccgcgcgc ccaggccgcc cgcctacca accatcggcg 300  
 tcggcaatgg cggccatggc gaccaaggcc gccgcgggca ccgtgtcgtc ggacctcgcc 360  
 gcgcgcggcg cggcggcagc ggcggcggcg gtgcaggcgg gtgccgagga gatcgtgctg 420  
 cagcccatca aggagatctc cggcacctgc aagctgccgg ggtccaagtc gctttccaac 480  
 cggatcctcc tgctcgcgc cctgtccgag gtgagcgatt ttggtgcttg ctgcgctgcc 540  
 ctgtctcact gctacctaaa tgttttgcc gtcgaatacc atggattctc ggtgtaatcc 600  
 atctcacgat cagatgcacc gcatgtcga tgcctagctc tctctaattt gtctagtagt 660  
 ttgtatacgg attaataattg ataaatcgg accgcaaaag ctaggtgtaa ataaacacta 720  
 gaaaattgga tgttccccta tcggcctgta ctccgctact cgttcttgtg atggcatgct 780  
 gtctcttctt ggtgtttggg gaacaacctt atgaaatttg ggcgcaaaga actcgcctc 840  
 aagggttgat cttatgccat cgtcatgata aacagtggag cacggacgat ctttacggt 900  
 gtttttaaca aactttgtca gaaaactagc atcattaact tcttaatgac gatttcacaa 960  
 caaaaaagg taacctcgt actaacataa caaatactt gttgcttatt aattatatgt 1020  
 tttttaatct ttgatcaggg gacaacagtg gttgataacc tgttgaacag tgaggatgct 1080  
 cactacatgc tcggggcctt gaggactctt ggtctctctg tcgaagcggc caaagctgcc 1140  
 aaaagagctg tagttgttg ctgtggtgga aagttcccag ttgaggattc taaagaggaa 1200  
 gtgcagctct tcttggggaa tgctggaact gcaatgcggc cattgacagc agctgttact 1260  
 gctgctggg gaaatgcaac gtatgtttcc tctctttctc tctacaatac ttgctggagt 1320  
 tagtatgaaa cccatgggta tgtctagtgg cttatggtgt attggttttt gaacttcagt 1380  
 tacgtgcttg atggagtacc aagaatgagg gagagacca ttggcgactt ggttgtcgga 1440  
 ttgaagcagc ttgggtcaga tgttgattgt ttccttgcca ctgactgcc acctgttcgt 1500  
 gtcaatggaa tcggagggt acctggtggc aaggtagct actaagggcc acatgttaca 1560  
 ttcttctgta aatggtacaa ctattgtcga gcttttgcac ttgtaaggaa agcattgatt 1620  
 gatctgaatt tgatgctaca ccacaaaata tcctacaaat ggtcatccct aactagcaaa 1680  
 caatgaagta atacttgcca tgtgtttatc aaattaattt ccatcttctg gggcattgcc 1740

ES 2 641 642 T3

tgttttctag tctaatagca tttgttttta gcattaatta gctcttaca ttgttatggt 1800  
 ctacaggtca agctgtctgg ctccatcagc agtcagtact tgagtgcctt gctgatggct 1860  
 gctcctttgg ctcttgggga tgtggagatt gaaatcattg ataaattaat ctccattccc 1920  
 tacgtogaaa tgacattgag attgatggag cgttttggtg tgaaagcaga gcattctgat 1980  
 agctgggaca gattctacat taagggaggt caaaaataca agtaagctct gtaatgtatt 2040  
 tcactacttt gatgccaatg tttcagtttt cagttttcca aacagtcgca tcaatatttg 2100  
 aatagatgca ctgtagaaaa aaaatcattg cagggaaaaa ctagtactga gtattttgac 2160  
 tgtaaattat tttaccagtc ggaatatagt cagtctattg gagtcaagag cgtgaaccga 2220  
 aatagccagt taattatccc attatacaga ggacaacat gtatactatt gaaacttggg 2280  
 ttataagaga atctaggtag ctggactcgt agctgcttgg catggatacc ttcttatctt 2340  
 taggaaaaga cacttgattt ttttttctg tggcctcta tgatgtgtga acctgcttct 2400  
 ctattgcttt agaaggatat atctatgtcg ttatgcaaca tgcttccctt agccatttgt 2460  
 actgaaatca gtttcataag ttcgttagtg gttccctaaa cgaaacctg tttttctttg 2520  
 caatcaacag gtcccctaaa aatgcctatg ttgaagggtga tgcctcaagc gcaagctatt 2580  
 tcttggtgg tgctgcaatt actggagggg ctgtgactgt ggaagggtgt ggcaccacca 2640  
 gtttgaggt aaagatttct tggctggtgc tacaataact gcttttctt ttttggtttc 2700  
 agcattgttc tcagagtcac taaataacat tatcatctgc aaatgtcaaa tagacatact 2760  
 taggtgaatt catgtaaccg tttccttaca aatttgctga aacctcaggg tgatgtgaag 2820  
 tttgctgagg tactggagat gatgggagcg aaggttacat ggaccgagac tagcgtaact 2880  
 gttactggcc caccgcgga gccatttggg aggaaacacc tcaaggcgat tgatgtcaac 2940  
 atgaacaaga tgcctgatgt cgccatgact cttgctgtgg ttgccctctt tgccgatggc 3000  
 ccgacagcca tcagagacgg taaaacattc tcagccctac aacctgcct cttctacatc 3060  
 actacttgac aagactaaaa actattggct cgttggcagt ggcttccctg agagtaaagg 3120  
 agaccgagag gatggttgcg atccggacgg agctaaccaa ggtaaggcta catacttcac 3180  
 atgtctcacg tcgtctttcc atagctcgt gcctcttagc ggcttgctg cggtcgctcc 3240  
 atcctcggtt gctgtctgtg tttccacag ctgggagcat ctggtgagga agggccggac 3300  
 tactgcatca tcacgccgcc ggagaagctg aacgtgacgg cgatcgacac gtacgacgac 3360  
 cacaggatgg ccattggcctt ctcccttgcc gcctgtgccc aggtccccgt gaccatccgg 3420  
 gaccctgggt gcaccggaa gaccttccc gactacttcg atgtgctgag cactttcgtc 3480  
 aagaattaat aaagcgtgcg atactaccac gcagcttgat tgaagtgata ggcttgtgct 3540  
 gaggaaatac atttcttttg ttctgttttt tctctttcac gggattaagt tttgagtctg 3600  
 taacgttagt tgtttgtagc aagtttctat ttoggatctt aagtttgtgc actgtaagcc 3660

ES 2 641 642 T3

aaatttcatt tcaagagtgg ttcgttggaa taataagaat aataaattac gtttcagtgg 3720  
ctgtcaagcc tgctgctacg ttttaggaga tggcattaga cattcatcat caacaacaat 3780  
aaaacctttt agcctcaaac aataatagtg aagttatttt ttagtcctaa acaagttgca 3840  
ttaggatata gttaaaacac aaaagaagct aaagttaggg ttagacatg tggatattgt 3900  
tttccat 3907

<210> 317  
<211> 2149  
<212> ADN  
<213> *Zea mays*  
<400> 317

5

ES 2 641 642 T3

acctacttcc ccoctcgcccc tctcatggtc tctctcgcgc ccagatctgc tactagacgg 60  
 caccgctgca gogcgtcgtg tcgcgggggt tggtaggcagg cagcgagagc ttgocgttcc 120  
 tctctctcag ttgtcaggtc ctaggctcac ctcacoggct ccagccccgc ttctatttct 180  
 tctccccga ccccggtgcag gtggcagtc agtccacgcc accaaccgcg aggcgaacca 240  
 aaccaacca ctctcccca ccccgcgcgcc ccaggccgcc cgcctacca accatcggcg 300  
 tcggcaatgg cggccatggc gaccaaggcc gccgcgggca ccgtgtcgtt ggacctcgcc 360  
 gcgcgcgcgg cggcggcagc ggcggcggcg gtgcaggcgg gtgccgagga gatcgtgctg 420  
 cagcccatca aggagatctc cggcacogtc aagctgcggg ggtccaagtc gctttccaac 480  
 cggatcctcc tgctcgcgc cctgtccgag gggacaacag tggttgataa cctgttgaac 540  
 agtgaggatg tccactacat gctcggggcc ttgaggactc ttggtctctc tgtcgaagcg 600  
 gacaaagctg ccaaaagagc tgtagttggt ggctgtggtg gaaagttccc agttgaggat 660  
 tctaaagagg aagtgcagct cttcttgggg aatgctgga ctgcaatgcg gccattgaca 720  
 gcagctgta ctgctgctgg tggaaatgca acttacgtgc ttgatggagt accaagaatg 780  
 agggagagac ccattggcga cttggttgtc ggattgaagc agcttgggtc agatgttgat 840  
 tgtttccttg gcactgactg cccacctgtt cgtgtcaatg gaatcggagg gctacctggt 900  
 ggcaaggcca agctgtctgg ctccatcagc agtcagtact tgagtgcctt gctgatggct 960  
 gctcctttgg ctcttgggga tgtggagatt gaaatcattg ataaattaat ctccattccc 1020  
 tacgtcgaaa tgacattgag attgatggag cgttttgggt tgaagcaga gcattctgat 1080  
 agctgggaca gattctacat taaggagggt caaaaataca agtcccctaa aatgcctat 1140  
 gttgaagggt atgcctcaag cgcgaagctat ttcttggctg gtgctgcaat tactggaggg 1200  
 actgtgactg tggaaaggtt tggcaccacc agtttgcagg gtgatgtgaa gtttgctgag 1260  
 gtactggaga tgatgggagc gaaggttaca tggaccgaga ctagcgtaac tgttactggc 1320  
 ccaccgcggg agccatttgg gaggaacac ctcaaggcga ttgatgtcaa catgaacaag 1380



ES 2 641 642 T3

atgcctgatg tgcctatgac tcttgctgtg gttgccctct ttgccgatgg cccgacagcc 1440  
atcagagacg tggcttcctg gagagtaaag gagaccgaga ggatggttgc gatccggacg 1500  
gagctaacca agctgggagc atctgttgag gaagggcccg actactgcat catcacgccc 1560  
ccggagaagc tgaacgtgac ggcgatcgac acgtacgacg accacaggat ggccatggcc 1620  
ttctcccttg ccgcctgtgc cgaggtcccc gtgaccatcc gggaccctgg gtgcacccgg 1680  
aagaccttcc ccgactactt cgatgtgctg agcactttcg tcaagaatta ataaagcgtg 1740  
cgatactacc acgcagcttg attgaagtga taggcttgtg ctgaggaaat acatttcttt 1800  
tgttctgttt tttctctttc acgggattaa gttttgagtc tgtaacgta gttgtttgta 1860  
gcaagtttct atttcggatc ttaagtttgt gcaactgtaag ccaaatttca tttcaagagt 1920  
ggttcggttg aataataaga ataataaatt acgtttcagt ggctgtcaag cctgctgcta 1980  
cgtttttagga gatggcatta gacattcatc atcaacaaca ataaaacctt ttagcctcaa 2040  
acaataatag tgaagttatt ttttagtctt aaacaagttg cattaggata tagttaaaac 2100  
acaaaagaag ctaaagttag ggtttagaca tgtggatatt gttttccat 2149

5 <210> 318  
<211> 240  
<212> ADN  
<213> *Zea mays*  
<400> 318

tacttgagtg ccttgctgat ggctgctcct ttggctcttg gggatgtgga gattgaaatc 60  
attgataaat taatctccat tccgtacgtc gaaatgacat tgagattgat ggagcgtttt 120  
ggtgtgaaag cagagcattc tgatagctgg gacagattct acattaaggg aggtcaaaaa 180  
tacaagtccc ctaaaaatgc ctatgttgaa ggtgatgctt caagcgcaag ctatttcttg 240

10 <210> 319  
<211> 297  
<212> ADN  
<213> *Nicotiana benthamiana*

<400> 319  
gctgtatcat atcttcttct ttagaacact aataaattaa acttcogagat aatgatttct 60  
gacaagagta taaacaagtg catctatgaa gatttgaggt tgtccaaaaa agtgacaatt 120  
ttgggttctt ataaactgta ttacattat tgttatttgc aactataaaa attttagatt 180  
attccaagc tcagtttctt caacttaaat gaaggtagca cttgaatttc atcagcctct 240  
atgaccagc aacctatgtg ggagatggga gcaaagtggt caaactttag aaggaat 297

15 <210> 320  
<211> 269  
<212> ADN  
<213> *Nicotiana benthamiana*

ES 2 641 642 T3

<400> 320

gtatgaactt	tcagaatatt	ataccggatc	aatatattat	gctgaaatat	ttttcggact	60
ttaaataatt	tctttattta	aatttatfff	tatacaaaaa	taactaaatt	tcaattactt	120
ttaaattat	gattatffff	caattaccac	ttatacatcc	tgctatfff	aatttcaccc	180
gaaagaacta	ctactatacg	tggatcctca	atgacccagt	aaccaagtg	ggagatgtgt	240
gcaaagtgg	caaatcttag	aaggaatga				269

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de regulación de la expresión de un gen diana endógeno en una planta en crecimiento que comprende: aplicar tópicamente sobre la superficie de dicha planta en crecimiento:

- 5 (a) al menos un polinucleótido de ARN bicatenario (ARNbc) que comprende una secuencia que es esencialmente idéntica a o esencialmente complementaria a, 18 o más nucleótidos contiguos de dicho gen diana o una secuencia de nucleótidos de un ARN transcrito a partir de dicho gen diana; y  
 (b) una cantidad eficaz de un agente de transferencia, en el que dicho agente de transferencia permite que dicho  
 10 al menos un polinucleótido de ARNbc permee directamente el interior de dicha planta en crecimiento, mediante lo cual dicho al menos un polinucleótido de ARNbc induce la supresión de dicho gen diana endógeno en dicha planta en crecimiento

en el que el gen diana codifica una proteína que proporciona resistencia a los herbicidas a la planta en crecimiento.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho gen diana expresa una proteína que proporciona resistencia a los herbicidas para un herbicida no polinucleotídico,

- 15 (a) en el que dicho gen diana codifica una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una acetohidroxiácido sintasa, 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 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DOXP) sintasa, una dihidropteroato  
 20 (DHP) sintasa, una fenilalanina amoniaco liasa (PAL), una glutatión-s-transferasa (GST), una proteína D1 del fotosistema II, una monooxigenasa, un citocromo P450, una celulosa sintasa, una beta-tubulina, una RUBISCO, un factor de iniciación de la traducción, una fitoeno desaturasa y una ADN bicatenario adenosina tripolfosfatasa (ddATP); y  
 (b) en el que dicho procedimiento comprende además aplicar dicho herbicida no polinucleotídico a dicha planta  
 25 en crecimiento; mediante lo cual dicho al menos un polinucleótido de ARNbc potencia la actividad de dicho herbicida no polinucleotídico en dicha planta en crecimiento.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que

- (a) se regula la expresión de dicho gen diana en células vegetales distintas de aquellas recubiertas por vía  
 30 tópica; o  
 (b) en el que dicho gen diana endógeno se regula sistémicamente en al menos un órgano de planta; o  
 (c) al menos un polinucleótido de ARNbc se dirige a diferentes segmentos del gen diana o a diferentes genes diana; o  
 (d) dicho agente de transferencia comprende un tensioactivo de organosilicona; o  
 (e) dichas plantas están creciendo en campo abierto; o  
 35 (f) dichas plantas están creciendo en un invernadero; o  
 (g) dichas plantas también se rocían con un herbicida no polinucleotídico.

4. Una planta que comprende ARNbc exógeno para suprimir un gen endógeno, en la que dicho ARNbc exógeno no se transcribe a partir del ADN integrado en un cromosoma de dicha planta y en la que dicho gen endógeno se suprime por la aplicación tópica de un polinucleótido de ARNbc a dicha planta después de que dicha planta haya  
 40 emergido a partir de una semilla, en la que el gen diana codifica una proteína que proporciona resistencia a los herbicidas a la planta en crecimiento.

5. Una composición que comprende:

- (a) una solución de uno o más polinucleótidos de ARNbc no transcribibles que comprenden una secuencia  
 45 esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir de dicho gen endógeno; en la que dichos polinucleótidos de ARNbc son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de dicha planta con dicho ARN transcrito a partir de dicho gen endógeno para efectuar el silenciamiento de dicho gen endógeno; y  
 (b) un agente de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de dichos uno o más polinucleótidos de ARNbc del exterior de dicha célula vegetal al interior de dicha célula vegetal

50 en el que el gen diana codifica una proteína que proporciona resistencia a los herbicidas a la planta en crecimiento.

6. La composición de la reivindicación 5, en la que la composición es una composición herbicida líquida.

7. La composición de la reivindicación 5 o 6, en la que

- (a) dicho agente de transferencia comprende un tensioactivo y una sal; o  
 (b) dicho agente de transferencia es un tensioactivo de organosilicona; o

- (c) dicho agente de transferencia es un copolímero de silicona y poliéter; o
- (d) dicho agente de transferencia es un copolímero de heptametil siloxano modificado con óxido de polialquileo y metiléter de aliloxi-polipropilenglicol (disponible como tensioactivo Silwet® L-77); o
- 5 (e) la composición comprende además una molécula herbicida no polinucleotídica; o
- (f) dicho gen diana codifica una proteína que proporciona tolerancia a herbicidas seleccionada entre el grupo que consiste en 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una acetohidroxiácido sintasa o una acetolactato sintasa (ALS), una acetil-coenzima A carboxilasa (ACCasa), una dihidropteroato sintasa, una fitoeno desaturasa (PDS), una protoporfirina IX oxigenasa (PPO), una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), una para-
- 10 aminobenzoato sintasa, una glutamina sintasa (GS), 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 del fotosistema II, una monooxigenasa, un citocromo P450, una celulosa sintasa, una beta-tubulina, una RUBISCO, un factor de iniciación de la traducción, una fitoeno desaturasa y una ADN bicatenario adenosina tripolifosfatasa (ddATP).

Figura 1

ATGGCTCAAGCTACTACCATCAACAATGGTGTCCATACTGGTCAATTGCACCATACTTTACCCAAAA  
**CCCAGTTACCCAAATCTTCAAAA**ACTCTTAATTTTGGATCAA**ACTTGAGAATTTCTCCAAAGTTCAT**  
**GCTTTTAACCAATAAAAGAGTTGGTGGGCAATCATCAATTGTTCCCAAGATTCAAGCTTCTGTTGCT**  
 GCTGCAGCTGAGAAACCTTCATCTGTCCAGAAATTGTGTTACAACCCATCAAAGAGATCTCTGGTA  
 CTGTTCAATTGCCTGGGTCAAAGTCTTTATCCAATCGAATCCTTCTTTTAGCTGCTTTGTCTGAGGG  
 CACAACAGTGGTCGACAACTTGCTGTATAGTGATGATATTCTTTATATGTTGGACGCTCTCAGAACT  
 CTTGGTTTTAAAAGTGGAGGATGATAGTACAGCCAAAAGGGCAGTCGTAGAGGGTTGTGGTGGTCTGT  
**TTCTGTTGGTAAAGATGGAAAGGAAGAGATTCAACTTTTCCTTGGTAATGCAGGAACAGCGATGCG**  
**CCCATTGACAGCTGCGGTTGCCGTTGCTGGAGGAAATTCAAGTTATGTGCTTGATGGAGTACCAAGA**  
**ATGAGGGAGCGCCCCATTGGGGATCTGGTAGCAGGTCTAAAGCAACTTGGTTCAGATGTAGATTGTT**  
**TTCTTGGCACAAATTGCCCTCCTGTTCCGGTCAATGCTAAAGGAGGCCCTTCCAGGGGGCAAGGTCAA**  
 GCTCTCTGGATCGGTTAGTAGCCAATATTTAACTGCACTTCTCATGGCTACTCCTTTGGGTCTTGGTA  
 GACGTGGAGATTGAGATAGTTGATAAATTGATTTCTGTACCGTATGTTGAAATGACAATAAAGTTGA  
 TGGAACGCTTTGGAGTATCCGTAGAACATAGTGATAGTTGGGACAGGTTCTACATTGAGGTGGTCA  
 GAAATACAAATCTCCTGGAAAGGCATATGTTGAGGGTGATGCTTCAAGTGCTAGCTACTTCCTAGCC  
 GGAGCCGCCGTCACTGGTGGGACTGTCACTGTCAAGGGTGTGGAACAAGCAGTTTACAGGGTGATG  
 TAAAATTTGCCGAAGTTCTTGAGAAGATGGGTTGCAAGGTCACCTGGACAGAGAATAGTGTAACTGT  
**TACTGGACCACCCAGGGATTCATCTGGAAAGAAACATCTGCGTGCTATCGACGTCAACATGAACAAA**  
**ATGCCAGATGTTGCTATGACTCTTGCAGTTGTTGCCTTGTATGCAGATGGGCCACCGCCATCAGAG**  
**ATGTGGCTAGCTGGAGAGTGAAGGAAACCGAACGGATGATTGCCATTTGCACAGAACTGAGAAAGCT**  
 TGGGGCAACAGTTGAGGAAGGATCTGATTACTGTGTGATCACTCCGCCTGAAAAGCTAAACCCACC  
 GCCATTGAAACTTATGACGATCACCGAATGGCCATGGCATTCTCTCTTGCTGCCTGTGCAGATGTTCC  
 CCGTCACTATCCTTGATCCGGGATGCACCCGTAAAACCTTCCCGGACTACTTTGATGTTTTAGAAAA  
 GTTCGCCAAGCATTGA

SEQ ID NO:1

Figura 2

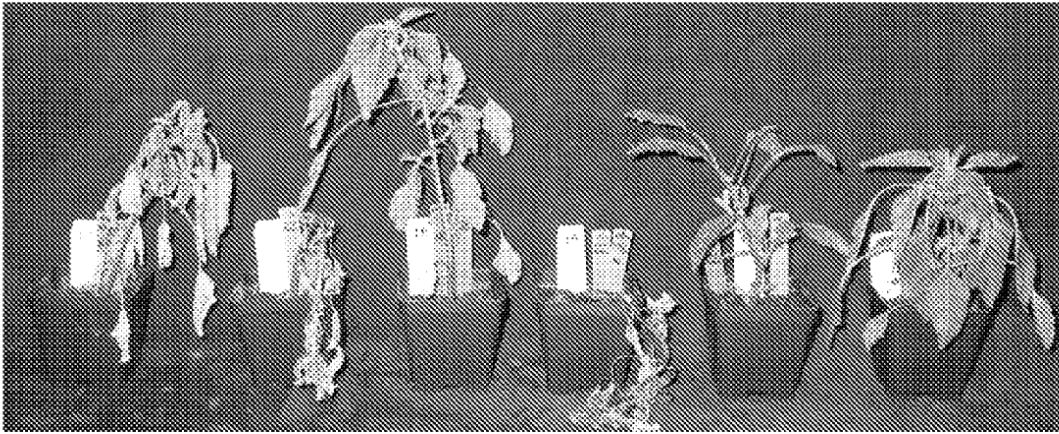
GCCCATAGGCCTTTTTCTAAAATAGGCCCATTTAAGCTATTAACAATCTTCAAAAAGTACCACATCG  
CTTAGGTAAAGAAAGCAGCTGAGTTTATATATGGTTAGAGACGAAGTAGTGATTGCGACGAGCGACG  
TCTCGCCCTCATCGCAATCCACGCCATTGAGCTTGAGGCCATTGGCGACGGCCGAGAGGCGGTCTGCT  
TAAGATTAGCATGTCCTTGACGGGAGTTCTTCCAGACCGTTCATCACGGTCGCCCCCTCCGCGAAG  
GCGGCGGCGACAGCGAGAATCGGATATTCGTTCGATCATCGAAGGCGCGGGTCTCCGGCACCGTGA  
CGCATAAAcaagggtgccggaagaccgcgcgccttcgatgatcgacgaatatccgattctcgctgtcg  
ccgccgccttcgcggaaggggcgaccgtgatgaacggctctggaagaactccgcgtcaaggaaagcga  
ccgcctctcgccgctcgccaatggcctcaagctcaatggcgtggattgcatgagggcgagacgtcg  
ctcgctcgTTTTTTTTGGCAAAAA

SEQ ID NO:3

**Figura 3**



**3A**

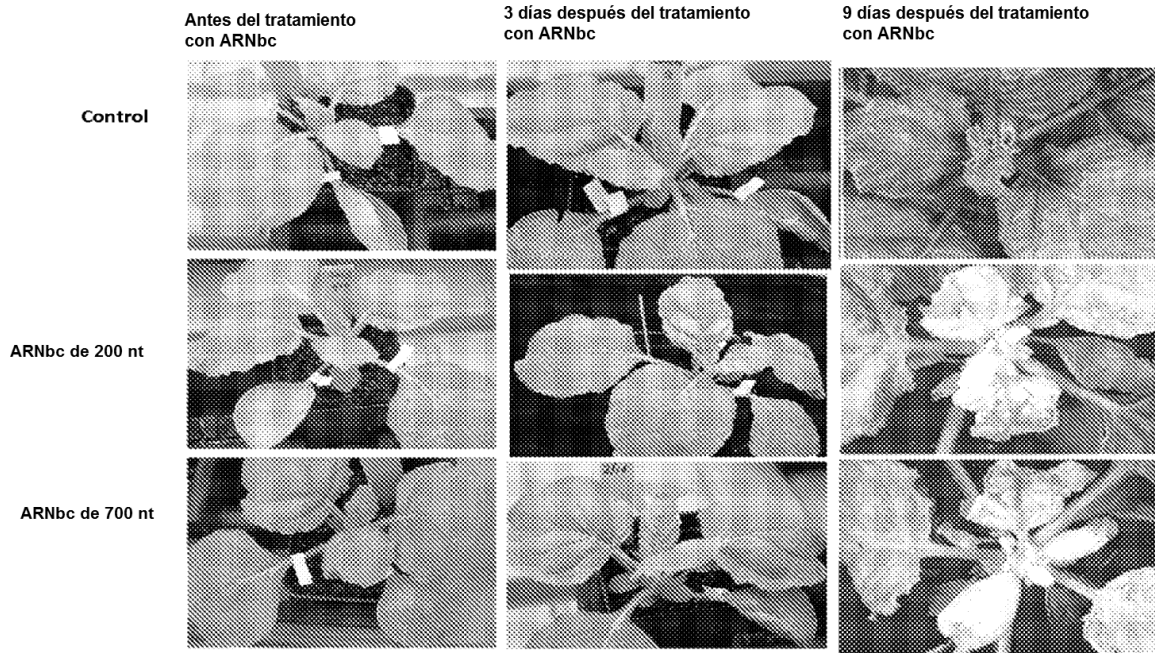


**3B**



**3C**

Figura 4





## Figura 5

ATGCCCCAAATCGGACTTGTATCTGCTGTTAATTTGAGAGTCCAAGGTAATTCAGCTTATCTTTGGA  
 GCTCGAGGTCTTCGTTGGGAACTGAAAAGTCAAGATGTTTGCTTGCAAAGGAATTTGTTATGTTTTGG  
 TAGTAGCGACTCCATGGGGCATAAGTTAAGGATTCGTAAGTCCAAGTGCCACGACCCGAAGATTGACA  
 AAGGACTTTAATCCTTTAAAGGTAGTCTGCATTGATTATCCAAGACCAGAGCTAGACAATACAGTTA  
 ACTATTTGGAGGCGCGTATTATCATCATCGTTTCGTAAGTCCAAGACCAGAGCTAGACAATACAGTTA  
 GATTGTTATTGCTGGTGCAGGTTTGGGTGGTTTGTCTACAGCAAATATCTGGCAGATGCTGGTGCAC  
 AAACCGATATTGCTGGAGGCAAGAGATGTCCTAGGTGGGAAGGTAGCTGCATGGAAAGATGATGATG  
 GAGATTGGTACGAGACTGGGTTGCACATATTTCTTTGGGGCTTACCCAAATATGCAGAACCTGTTTGG  
 AGAACTAGGGATTGATGATCGGTTGCAGTGGAAAGAACATTCAATGATATTTGCGATGCCTAACCAAG  
 CCAGGGGAGTTTACGCCGCTTTGATTTTCTTGAAGCTCTTCTTGCGCCATTAAATGGAATTTTGGCCA  
 TACTAAAGAACAACGAAATGCTTACGTGGCCCCGAGAAAGTCAAATTTGCTATTGGACTCTTGCCAGC  
 AATGCTTGGAGGGCAATCTTATGTTGAAGCTCAAGACGGTTAAGTGTAAAGGACTGGATGAGAAAG  
 CAAGGTGTGCCTGATAGGGTGACAGATGAGGTGTTTCAATGCCATGTCAAAGGCACCTAACTTCATAA  
 ACCCTGACGAGCTTTCGATGCAGTGCATTTTGATTGCTTT**GAACAGATTTCTTCAGGAGAAACATGG**  
**TTCAAAAATGGCCTTTT****TAGATGGTAACCCTCCTGAGAGACTTTGCATGCCGATTGTGGAACATATT**  
**GAGTCAAAGGTGGCCAAGTCAGACTAACTCACGAATAAAAAAGATCGAGCTGAATGAGGATGGAA**  
**GTGTCAAATGTTTTATACTGAATAATGGCAGTA**CAATTAAGGAGATGCTTTTGTGTTTGCCACTCC  
 AGTGGATATCTTGAAGCTTCTTTTGCCTGAAGACTGAAAAGAGATCCCATATTTCCAAAAGTTGGAG  
 AAGCTAGTGGGAGTTCCTGTGATAAATGTCCATATATGGTTTGACAGAAAACGAAGAACACATCTG  
 ATAATCTGCTCTTCAGCAGAAGCCCGTTGCTCAGTGTGTACGCTGACATGTCTGTACATGTAAGGA  
 ATATTACAACCCCAATCAGTCTATGTTGGAATTGGTATTTGCACCCGCAGAAGAGTGGATAAATCGT  
 AGTACTCAGAAATATTGATGCTACAATGAAGGAAGTACGGAAGCTTTTCCCTGATGAAATTTCCG  
 CAGATCAGAGCAAAGCAAAAATATTGAAGTATCATGTTGTCAAACCCCAAGGTCTGTTTATAAAAC  
 TGTGCCAGGTTGTGAACCCTGTCGGCCCTTGCAAAGATCCCCTATAGAGGGTTTTTATTTAGCTGGT  
 GACTACACGAAACAGAAGTACTTGGCTTCAATGGAAGGTGCTGTCTTATCAGGAAAGCTTTGTGCAC  
 AAGCTATTGTACAGGATTACGAGTTACTTCTTGGCCGGAGCCAGAAGATGTTGGCAGAAGCAAGCGT  
 AGTTAGCATAGTGAACATA

SEQ ID NO:2

Figura 6

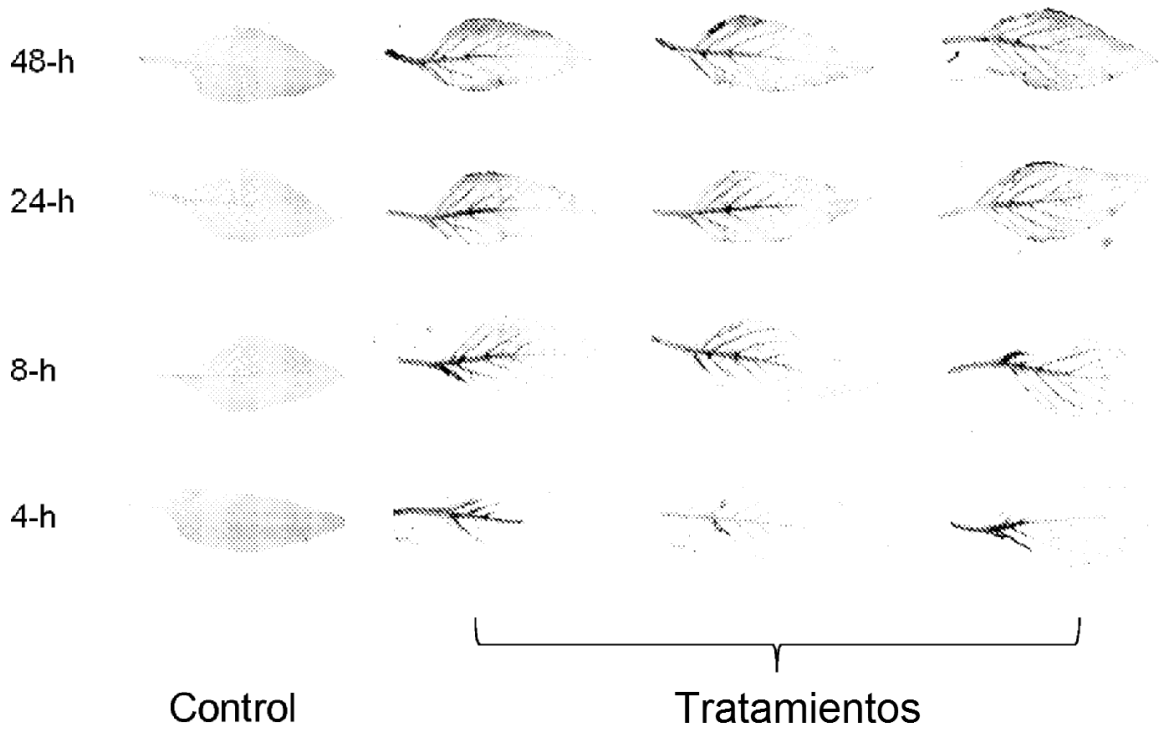
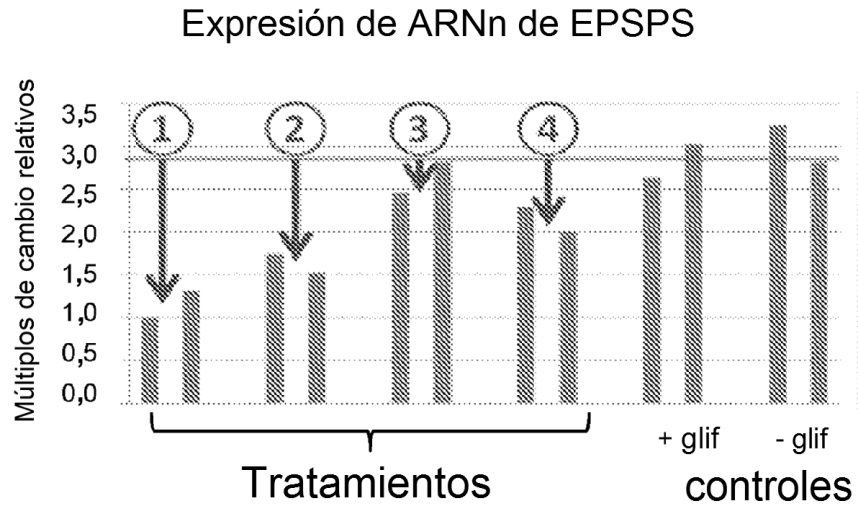


Figura 7



**Figura 8**

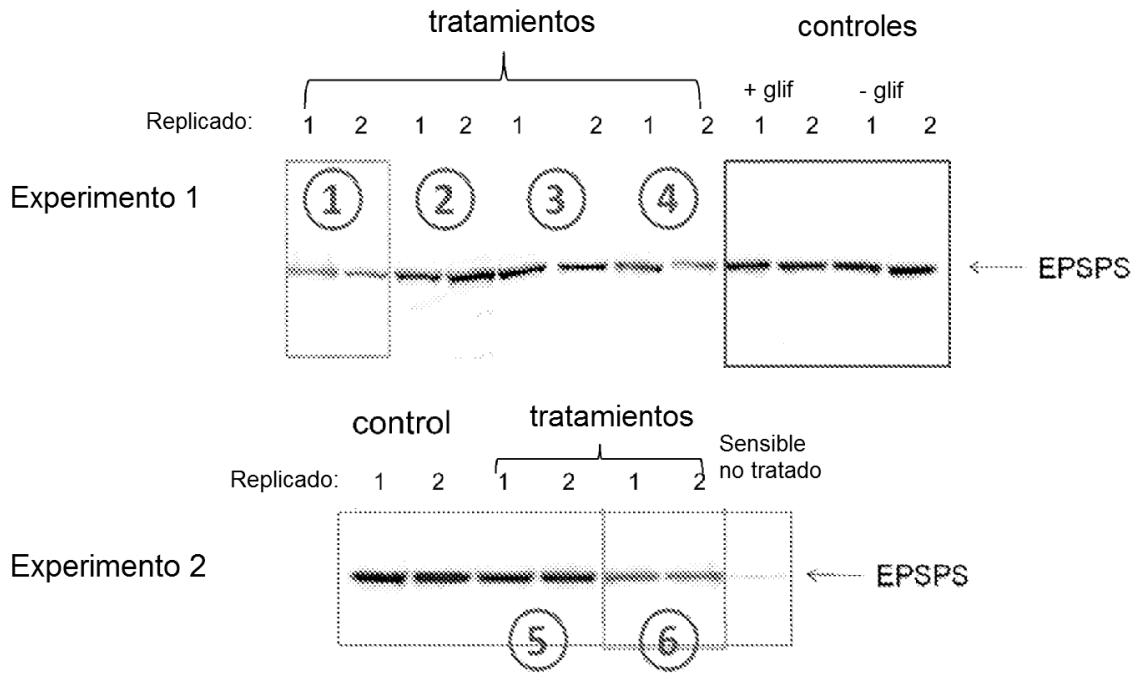


Figura 9

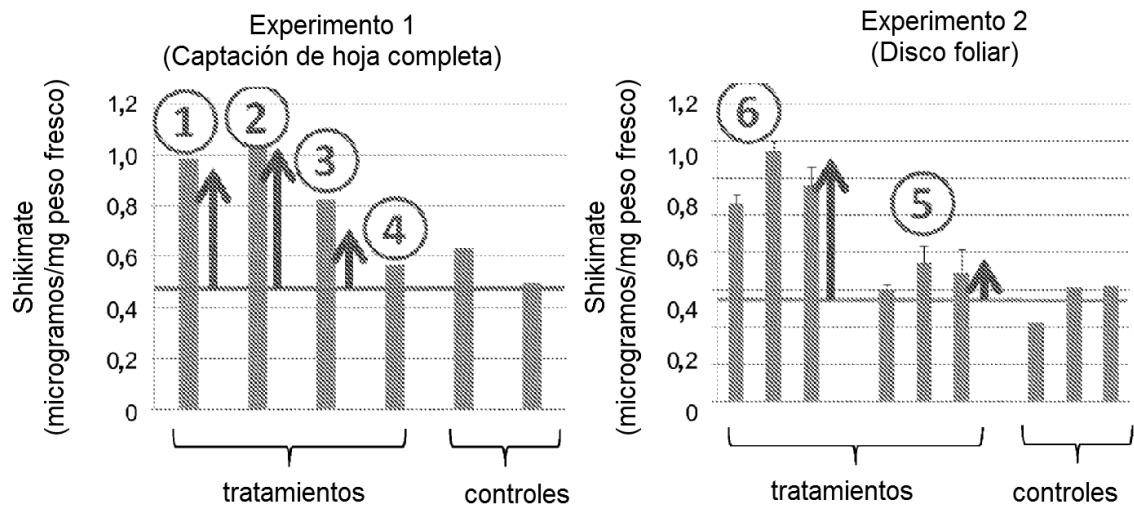


Figura 10

>gi|93117609|gb|DQ469932.1| ARNm de fitoeno desaturasa  
de *Nicotiana benthamiana*, cds completo

ATGCCCCAAATCGGACTTGTATCTGCTGTTAATTTGAGAGTCCAAGGTAATTCAGCTTATCTTTGGA  
GCTCGAGGTCTTCGTTGGGAACTGAAAGTCAAGATGTTTGCTTGCAAAGGAATTTGTTATGTTTTGG  
TAGTAGCGACTCCATGGGGCATAAGTTAAGGATTCGTACTCCAAGTGCCACGACCCGAAGATTGACA  
AAGGACTTTAATCCTTTAAAGGTAGTCTGCATTGATTATCCAAGACCAGAGCTAGACAATACAGTTA  
ACTATTTGGAGGCGGCGTTATTATCATCATCGTTTCGTACTTCCTCACGCCAACTAAACCATTGGA  
GATTGTTATTGCTGGTGCAGGTTTGGGTGGTTTGTCTACAGCAAAAATATCTGGCAGATGCTGGTCAC  
AAACCGATATTGCTGGAGGCAAGAGATGTCTAGGTGGGAAGGTAGCTGCATGGAAAGATGATGATG  
GAGATTGGTACGAGACTGGGTGACATATTCTTTGGGGCTTACCCAAATATGCAGAACCCTGTTTGG  
AGAAGTAGGGATTGATGATCGGTTGCAGTGAAGGAACATTCAATGATATTTGCGATGCCAACAAG  
CCAGGGGAGTTCAGCCGCTTTGATTTTCTGAAGCTCTTCCTGCGCCATTAATGGAATTTTGGCCA  
TACTAAAGAACAACGAAATGCTTACGTGGCCGAGAAAGTCAAATTTGCTATTGGACTCTTGCCAGC  
AATGCTTGGAGGGCAATCTTATGTTGAAGCTCAAGACGGTTTAAGTGTAAAGGACTGGATGAGAAAG  
CAAGGTGTGCCTGATAGGGTGACAGATGAGGTGTTTATTGCCATGTCAAAGGCACTTAACCTCATAA  
ACCCTGACGAGCTTTTCGATGCAGTGCATTTTGATTGCTTTGA**ACAGATTTCTTCAGGAGAAACATGG**  
**TTCAAAAATGGCCTTTTTAGATGGTAACCCTCTGAGAGACTTTGCATGCCGATTGTGGAACATATT**  
**GAGTCAAAGGTGGCCAAGTCAGACTAAACTCACGAATAAAAAAGATCGAGCTGAATGAGGATGGAA**  
**GTGTCAAATGTTTTATACTGAATAATGGCAGTACAATTAAGGAGATGCTTTTGTGTTTGCCACTCC**  
AGTGGATATCTTGAAGCTTCTTTTGCCTGAAGACTGGAAAGAGATCCCATATTTCCAAAAGTTGGAG  
AAGCTAGTGGGAGTTTCTGTGATAAATGTCCATATATGGTTTGACAGAAAACCTGAAGAACACATCTG  
ATAATCTGCTCTTCAGCAGAAGCCCGTTGCTCAGTGTGTACGCTGACATGTCTGTTACATGTAAGGA  
ATATTACAACCCCAATCAGTCTATGTTGGAATGGTATTTGCACCCGCAGAAGAGTGGATAAATCGT  
AGTGACTCAGAAATTATTGATGCTACAATGAAGGAACTAGCGAAGCTTTTCCCTGATGAAATTTGCG  
CAGATCAGAGCAAAGCAAAAATATTGAAGTATCATGTTGTCAAACCCCAAGGTCTGTTATAAAAC  
TGTGCCAGGTTGTGAACCCTGTCGGCCCTTGCAAAGATCCCCTATAGAGGGTTTTTATTTAGCTGGT  
GACTACACGAAACAGAAGTACTTGGCTTCAATGGAAGGTGCTGTCTTATCAGGAAAGCTTTGTGCAC  
AAGCTATTGTACAGGATTACGAGTTACTTCTTGCCGGAGCCAGAAGATGTTGGCAGAAGCAAGCGT  
AGTTAGCATAGTGAACATA

SEQ ID NO:2

Figura 11

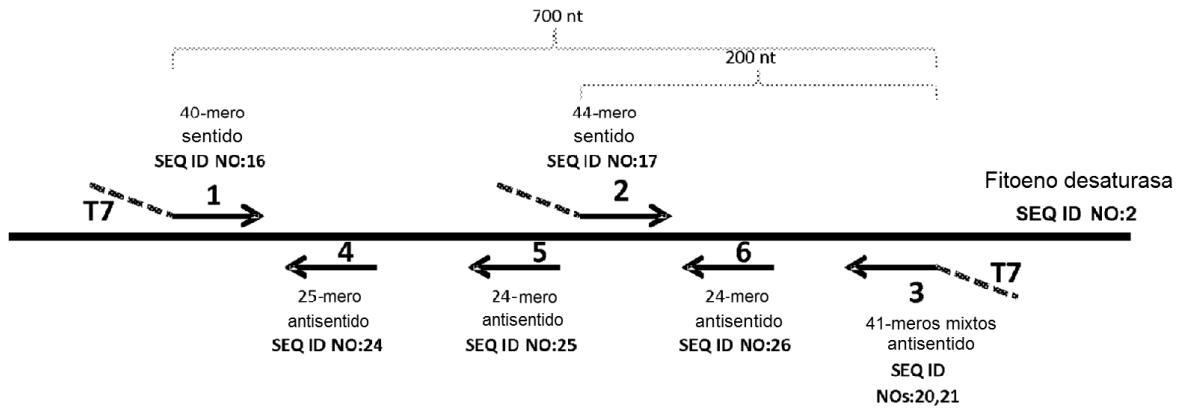
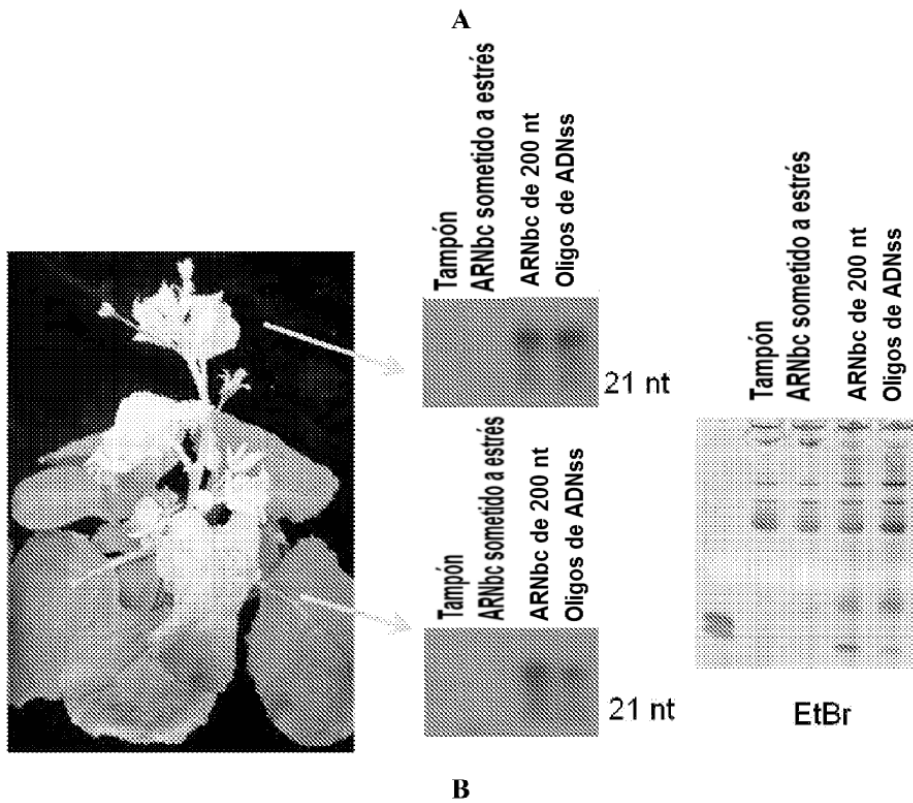


Figura 12

Control                      ARNbc de 200 nt                      Oligos de ADNss  
(1+2+3+4+5+6)  
**SEQ ID NOs:16, 17, 20,**  
**21, 24, 25 y 26**





**Figura 13**

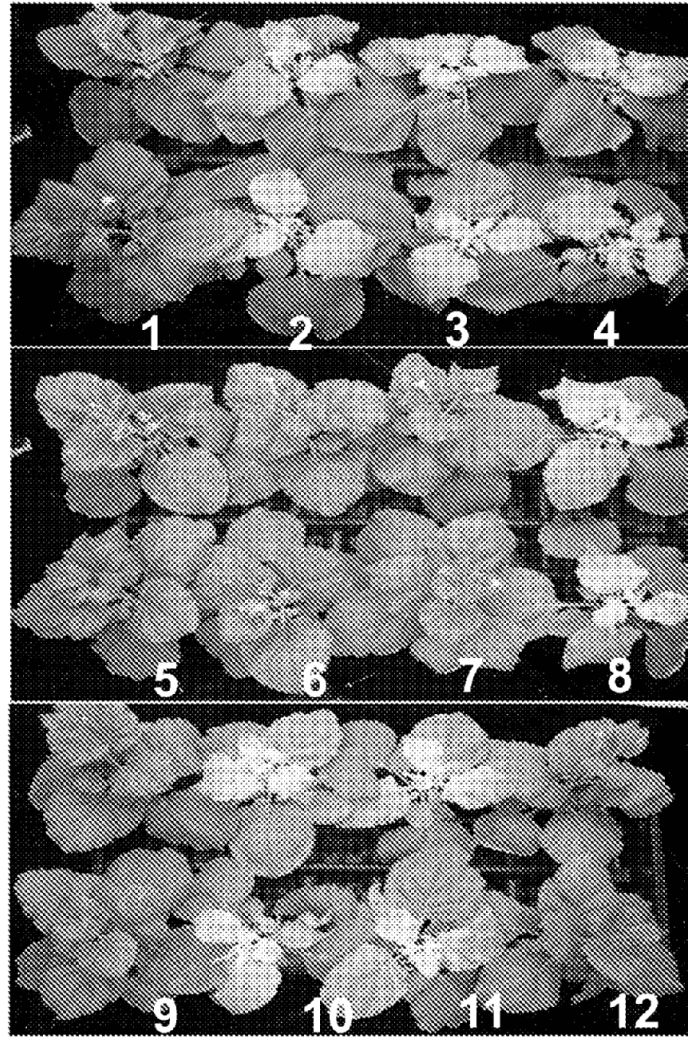


Figura 14

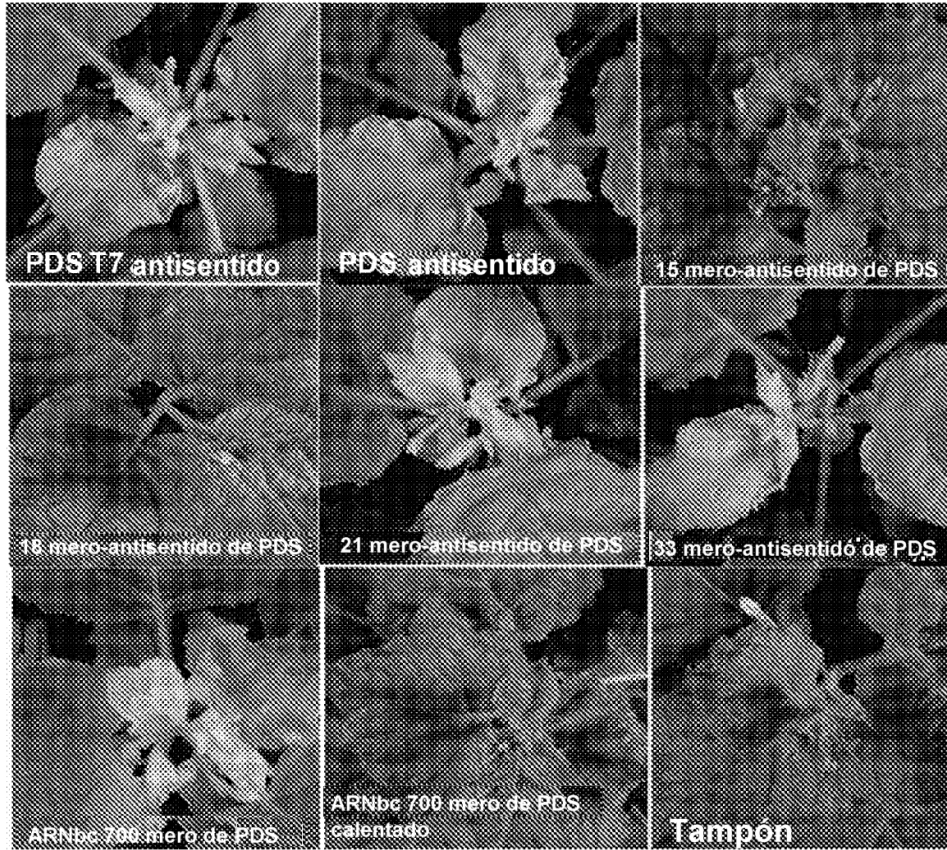


Figura 15

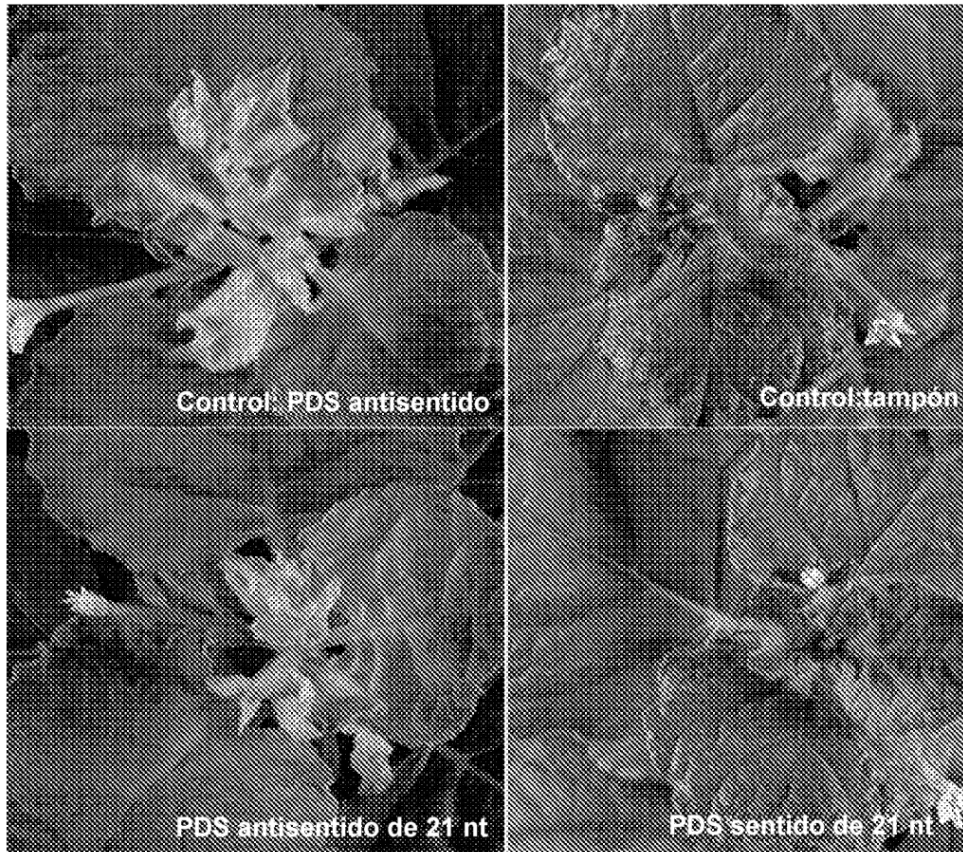


Figura 16

```

Almizcle      T-----CAA-----TTTCATCT-----ATTGGA-----AGTGAT  SEQ ID NO:37
                :::          ::  :::          :::  ::          ::  :
Benthamiana  ATGCCCCAAATCGGACTTGTATCTGCTGTTAATTTGAGAGTCCAAGGTAA  SEQ ID NO:38
                10          20          30          40          50

Almizcle      TT-----TTTGG-----GTCATTCTGTGAGAAATTCAGTG--
                ::          ::::          ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::
Benthamiana  TTCAGCTTATCTTTGGAGCTCGAGGTC-TTCGTTGGGAACTGAAAGTCAA
                60          70          80          90

Almizcle      -----TTAGTAAAGTTT-----AT
                ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::
Benthamiana  GATGTTTGCTTGCAAAGGAATTTGTTATGTTTTGGTAGTAGCGACTCCAT
                100          110          120          130          140

Almizcle      70          80          90
GGAGCA-AAGCAAAGAAATGGGC-----ACTGCC-----
                ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::
Benthamiana  GGGGCATAAGTTAAGGATTCGTACTCCAAGTGCCACGACCCGAAGATTGA
                150          160          170          180          190

Almizcle      -----CTTAAAGGTTGTTTGTATAGATTATCCTAGGCCA
                ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::
Benthamiana  CAAAGGACTTTAATCCTTTAAAGGTAGTCTGCATTGATTATCCAAGACCA
                200          210          220          230          240

Almizcle      140          150          160          170          180
GAGCTTCAAAGTACATCCAATTTCTTGAAGCCGCCTACTTATCTTCTAC
                ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::
Benthamiana  GAGCTAGACAATACAGTTAACTATTTGGAGGCGGCGTTATTATCATCATC
                250          260          270          280          290

Almizcle      190          200          210          220          230
TTTTCGGAATTCGCCTCGTCCTCAGAAGCCATTAGAAGTTGTAATTGCTG
                ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::
Benthamiana  GTTTCGTACTTCCTCACGCCCAACTAAACCATTGGAGATTGTTATTGCTG
                300          310          320          330          340

Almizcle      240          250          260          270          280
GAGCAGGTTTGGCTGGTCTATCCACGGCAAAGTATTTAGCTGATGCAGGT
                ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::
Benthamiana  GTGCAGGTTTGGGTGGTTGTCTACAGCAAATATCTGGCAGATGCCTGGT
                350          360          370          380          390

Almizcle      290          300          310          320          330
CACAAACCCATATTGTTGGAAGCACGAGATGTTTTAGGAGGAAAGGTTGC  SEQ ID NO:37
                ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::
Benthamiana  CACAAACCGATATTGCTGGAGGCAAGAGATGTCTAGGTGGGAAGGTAGC  SEQ ID NO:38
                400          410          420          430          440

```





Figura 16 (continuación)

```

                1240      1250      1260      1270      1280
Almizcle      TCCAAATAGATCCATGCTGGAATTGGTTTTTGCACCCGCGGAGGAATGGA SEQ ID NO:37
                :: :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Benthamiana  CCCAATCAGTCTATGTTGGAATTGGTATTTGCACCCGAGAAGAGTGGA SEQ ID NO:38
                1350      1360      1370      1380      1390

                1290      1300      1310      1320      1330
Almizcle      TTTACGAAGCGACACTGATATTATAGAGGCAACAATGAAAGAGCTTGCC
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Benthamiana  TAAATCGTAGTGACTCAGAAATTATTGATGCTACAATGAAGGAAGTAGCG
                1400      1410      1420      1430      1440

                1340      1350      1360      1370      1380
Almizcle      AAGCTTTTCCCGGATGAAATCGCTGCCGATGGAAGCAAGGCCAAGATCCT
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Benthamiana  AAGCTTTTCCCTGATGAAATTTCCGGCAGATCAGAGCAAAGCAAAAATATT
                1450      1460      1470      1480      1490

                1390      1400      1410      1420      1430
Almizcle      CAAATATCATGTGTCGTCAAAACCTCCAAGGTCGGTTTATAAGACTGTACCGG
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Benthamiana  GAAGTATCATGTTGTCAAACCCCAAGTCTGTTTATAAAAAGTGTGCCAG
                1500      1510      1520      1530      1540

                1440      1450      1460      1470      1480
Almizcle      ATTGTGAACCTTGTGCGCCGCTGCAAAGATCACCAATAGAGGGTTTCTAT
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Benthamiana  GTTGTGAACCTTGTGCGCCCTTGCAAAGATCCCCTATAGAGGGTTTTTAT
                1550      1560      1570      1580      1590

                1490      1500      1510      1520      1530
Almizcle      TTAGCTGGTGATTACACAAAACAAAATATTTGGCTTCTATGGAAGGTGC
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Benthamiana  TTAGCTGGTGACTACGAAACAGAAGTACTTGGCTTCAATGGAAGGTGC
                1600      1610      1620      1630      1640

                1540      1550      1560      1570      1580
Almizcle      TGTCTTATCTGGGAAGCTTTGTGCACAGGCTATCGTACAGGATTATGA--
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Benthamiana  TGTCTTATCAGGAAAGCTTTGTGCACAAGCTATTGTACAGGATTACGAGT
                1650      1660      1670      1680      1690

                1590      1600      1610
Almizcle      ----TCT--GCTG-----AGTTCTCG--AGCACAAAGAGAA--TTGGC
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Benthamiana  TACTTCTTGGCCGGAGCCAGAAGATGTTGGCAGAAGCAAGCGTAGTTAGC
                1700      1710      1720      1730      1740

Almizcle      G----- SEQ ID NO:37

Benthamiana  ATAGTGAACTAA SEQ ID NO:38
                1750      1760

```

**Figura 17**

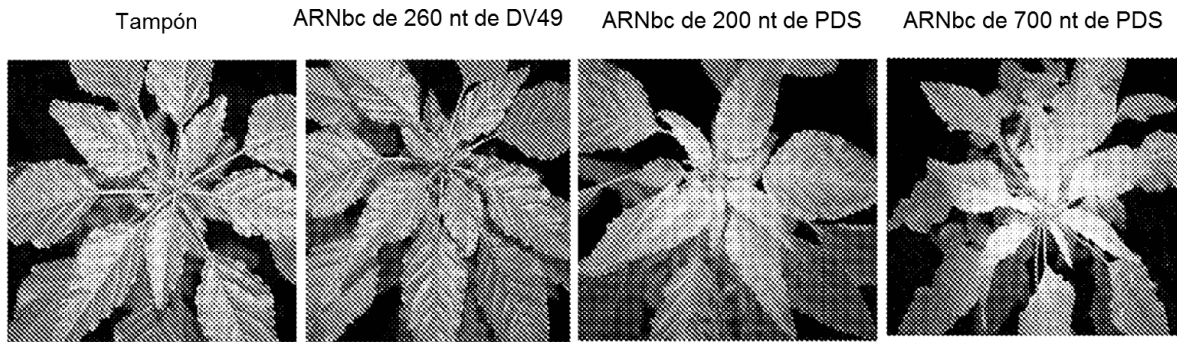
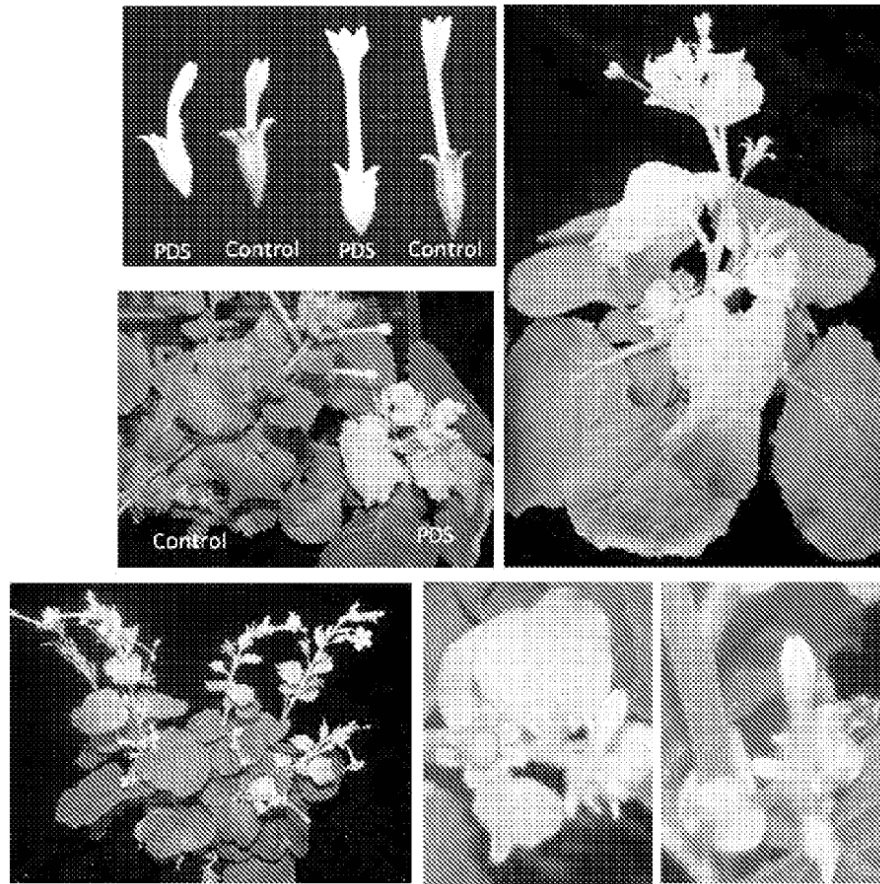
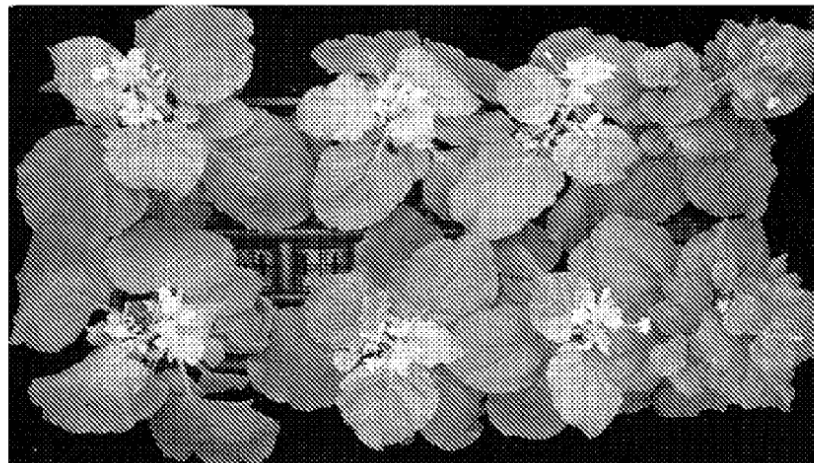




Figura 18



A



Condicionamiento de Silwet al 0,1 % seguido de 1 nanomol de ADNss de PDS + Silwet al 0,01 %

Sin condicionamiento de Silwet; infiltrado 1 nanomol de ADNss de PDS + Silwet al 0,01 %

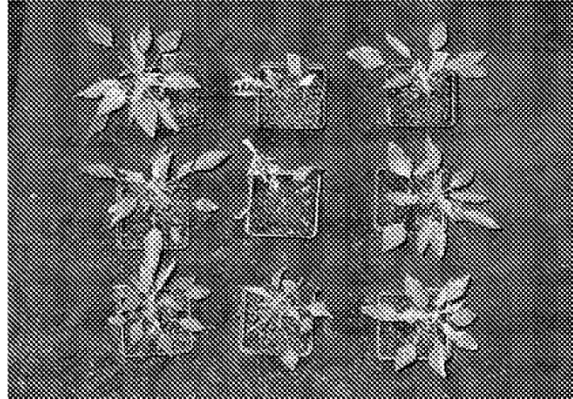
Sin condicionamiento de Silwet; infiltrado 1 nanomol de ADNss de PDS (sin Silwet)

Tampón

B

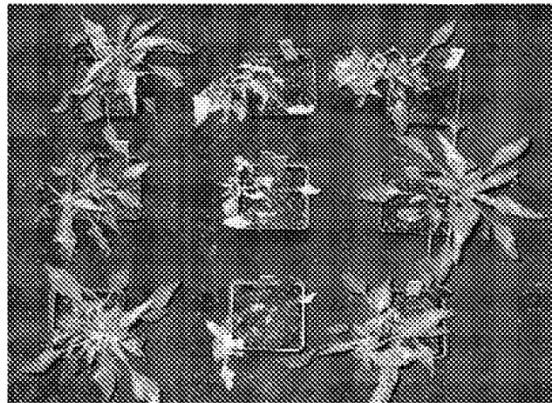
**Figura 19**

Exp. n.º 3      Exp. n.º 2      Exp. n.º 1



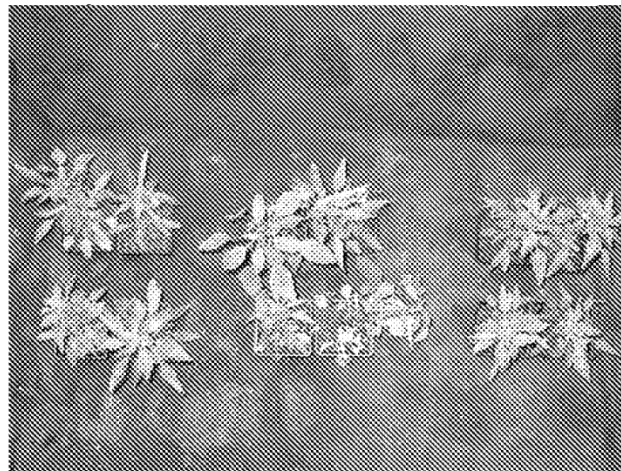
**R31 (35 copias de EPSPS)**

Exp. n.º 6      Exp. n.º 5      Exp. n.º 4



**R34 (57 copias de EPSPS)**

Exp. n.º 9      Exp. n.º 8      Exp. n.º 7



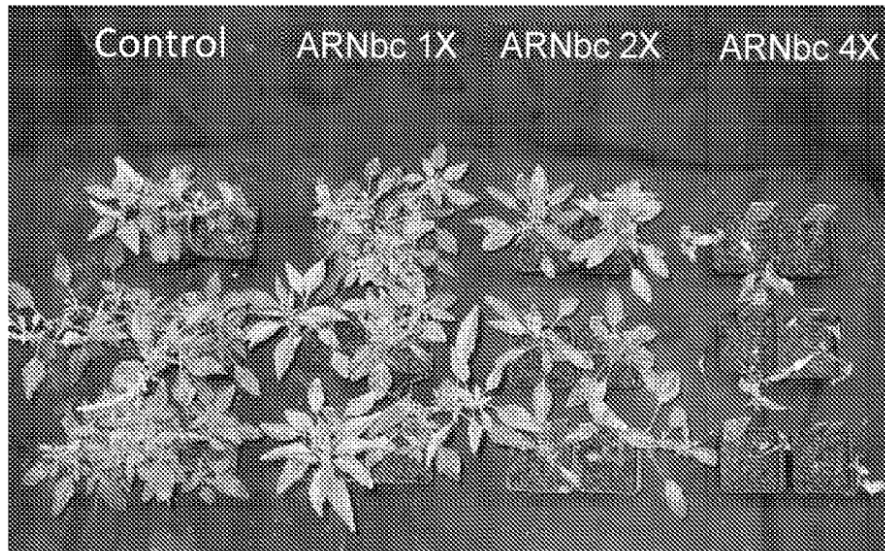
**R28 (87 copias de EPSPS)**

Figura 20

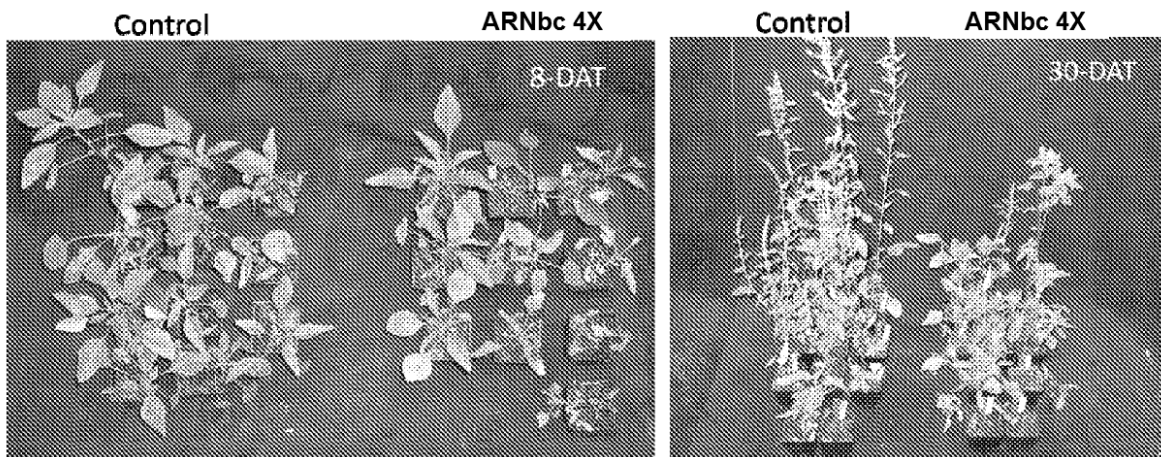
ATGGCTCAAGCTACTACCATCAACAATGGTGTCCATACTGGTCAATTGCACCATACTTTACCCAAA  
**CCCAGTTACCCAAATCTTCAAAA**ACTCTTAATTTTGGATCAAACCTTGAGAATTTCTCCAAAGTTCAT  
**GTCTTTAACCAATAAAA**AGAGTTGGTGGGCAATCATCAATTGTTCCCAAGATTCAAGCTTCTGTTGCT  
 GCTGCAGCTGAGAAACCTTCATCTGTCCAGAAAATTGTGTTACAACCCATCAAAGAGATCTCTGGTA  
 CTGTTCAATTGCCTGGGTCAAAGTCTTTATCCAATCGAATCCTTCTTTTAGCTGCTTTGTCTGAGGG  
 CACAACAGTGGTCGACAACCTGCTGTATAGTGATGATATTCTTTATATGTTGGACGCTCTCAGAACT  
 CTTGGTTTTAAAAGTGGAGGATGATAGTACAGCCAAAAGGGCAGTCGTAGAGGGTTGTGGTGGTCTGT  
**TTCTGTTGGTAAAGATGGAAGGAAGAGATTCAACTTTTCTTGGTAATGCAGGAACAGCGATGCG**  
**CCCATTGACAGCTGCGGTTGCCGTTGCTGGAGGAAATTCAAGTTATGTGCTTGATGGAGTACCAAGA**  
**ATGAGGGAGCGCCCATTTGGGGATCTGGTAGCAGGTCTAAAGCAAACCTTGGTT**CAGATGTAGATTGTT  
**TTCTTGGCACA**AATTGCCCTCCTGTTCCGGTCAATGCTAAAGGAGGCCTTCCAGGGGGCAAGGTCAA  
 GCTCTCTGGATCGGTTAGTAGCCAATATTTAACTGCACCTTCTCATGGCTACTCCTTTGGGTCTTGGA  
 GACGTGGAGATTGAGATAGTTGATAAATTGATTTCTGTACCGTATGTTGAAATGACAATAAAGTTGA  
 TGGAACGCTTTGGAGTATCCGTAGAACATAGTGATAGITGGGACAGGTTCTACATTCGAGGTGGTCA  
 GAAATACAAATCTCCTGGAAAGGCATATGTTGAGGGTGATGCTTCAAGTGCTAGCTACTTCCTAGCC  
 GGAGCCGCCGTCACTGGTGGGACTGTCACTGTCAAGGGTTGTGGAACAAGCAGTTTACAGGGTGATG  
 TAAAATTTGCCGAAGTTCTTGAGAAGATGGGTTGCAAGGTCACCTGGACAGAGAATAGTGTA**ACTGT**  
**TACTGGACCACCCAGGGATT**CATCTGGAAA**GAACATCTGCGTGCTATCGACGTCAACATGAACAAA**  
**ATGCCAGATGTTGCTATGACTCTTG**CAGTTGTTGCCTTGTATGCAGATGGGCC**CCACCGCCATCAGAG**  
**ATGTGGCTAGCTGGAGAGTGAAGGAAACCGAACGGATGATTGCCATTTGCACAGA**ACTGAGAAAGCT  
 TGGGGCAACAGTTGAGGAAGGATCTGATTACTGTGTGATCACTCCGCCTGAAAAGCTAAACCCACC  
 GCCATTGAAACTTATGACGATCACCGAATGGCCATGGCATTCTCTCTTGTCTGCTGTGCAGATGTTT  
 CCGTCACTATCCTTGATCCGGGATGCACCCGTAACCTTCCCGGACTACTTTGATGTTTTAGAAAA  
 GTTCGCCAAGCATTGA

SEQ ID NO:40

**Figura 21**







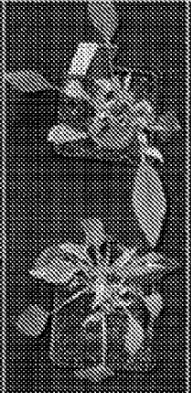

**A**



**B**

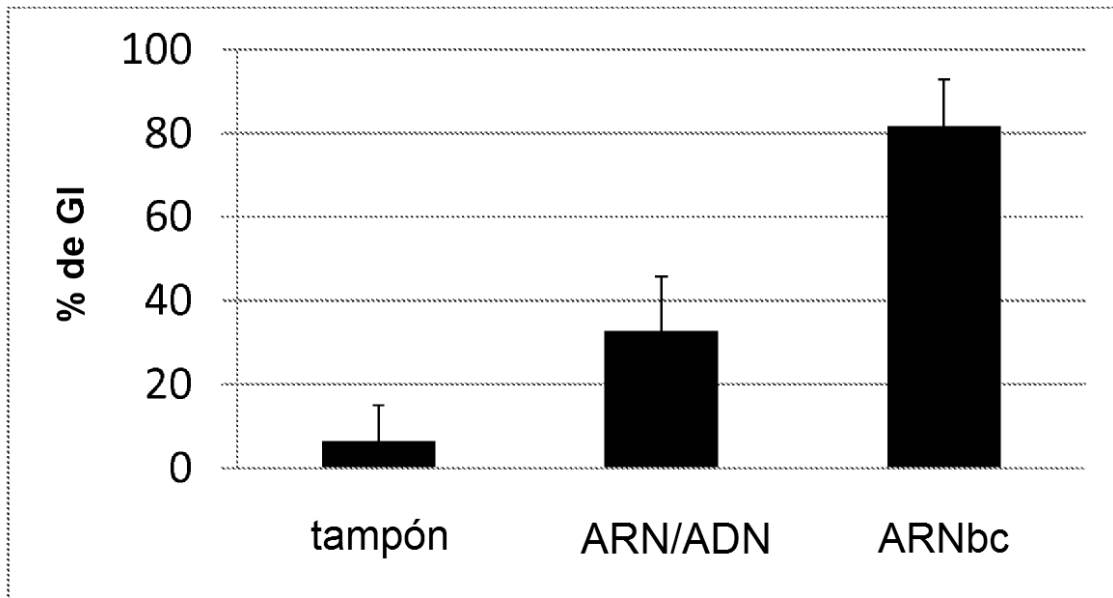
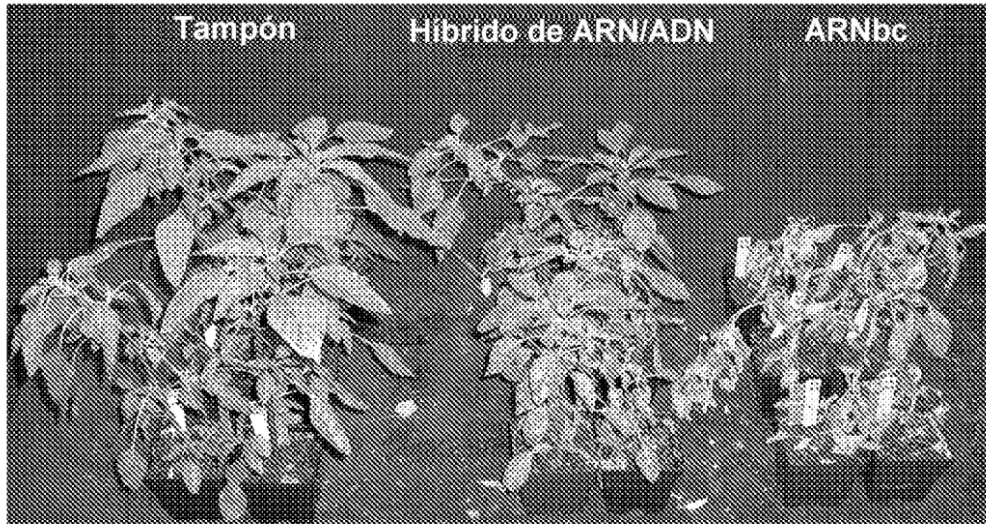
Figura 22

**Reactivos de transfección de la prueba cinco**  
 (ARNbc el 18 de junio; WM 4X el 21 de junio; puntuados en 7-DAT)

Etapa 1: Deposition manual de ARNbc		Etapa 2: Rociado		Etapa 3:	
ARNbc 10X formulado en reactivo de transfección		Silwet al 1 %		WM 4X (72 h)	
	jetPRIME (Polyplus)	SilenceMag (OZ Biosciences)	Nanopartícula (Sigma-Aldrich)	siPORT NeoFX (Ambion)	TransIT (Mirus Bio)
MON0818/AMS	Poliamina	Nanopartícula magnética	Péptido de N-TER	Lípido	Lípido/polímero catiónico
					

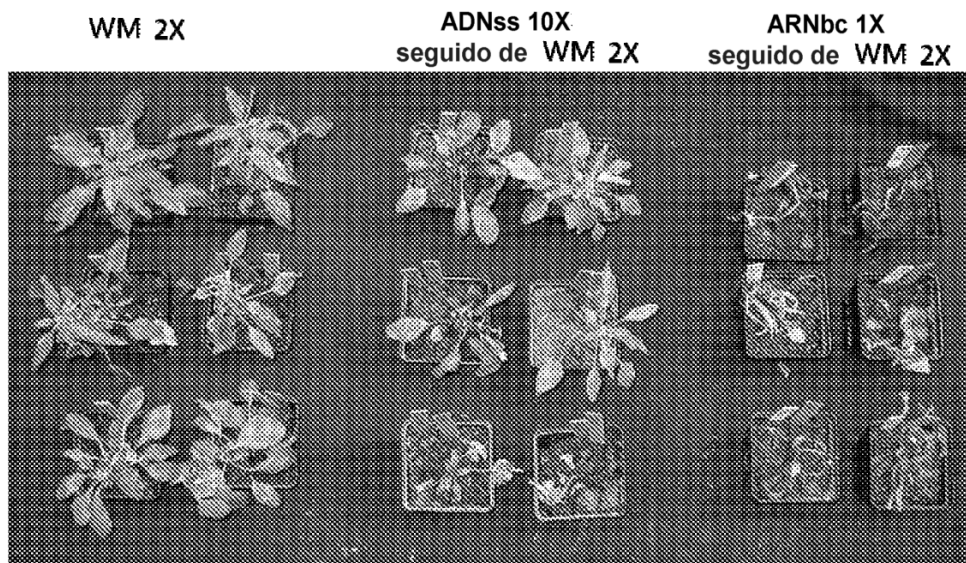
Almizcle con 35 copias de EPSPS; ARNbc 10X

Figura 23



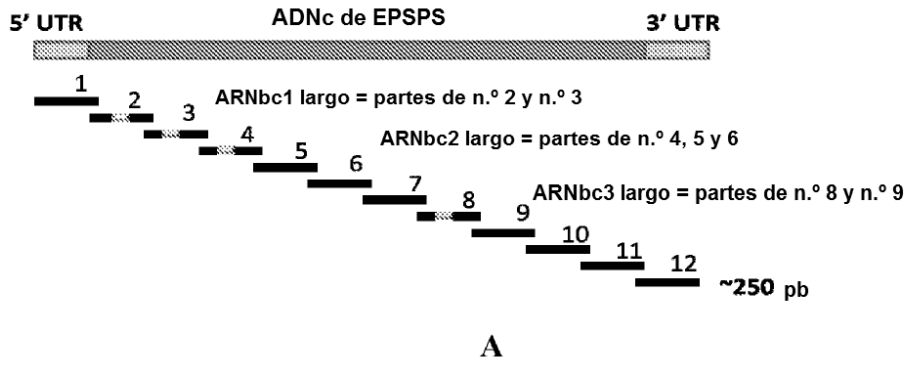
**Figura 24**

Etapa 1	Etapa 2: ARNbc formulados en	Etapa 3:
Silwet al 1 %	ARNbc 1X o ADNss 10X con AMS al 2 % (mediante deposición manual)	WM 2X (48 h)



(Almizcle con 16 copias de EPSPS)

Figura 25



Tampón    4 ARN corto    2,5,8,11    3,6,9,12    1,4,7,10    1,2,3    4,5,6    7,8,9

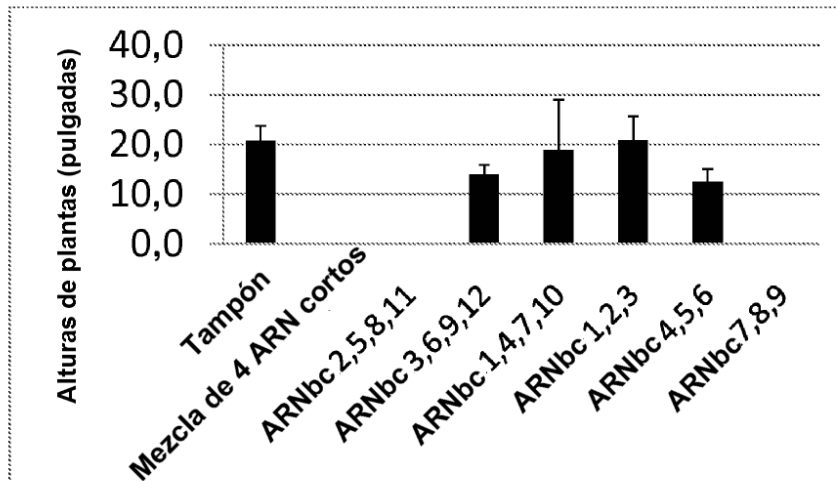
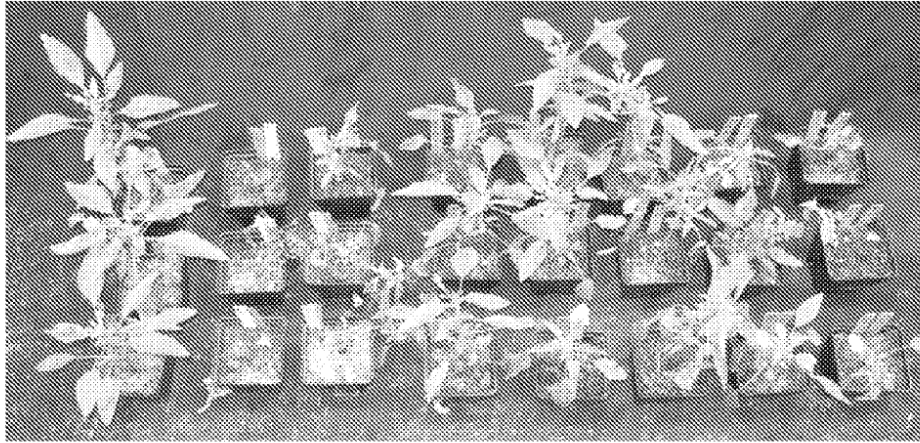




Figura 26

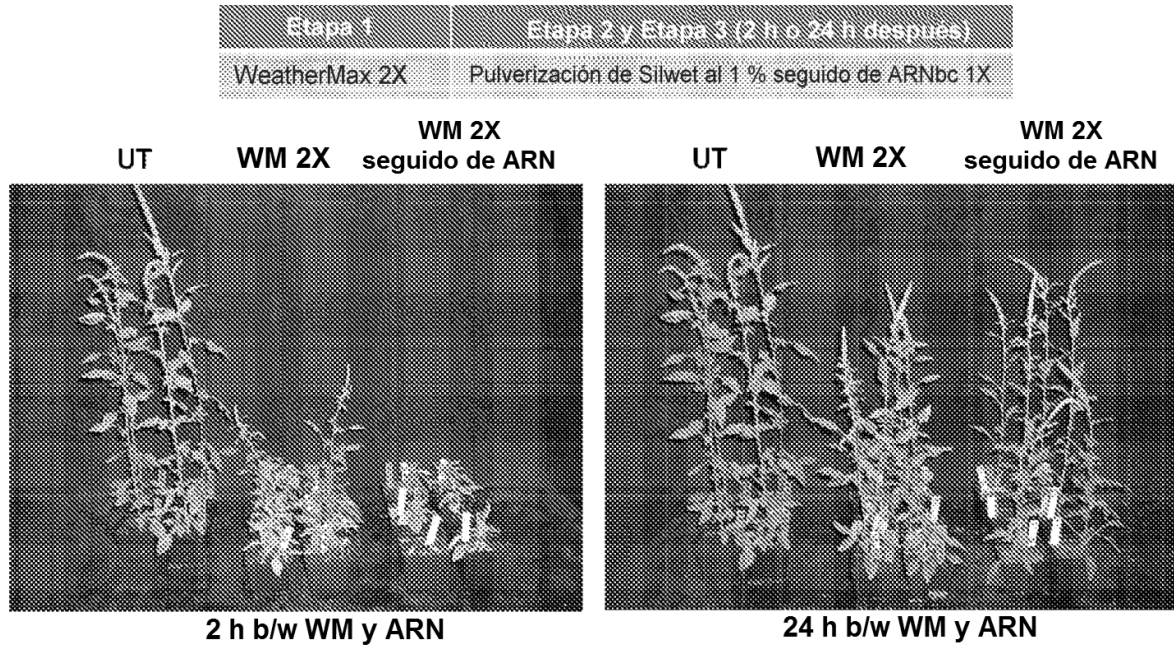
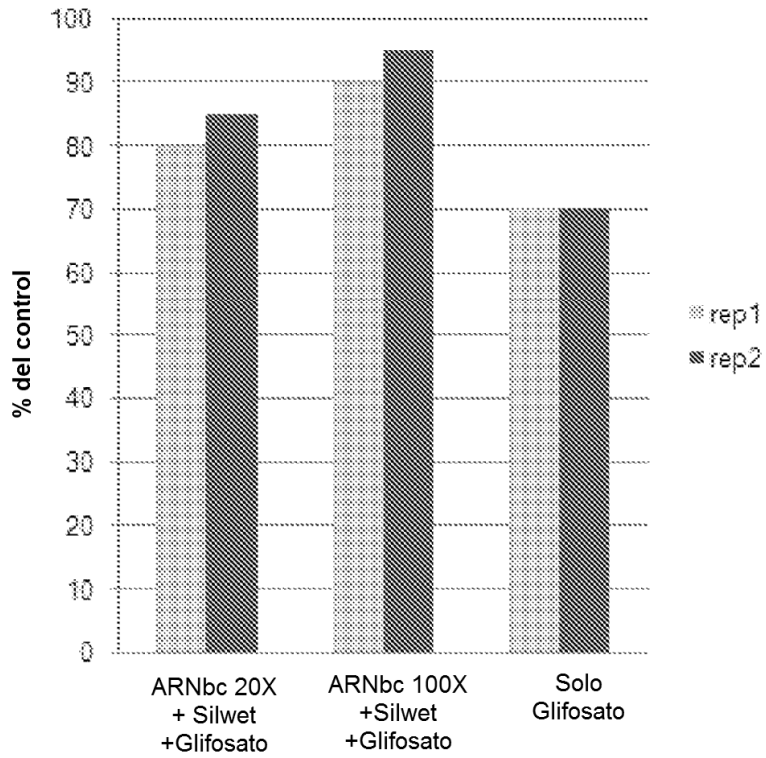


Figura 27

**Mezcla de ARNbc, Silwet L-77,  
y glifosato aplicado en una sola etapa**



**Figura 28**

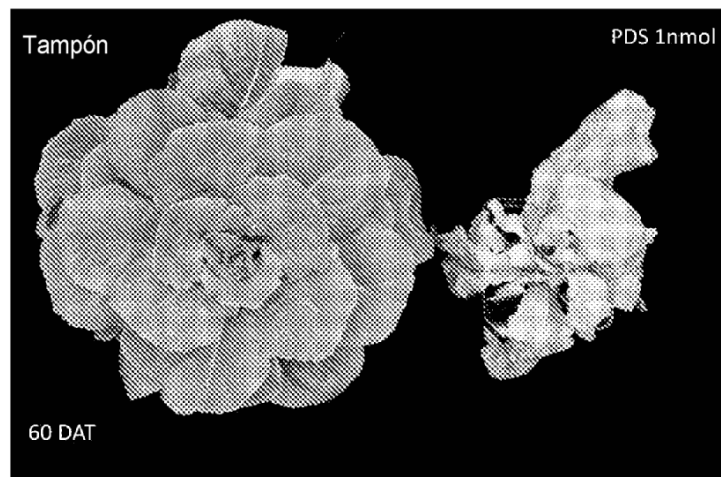
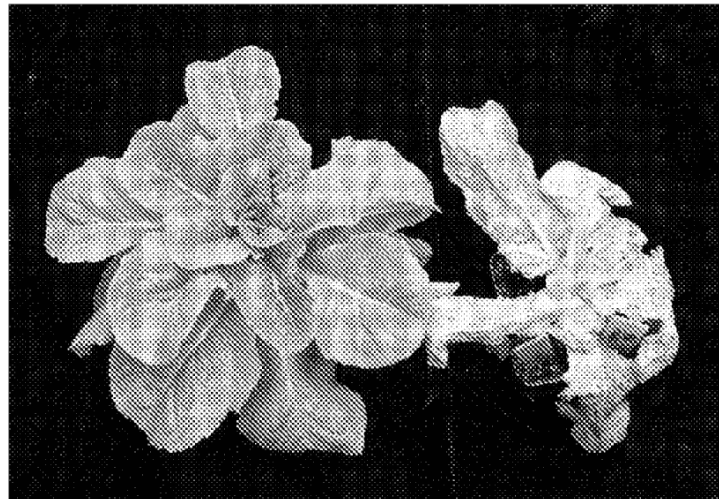
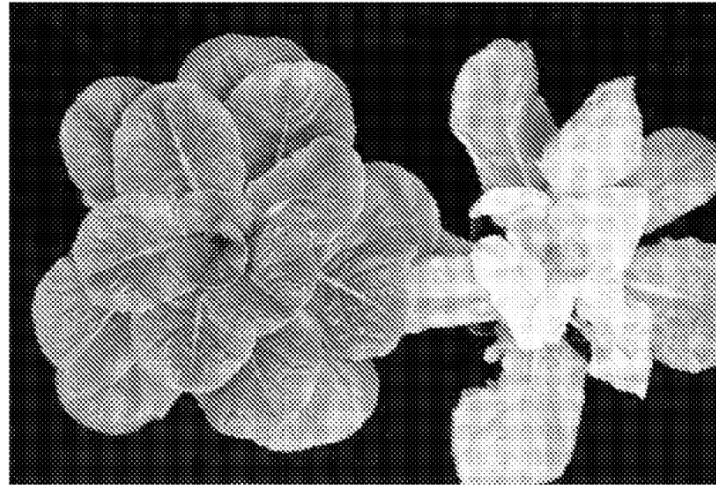
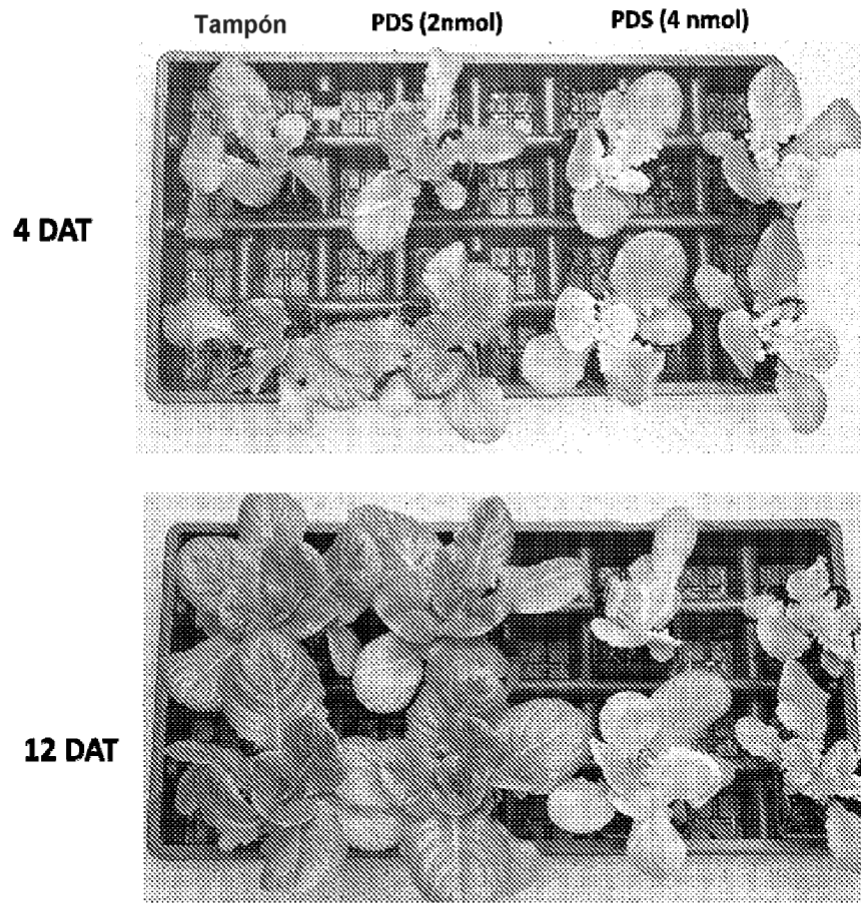


Figura 29



A



B

Figura 30

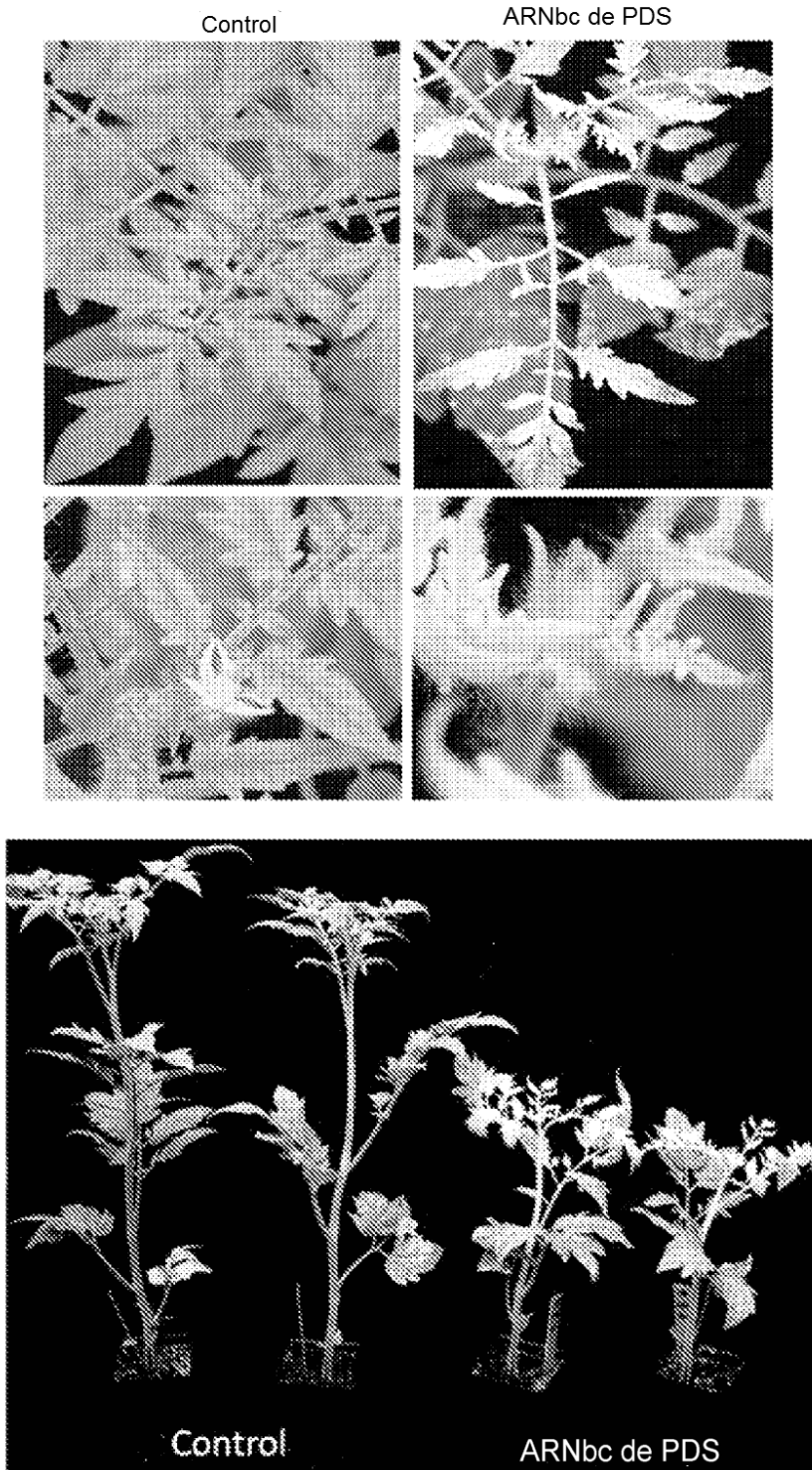


Figura 31

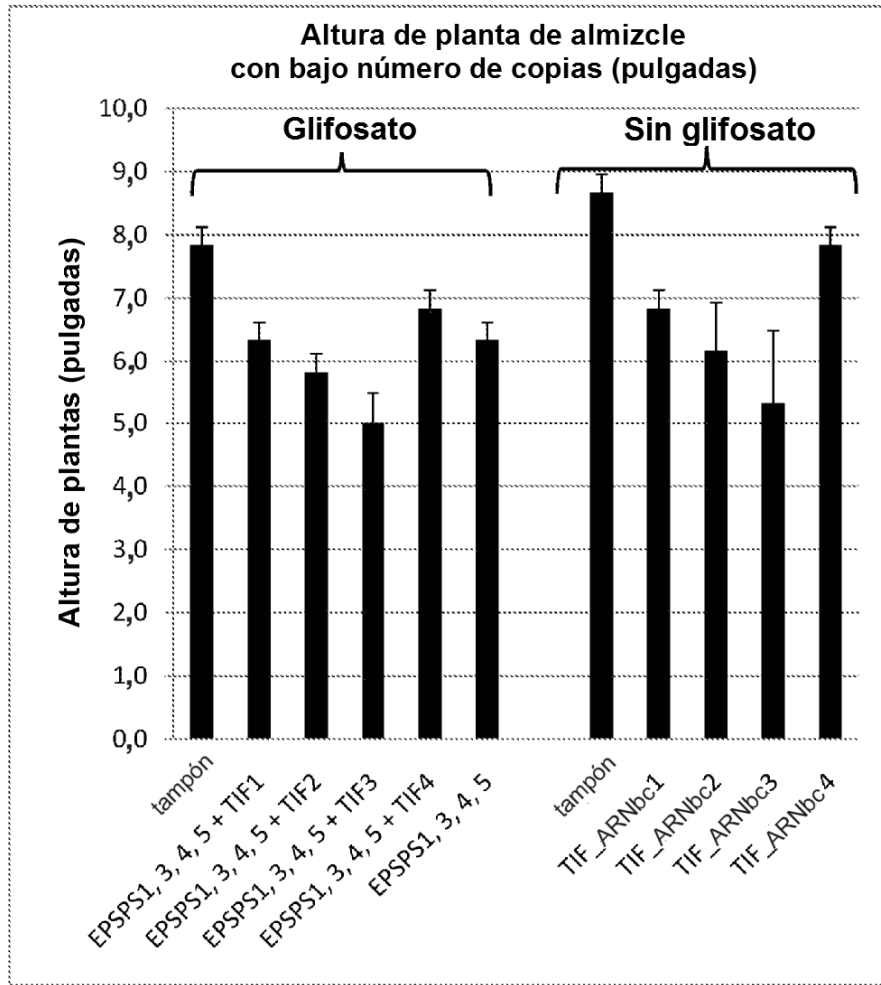


Figura 32

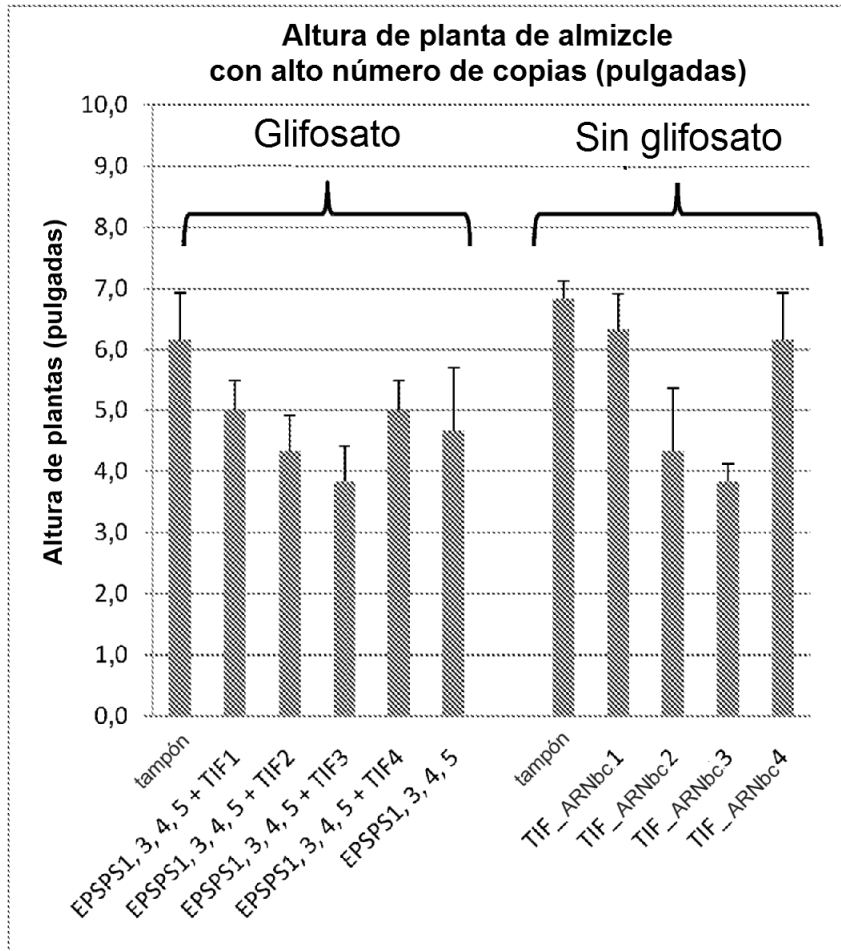
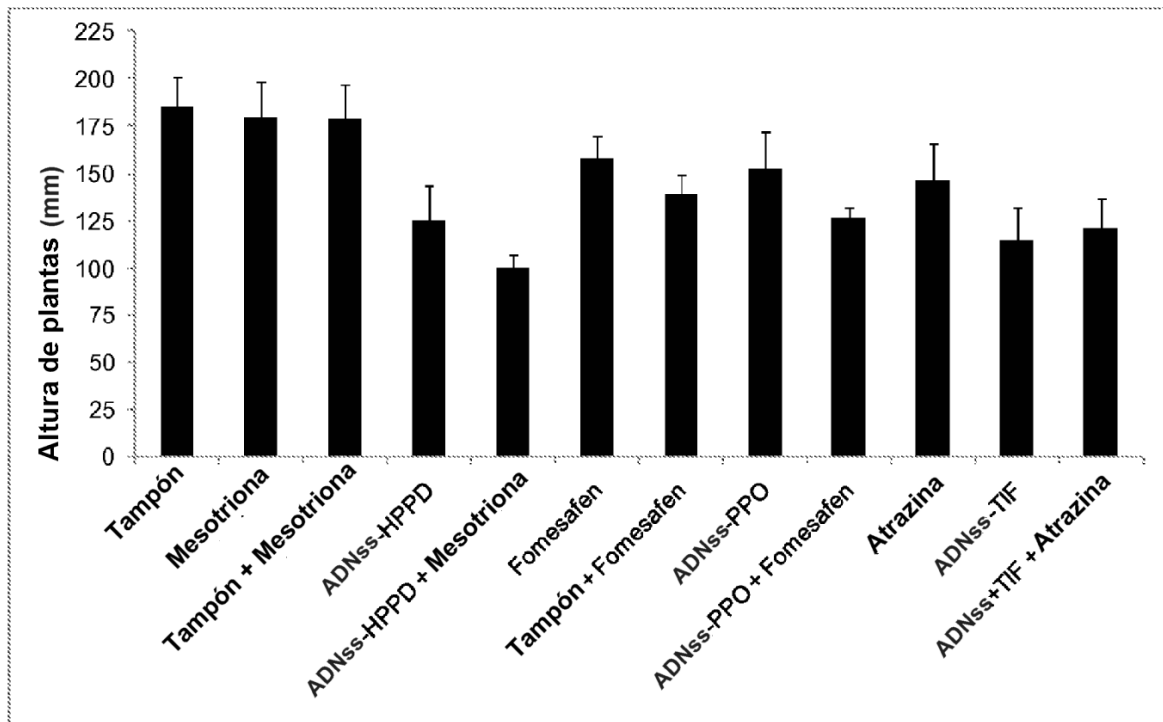


Figura 33





**Figura 34**

```

      810      820      830      840      850      860
PDS-2_ GTATGAAC TTCAGAATATTATACCGGATCAATATATTATGCT--GAAATATT--TTTCG
                |||| |||| || || |||| | ||||
PDS-1_ GCTGTATCATATCTTCTTCTTTAGAACACTAATAAATTAAACTTCGAGATAATGATTTCT
      330      340      350      360      370      380
      870      880      890      900      910
PDS-2_ GAC-----TTTAAATAATTTCTT-TATTTAAATTTATTTTTATACAAAAATAACTAAATT
      |||  | |||| || | | ||| | ||||  || | |||||  ||||
PDS-1_ GACAAGAGTATAAAACAAGTGCATCTATGAAGATTTGAGGTTGTCCAAAAAAGTGACAATT
      390      400      410      420      430      440
      920      930      940      950      960      970
PDS-2_ TCAATTACTTTTTAAA----ATTATGATTATTTTTCAATTACCACT-TATACATCCTGC--
      |  | | | ||||  |||  ||||| || | | | ||| || | | |
PDS-1_ TTGGGTTCCCTATAAACTGTATTTACATTATTGTT-ATTTGCAACTATAAAAATTTTAGAT
      450      460      470      480      490
      980      990      1000      1010
PDS-2_ TATTTTGAAT-----TTCACCCGAAA-GAAC-TACTACTATACGTGGATC---CTC
      ||||| ||  |||| | ||| ||| || ||| | | |||  |||
PDS-1_ TATTTCCAAGCTCAGTTTCTTCAACTTAAATGAAGGTAGCACTTGAATTTTCATCAGCCTC
      500      510      520      530      540      550
      1020      1030      1040      1050      1060      1070
PDS-2_ AATGACCCAGTAACCCAAGTGGGAGATGTGTGCAAAGTGGTCAAATCTTAGAAGGAATGA
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
PDS-1_ TATGACCCAGTAACCCATGTGGGAGATGGGAGCAAAGTGGTCAAACCTTAGAAGGAAT
      560      570      580      590      600      610

```

**Secuencia promotora de PDS-1 (SEQ ID NO:319)**

**y**

**Secuencia promotora de PDS-2 (SEQ ID NO:320)**

Figura 35

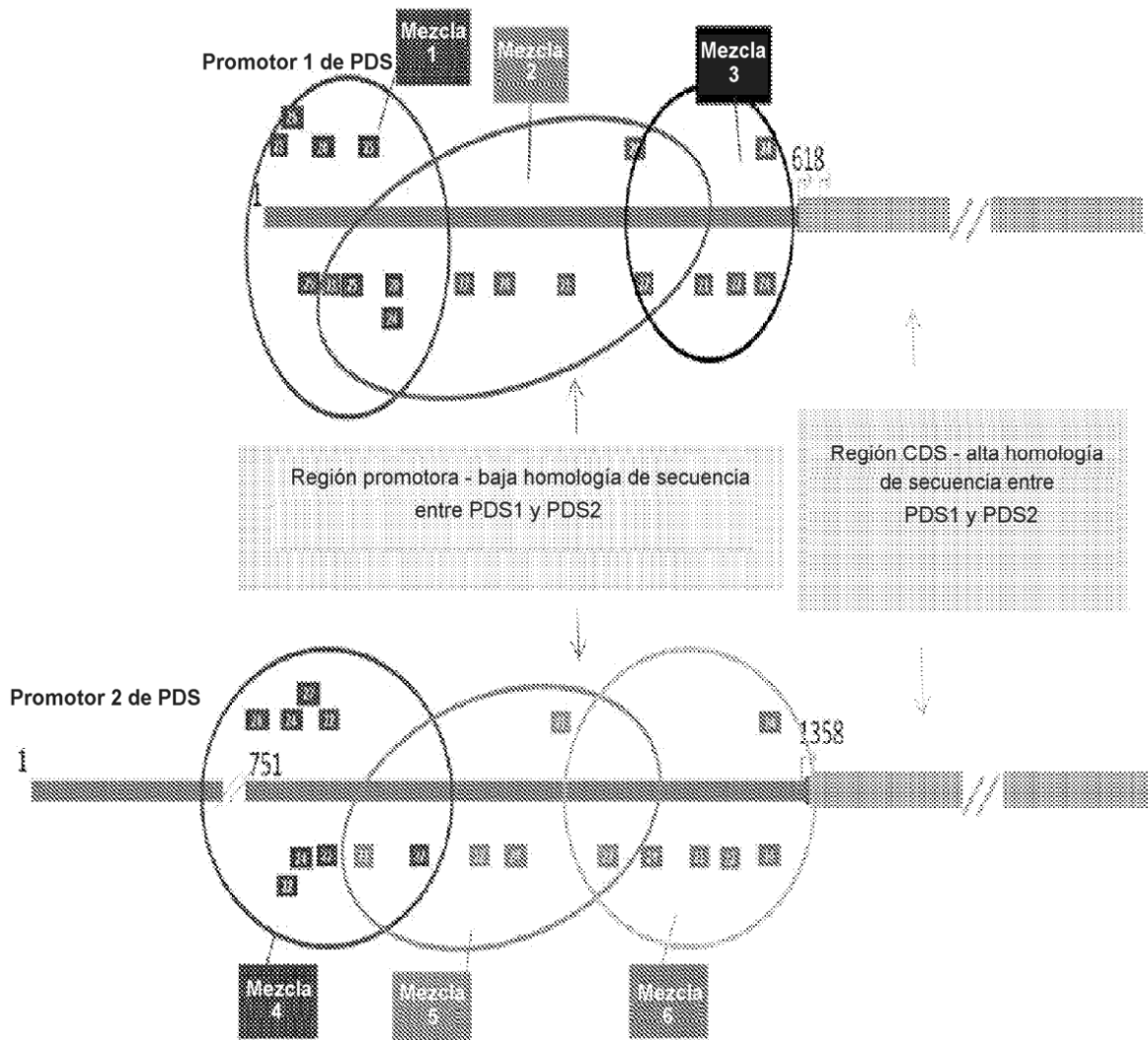
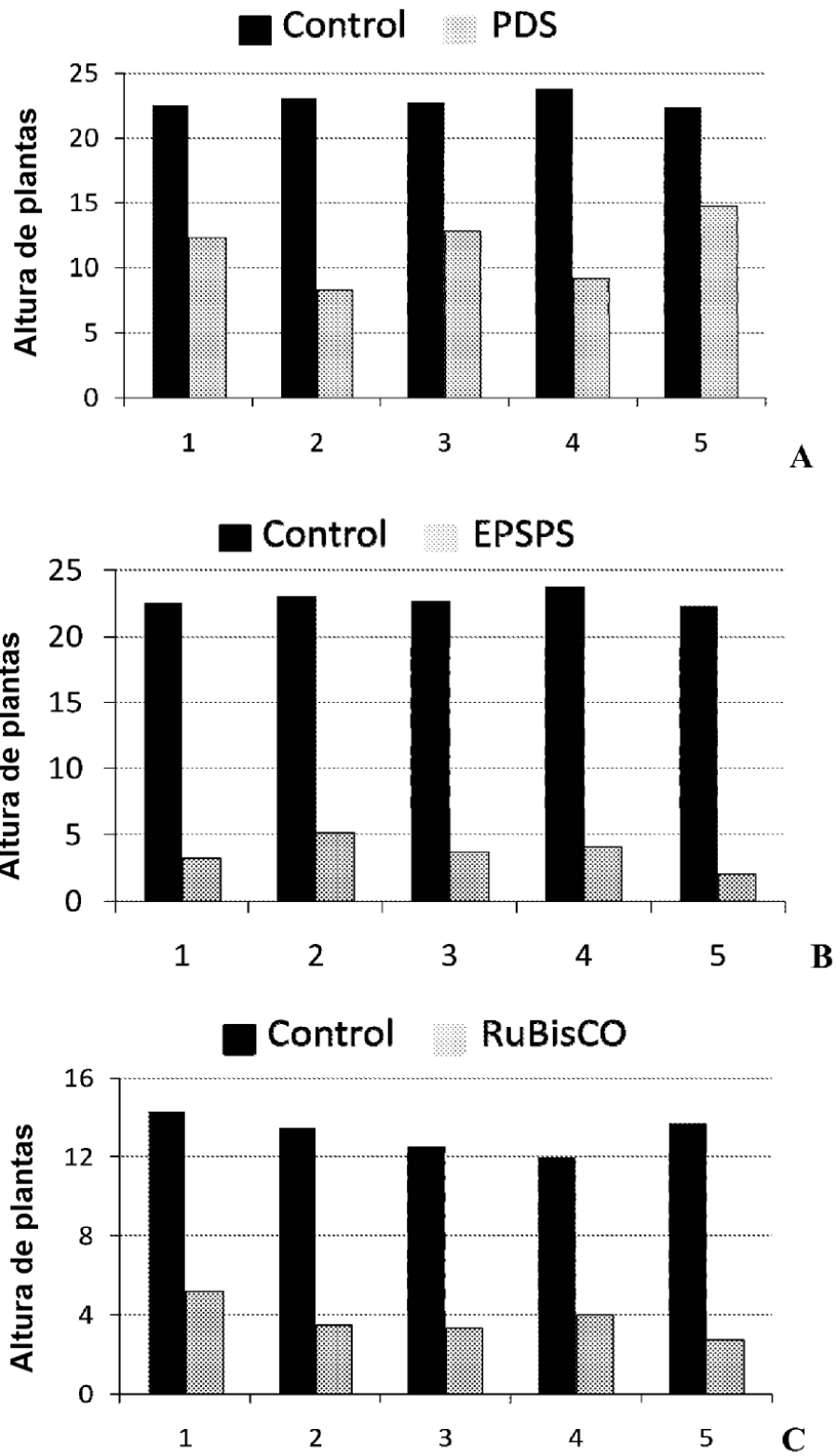


Figura 36



**Figura 37**

**Oligo de ADN de EPSPS**

**Tampón (control)**

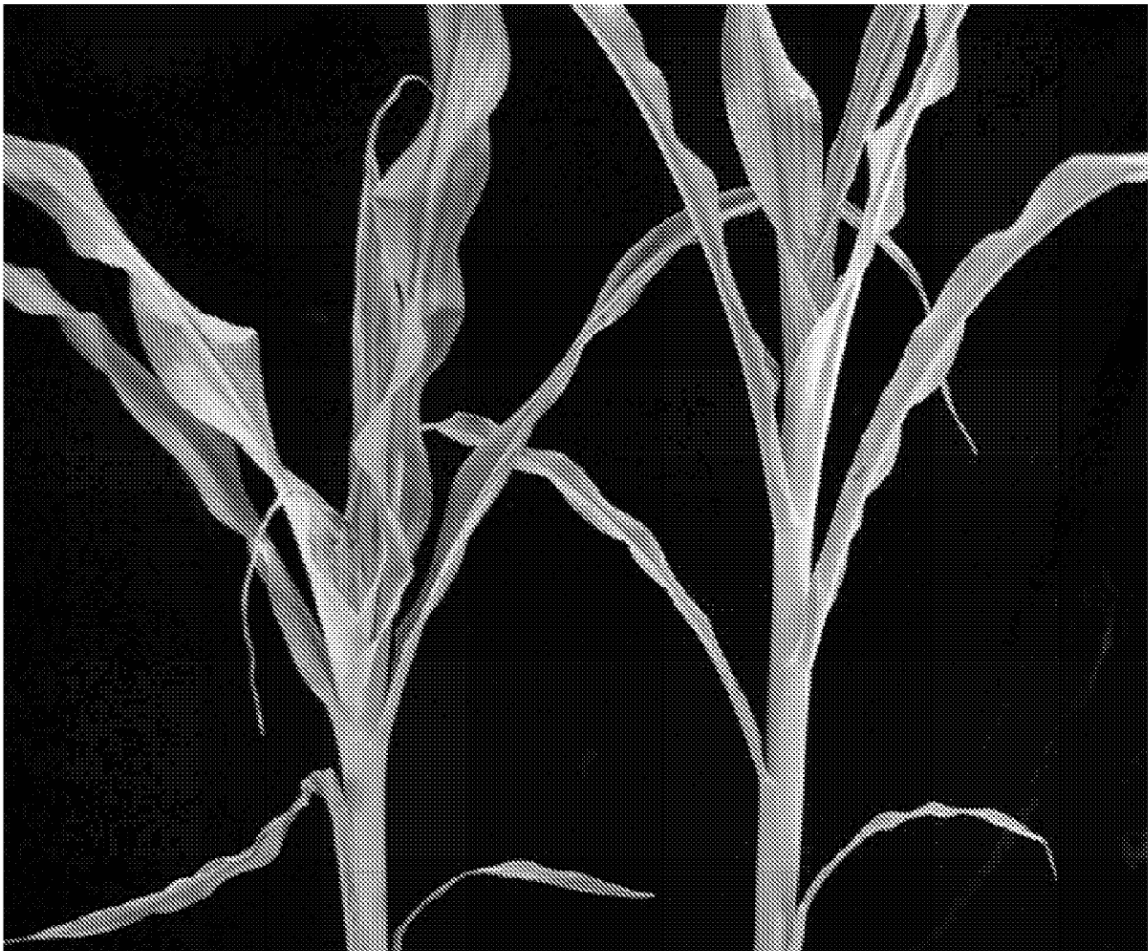
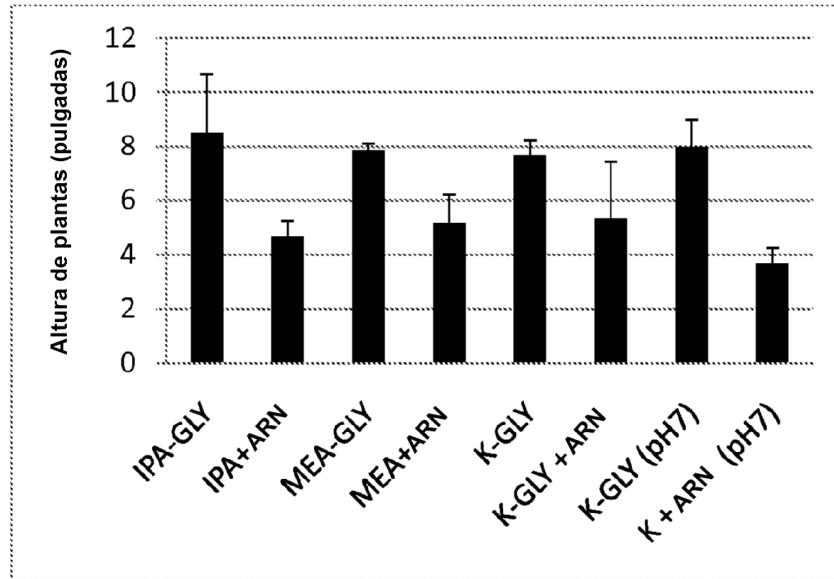
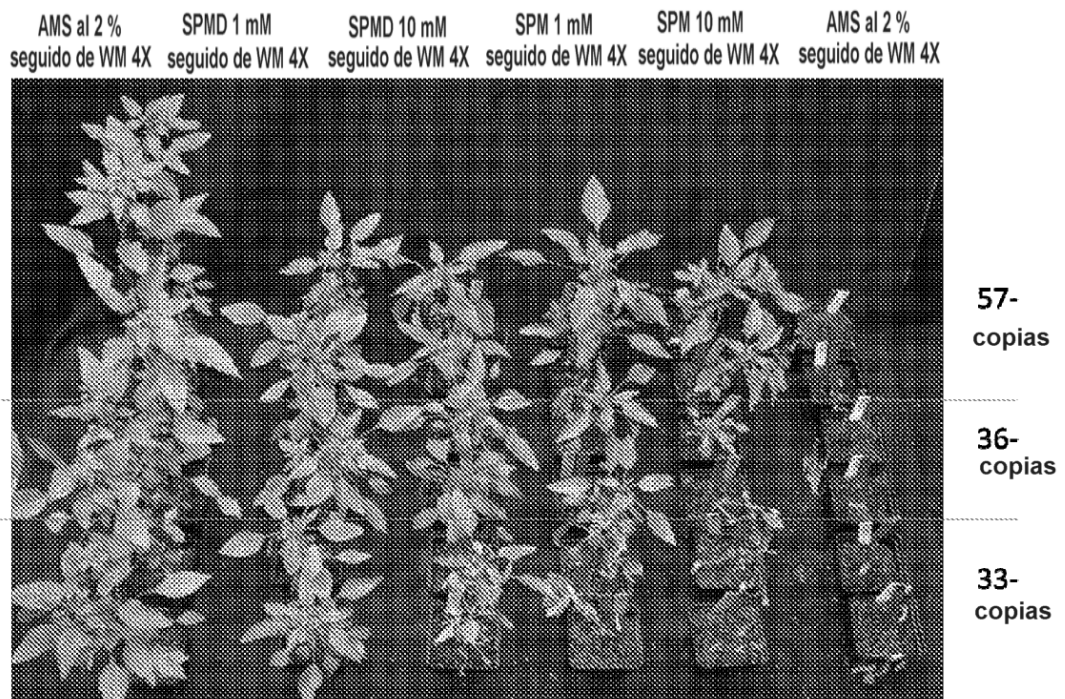


Figura 38



**Figura 39**



Comparación de espermina (SPM), espermidina (SPMD), sulfato de amonio (AMS)