

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 927**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 3/04 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2012 PCT/US2012/054883**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13040049**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2012 E 12831945 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2755467**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para el control de malezas**

30 Prioridad:

13.09.2011 US 201161534076 P

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

11.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FINNESSY, JOHN J.;
ADER, DANIEL;
LI, ZHAOLONG;
MASUCCI, JAMES D.;
TAO, NENGBING;
SHAH, RONAK HASMUKH y
TAYLOR, JENNIFER CHOU**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 645 927 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

Procedimientos y composiciones para el control de malezas

Campo

5 Los procedimientos y composiciones se refieren, en general, al campo de control de malezas. Más específicamente, se refieren a genes de glutamina sintetasa (GS) en plantas y composiciones que contienen moléculas de polinucleótido para modular su expresión. También se proporcionan procedimientos y composiciones de utilidad para controlar malezas.

Antecedentes

10 Las malezas son plantas que compiten con plantas cultivadas en un ambiente agronómico y cuestan a los agricultores billones de dólares anuales en pérdidas de cultivos y gasto de esfuerzos para mantener a las malezas bajo control. Las malezas también sirven como huéspedes para enfermedades en cultivos y plagas de insectos. Las pérdidas causadas por las malezas en ambientes de producción agrícola incluyen reducciones en el rendimiento de los cultivos, menor calidad de los cultivos, mayores costos de irrigación, mayores costos de recolección, menor valor de la tierra, lesiones al ganado y daños a los cultivos provenientes de insectos y enfermedades albergadas por las malezas. Los principales medios por los cuales las malezas causan estos efectos son: 1) competencia con plantas de cultivo para agua, nutrientes, luz solar y otros factores esenciales para el crecimiento y el desarrollo, 2) producción de productos químicos tóxicos o irritantes que causan problemas de salud en humanos o animales, 3) producción de inmensas cantidades de semillas o partes reproductivas vegetativas o ambas que contaminan los productos agrícolas y perpetúan las especies en tierras agrícolas y 4) producción en tierras agrícolas y no agrícolas de vastas cantidades de vegetación que deben ser eliminadas. Las malezas tolerantes a herbicidas son un problema con casi todos los herbicidas en uso, hay una necesidad de controlar efectivamente estas malezas. Hay más de 365 biotipos de malezas actualmente identificadas como resistentes a uno o varios herbicidas por el Herbicide Resistance Action Committee (HRAC), el North American Herbicide Resistance Action Committee (NAHRAC) y el Weed Science Society of America (WSSA).

25 La enzima glutamina sintetasa (GS) es una enzima esencial en el metabolismo del nitrógeno al catalizar la condensación de glutamato y amoníaco para formar glutamina. Esta enzima es el blanco de herbicidas de ácidos fosfínicos que incluyen glufosinato-amonio y bialafos.

Sumario

30 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de control de plantas que comprende: tratar una planta con una composición mediante aplicación externa de la composición a la planta, en el que la composición comprende un polinucleótido de ARN bicatenario (ARNds) y un agente de transferencia, en el que dicho polinucleótido de ARNds es idéntico o complementario de un transcrito de ARN de una secuencia del gen de la glutamina sintetasa (GS), en el que dicha secuencia del gen GS se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-4, 6, 7, 9, 10, 14, 16, 17, 20, 21, 23, 27-49, 51-59, y un fragmento de polinucleótido de al menos 18 nucleótidos contiguos del mismo, en el que dicho agente de transferencia acondiciona la superficie de dicha planta para la permeación de dicho polinucleótido de ARNds, y mediante lo cual se suprime o retrasa el crecimiento, desarrollo, o capacidad reproductora de dicha planta, o dicha planta es más sensible a un herbicida inhibidor de GS como resultado de dicha composición que comprende dicho polinucleótido de ARNds, con respecto a una planta no tratada con dicha composición.

40 En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un polinucleótido de ARNds y un agente de transferencia, en el que dicho polinucleótido de ARNds es idéntico o complementario de un transcrito de ARN de una secuencia del gen GS, en el que dicha secuencia del gen GS se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-4, 6, 7, 9, 10, 14, 16, 17, 20, 21, 23, 27-49, 51-59, y un fragmento de polinucleótido de al menos 18 nucleótidos contiguos del mismo, en el que dicho agente de transferencia acondiciona la superficie de una planta para la permeación de dicho polinucleótido de ARNds, y mediante lo cual dicha planta tratada con dicha composición tiene un crecimiento, desarrollo, o capacidad reproductora suprimida o retrasada, o dicha planta es más sensible a un herbicida inhibidor de GS como resultado de dicha composición que comprende dicho polinucleótido de ARNds, con respecto a una planta no tratada con dicha composición.

50 En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para reducir la expresión de un gen GS en una planta que comprende: la aplicación externa a dicha planta de una composición que comprende un polinucleótido de ARNds y un agente de transferencia, en el que dicho polinucleótido de ARNds es idéntico o complementario de un transcrito de ARN de una secuencia del gen GS, en el que dicha secuencia del gen GS se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-4, 6, 7, 9, 10, 14, 16, 17, 20, 21, 23, 27-49, 51-59, y un fragmento de polinucleótido de al menos 18 nucleótidos contiguos del mismo, en el que dicho agente de transferencia acondiciona la superficie de dicha planta para la permeación de dicho polinucleótido de ARNds, y mediante lo cual se reduce dicha expresión de dicho gen GS, con respecto a una planta en la que no se aplicó dicha composición.

La invención proporciona también un casete de expresión microbiana que comprende un polinucleótido que tiene al menos 18 nucleótidos contiguos, al menos 19 nucleótidos contiguos, al menos 20 nucleótidos contiguos, o al menos 21 nucleótidos contiguos en longitud que son idénticos o complementarios a al menos 18 nucleótidos contiguos de una secuencia del gen GS seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-4, 6, 7, 9, 10, 14, 16, 17, 20, 21, 23, 27-49, y 51-59.

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para identificar polinucleótidos de ARNs útiles para modular la expresión del gen GS cuando se trata externamente una planta que comprende: a) proporcionar una pluralidad de polinucleótidos de ARNs que comprende una región idéntica o complementaria a al menos 18 nucleótidos contiguos de un transcrito de ARN de una secuencia del gen GS seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-4, 6, 7, 9, 10, 14, 16, 17, 20, 21, 23, 27-49, y 51-59; b) tratar externamente dicha planta con una composición que comprende uno o más de dichos polinucleótidos de ARNs y un agente de transferencia; c) analizar dicha planta, o un extracto vegetal de la misma para modular la expresión del gen GS, en el que dicho agente de transferencia acondiciona la superficie de dicha planta para la permeación por uno o más de dichos polinucleótidos de ARNs, y d) dicha planta tratada con dicha composición tiene su crecimiento, desarrollo, o capacidad reproductora suprimido o retrasado, o dicha planta es más sensible a un herbicida inhibidor de GS como resultado de dicha composición, con respecto a una planta no tratada con dicha composición.

La invención proporciona también una composición que comprende un polinucleótido de ARNs y un agente de transferencia, en el que dicho polinucleótido de ARNs es idéntico o complementario de un transcrito de ARN de una secuencia del gen GS, en el que dicha secuencia génica de GS se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 2046 -2056 y un fragmento de polinucleótido de al menos 18 nucleótidos contiguos, en el que dicho agente de transferencia acondiciona la superficie de una planta para la permeación de dicho polinucleótido de ARNs, y mediante lo cual dicha planta tratada con dicha composición tiene su crecimiento, desarrollo, o capacidad reproductora suprimido o retrasado o dicha planta es más sensible a un herbicida inhibidor de GS como resultado de dicha composición que comprende dicho polinucleótido de ARNs, con respecto a una planta no tratada con dicha composición.

Descripción detallada

Se proporcionan procedimientos y composiciones que contienen un polinucleótido que proporcionan regulación, represión o retraso de GS (glutamina sintetasa) gene expresión y mejor control de especies de plantas herbáceas y, de modo importante, biotipos de malezas resistentes a inhibidor de GS. Los aspectos del procedimiento se pueden aplicar para controlar diversas plantas herbáceas en ambientes agronómicos y otros ambientes cultivados.

Las siguientes definiciones y procedimientos se proporcionan para definir mejor la presente invención y guiar a los expertos en el arte en la práctica de la presente invención. A menos que se note otra cosa, los términos se han de entender de acuerdo con el uso convencional por los expertos en el arte. Cuando un término se proporciona en singular, los inventores también contemplan aspectos de la invención descritos por el plural de ese término.

Por polinucleótidos “no transcribibles” se entiende que los polinucleótidos no comprenden una unidad de transcripción completa de polimerasa II. Tal como se usa en la presente, “solución” se refiere a mezclas homogéneas y mezclas no homogéneas tales como suspensiones, coloides, micelas y emulsiones.

Las plantas herbáceas son plantas que compiten con plantas cultivadas, aquellas de particular importancia incluyen, pero sin limitación, importantes malezas invasivas y nocivas y biotipos resistentes a herbicidas en la producción de cultivos, tales como, *Amaranthus* species –*A. albus*, *A. blitoides*, *A. hybridus*, *A. palmeri*, *A. powellii*, *A. retroflexus*, *A. spinosus*, *A. tuberculatus* y *A. viridis*; especies de *Ambrosia* – *A. trifida*, *A. artemisifolia*; especies de *Lolium* –*L. multiflorum*, *L. rigidum*, *L. perenne*; especies de *Digitaria* –*D. insularis*; *Euphorbia* species –*E. heterophylla*; especies de *Kochia* – *K. scoparia*; especies de *Sorghum* –*S. halepense*; especies de *Conyza* –*C. bonariensis*, *C. canadensis*, *C. sumatrensis*; especies de *Chloris* –*C. truncate*; especies de *Echinochola* – *E. colona*, *E. crus-galli*; especies de *Eleusine* –*E. indica*; especies de *Poa* –*P. annua*; especies de *Plantago* –*P. lanceolata*; especies de *Avena* – *A. fatua*; especies de *Chenopodium* – *C. album*; especies de *Setaria* – *S. viridis*, *Abutilon theophrasti*, especies de *Ipomoea*, especies de *Sesbania*, especies de *Cassia*, especies de *Sida*, especies de *Brachiaria* y especies de *Solanum*.

Las especies adicionales de plantas herbáceas halladas en las áreas cultivadas incluyen *Alopecurus myosuroides*, *Avena sterilis*, *Avena sterilis ludoviciana*, *Brachiaria plantaginea*, *Bromus diandrus*, *Bromus rigidus*, *Cynosurus echinatus*, *Digitaria ciliaris*, *Digitaria ischaemum*, *Digitaria sanguinalis*, *Echinochloa oryzicola*, *Echinochloa phyllopogon*, *Eriochloa punctata*, *Hordeum glaucum*, *Hordeum leporinum*, *Ischaemum rugosum*, *Leptochloa chinensis*, *Lolium persicum*, *Phalaris minor*, *Phalaris paradoxa*, *Rottboellia exalta*, *Setaria faberi*, *Setaria viridis* var, *robusta*–*alba schreiber*, *Setaria viridis* var, *robusta* –*purpurea*, *Snowdenia polystachea*, *Sorghum sudanese*, *Alisma plantago-aquatica*, *Amaranthus lividus*, *Amaranthus quitensis*, *Ammania auriculata*, *Ammania coccinea*, *Anthemis cotula*, *Apera spica-venti*, *Bacopa rotundifolia*, *Bidens pilosa*, *Bidens subalternans*, *Brassica tournefortii*, *Bromus tectorum*, *Camelina microcarpa*, *Chrysanthemum coronarium*, *Cuscuta campestris*, *Cyperus difformis*, *Damasonium minus*, *Descurainia sophia*, *Diploaxis tenuifolia*, *Echium plantagineum*, *Elatine triandra* var, *pedicellata*, *Euphorbia heterophylla*, *Fallopia convolvulus*, *Fimbristylis miliacea*, *Galeopsis tetrahit*, *Galium spurium*, *Helianthus annuus*, *Iva xanthifolia*, *Ixophorus unisetus*, *Ipomoea indica*, *Ipomoea purpurea*, *Ipomoea sepiaria*, *Ipomoea aquatic*, *Ipomoea*

5 *triloba*, *Lactuca serriola*, *Limncharis flava*, *Limnophila erecta*, *Limnophila sessiliflora*, *Lindernia dubia*, *Lindernia dubia* var. *major*, *Lindernia micrantha*, *Lindernia procumbens*, *Mesembryanthemum crystallinum*, *Monochoria korsakowii*, *Monochoria vaginalis*, *Neslia paniculata*, *Papaver rhoeas*, *Parthenium hysterophorus*, *Pentzia suffruticosa*, *Phalaris minor*, *Raphanus raphanistrum*, *Raphanus sativus*, *Rapistrum rugosum*, *Rotala indica* var. *uliginosa*, *Sagittaria guyanensis*, *Sagittaria montevidensis*, *Sagittaria pygmaea*, *Salsola iberica*, *Scirpus juncooides* var. *ohwianus*, *Scirpus mucronatus*, *Setaria lutescens*, *Sida spinosa*, *Sinapis arvensis*, *Sisymbrium orientale*, *Sisymbrium thellungii*, *Solanum ptycanthum*, *Sonchus asper*, *Sonchus oleraceus*, *Sorghum bicolor*, *Stellaria media*, *Thlaspi arvense*, *Xanthium strumarium*, *Arctotheca calendula*, *Conyza sumatrensis*, *Crassocephalum crepidioides*, *Cuphea carthagenensis*, *Epilobium adenocaulon*, *Erigeron philadelphicus*, *Landoltia punctata*, *Lepidium virginicum*,
10 *Monochoria korsakowii*, *Solanum americanum*, *Solanum nigrum*, *Vulpia bromoides*, *Youngia japonica*, *Hydrilla verticillata*, *Carduus nutans*, *Carduus pycnocephalus*, *Centaurea solstitialis*, *Cirsium arvense*, *Commelina diffusa*, *Convolvulus arvensis*, *Daucus carota*, *Digitaria ischaemum*, *Echinochloa crus-pavonis*, *Fimbristylis miliacea*, *Galeopsis tetrahit*, *Galium spurium*, *Limnophila erecta*, *Matricaria perforata*, *Papaver rhoeas*, *Ranunculus acris*, *Siliva sessilis*, *Sphenoclea zeylanica*, *Stellaria media*, *Nassella trichotoma*, *Stipa neesiana*, *Agrostis stolonifera*,
15 *Polygonum aviculare*, *Alopecurus japonicus*, *Beckmannia syzigachne*, *Bromus tectorum*, *Chloris inflata*, *Echinochloa erecta*, *Portulaca oleracea* y *Senecio vulgaris*. Se cree que todas las plantas contienen un gen de glutamina sintetasa (GS) en su genoma, cuya secuencia se puede aislar y polinucleótidos hechos de acuerdo con los procedimientos de la presente invención que son de utilidad para la regulación, supresión o retraso de la expresión de el blanco GS gene en las plantas y el crecimiento o el desarrollo de las plantas tratadas.

20 Algunas plantas cultivadas también pueden ser plantas herbáceas que proliferan en ambientes no deseados. Por ejemplo, las plantas de maíz que crecen en un campo de soja. Los cultivos transgénicos con una o varias tolerancias a herbicidas necesitarán procedimientos de manejo especializados para controlar malezas y plantas de cultivo voluntarias. La presente invención permite controlar el transgén para tolerancia a herbicidas para permitir que las plantas tratadas se vuelvan sensibles a los herbicidas. Por ejemplo, las secuencias transgénicas de ADN GS en
25 eventos transgénicos que incluyen, pero sin limitación, DP-004114-3, DAS-44406-6, DAS-68416-4, T304-40XGHB119, LLRICE601, TC-6275, LLCotton25, MS1 & RF1/RF2, Topas 19/2, Line 1507, MS6, GU262, A5547-127, T-120-7, W62, W98, A2704-12, A2704-21, A5547-35 y B16.

Un "disparador" o "polinucleótido disparador" de la presente invención es una molécula de polinucleótido que es homóloga o complementaria a un gen de polinucleótido blanco. Las moléculas de polinucleótido disparadoras modulan la expresión del gen blanco cuando se aplican tópicamente a la superficie de una planta con un agente de transferencia, en donde una planta tratada con dicha composición tiene su crecimiento o desarrollo o capacidad reproductiva regulada, suprimida o retrasada o dicha planta es más sensible a un herbicida inhibidor de GS como resultado de dicho polinucleótido que contiene la composición respecto a una planta no tratada con una composición que contiene la molécula disparadora. Los polinucleótidos disparadores revelados en la presente se describen en
35 general en relación con la secuencia génica blanco y se pueden usar en orientación con sentido (homólogo) o antisentido (complementario) como moléculas monocatenarias o comprenden ambas cadenas como moléculas bicatenarias o variantes de nucleótidos y sus nucleótidos modificados según las diversas regiones de un gen blanco.

Se contempla que la composición de la presente invención contenga múltiples polinucleótidos y herbicidas que incluyen, pero sin limitación, GS gene polinucleótidos disparadores y un herbicida inhibidor de GS y cualquiera o
40 varios genes de herbicida adicional de polinucleótidos disparadores blanco y los herbicidas relacionados y cualquiera o varios polinucleótidos disparadores génicos esenciales adicionales. Los genes esenciales son genes en una planta que proporcionan enzimas clave u otras proteínas, por ejemplo, una enzima biosintética, enzima metabolizante, receptor, proteína de transducción de señales, producto génico estructural, factor de transcripción o supervivencia del organismo o célula o incluida en el crecimiento normal y el desarrollo de la planta (Meinke, et al., Trends Plant Sci. 2008 Sep;13(9):483-91). La supresión de un gen esencial mejora el efecto de un herbicida que afecta la función de un producto génico diferente del gen esencial suprimid. Las composiciones de la presente invención pueden incluir diversos polinucleótidos disparadores que modulan la expresión de un gen esencial distinto de un gen GS.

Los herbicidas para los que se han demostrado transgenes para la tolerancia de plantas y se puede aplicar el procedimiento de la presente invención, incluyen, pero sin limitación: herbicidas de tipo auxina, glifosato, glufosinato, sulfonilureas, imidazolinonas, bromoxinilo, delapon, dicamba, ciclohezandiona, inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa, herbicidas inhibidores de 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa. Por ejemplo, transgenes y sus moléculas de polinucleótido que codifican proteínas incluidas en tolerancia a herbicida se conocen en el arte e incluyen, pero sin limitación, una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), por ejemplo, como se describe más
55 completamente en las patentes U. S. Nros. 7.807.791 (SEQ ID NO:5); 6.248.876 B1; 5.627.061; 5.804.425; 5.633.435; 5.145.783; 4.971.908; 5.3372.910; 5.188.642; 4.940.835; 5.866.775; 6.225.114 B1; 6.130.366; 5.3370.667; 4.535.060; 4.769.061; 5.633.448; 5.510.471; patente U. S. N.º Re. 36.449; pat. U. S. Nros. RE 37.287 E; y 5.491.288; tolerancia a sulfonilurea y/o imidazolinona, por ejemplo, tal como se describe más exhaustivamente en las patentes U. S. Nros. 5.605.011; 5.013.659; 5.141.870; 5.767.361; 5.7337.180; 5.304.732; 4.761.373; 5.3337.107; 5.928.937; y 5.378.824; y la publicación internacional WO 96/33270; tolerancia a herbicidas que inhiben las hidroxifenilpiruvatodioxigenasas en plantas se describen en las patentes U. S. Nros. 6.245.968 B1; 6.268.549; y 6.069.115; publicación de patentes US 20110191897 y US 7.3372.379 SEQ ID NO:3; US 7.935.869; US 7.304.209, SEQ ID NO:1, 3,5 y 15; polinucleótidos de ariloxialcanoato dioxigenasa, que confieren tolerancia a 2,4-D y otros

herbicidas de fenoxiauxina así como a herbicidas de ariloxifenoxipropionato tal como se describe, por ejemplo, en los documentos WO 2005/107437; US 7.838.733 SEQ ID NO:5; y polinucleótidos de tolerancia a dicamba tal como se describe, por ejemplo, en Herman et al. (2005) *J. Biol. Chem.* 280: 24759–24767. Otros ejemplos de rasgos de tolerancia a herbicidas incluyen aquellos conferidos por polinucleótidos que codifican una fosfinotricina acetiltransferasa exógena, tal como se describe en las patentes U. S. Nros. 5.969.213; 5.489.520; 5.550.3378; 5.874.265; 5.919.675; 5.561.236; 5.648.477; 5.646.024; 6.177.616; y 5.879.903. Las plantas que contienen una fosfinotricina acetiltransferasa exógena pueden exhibir una mejor tolerancia a herbicidas de glufosinato, que inhiben la enzima glutamina sintetasa. Adicionalmente, los polinucleótidos de tolerancia a herbicidas incluyen aquellos conferidos por polinucleótidos que confieren una actividad alterada de protoporfirinógeno oxidasa (protox), tal como se describe en las patentes U. S. Nros. 6.288.306 B1; 6.282.837 B1; y 5.767.373; y WO 01/12825. Las plantas que contienen tales polinucleótidos pueden exhibir mejor tolerancia a cualquiera de una variedad de herbicidas que se dirigen a la enzima protox (también mencionado como inhibidores protox). Los polinucleótidos que codifican una glifosato oxidorreductasa y una glifosato–N–acetiltransferasa (GOX descrito en la patente U. S. 5.463.175 y GAT descrito en la publicación de patente U. S. 20030083480, dicamba monooxigenasa publicación de patente U. S. 20030135879, todos los cuales se incorporan en la presente por referencia); una molécula de polinucleótido que codifica la bromoxinilo nitrilasa (*Bxn* descrito en la patente U. S. N.º 4.810.648 para la tolerancia a bromoxinilo, que se incorpora en la presente por referencia); una molécula de polinucleótido que codifica fitoeno desaturasa (*crtl*) descrita en Misawa et al, (1993) *Plant J.* 4:833–840 y Misawa et al, (1994) *Plant J.* 6:481–489 para la tolerancia a norflurazona; una molécula de polinucleótido que codifica acetohidroxiácido sintasa (AHAS, *aka* ALS) descrita en Sathasiivan et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:3378–2193 para la tolerancia a herbicidas de sulfonilurea; y el gen *bar* descrito en DeBlock, et al. (1987) *EMBO J.* 6:2513–2519 para la tolerancia a glufosinato y bialafos. Las regiones codificantes transgénicas y elementos de regulación de los genes de tolerancia a herbicidas son blancos en los que polinucleótidos disparadores y herbicidas se pueden incluir en la composición de la presente invención.

Las composiciones incluyen un componente que es un herbicida inhibidor de GS, que incluyen miembros del grupo de herbicidas de ácidos fosfinicos tales como glufosinato–amonio y bialafos.

Numerosos herbicidas con similares o diferentes modos de acción (en la presente, mencionados como coherbicidas) están a disposición, que se pueden añadir a la composición de la presente invención, por ejemplo, miembros de las familias de herbicidas que incluyen, pero sin limitación, herbicidas de amida, herbicidas de ácidos aromáticos, herbicidas de arsénico, herbicidas de benzotiazol, herbicidas de benzoilciclohexandiona, herbicidas de benzofuranilalquilsulfonato, herbicidas de carbamato, herbicidas de ciclohexenoxima, herbicidas de ciclopropilisoaxazol, herbicidas de dicarboximida, herbicidas de dinitroanilina, herbicidas de dinitrofenol, herbicidas de éter difenilico, herbicidas de ditiocarbamato, herbicidas alifáticos halogenados, herbicidas de imidazolinona, herbicidas inorgánicos, herbicidas de nitrilo, herbicidas de organofósforo, herbicidas de oxadiazolona, herbicidas de oxazol, herbicidas de fenoxi, herbicidas de fenilendiamina, herbicidas de pirazol, herbicidas de piridazina, herbicidas de piridazinona, herbicidas de piridina, herbicidas de pirimidindiamina, herbicidas de pirimidiniloxibencilamina, herbicidas de amonio cuaternario, herbicidas de tiocarbamato, herbicidas de tiocarbonato, herbicidas de tiourea, herbicidas de triazina, herbicidas de triazinona, herbicidas de triazol, herbicidas de triazolona, herbicidas de triazolopirimidina, herbicidas de uracilo y herbicidas de urea. En particular, las tasas de uso de los herbicidas añadidos se pueden reducir en composiciones que comprenden los polinucleótidos de la invención. El uso de reducciones en las tasas de los herbicidas añadidos adicionales puede ser del 10–25%, 26–50%, 51–75% o que mejoran la actividad de los polinucleótidos y la composición herbicida y está contemplado como un aspecto de la invención. Los coherbicidas representativos de las familias incluyen, pero sin limitación, acetoclor, acifluorfenol, acifluorfenol–sodio, aclonifeno, acroleína, alaclor, aloxidim, alcohol alílico, ametrina, amicarbazona, amidosulfurona, aminopirralida, amitrol, sulfamato de amonio, anilofos, asulam, atraton, atrazina, azimsulfurona, BCPC, beflubutamida, benazolina, benfluralina, benfuresato, bensulfurona, bensulfurona–metilo, bensulide, bentazona, benzofendizona, benzobiciclona, benzofenap, bifenox, bilanafos, bispiribac, bispiribac–sodio, bórax, bromacilo, bromobutide, bromoxinilo, butaclor, butafenacilo, butamifos, butralina, butroxitidim, butilato, ácido cacodílico, clorato de calcio, cafenstrol, carbetamida, carfentrazona, carfentrazona–etilo, CDEA, CEPC, clorflurenol, clorflurenol–metilo, cloridazona, clorimurona, clorimurona–etilo, ácido cloroacético, clorotolurona, clorprofam, clorsulfurona, clortal, clortal–dimetilo, cinidona–etilo, cinmetilina, cinosulfurona, cisanilida, cletodim, clodinafop, clodinafop–propargilo, clomazona, clomeprop, clopiralida, cloransulam, cloransulam–metilo, CMA, 4–CPB, CPMF, 4–CPP, CPPC, cresol, cumilurona, cianamida, cianazina, cicloato, ciclofurfamurona, cicloxitidim, cihalofop, cihalofop–butilo, 2,4–D, 3,4–DA, daimurona, dalapona, dazomet, 2,4–DB, 3,4–DB, 2,4–DEB, desmedifam, dicamba, diclobenilo, orto–diclorobenceno, para–diclorobenceno, dicloroprop, dicloroprop–P, diclofop, diclofop–metilo, diclosulam, difenzoquat, metilsulfato de difenzoquat, diflufenicano, diflufenzopir, dimefufurona, dimepiperato, dimetaclor, dimetametrina, dimetenamida, dimetenamida–P, dimetipina, ácido dimetilarsínico, dinitramina, dinoterb, difenamida, diquat, dibromuro de diquat, ditiopir, diurona, DNOC, 3,4–DP, DSMA, EBEP, endotal, EPTC, esprocarb, etaflluralina, etametsulfurona, etametsulfurona–metilo, etofumesato, etoxifeno, etoxisulfurona, etobenzanida, fenoxaprop–P, fenoxaprop–P–etilo, fentrazamida, sulfato ferroso, flamprop–M, flazasulfurona, florasulam, fluazifop, fluazifop–butilo, fluazifop–P, fluazifop–P–butilo, flucarbazona, flucarbazona–sodio, flucetosulfurona, flucloalinalina, flufenacet, flufenpir, flufenpir–etilo, flumetsulam, flumiclorac, flumiclorac–pentilo, flumioxazina, fluometurona, fluoroglicofeno, fluoroglicofeno–etilo, flupropanato, flupirsulfurona, flupirsulfurona–metilo–sodio, flurenol, fluridona, fluorocloridona, fluoroxipir, flurtamona, flutiacet, flutiacet–metilo, fomesafeno, foramsulfurona, fosamina, glufosinato, glufosinato–amonio, glifosato, halosulfurona, halosulfurona–metilo, haloxifop, haloxifop–P, HC–252, hexazinona, imazametabenz, imazametabenz–

metilo, imazamox, imazapic, imazapir, imazaquina, imazetapir, imazosulfurona, indanofano, yodometano, yodosulfurona, yodosulfurona-metil-sodio, ioxinilo, isoproturona, isourona, isoxabeno, isoxaclortol, isoxaflutol, karbutilato, lactofeno, lenacilo, linurona, MAA, MAMA, MCPA, MCPA-tioetilo, MCPB, mecoprop, mecoprop-P, mefenacet, mefluidide, mesosulfurona, mesosulfurona-metilo, mesotriona, metam, metamifop, metamitrona, metazaclor, methabenztiaturona, ácido metilarsónico, metildimrona, isotiocianato de metilo, metobenzurona, metolaclor, S-metolaclor, metosulam, metoxurona, metribuzina, metsulfurona, metsulfurona-metilo, MK-66, molinato, monolinurona, MSMA, naproanilida, napropamida, naptalam, neburona, nicosulfurona, ácido nonanoico, norflurazona, ácido oleico (ácidos grasos), orbencarb, ortosulfamurona, orizalina, oxadiargilo, oxadiazona, oxasulfurona, oxaziclomefona, oxifluorfenol, paraquat, dicloruro de paraquat, pebulato, pendimetalina, penoxsulam, pentaclorofenol, pentanoclor, pentoxazona, petoxamida, aceites de petróleo, fenmedifam, fenmedifam-etilo, picloram, picolinafeno, pinoxadeno, piperofos, arsenito de potasio, azida de potasio, pretilaclor, primisulfurona, primisulfurona-metilo, prodiamina, profluazol, profoxidim, prometona, prometrina, propaclor, propanilo, propaquizafop, propazina, profam, propisoclor, propoxicarbazona, propoxicarbazona-sodio, propizamida, prosulfocarb, prosulfurona, piraclonilo, pirafulfeno, piraflufeno-etilo, pirazolinato, pirazosulfurona, pirazosulfurona-etilo, pirazoxifeno, piribenzoxim, piributicarb, piridafol, piridato, piriftalida, piriminobac, piriminobac-metilo, pirimisulfano, piritiobac, piritiobac-sodio, quinclozac, quinmerac, quincloclamina, quizalofop, quizalofop-P, rimsulfurona, setoxidim, sidurona, simazina, simetrina, SMA, arsenito de sodio, azida de sodio, clorato de sodio, sulcotriona, sulfentrazona, sulfometurona, sulfometurona-metilo, sulfosato, sulfosulfurona, ácido sulfúrico, aceites de alquitrán, 2,3,6-TBA, TCA, TCA-sodio, tebutiurona, tepraloxidim, terbacilo, terbumetona, terbutilazina, terbutrina, tenilclor, tiazopir, tifensulfurona, tifensulfurona-metilo, tiobencarb, tiocarbazilo, topramezona, tralkoxidim, tri-alato, triasulfurona, triaziflam, tribenuron, tribenurona-metilo, tricamba, triclopir, trietazina, trifloxisulfurona, trifloxisulfurona-sodio, trifluralina, triflusalurona, triflusalurona-metilo, trihidroxitriazina, tritosulfurona, éster etílico del ácido [3-[2-cloro-4-fluoro-5-(metil-6-trifluorometil-2,4-dioxo-,2,3,4-tetrahidropirimidin-3-il)fenoxi]-2-piridiloxi]acético (CAS RN 353292-3-6), ácido 4-[(4,5-dihidro-3-metoxi-4-metil-5-oxo)-H-,2,4-triazol-ilcarbonil-sulfamoi]-5-metiltofen-3-carboxílico (BAY636), BAY747 (CAS RN 33504-84-2), topramezona (CAS RN 2063-68-8), 4-hidroxi-3-[[2-[(2-metoxietoxi)metil]-6-(trifluoro-metil)-3-piridinil]carbonil]-biciclo[3.2.]oct-3-en-2-ona (CAS RN 35200-68-5) y 4-hidroxi-3-[[2-(3-metoxipropil)-6-(difluorometil)-3-piridinil]carbonil]-biciclo[3.2.]oct-3-en-2-ona. Adicionalmente, que incluyen compuestos herbicidas de modos de acción inespecífico tal como se describe en CN101279950A, CN101279951A, DE10000600A1, DE10116399A1, DE102004054666A1, DE102005014638A1, DE102005014906A1, DE102007012168A1, DE102010042866A1, DE10204951A1, DE10234875A1, DE10234876A1, DE10256353A1, DE10256354A1, DE10256367A1, EP1157991A2, EP1238586A1, EP2147919A1, EP2160098A2, JP03968012B2, JP2001253874A, JP2002080454A, JP2002138075A, JP2002145707A, JP2002220389A, JP2003064059A, JP2003096059A, JP2004051628A, JP2004107228A, JP2005008583A, JP2005239675A, JP2005314407A, JP2006232824A, JP2006282552A, JP2007153847A, JP2007161701A, JP2007182404A, JP2008074840A, JP2008074841A, JP2008133207A, JP2008133218A, JP2008169121A, JP2009067739A, JP2009114128A, JP2009126792A, JP2009137851A, US20060111241A1, US20090036311A1, US20090054240A1, US20090215628A1, US20100099561A1, US20100152443A1, US20110105329A1, US20110201501A1, WO2001055066A2, WO2001056975A1, WO2001056979A1, WO2001090071A2, WO2001090080A1, WO2002002540A1, WO2002028182A1, WO2002040473A1, WO2002044173A2, WO2003000679A2, WO2003006422A1, WO2003013247A1, WO2003016308A1, WO2003020704A1, WO2003022051A1, WO2003022831A1, WO2003022843A1, WO2003029243A2, WO2003037085A1, WO2003037878A1, WO2003045878A2, WO2003050087A2, WO2003051823A1, WO2003051824A1, WO2003051846A2, WO2003076409A1, WO2003087067A1, WO2003090539A1, WO2003091217A1, WO2003093269A2, WO2003104206A2, WO2004002947A1, WO2004002981A2, WO2004011429A1, WO2004029060A1, WO2004035545A2, WO2004035563A1, WO2004035564A1, WO2004037787A1, WO2004067518A1, WO2004067527A1, WO2004077950A1, WO2005000824A1, WO2005007627A1, WO2005040152A1, WO2005047233A1, WO2005047281A1, WO2005061443A2, WO2005061464A1, WO2005068434A1, WO2005070889A1, WO2005089551A1, WO2005095335A1, WO20060065691, WO2006024820A1, WO2006029828A1, WO2006029829A1, WO2006037945A1, WO2006050803A1, WO2006090792A1, WO2006123088A2, WO2006125687A1, WO2006125688A1, WO2007003294A1, WO2007026834A1, WO2007071900A1, WO2007077201A1, WO2007077247A1, WO2007096576A1, WO2007119434A1, WO2007134984A1, WO2008009908A1, WO2008029084A1, WO2008059948A1, WO2008071918A1, WO2008074991A1, WO2008084073A1, WO2008100426A2, WO2008102908A1, WO2008152072A2, WO2008152073A2, WO2009000757A1, WO2009005297A2, WO2009035150A2, WO2009063180A1, WO2009068170A2, WO2009068171A2, WO2009086041A1, WO2009090401A2, WO2009090402A2, WO2009115788A1, WO2009116558A1, WO2009152995A1, WO2009158258A1, WO2010012649A1, WO2010012649A1, WO2010026989A1, WO2010034153A1, WO2010049270A1, WO2010049369A1, WO2010049405A1, WO2010049414A1, WO2010063422A1, WO2010069802A1, WO2010078906A2, WO2010078912A1, WO2010104217A1, WO2010108611A1, WO2010112826A3, WO2010116122A3, WO2010119906A1, WO2010130970A1, WO2011003776A2, WO2011035874A1, WO2011065451A1, todos los cuales se incorporan en la presente por referencia.

Un campo agronómico que requiere de control de plantas se trata por aplicación de la composición directamente a la superficie de las plantas en proliferación, como por pulverización. Por ejemplo, el procedimiento se aplica para controlar las malezas en un campo de plantas de cultivo por pulverización del campo con la composición. La composición se puede proporcionar como una mezcla en tanque, un tratamiento secuencial de componentes (en

general, el polinucleótido que contiene la composición seguido del herbicida) o un tratamiento simultáneo o mezcla de uno o varios de los componentes de la composición de recipientes separados. El tratamiento del campo se puede producir cuando se requiera para proporcionar control de malezas y los componentes de la composición se pueden ajustar para dirigirse a especies de malezas o familias de malezas específicas a través de la utilización de polinucleótidos específicos o composiciones de polinucleótido capaces de dirigirse selectivamente especies específicas o familia de plantas por controlar. La composición se puede aplicar en tasas de uso efectivas de acuerdo con el momento de aplicación en el campo, por ejemplo, preplantado, en el plantado, después del plantado, después de la cosecha. Los herbicidas inhibidores de GS se pueden aplicar a un campo en tasas de 100 a 500 g ai/ha (ingrediente activo por hectárea) o más. Los polinucleótidos de la composición se pueden aplicar en tasas de 1 a 30 gramos por acre según la cantidad de moléculas disparadoras necesarias para el alcance de las malezas en el campo.

Las plantas de cultivo en las que se necesita un control de malezas incluyen, pero sin limitación, i) maíz, soja, algodón, canola, remolacha, alfalfa, caña de azúcar, arroz y trigo; ii) plantas vegetales que incluyen, sin limitación, tomate, pimiento morrón, pimiento picante, melón, sandía, pepino, berenjena, coliflor, brócoli, lechuga, espinaca, cebolla, judías, zanahorias, maíz dulce, repollo chino, puerro, hinojo, calabaza o zapallo, rábano, repollos de Bruselas, tomatillo, alubias, frijoles secos o quimbombó; iii) plantas culinarias que incluyen, pero sin limitación, albahaca, perejil, café o té; o, iv) plantas frutales que incluyen, pero sin limitación, manzana, pera, cereza, durazno, ciruela, damasco, banana, plátano, uva de mesa, uva, cítricos, aguacate, mango o bayas; v) un árbol crecido para uso ornamental o comercial, que incluyen, pero sin limitación, un árbol frutal o nogal; o vi) una planta ornamental (por ejemplo, una planta de flor ornamental o arbusto o césped). Los procedimientos y composiciones proporcionados en la presente también se pueden aplicar a plantas producidas por un procedimiento de corte, clonación o injerto (es decir, una planta no crecida de una semilla) incluyen árboles frutales y plantas que incluyen, sin limitación, citrus, manzanas, aguacates, tomates, berenjena, pepino, melones, sandías y uvas, así como diversas plantas ornamentales.

Mezclas pesticidas

Las composiciones de polinucleótido también se pueden usar como mezclas con diversos químicos agrícolas y/o insecticidas, miticidas y fungicidas, agentes pesticidas y agentes bioplaguicidas. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, azinfos–metilo, acefato, isoxationa, isofenfos, etiona, etrinfos, oxidemetona–metilo, oxideprofos, quinalfos, clorpirifos, clorpirifos–metilo, clorfenvinfos, cianofos, dioxabenzofos, diclorvos, disulfotona, dimetilvinfos, dimetoato, sulprofos, diazinona, tiometona, tetraclorvinfos, temefos, tebupirifos, terbufos, naled, vamidotona, piraclofos, piridafentiona, pirimifos–metilo, fenitrotiona, fentiona, fentoato, flupirazofos, protiofos, propafos, profenofos, foxima, fosalona, fosmet, formotiona, forato, malationa, mecarbam, mesulfenfos, metamidofos, metidationa, parationa, metilparationa, monocrotofos, triclorfona, EPN, isazofos, isamidofos, cadusafos, diamidafos, diclofentiona, tionazina, fenamifos, fostiazato, fostietano, fosfocarb, DSP, etoprofos, alanicarb, aldicarb, isoproc carb, etiofencarb, carbarilo, carbosulfano, xilicarb, tiodicarb, pirimicarb, fenobucarb, furatiocarb, propoxur, bendiocarb, benfuracarb, metomilol, metolcarb, XMC, carbofurano, aldoxicarb, oxamilo, acrinatrina, aletrina, esfenvalerato, empentrina, cicloprotrina, cihalotrina, gamma–cihalotrina, lambda–cihalotrina, ciflutrina, betaciflutrina, cipermetrina, alfa–cipermetrina, zeta–cipermetrina, silafluofeno, tetrametrina, teflutrina, deltametrina, tralometrina, bifentrina, fenotrina, fenvalerato, fenpropatrina, furametrina, praletrina, flucitrinato, fluvalinato, flubrocitrinato, permetrina, resmetrina, etofenprox, cartap, tiociclam, bensultap, acetamiprid, imidacloprid, clotianidina, dinotefurano, tiacloprid, tiametoxam, nitenpiram, clorfluazurona, diflubenzurona, teflubenzurona, triflumurona, novalurona, noviflumurona, bistrifluorona, fluazurona, flucicloخورona, flufenoxurona, hexaflumurona, lufenurona, cromafenozida, tebufenozida, halofenozida, metoxifenozida, diifenolano, ciromazina, piriproxifeno, buprofezina, metopreno, hidropreno, quinopreno, triazotam, endosulfano, clorfenosona, clorobencilato, dicofol, bromopropilato, acetoprol, fipronilo, etiprol, piretrina, rotenona, sulfato de nicotina, agente BT (*Bacillus thuringiensis*), espinosad, abamectina, acequinocilo, amidoflumet, amitraz, etoxazol, quinometionato, clofentezina, óxido de fenbutatina, dienoclor, cihexatina, espiroclorfenol, espiromesifeno, tetradifona, tebufenpirad, binapacril, bifenazato, piridabeno, pirimidifeno, fenazaquina, fenotiocarb, fenpiroximato, fluacipirim, fluazinam, flufenzina, hexitiazox, propargita, benzomato, complejo de polinactina, milbemectina, lufenurona, mecarbam, metiocarb, mevinfos, halfenprox, azadiractina, diafentiurona, indoxacarb, benzoato de emamectina, oleato de potasio, oleato de sodio, clorfenapir, tolfenpirad, pimetrozina, fenoxicarb, hidrametilnona, almidón de hidroxipropilo, piridalilo, flufenerim, flubendiamida, flonicamida, metaflumizol, lepimectina, TPIC, albendazol, oxiendazol, oxfendazol, triclámida, fensulfotona, fenbendazol, clorhidrato de levamisol, tartrato de morantel, dazomet, metam–sodio, triadimefona, hexaconazol, propiconazol, ipconazol, procloraz, triflumizol, tebuconazol, epoxiconazol, difenoconazol, flusilazol, triadimenol, ciproconazol, metconazol, fluquinconazol, bitertanol, tetraconazol, triticonazol, flutriafol, penconazol, diniconazol, fenbuconazol, bromuconazol, imibenconazol, simeconazol, miclobutanilo, himexazol, imazalilo, furametpir, tifulzamida, etridiazol, oxpoconazol, fumarato de oxpoconazol, pefurazolato, protioconazol, pirifenox, fenarimol, nuarimol, bupirimato, mepanipirim, ciprodinilo, pirimetanilo, metalaxilo, mefenoxam, oxadixilo, benalaxilo, tiofanato, tiofanato–metilo, benomilo, carbendazim, fuberidazol, tiabendazol, manzeb, propineb, zineb, metiram, maneb, ziram, tiuram, clorotalonilo, etaboxam, oxicarboxina, carboxina, flutolanilo, siltiofam, mepronilo, dimetomorf, fenpropidina, fenpropimorf, espiroxamina, tridemorf, dodemorf, flumorf, azoxistrobina, cresoxim–metilo, metominostrobina, orisastrobina, fluoxastrobina, trifloxistrobina, dimoxistrobina, piracllostrobina, picoxistrobina, iprodiona, procimidona, vinclozolina, clozolinato, flusulfamida, dazomet, isotiocianato de metilo, cloropicrina, metasulfocarb, hidroxisoxazol, hidroxisoxazol de

potasio, ecomezol, D-D, carbam, cloruro de cobre básico, sulfato de cobre básico, nonilfenolsulfonato de cobre, oxina cobre, DBEDC, sulfato de cobre anhidro, sulfato de cobre pentahidrato, hidróxido cúprico, azufre inorgánico, azufre humectable, azufre de cal, sulfato de zinc, fentina, hidrógeno-carbonato de sodio, hidrógeno-carbonato de potasio, hipoclorito de sodio, plata, edifenfos, tolclofos-metilo, fosetilo, iprobenfos, dinocap, pirazofos, carpropamida, ftalida, triciclazol, piroquilona, diclocimet, fenoxanilo, casugamicina, validamicina, polioxinas, blasticideno S, oxitetraciclina, mildiomicina, estreptomycin, aceite de colza, aceite de máquina, bentiavalicarbisopropilo, iprovalicarb, propamocarb, dietofencarb, fluoroimida, fludioxanilo, fencliclonilo, quinoxifeno, ácido oxolínico, clorotalonilo, captano, folpet, probenazol, acibenzolar-S-metilo, tiadinilo, ciflufenamida, fenhexamida, diflumetorim, metrafenona, picobenzamida, proquinazida, famoxadona, ciazofamida, fenamidona, zoxamida, boscalida, cimoxanilo, ditianona, fluazinam, diclofluanida, triforina, isoprotiolano, ferimzona, diclomezina, tecloftalam, pencicurona, quinometionato, acetato de iminoctadina, albesilato de iminoctadina, ambam, policarbamato, tiadiazina, cloroneb, dimetilditiocarbamato de níquel, guazatina, acetato de dodecilguanidina, quintoceno, tolilfluanida, anilazina, nitrotalisopropilo, fenitropano, dimetirimol, bentiazol, proteína harpina, flumetover, mandipropamida y pentiopirad.

Polinucleótidos

Tal como se usa en la presente, la expresión "ADN", "molécula de ADN", "molécula de polinucleótido de ADN" se refiere a una molécula de ADN monocatenaria (ssADN) o ADN bicatenaria (dsADN) de origen genómico o sintético, tales como un polímero de bases de desoxirribonucleótido o una molécula de polinucleótido de ADN. Tal como se usa en la presente, la expresión "secuencia de ADN", "secuencia de nucleótido de ADN" o "secuencia de polinucleótido de ADN" se refiere a la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN. Tal como se usa en la presente, la expresión "ARN", "molécula de ARN", "molécula de polinucleótido de ARN" se refiere a una molécula de ARN monocatenaria (ssARN) o una molécula de ARN bicatenaria (dsARN) de origen genómico o sintético, tales como un polímero de bases de ribonucleótido que comprenden regiones monocatenarias o bicatenarias. A menos que se establezca otra cosa, las secuencias de nucleótidos en el texto de esta memoria descriptiva se brindan cuando se lee de izquierda a derecha en la dirección 5' a 3'. La nomenclatura usada en la presente es aquella requerida por el título 37 del Código de los Estados Unidos de Regulaciones Federales § 1.822 y establecida en las tablas en WIPO Standard ST.25 (1998), Apéndice 2, Tablas 1 y 3.

Tal como se usa en la presente, "polinucleótido" se refiere a una molécula de ADN o ARN que contiene múltiples nucleótidos y en general se refiere tanto a "oligonucleótidos" (una molécula de polinucleótido de típicamente 50 o menos nucleótidos de longitud) como a polinucleótidos de 51 o más nucleótidos. Las formas de realización de esta invención incluyen composiciones que incluyen oligonucleótidos que tienen una longitud de 18-25 nucleótidos (18-meros, 19-meros, 20-meros, 21-meros, 22-meros, 23-meros, 24-meros o 25-meros), por ejemplo, oligonucleótidos (SEQ ID NO:1444-2045) o sus fragmentos o polinucleótidos de longitud media que tienen una longitud de 26 o más nucleótidos (polinucleótidos de 26, 27, 28, 29, 30, 33, 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), por ejemplo, oligonucleótidos (SEQ ID NO: 60-1443) o sus fragmentos o polinucleótidos largos que tienen una longitud más largo de aproximadamente 300 nucleótidos (por ejemplo, polinucleótidos de entre aproximadamente 300 y 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 aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud o incluso más de aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, por ejemplo, hasta la longitud entera de un gen blanco que incluye las porciones codificantes o no codificantes o ambas del gen blanco), por ejemplo, polinucleótidos de la Tabla 1 (SEQ ID NO:1-59), en donde los polinucleótidos seleccionados o sus fragmentos homólogos o complementarios a la SEQ ID NO:1-59 suprime, reprime o demora de otro modo la expresión del gen blanco de GS. Un gen blanco comprende cualquier molécula de polinucleótido en una célula de planta o su fragmento para los que la modulación de la expresión del gen blanco es proporcionada por los procedimientos y composiciones de la presente invención. Cuando un polinucleótido es bicatenario, su longitud puede describirse de forma similar en términos de pares de bases. Los oligonucleótidos y polinucleótidos de la presente invención se pueden preparar, que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios a los elementos genéticos adyacentes de un gen, por ejemplo, que abarca la región de unión de un intrón y exón, la región de unión de un promotor y una región transcrita, la región de unión de una secuencia líder 5' y una secuencia codificante, la unión de una región no traducida 3' y una secuencia codificante.

Las composiciones de polinucleótido usadas en las diversas formas de realización de la presente invención incluyen composiciones que incluyen oligonucleótidos o polinucleótidos o una mezcla de ambos, incluyendo ARNs.

En algunas formas de realización, el polinucleótido incluye nucleótidos no canónicos tales como inosina, tiouridina o pseudouridina. En algunas formas de realización, el polinucleótido incluye nucleótidos químicamente modificados. Los ejemplos de oligonucleótidos o polinucleótidos químicamente modificados son bien conocidos en el arte; ver, por ejemplo, la publicación de patente U. S. 20110171287, la publicación de patente U. S. 20110171176 y la publicación de patente U. S. 20110152353, la publicación de patente U. S. 20110152346, publicación de patente U. S. 20110160082, incorporadas en la presente por referencia. Por ejemplo, incluyen, pero sin limitación, la estructura de fosfodiéster natural de un oligonucleótido o polinucleótido puede estar parcial o completamente modificado con modificaciones de ligación de internucleótido de fosforotioato, fosforditioato o metilfosfonato, se pueden usar bases de nucleósidos modificados o azúcares modificados en la síntesis de oligonucleótidos o polinucleótidos y oligonucleótidos o polinucleótidos se pueden rotular con un resto fluorescente (por ejemplo, fluoresceína o rodamina) u otro rótulo (por ejemplo, biotina).

Los polinucleótidos son ARN bicatenario. En algunas formas de realización, estos polinucleótidos incluyen nucleótidos o nucleótidos no canónicos químicamente modificados. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos pueden tener extremos romos o pueden comprender una saliente 3' de 1–5 nucleótidos de al menos una o las dos cadenas. Otras configuraciones de los oligonucleótidos conocidas en el campo se contemplan en la presente. En formas de realización del procedimiento, los polinucleótidos incluyen ARN bicatenario formado por hibridación intramolecular, ADN bicatenario formado por hibridación intermolecular. Sin pretender quedar ligado por cualquier mecanismo, se cree que tales polinucleótidos son o producirán ARN monocatenario con al menos un segmento que hibridará en ARN transcrito de un gen dirigido para supresión. En ciertas formas de realización diferentes, los polinucleótidos también incluyen un promotor, en general, 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.

El término “gen” se refiere a ADN cromosómico, ADN de plásmido, cADN, ADN de intrón y exón, ADN de polinucleótido artificial u otro ADN que codifica un péptido, polipéptido, proteína o molécula de transcrito de ARN y los elementos genéticos que flanquean la secuencia codificante que están incluidos en la regulación de expresión, tales como, regiones promotoras, regiones líderes 5', regiones no traducidas 3'. Cualquiera de los componentes del gen son blancos potenciales para los oligonucleótidos y polinucleótidos de la presente invención.

Las moléculas de polinucleótido de la presente invención se diseñan para modular la expresión al inducir la regulación o la supresión de un gen de GS endógeno en una planta y se diseñan para tener una secuencia de nucleótidos esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a la secuencia de nucleótidos de un gen de GS endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita de un gen de GS endógeno de una planta, incluyendo un transgén en una planta que proporciona una enzima de GS resistente a herbicidas, que puede ser una secuencia codificante o una secuencia no codificante. Las moléculas efectivas que modulan la expresión se mencionan como una “molécula disparadora o polinucleótidos disparadores”. Por “esencialmente idéntico” o “esencialmente complementario” se entiende que los polinucleótidos disparadores (o al menos una cadena de un polinucleótido bicatenario o una de sus porciones o una porción de un polinucleótido monocatenario) se diseñan para hibridar en la secuencia no codificante del gen endógeno o ARN transcrito (conocido como ARN mensajero o un transcrito de ARN) del gen endógeno para realizar la regulación o la supresión de la expresión del gen endógeno. Las moléculas disparadoras se identifican por “azulejado” de los blancos génicos con sondas parcialmente superpuestas o sondas no superpuestas de polinucleótidos antisentido o consentido que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios a la secuencia de nucleótidos de un gen endógeno. Múltiples secuencias blanco se pueden alinear y regiones de secuencia con homología en común, de acuerdo con los procedimientos de la presente invención, se identifican como potenciales moléculas disparadoras para los blancos múltiples. Las múltiples moléculas disparadoras de diversas longitudes, por ejemplo 18–25 nucleótidos, 26–50 nucleótidos, 51–100 nucleótidos, 101–200 nucleótidos, 201–300 nucleótidos o más se pueden reunir en pocos tratamientos a fin de investigar moléculas de polinucleótido que cubren una porción de una secuencia génica (por ejemplo, una porción de una porción codificante versus una porción de una región no codificante o una porción 5' versus 3' de un gen) o una secuencia génica entera que incluye las regiones codificantes y no codificantes de un gen blanco. Las moléculas de polinucleótido de las moléculas disparadoras reunidas se pueden dividir en pools más pequeños o moléculas individuales a fin de identificar moléculas disparadoras que proporcionan el efecto deseado.

Las moléculas de polinucleótido de ARN y ADN de gen blanco (Tabla 1, SEQ ID NO:1–59) se secuencian por cualquier cantidad de procedimientos y equipamiento apropiados. Algunas de las tecnologías de secuenciación están disponibles en comercios, tales como la plataforma de secuenciación por hibridación de Affymetrix Inc. (Sunnyvale, Calif.) y las plataformas de secuenciación por síntesis de 454 Life Sciences (Bradford, Conn.), Illumina/Solexa (Hayward, Calif.) y Helicos Biosciences (Cambridge, Mass.) y la plataforma de secuenciación por ligación de Applied Biosystems (Foster City, Calif.), tal como se describe más abajo. Además de la secuenciación de moléculas simples realizada usando secuenciación por síntesis de Helicos Biosciences, están comprendidas otras tecnologías de secuenciación de moléculas simples por el procedimiento de la invención e incluyen la tecnología SMRT™ de Pacific Biosciences, la tecnología Ion Torrent™ y secuenciación de nanoporos desarrolla, por ejemplo, por Oxford Nanopore Technologies. Un gen blanco de GS que comprende ADN o ARN se puede aislar usando cebadores o sondas esencialmente complementarias o esencialmente homólogas a la SEQ ID NO:1–59 o a su fragmento. Un gen de reacción de polimerasa en cadena (PCR) se puede producir usando cebadores esencialmente complementarios o esencialmente homólogos a SEQ ID NO:1–59 o a su fragmento que es de utilidad para aislar un gen de GS de un genoma de planta. SEQ ID NO: 1–59 o sus fragmentos se pueden usar en diversas tecnologías de

captura de secuencias para aislar secuencias génicas blanco adicionales, por ejemplo, que incluyen, pero sin limitación, Roche NimbleGen® (Madison, WI) y Dynabeads® acopladas con estreptavidina (Life Technologies, Grand Island, NY) y US 20110015084, incorporada en la presente por referencia en su totalidad.

5 Las formas de realización de polinucleótidos monocatenarios tienen una complementariedad de secuencia que no requiere ser del 100%, pero es al menos suficiente para permitir la hibridación en ARN transcrito del gen blanco o ADN del gen blanco para formar un dúplex para permitir un mecanismo de silenciamiento génica. Así, en formas de realización, un fragmento de polinucleótido se diseña para ser esencialmente idéntico o esencialmente complementario a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en la secuencia de gen blanco de GS o ARN mensajero transcrito del gen blanco. Por "esencialmente idéntico" se entiende que tiene 100% de identidad de secuencia o al menos aproximadamente 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 ya sea en el gen blanco o ARN transcrito del gen blanco; por "esencialmente complementario" se entiende que tiene 100% de complementariedad de secuencia o al menos aproximadamente 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% complementariedad de secuencia cuando se compara con la secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos ya sea en el gen blanco o ARN transcrito del gen blanco. En algunas formas de realización de esta invención, las moléculas de polinucleótido se diseñan para tener 100% de identidad de secuencia o complementariedad con un alelo o un miembro de la familia de un gen blanco dado (secuencia codificante o no codificante de un gen de la presente invención); en otras formas de realización, las moléculas de polinucleótido se diseñan para tener 100% de identidad de secuencia o complementariedad con múltiples alelos o miembros de la familia de un gen blanco dado.

En ciertas formas de realización, los polinucleótidos usados en las composiciones que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios al gen blanco o transcrito comprenderán el ácido nucleico predominante en la composición. Así, en ciertas formas de realización, los polinucleótidos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios al gen blanco o transcrito comprenderán al menos aproximadamente 50%, 75%, 95%, 98% o 100% de los ácidos nucleicos proporcionados en la composición por concentración de masa o molar. Sin embargo, en ciertas formas de realización, los polinucleótidos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios al gen blanco o transcrito pueden comprender al menos aproximadamente 1% a aproximadamente 50%, aproximadamente 10% a aproximadamente 50%, aproximadamente 20% a aproximadamente 50% o aproximadamente 30% a aproximadamente 50% de los ácidos nucleicos proporcionados en la composición por concentración de masa o molar. También se proporcionan composiciones en las que los polinucleótidos que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios al gen blanco o transcrito pueden comprender al menos aproximadamente 1% a 100%, aproximadamente 10% a 100%, aproximadamente 20% a aproximadamente 100%, aproximadamente 30% a aproximadamente 50% o aproximadamente 50% a 100% de los ácidos nucleicos proporcionados en la composición por concentración de masa o molar.

35 "Identidad" se refiere al grado de similitud entre dos secuencias de ácido polinucleico o proteína. Una alineación de las dos secuencias se lleva a cabo por medio de un programa de computadora apropiado. Un programa de computadora ampliamente usado y aceptado para realizar alineaciones de secuencias es CLUSTALW v1.6 (Thompson, et al. Nucl. Acids Res., 22: 4673–4680, 1994). La cantidad de bases o aminoácidos coincidentes se divide por la cantidad total de bases o aminoácidos y se multiplica por 100 para obtener un porcentaje de identidad. Por ejemplo, si dos secuencias de 580 pares de bases tienen 145 bases coincidentes, serán 25% idénticas. Si las dos secuencias comparadas son de diferentes longitudes, la cantidad de coincidencia se divide por la más corta de las dos longitudes. Por ejemplo, si hay 100 aminoácidos coincidentes entre una proteína de 200 y 400 aminoácidos, son 50% idénticos respecto de la secuencia más corta. Si la secuencia más corta es menor a 150 bases o 50 aminoácidos de longitud, la cantidad de coincidencias se dividen por 150 (para bases de ácidos nucleicos) o 50 (para aminoácidos) y se multiplican por 100 para obtener un porcentaje de identidad.

Las moléculas disparadoras para miembros de la familia génica específica se pueden identificar de secuencias codificantes y/o no codificantes de familias de genes de una planta o múltiples plantas, por alineación y selección de 200–300 fragmentos de polinucleótidos de las últimas regiones homólogas entre las secuencias alineadas y evaluadas usando polinucleótidos aplicados tópicamente (como ssADN o ssARN, dsARN o dsADN con sentido o antisentido) para determinar su eficacia relativa en la inducción del fenotipo herbicida. Los segmentos efectivos luego se subdividen en 50–60 fragmentos de polinucleótidos, se priorizan por mínima homología y se reevalúan usando los polinucleótidos aplicados tópicamente. Los fragmentos efectivos de 50–60 polinucleótidos se subdividen en 19–30 fragmentos de polinucleótidos, se priorizan por mínima homología y nuevamente se evalúan respecto de la inducción del fenotipo de rendimiento / calidad. Una vez determinada la efectividad relativa, los fragmentos se utilizan individualmente o se evalúan otra vez en combinación con uno o varios fragmentos diferentes para determinar la composición disparadora o mezcla de polinucleótidos disparadores para proporcionar el fenotipo de rendimiento / calidad.

Las moléculas disparadoras para la actividad amplia se pueden identificar de secuencias codificantes y/o no codificantes de familias de genes de una planta o varias plantas, por alineación y selección de 200–300 fragmentos de polinucleótidos de las regiones más homólogas entre las secuencias alineadas y evaluadas usando polinucleótidos tópicamente aplicados (como ssADN o ssARN, dsARN o dsADN con sentido o antisentido) para determinar su efectividad relativa en la inducción del fenotipo de rendimiento / calidad. Los segmentos efectivos se

subdividen en 50–60 fragmentos de polinucleótidos, se priorizan por la máxima homología y se reevalúan usando polinucleótidos tópicamente aplicados. Los 50–60 fragmentos de polinucleótido se subdividen en 19–30 fragmentos de polinucleótidos, se priorizan por la máxima homología y se reevalúan respecto de la inducción del fenotipo de rendimiento / calidad. Una vez determinada la eficacia relativa, los fragmentos se pueden utilizar de forma individual o en combinación con uno o varios otros fragmentos para determinar la composición disparadora o mezcla de polinucleótidos disparadores para proporcionar el fenotipo de rendimiento / calidad.

Los procedimientos para preparar polinucleótidos son bien conocidos en el arte. Las síntesis químicas, las síntesis in vivo y procedimientos de síntesis in vivo y composiciones son conocidos en el arte e incluyen diversos elementos virales, células microbianas, polimerasas modificadas y nucleótidos modificados. La preparación comercial de oligonucleótidos proporciona a menudo dos desoxirribonucleótidos en el extremo 3' de la cadena con sentido. Las moléculas largas de polinucleótido se pueden sintetizar de kits asequibles en comercios, por ejemplo, kits de Applied Biosystems/Ambion (Austin, TX) tienen ADN ligado en el extremo 5' en un casete de expresión microbiano que incluye un promotor bacteriano T7 de polimerasa que hace que cadenas de ARN se puedan reunir en un dsARN y kits proporcionados por diversos fabricantes que incluyen T7 RiboMax Express (Promega, Madison, WI), AmpliScribe T7–Flash (Epicentre, Madison, WI) y TranscriptAid T7 High Yield (Fermentas, Glen Burnie, MD). Las moléculas de dsARN se pueden producir a partir de casetes de expresión microbiano en células bacterianas (Ongvarrasopone et al. *ScienceAsia* 33:35–39; Yin, *Appl. Microbiol. Biotechnol* 84:323–333, 2009; Liu et al., *BMC Biotechnology* 10:85, 2010) que tienen una actividad enzimática regulada o deficiente de ARNasa III o el uso de diversos vectores virales para producir cantidades suficientes de dsARN. En la presente invención, los fragmentos génicos de GS se insertan en los casetes de expresión microbiana en una posición position en donde los fragmentos se expresan para producir ssARN o dsARN de utilidad en los procedimientos descritos en la presente para regular la expresión en un gen blanco de GS. Las moléculas largas de polinucleótido también se pueden reunir de múltiples fragmentos de ARN o ADN. En algunas formas de realización, parámetros de diseño tales como puntaje de Reynolds (Reynolds et al. *Nature Biotechnology* 22, 326 – 330 (2004), reglas de Tuschl (Pei y Tuschl, *Nature Methods* 3(9): 670–676, 2006), puntaje i (Nucleic Acids Res 35: e123, 2007), herramienta de diseño de puntaje i y algoritmos asociados (Nucleic Acids Res 32: 936–948, 2004. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 1050–1058, 2004, *Nucleic Acids Res* 32: 893–901, 2004, *Cell Cycle* 3: 790–5, 2004, *Nat Biotechnol* 23: 995–1001, 2005, *Nucleic Acids Res* 35: e27, 2007, *BMC Bioinformatics* 7: 520, 2006, *Nucleic Acids Res* 35: e123, 2007, *Nat Biotechnol* 22: 326–330, 2004) se conocen en el arte y se pueden usar en la selección de secuencias de polinucleótido efectivas para la silenciamiento génica. En algunas formas de realización, la secuencia de un polinucleótido se controla contra el ADN genómico de la planta pretendida para minimizar la silenciamiento no intencional de otros genes.

Las composiciones de polinucleótido disparador y molécula de oligonucleótido de esta invención son de utilidad en composiciones, tales como líquidos que comprenden las moléculas de polinucleótido en bajas concentraciones, solas o en combinación con otros componentes, por ejemplo, una o varias moléculas de herbicida, ya sea en la misma solución o en líquidos aplicados por separado que también proporcionan un agente de transferencia. Si bien no hay un límite superior en las concentraciones y dosis de moléculas de polinucleótido que pueden ser de utilidad en los procedimientos, concentraciones menos efectivas y dosis se buscar en general por su eficacia. Las concentraciones se pueden ajustar en consideración al volumen de pulverización o tratamiento aplicado a las hojas de plantas u otra parte de una superficie de la planta, tales como pétalos de la flor, tallos, tubérculos, fruta, anteras, polen o semillas. En una forma de realización, un tratamiento útil para plantas herbáceas usando moléculas de oligonucleótido 25–mero es de aproximadamente 1 nanomol (nmol) de moléculas de oligonucleótido por planta, por ejemplo, de aproximadamente 0,05 a 1 nmol por planta. Otras formas de realización para plantas herbáceas incluyen rangos útiles de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 100 nmol o aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 nmol o aproximadamente 1 nmol a aproximadamente 10 nmol de polinucleótidos por planta. Plantas muy grandes, árboles y viñedos pueden requerir cantidades correspondientemente grandes de polinucleótidos. Cuando se usan moléculas largas de dsARN que se pueden procesar en múltiples oligonucleótidos, se pueden usar menores concentraciones. Para ilustrar las formas de realización de la invención, el factor 1X, cuando se aplica a moléculas de oligonucleótido se usa arbitrariamente para denotar un tratamiento de 0,8 nmol de molécula de polinucleótido por planta; 10X, 8 nmol de molécula de polinucleótido por planta; y 100X, 80 nmol de molécula de polinucleótido por planta.

Las composiciones de polinucleótido de esta invención son de utilidad en composiciones, tales como líquidos que comprenden moléculas de polinucleótido, solos o en combinación con otros componentes ya sea en el mismo líquido o en líquidos aplicados por separado que proporcionan un agente de transferencia. Tal como se usa en la presente, un agente de transferencia es un agente que, cuando se combina con un polinucleótido en una composición que se aplica tópicamente a una superficie de planta objeto, permite que el polinucleótido entre en una célula de planta. En determinadas formas de realización, un agente de transferencia es un agente que condiciona la superficie del tejido de planta, por ejemplo, hojas, tallos, raíces, flores o frutos, a la permeación por las moléculas de polinucleótido en células de plantas. La transferencia de polinucleótidos en células de plantas se puede facilitar por aplicación anterior o contemporánea de un agente de transferencia de polinucleótido al tejido de la planta. En algunas formas de realización, el agente de transferencia se aplica luego de la aplicación de la composición de polinucleótido. El agente de transferencia de polinucleótido permite una vía para los polinucleótidos a través de las barreras de cera de cutícula, estomas y/o pared celular o barreras de membrana en células de plantas. Los agentes de transferencia apropiados para facilitar la transferencia del polinucleótido en una célula de planta incluyen agentes que incrementan

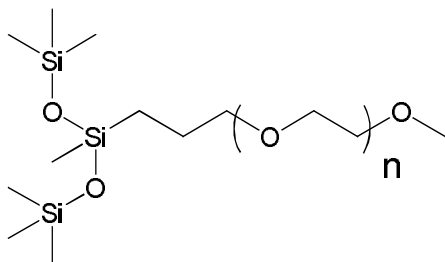
la permeabilidad del exterior de la planta o que incrementan la permeabilidad de células de planta a oligonucleótidos o polinucleótidos. Estos agentes para facilitar la transferencia de la composición en una célula de planta incluyen un agente químico o un agente físico o sus combinaciones. Los agentes químicos para acondicionamiento o transferencia incluyen (a) tensioactivos, (b) un solvente orgánico o una solución acuosa o mezclas acuosas de solventes orgánicos, (c) agentes oxidantes, (d) ácidos, (e) bases, (f) aceites, (g) enzimas o sus combinaciones. Las formas de realización del procedimiento pueden incluir opcionalmente una etapa de incubación, una etapa de neutralización (por ejemplo, para neutralizar un ácido, una base o un agente oxidante o para inactivar una enzima), una etapa de enjuague o sus combinaciones. Las formas de realización de agentes o tratamientos para acondicionamiento de una planta para la permeación por polinucleótidos incluyen emulsiones, emulsiones inversas, liposomas y otras composiciones de tipo micelar. Las formas de realización de agentes o tratamientos para acondicionamiento de una planta a la permeación por polinucleótidos incluyen contraiones u otras moléculas que se conocen para asociarse con moléculas de ácidos nucleicos, por ejemplo, iones amonio inorgánicos, iones alquilamonio, iones litio, poliaminas tales como espermina, espermidina o putrescina y otros cationes. Los solventes orgánicos de utilidad en el acondicionamiento de una planta a la permeación por polinucleótidos incluyen DMSO, DMF, piridina, *N*-pirrolidina, hexametildisfosforamida, acetonitrilo, dioxano, polipropilenglicol, otros solventes miscibles con agua o que disolverán fosfonucleótidos en sistemas no acuosos (tal como se usa en reacciones de síntesis). Los aceites naturales o sintéticos con o sin tensioactivos o emulsionantes se pueden usar, *por ejemplo*, aceites de origen vegetal, aceites de cultivos (tales como los enumerados en el 9th Compendium of Herbicide Adjuvants, disponibles al público en la WorldWide Web (Internet) en herbicide.adjuvants.com, *por ejemplo*, aceites parafínicos, ésteres de ácido grasos de poliol o aceites con moléculas de cadena corta modificadas con amidas o poliaminas tales como polietilenimina o *N*-pirrolidina. Los agentes de transferencia incluyen, pero sin limitación, preparaciones de organosilicio.

En ciertas formas de realización, una preparación de organosilicona que está disponible en el comercio como tensioactivo Silwet® L-77 que tiene Número CAS 27306-78-1 y Número EPA: CAL.REG.NO. 5905-50073-AA, y disponible actualmente de Momentive Performance Materials, Albany, New York se puede usar para preparar una composición de polinucleótido. En ciertas formas de realización cuando se usan una preparación de organosilicona Silwet L-77 como un tratamiento pre-rocado de hojas de planta u otras superficies de plantas, concentraciones recién preparadas en el rango de aproximadamente 0,015 a aproximadamente 2 por ciento en peso (por ciento 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 por ciento en peso) son eficaces para preparar una hoja u otra superficie de planta para la transferencia de moléculas de polinucleótidos en células de plantas a partir de una aplicación tópica sobre la superficie. En ciertas formas de realización de los procedimientos y las composiciones que se proporcionan en la presente, se usa o proporciona una composición que comprende una molécula de polinucleótido y una preparación de organosilicona que comprende Silwet L-77 en el rango de aproximadamente 0,015 a aproximadamente 2 por ciento en peso (por ciento 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 por ciento en peso) .

En ciertas formas de realización, alguna de las preparaciones de organosilicona disponibles en el comercio provistas tales como las siguientes Breakthru S 321, Breakthru S 200 Cat# 67674-67-3, Breakthru OE 441 Cat#68937-55-3, Breakthru S 278 Cat #27306-78-1, Breakthru S 243, Breakthru S 233 Cat#134180-76-0, disponibles del fabricante Evonik Goldschmidt (Alemania), Silwet® HS 429, Silwet® HS 312, Silwet® HS 508, Silwet® HS 604 (Momentive Performance Materials, Albany, New York) se pueden usar como agentes de transferencia en una composición de polinucleótido. En ciertas formas de realización cuando una preparación de organosilicona se usa como un tratamiento de pre-rocado de hojas de plantas u otras superficies, las concentraciones recién preparadas en el rango de aproximadamente 0,015 a aproximadamente 2 por ciento en peso (por ciento 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 por ciento en peso) son eficaces para preparar una hoja u otra superficie de planta para la transferencia de las moléculas de polinucleótidos en las células vegetales a partir de la aplicación tópica sobre la superficie. En ciertas formas de realización de los procedimientos y composiciones provistos en la presente, se usa o proporciona una composición que comprende una molécula de polinucleótido y una preparación de organosilicona en el rango de aproximadamente 0,015 a aproximadamente 2 por ciento en peso (por ciento 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 por ciento en peso).

Las preparaciones de organosilicona usadas en los procedimientos y composiciones provistos en la presente pueden comprender uno o más compuestos de organosilicona efectivos. Como se usa en la presente, la frase "compuesto de organosilicona efectivo" se usa para describir cualquier compuesto de organosilicona que se halla en una preparación de organosilicona que permite que un polinucleótido entre en una célula de planta. En ciertas formas de realización, un compuesto de organosilicona efectivo puede permitir que un polinucleótido entre a una célula de planta de una manera que permite una supresión mediada por polinucleótido de una expresión del gen blanco en la célula de planta. En general, los compuestos de organosilicona efectivos incluyen, pero sin limitación,

compuestos que pueden comprender: i) un grupo principal trisiloxano que se une covalentemente a, ii) un ligador alquilo que incluye, pero sin limitación, un ligador n-propilo, que se une covalentemente a, iii) una cadena de poliglicol, que se une covalentemente a, iv) un grupo terminal. Los grupos principales trisiloxano de tales compuestos de organosilicona efectivos incluyen, pero sin limitación, heptametiltrisiloxano. Los ligadores alquilo pueden incluir, pero sin limitación, un ligador n-propilo. Las cadenas poliglicol incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol o polipropilenglicol. Las cadenas de poliglicol pueden comprender una mezcla que proporciona una longitud de cadena promedio "n" de aproximadamente "7,5". En ciertas formas de realización, la longitud de cadena promedio "n" puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 14. Los grupos terminales pueden incluir, pero sin limitación, grupos alquilo tales como un grupo metilo. Se considera que los compuestos de organosilicona efectivos incluyen, pero sin limitación, tensioactivos de etoxilato de trisiloxano o heptametiltrisiloxano modificado con óxido de polialquileno.



(Compuesto I: heptametiltrisiloxano con óxido de polialquileno, promedio=7,5).

En ciertas formas de realización, se usa una preparación de organosilicona que comprende un compuesto de organosilicona que comprende un grupo principal trisiloxano en los procedimientos y las composiciones que se proporcionan en la presente. En ciertas formas de realización, se usa una preparación de organosilicona que comprende un compuesto de organosilicona que comprende un grupo principal heptametiltrisiloxano en los procedimientos y las composiciones que se proporcionan en la presente. En ciertas formas de realización, se usa una composición de organosilicona que comprende Compuesto I en los procedimientos y las composiciones que se proporcionan en la presente. En ciertas formas de realización, se usa una composición de organosilicona que comprende el Compuesto I en los procedimientos y las composiciones que se proporcionan en la presente. En ciertas formas de realización de los procedimientos y las composiciones que se proporcionan en la presente, se usa o proporciona una composición que comprende una molécula de polinucleótido y uno o más compuestos de organosilicona efectivo en el rango de aproximadamente 0,015 a aproximadamente 2 por ciento 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 por ciento en peso).

Las composiciones de la presente invención incluyen pero sin limitación componentes que son uno o más polinucleótidos esencialmente idénticos, o esencialmente complementarios a una secuencia del gen GS (promotor, intrón, exón, región no traducida 5', región no traducida 3'), un agente de transferencia que permite que el polinucleótido entre en una célula de planta, un herbicida que complementa la acción del polinucleótido, uno o más herbicidas adicionales que también potencian la actividad herbicida de la composición o proporcionan un modo de acción adicional diferente del herbicida de complementación, varias sales y agentes estabilizantes que aumentan la utilidad de la composición como una combinación de los componentes de la composición.

Los procedimientos incluyen una o más aplicaciones de una composición de polinucleótido y una o más aplicaciones de un agente potenciador de la permeabilidad para acondicionar una planta para la penetración por los polinucleótidos. Cuando el agente para acondicionar la penetración es una composición de organosilicona o compuesto contenida en esta, las formas de realización de las moléculas de polinucleótidos son oligonucleótidos de ARN de cadena doble, oligonucleótidos de ARN de cadena simple, polinucleótidos de ARN de cadena doble, polinucleótidos de ARN de cadena simple, oligonucleótidos de ADN de cadena doble, oligonucleótidos de ADN de cadena simple, polinucleótidos de ADN de cadena doble, polinucleótidos de ADN de cadena simple, oligonucleótidos o polinucleótidos de ARN o ADN modificado químicamente o sus mezclas.

Las composiciones y los procedimientos son de utilidad para modular la expresión de un gen endógeno de GS (por ejemplo, Pest Manag Sci 2009; 65: 216–222, mutantes GS249) o gen transgénico GS (por ejemplo, patente U. S. N.º: 7.910.805; 5.969.213; 5.489.520; 5.550.318; 5.874.265; 5.919.675; 5.561.236; 5.648.477; 5.646.024; 6.177.616; y 5.879.903) en una célula vegetal. En varias formas de realización, un gen de GS incluye la secuencia codificadora (codificadora de la proteína o traducible), secuencia no codificadora (no traducible) o secuencia codificadora y no codificadora. Las composiciones de la invención pueden incluir polinucleótidos y oligonucleótidos diseñador para genes múltiples blanco o múltiples segmentos de uno o más genes. El gen blanco puede incluir múltiples segmentos consecutivos de un gen blanco, múltiples segmentos no consecutivos de un gen blanco, múltiples alelos de un gen blanco, o múltiples genes blanco de una o más especies.

Un aspecto es un procedimiento para modular la expresión de un gen GS en una planta que incluye (a) acondicionamiento de una planta para la penetración por polinucleótidos y (b) tratamiento de la planta con las moléculas de polinucleótidos, donde las moléculas de polinucleótidos incluyen al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos clonados de o identificados de otro modo del gen GS blanco en orientación antisentido o sentido, a través de lo cual las moléculas de polinucleótidos penetran el interior de la planta e inducen la modulación del gen blanco. El acondicionamiento y la aplicación del polinucleótido se pueden realizar de modo separado o en una etapa única. Cuando el acondicionamiento y la aplicación del polinucleótido se realizan en etapas separadas, el acondicionamiento puede preceder o puede seguir a la aplicación del polinucleótido dentro de minutos, horas, o días. En algunas formas de realización se pueden realizar más de una etapa de acondicionamiento o más de una aplicación de la molécula de polinucleótido en la misma planta. En formas de realización del procedimiento, el segmento se puede clonar o identifica de (a) parte codificadora (que codifica una proteína), (b) no codificadora (promotor y otras moléculas relacionadas con el gen), o (c) las partes codificadora y no codificadora del gen blanco. Las partes no codificadoras incluyen ADN, tal como regiones promotoras o el ARN transcripto por el ADN que proporciona moléculas regulatorias de ARN, que incluyen pero sin limitación: intrones, regiones no traducidas 5' o 3' y microARN (miARN), ARNsi de acción actúan *trans*, ARNsi antisentido natural y otros ARN pequeños con función reguladora o ARN que tienen función estructural o enzimática que incluyen, pero sin limitación: ribozimas, ARN ribosómicos, t-ARNs, aptámeros, y riboswitches.

Ejemplos

Ejemplo 1. Polinucleótidos relacionados con la secuencia génica de GS

La molécula de polinucleótido de GS blanco se produce naturalmente en el genoma de *Abutilon theophrasti*, *Amaranthus albus*, *Amaranthus clorostachys*, *Amaranthus graecizans*, *Amaranthus hybridus*, *Amaranthus lividus*, *Amaranthus palmeri*, *Amaranthus rudis*, *Amaranthus spinosus*, *Amaranthus thunbergii*, *Ambrosia trifida*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Chenopodium album*, *Commelina diffusa*, *Convolvulus arvensis*, *Coryza candensis*, *Lolium multiflorum*, *Euphorbia heterophylla*, *Kochia scoparia*, *Sorghum halepense* y *Digitaria sanguinalis* e incluyen moléculas relacionadas con la expresión de un polipéptido identificado como un GS, que incluyen moléculas de regulación, cAADN que comprenden regiones codificantes y no codificantes de un gen de GS y sus fragmentos tal como se muestran en la Tabla 1.

Las moléculas de polinucleótido se extrajeron de estas especies de plantas por procedimientos estándar en el campo, por ejemplo, se extrae ARN total usando reactivo de trizol (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA Cat. No. 15596-018), de acuerdo con el protocolo del fabricante o sus modificaciones por los expertos en el arte de la extracción de polinucleótido que puede mejorar la recuperación o la pureza del ARN extraído. Brevemente, se inicia con 1 gramo de tejido de planta molido para extracción. Se hacen prealícuotas de 10 mililitros (ml) de reactivo de trizol en tubos cónicos de 15 ml. Se añade polvo molido a tubos y se agita para homogeneizar. Se incuban las muestras homogeneizadas durante 5 minutos (min) a temperatura ambiente (TA) y luego se añaden 3 ml de cloroformo. Se agitan los tubos vigorosamente a mano durante 15-30 segundos (seg) y se incuban a temperatura ambiente durante 3 min. Se centrifugan los tubos a 7.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 min a 4 grados C. Se transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo de 1,5 ml y se añade 1 volumen de isopropanol frío. Se incuban las muestras durante 20-30 min a TA y se centrifugan a 10.000 rpm durante 10 min a 4 grados C. Se lava el pellet con etanol al 80% de grado Sigma. Se elimina el sobrenadante y el pellet se seca brevemente con aire. Se disuelve el pellet de ARN en aproximadamente 200 microlitros de agua tratada con DEPC. Se calienta brevemente a 65 grados C para disolver el pellet y se somete a vórtex o se pipetea para resuspender el pellet de ARN. Se ajusta la concentración de ARN a 1-2 microgramos/microlitro.

El ADN se extrajo usando el kit EZNA SP Plant ADN Mini kit (Omega Biotek, Norcross GA, Cat#D5511) y tubos Lysing Matrix E (Q-Biogen, Cat#6914), de acuerdo con el protocolo del fabricante o sus modificaciones por los expertos en el arte de extracción de polinucleótidos que puede mejorar la recuperación o la pureza del ADN extraído. Brevemente, se alicuota el tejido molido en un tubo Lysing Matrix E en hielo seco, se añaden 800 µl de tampón SP1 a cada muestra, se homogeneiza en un batidor de perlas durante 35-45 seg, se incuban en hielo durante 45-60 seg, se centrifuga a ≥ 14000 rpm durante 1 min a TA, se añaden 10 microlitros de ARNasa A al lisado, se incuban a 65 °C durante 10 min, se centrifuga durante 1 min a TA, se añaden 280 µl de tampón SP2 y se somete a vórtex para mezclar, se incuban las muestras en hielo durante 5 min, se centrifuga a ≥ 10.000 g durante 10 min a TA, se transfiere el sobrenadante a una columna homogeneizadora en un tubo de colección de 2 ml, se centrifuga a 10.000 g durante 2 min a TA, se transfiere el lisado clarificado en un tubo micrófugo de 1,5 ml, se añaden 1,5 volúmenes de tampón SP3 al lisado clarificado, se somete a vórtex inmediatamente para obtener una mezcla homogénea, se transfiere hasta 650 µl de sobrenadante a la columna Hi-Bind, se centrifuga a 10.000 g durante 1 min, se repite, se aplican 100 µl a tampón de elución a 65 °C a la columna, se centrifuga a 10.000 g durante 5 min a TA.

Los secuenciadores de ADN de la próxima generación, tales como 454-FLX (Roche, Branford, CT), SOLiD (Applied Biosystems) y Genome Analyzer (HiSeq2000, Illumina, San Diego, CA) se usaron para proporcionar secuencia de polinucleótidos del ADN y ARN extraído de los tejidos de planta. Los datos en bruto de secuencias se reúnen en contigs. La secuencia de contigs se usa para identificar moléculas disparadoras que se pueden aplicar a la planta para permitir la regulación de la expresión génica.

La secuencia blanco de ADN aislada de (gADN) genómico y ADN codificante (cADN) de las diversas especies de plantas herbáceas para el gen de GS y los cóntigos reunidos se establecen en la SEQ ID NOs 1–59 y Tabla 1.

Ejemplo 2. Polinucleótidos de la invención relacionados con las moléculas disparadoras

5 Las secuencias génicas y fragmentos de la Tabla 1 se dividieron en longitudes de 200 polinucleótidos (200–meros) con regiones superpuestas de 25 polinucleótidos as en SEQ ID NO:37–1056. Estos polinucleótidos se ensayan para seleccionar las regiones disparadoras más eficaces a lo largo de toda secuencia blanco. Los polinucleótidos disparadores se construyen como ssADN o ssARN, dsARN o dsADN o híbridos de dsADN/ARN y se combinan con un agente de transferencia a base de organosilicio para proporcionar una preparación de polinucleótido. Los polinucleótidos se combinan en grupos de dos de tres polinucleótidos por grupo, usando 4–8 nmol de cada polinucleótido. Cada grupo de polinucleótidos se prepara con el agente de transferencia y se aplica a una planta o un campo de plantas en combinación con un inhibidor de GS con herbicida o seguido de un inhibidor de GS tratamiento uno a tres días después de la aplicación del polinucleótido, para determinar el efecto sobre la susceptibilidad de la planta a un inhibidor de GS. El efecto se mide impidiendo el crecimiento y/o matando la planta y se mide 8–14 días después del tratamiento con el grupo de polinucleótidos y el inhibidor de GS. Los grupos más eficaces se identifican y los polinucleótidos individuales se ensayan en los mismos procedimientos que los grupos y se identifican los 200–meros individuales más eficaces. La secuencia de 200–meros se divide en secuencias más pequeñas de regiones de 50–70–meros con regiones de superposición de 10–15 polinucleótidos y los polinucleótidos ensayados de forma individual. El 50–70–mero más eficaz luego se divide en secuencias más pequeñas de regiones de 25–meros con una región de superposición de 12 a 13 polinucleótidos y se ensaya respecto de la eficacia en combinación con tratamiento con inhibidor de GS. Por este procedimiento es posible identificar un oligonucleótido o varios oligonucleótidos que son la molécula disparadora más eficaz para efectuar la sensibilidad de la planta a un inhibidor de GS o modulación de un gen de GS expresión. La modulación de la expresión génica de GS se determina por detección de moléculas de GS siARN específicas de un gen de GS o por observación de una reducción en la cantidad de transcritpo de ARN de GS producido respecto de una planta no tratada o meramente observando el fenotipo anticipado de la aplicación del disparador con el herbicida inhibidor de HS. La detección de siARN se puede llevar a cabo, por ejemplo, usando kits tales como mirVana (Ambion, Austin TX) y mirPremier (Sigma–Aldrich, St Louis, MO).

30 La secuencia blanco de ADN aislada de (gADN) genómico y ADN codificante (cADN) de las diversas especies de plantas herbáceas para el gen de GS y los cóntigos reunidos que se establecen en la SEQ ID NOs 1–59 se dividieron en fragmentos de polinucleótido tal como se establece en SEQ ID NOs 60–1444.

35 Las secuencias génicas y fragmentos de la Tabla 1 se compararon y se identificaron 21–meros de polinucleótidos contiguos que tenían homología a través de diversas secuencias génicas de GS. La finalidad consiste en identificar moléculas disparadoras que son de utilidad como moléculas herbicidas o en combinación con un herbicida inhibidor de GS a través de un rango amplio de especies de malezas. Las secuencias SEQ ID NO: 1444–2045 representan los 21–meros que están presentes en los GS gene de al menos dos de las especies de malezas de la Tabla 1. Se contempla que 21–meros adicionales se pueden seleccionar de las secuencias de la Tabla 1 que son específicos de una única especie de malezas o algunas especies de malezas dentro de un género o moléculas disparadoras que tienen una longitud de al menos 18 nucleótidos contiguos, al menos 19 nucleótidos contiguos, al menos 20 nucleótidos contiguos o al menos 21 nucleótidos contiguos y al menos el 85% idéntico a una secuencia génica de GS seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1–59 o su fragmento.

40 Por este procedimiento es posible identificar un oligonucleótido o varios oligonucleótidos que son la molécula disparadora más eficaz para efectuar la sensibilidad de la planta a inhibidor de GS o modulación de expresión génica de GS. La modulación de la expresión génica de GS se determina por detección de moléculas de GS siARN específicas del gen de GS o por observación de una reducción en la cantidad de transcritpo de ARN de GS producido respecto de una planta no tratada o meramente observando el fenotipo anticipado de la aplicación del disparador con el herbicida que contiene inhibidor de GS. La detección de siARN se puede llevar a cabo, por ejemplo, usando kits tales como mirVana (Ambion, Austin TX) y mirPremier (Sigma–Aldrich, St Louis, MO).

50 La secuencia blanco de ADN aislada de (gADN) genómico y ADN codificante (cADN) de las diversas especies de plantas herbáceas para el gen de GS y los cóntigos reunidos que se establecen en la SEQ ID NOs 1–59 se dividieron en fragmentos tal como se establece en SEQ ID NOS 1444–2045.

Ejemplo 3. Procedimientos usados en la invención relacionados con el tratamiento de plantas o partes de plantas con una mezcla tóxica de las moléculas disparadoras.

55 Se cultivaron plantas de Palmer amaranth sensibles a glifosato (*A. palmeri* R–22) en el invernadero (30 / 20 C día/noche T; fotoperíodo de 14 horas) en macetas de 4 pulgadas cuadradas que contenían Sun Gro® Redi–Earth y 3,5 kg/metros cúbicos de fertilizante Osmocote® 14–14–14. Se trataron plantas Palmer amaranth a 5 a 10 cm de altura con una mezcla de 5 polinucleótidos de ADN monocatenarios cortos (40–meros) antisentido (ssADN) dirigidos a la secuencia codificante de GS a 4 nm (nanomoles) cada uno, formulados en 20 milimoles de tampón de fosfato de sodio (pH 6,8) con 2% de sulfato de amonio y 1% de Silwet L–77. Se ensayaron 3 pools de polinucleótidos ssADN. Un pool denominado GS CpGS1 contenía 5 polinucleótidos (SEQ ID NO: 2046–2050) que se seleccionaron para

dirigir el gen que codifica el gen cloroplástico dirigido de glutamina sintetasa 1. El segundo pool denominado GS CytGS1 contenía 5 polinucleótidos (SEQ ID NO: 2051–2055) que se seleccionaron para dirigir el gen citosólico de glutamina sintetasa 1. El tercer pool (GS Mix) era una combinación de moléculas disparadoras de ssADN, dos de ellas de GS CpGS1 y GS CytGS1 pool más un ssADN (SEQ ID NO: 2056) dirigido a un gen citosólico de glutamina sintetasa 2. Las plantas se tratan manualmente pipeteando 10 µL de solución de polinucleótido en cuatro hojas maduras completamente expandidas, para un total de 40 microlitros de solución por planta. 3 días después del tratamiento con polinucleótido disparador, las plantas se trataron con tasa de Ignite® (Bayer Cropscience) a 1/32X (23 gramos/hectárea) tasa de campo. Hubo cuatro replicaciones de cada tratamiento. El crecimiento de la planta y el desarrollo se calificó visualmente 16 días después del tratamiento con herbicida para determinar la eficacia del pool de polinucleótido y tratamientos con herbicida. El resultado se mostró en la Tabla 2 como la eficacia en % promedio observada de las cuatro replicaciones respecto del control no tratado.

Tabla 2. Actividad de polinucleótido disparador ssADN en Palmer Amaranth, % de eficacia

Control de formulación	GS CpGS1	GS CytGS1	GS Mezcla
3	19	15	36

Ejemplo 4. Un procedimiento para controlar malezas en un campo.

Un procedimiento para controlar las malezas en un campo comprende el uso de polinucleótidos disparadores que pueden modular la expresión de un gen de GS en una o varias de especies de plantas herbáceas blanco. En la SEQ ID NO: 1444–2045, un análisis de secuencias génicas de GS de 22 especies de plantas dio una colección de polinucleótidos 21–meros que se pueden usar en composiciones para afectar el crecimiento o desarrollo o sensibilidad al inhibidor de GS herbicida para controlar múltiples especies de malezas en un campo. Una composición con 1 o 2 o 3 o 4 o más de los polinucleótidos de SEQ ID NO: 1444–2045 permitiría una amplia actividad de la composición contra las múltiples especies de malezas que es producen en un ambiente de campo.

El procedimiento incluye la creación de una composición que comprende componentes que incluyen al menos un polinucleótido de SEQ ID NO: 1444–2045 o cualquier otra expresión génica efectiva que modula polinucleótido esencialmente idéntica o esencialmente complementario de SEQ ID NO:1–59 o su fragmento, un agente de transferencia que moviliza el polinucleótido en una célula vegetal y un herbicida inhibidor de GS y opcionalmente un polinucleótido que modula la expresión de un gen esencial y opcionalmente un herbicida que tiene un modo de acción diferente respecto a un inhibidor de GS. El polinucleótido de la composición incluye a dsARN, ssADN o dsADN o una de sus combinaciones. Una composición con un polinucleótido puede tener una tasa de uso de aproximadamente 1 a 30 gramos o más por acre según el tamaño del polinucleótido y la cantidad de polinucleótidos en la composición. La composición puede incluir uno o varios herbicidas adicionales según se requiera para proporcionar un control efectivo para malezas multiespecies. Un campo de plantas de cultivo que necesitan de un control de malezas de plantas se trata por aplicación por pulverización de la composición. La composición se puede proporcionar como una mezcla en tanque, un tratamiento secuencial de componentes (en general, el polinucleótido seguido del herbicida), un tratamiento simultáneo o mezcla de uno o varios de los componentes de la composición de recipientes separados. El tratamiento del campo se puede producir cuando se requiera para proporcionar control de malezas y los componentes de la composición se pueden ajustar a especies de malezas específicas blanco o familias de malezas.

Tabla 1. Secuencias génicas de glutamina sintetasa aisladas de diversas especies de malezas

SEQ ID NO	ESPECIES	TIPO	Longitud
1	Amaranthus palmeri	cADN Contig	1759
2	Amaranthus palmeri	gADN Contig	8486
3	Amaranthus palmeri	gADN Contig	6862
4	Amaranthus rudis	cADN Contig	1618
5	Amaranthus rudis	cADN Contig	1550
6	Amaranthus rudis	gADN Contig	2000
7	Amaranthus rudis	gADN Contig	208
8	Ambrosia trifida	cADN Contig	1723
9	Ambrosia trifida	gADN Contig	1000

ES 2 645 927 T3

(Continuación)

SEQ ID NO	ESPECIES	TIPO	Longitud
10	Ambrosia trifida	gADN Contig	841
11	Conyza canadensis	cADN Contig	1955
12	Conyza canadensis	gADN Contig	8676
13	Conyza canadensis	gADN Contig	8635
14	Euphorbia heterophylla	cADN Contig	1550
15	Euphorbia heterophylla	gADN Contig	3777
16	Euphorbia heterophylla	gADN Contig	1755
17	Commelina diffusa	cADN Contig	1587
18	Commelina diffusa	gADN Contig	6900
19	Digitaria sanguinalis	cADN Contig	1535
20	Digitaria sanguinalis	gADN Contig	7358
21	Kochia scoparia	cADN Contig	918
22	Kochia scoparia	cADN Contig	867
23	Kochia scoparia	cADN Contig	360
24	Kochia scoparia	gADN Contig	5248
25	Kochia scoparia	gADN Contig	3994
26	Kochia scoparia	gADN Contig	2204
27	Kochia scoparia	gADN Contig	135
28	Lolium multiflorum	cADN Contig	1673
29	Lolium multiflorum	cADN Contig	820
30	Lolium multiflorum	gADN Contig	1888
31	Lolium multiflorum	gADN Contig	1737
32	Lolium multiflorum	gADN Contig	975
33	Lolium multiflorum	gADN Contig	781
34	Lolium multiflorum	gADN Contig	766
35	Lolium multiflorum	gADN Contig	575
36	Lolium multiflorum	gADN Contig	455
37	Abutilon theophrasti	cADN Contig	1270
38	Abutilon theophrasti	gADN Contig	1252
39	Abutilon theophrasti	gADN Contig	885
40	Abutilon theophrasti	gADN Contig	1075
41	Amaranthus albus	cADN Contig	1603
42	Amaranthus clorostachys	cADN Contig	514
43	Amaranthus clorostachys	cADN Contig	1140

ES 2 645 927 T3

(Continuación)

SEQ ID NO	ESPECIES	TIPO	Longitud
44	<i>Amaranthus graecizans</i>	cADN Contig	1691
45	<i>Amaranthus hybridus</i>	cADN Contig	1883
46	<i>Amaranthus lividus</i>	cADN Contig	1683
47	<i>Amaranthus spinosus</i>	cADN Contig	1743
48	<i>Amaranthus thunbergii</i>	cADN Contig	1702
49	<i>Amaranthus viridis</i>	cADN Contig	1744
50	<i>Euphorbia heterophylla</i>	gADN Contig	4893
51	<i>Sorghum halepense</i>	cADN Contig	1581
52	<i>Convolvulus arvensis</i>	cADN Contig	710
53	<i>Chenopodium album</i>	cADN Contig	1276
54	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	gADN Contig	671
55	<i>Euphorbia heterophylla</i>	gADN Contig	3047
56	<i>Euphorbia heterophylla</i>	gADN Contig	2153
57	<i>Euphorbia heterophylla</i>	gADN Contig	946
58	<i>Euphorbia heterophylla</i>	gADN Contig	375
59	<i>Euphorbia heterophylla</i>	gADN Contig	459

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de control de plantas que comprende: tratar una planta con una composición mediante aplicación externa de la composición a la planta, en el que la composición comprende un polinucleótido de ARN bicatenario (ARNds) y un agente de transferencia, en el que dicho polinucleótido de ARNds es idéntico o complementario de un transcrito de ARN de una secuencia del gen de la glutamina sintetasa (GS), en el que dicha secuencia del gen GS se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-4, 6, 7, 9, 10, 14, 16, 17, 20, 21, 23, 27-49, 51-59, y un fragmento de polinucleótido de al menos 18 nucleótidos contiguos del mismo, en el que dicho agente de transferencia acondiciona la superficie de dicha planta para la permeación de dicho polinucleótido de ARNds, y mediante lo cual se suprime o retrasa el crecimiento, desarrollo, o capacidad reproductora, o dicha planta es más sensible a un herbicida inhibidor de GS como resultado de dicha composición que comprende dicho polinucleótido de ARNds, con respecto a una planta no tratada con dicha composición.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que
- (i) dicho agente de transferencia es una composición tensioactiva de organosilicona o un compuesto de organosilicio contenido en la anterior; o
 - (ii) dicha planta se selecciona entre el grupo que consiste en *Abutilon theophrasti*, *Amaranthus albus*, *Amaranthus chlorostachys*, *Amaranthus graecizans*, *Amaranthus hybridus*, *Amaranthus lividus*, *Amaranthus palmeri*, *Amaranthus rudis*, *Amaranthus spinosus*, *Amaranthus thunbergii*, *Ambrosia trifida*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Chenopodium album*, *Commelina diffusa*, *Convolvulus arvensis*, *Conyza canadensis*, *Lolium multiflorum*, *Euphorbia heterophylla*, *Kochia scoparia*, *Sorghum halepense*, y *Digitaria sanguinalis*; o
 - (iii) dicha composición comprende además dicho herbicida inhibidor de GS, o dicha composición comprende dicho herbicida inhibidor de GS y uno o más herbicidas simultáneos similares o diferentes de dicho herbicida inhibidor de GS.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho polinucleótido de ARNds tiene al menos 19 nucleótidos contiguos, al menos 20 nucleótidos contiguos, o al menos 21 nucleótidos de longitud, o dicha composición comprende cualquier combinación de dos o más de dichos polinucleótidos de ARNds.
4. Una composición que comprende un polinucleótido de ARNds y un agente de transferencia, en la que dicho polinucleótido de ARNds es idéntico o complementario de un transcrito de ARN de una secuencia del gen GS, en el que dicha secuencia del gen GS se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-4, 6, 7, 9, 10, 14, 16, 17, 20, 21, 23, 27-49, 51-59, y un fragmento de polinucleótido de al menos 18 nucleótidos contiguos del mismo, en el que dicho agente de transferencia acondiciona la superficie de una planta para la permeación de dicho polinucleótido de ARNds, y mediante lo cual dicha planta tratada con dicha composición tiene su crecimiento, desarrollo, o capacidad reproductora suprimido o retrasado o dicha planta es más sensible a un herbicida inhibidor de GS como resultado de dicha composición que comprende dicho polinucleótido de ARNds, con respecto a una planta no tratada con dicha composición.
5. La composición de la reivindicación 4, en la que
- (i) dicho agente de transferencia es una composición de organosilicona; o
 - (ii) dicho polinucleótido de ARNds tiene al menos 19 nucleótidos contiguos, al menos 20 nucleótidos contiguos, o al menos 21 nucleótidos de longitud; o
 - (iii) dicho polinucleótido de ARNds se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 60-389, 392-529, 532-593, 596-689, 692-785, 790-859, 862-877, 880-991, 996-1069, 1072-1215, 1218-1241, 1244-1263, 1266-1297, y 1300-1443; o
 - (iv) dicho polinucleótido de ARNds se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1444-2045; o
 - (v) dicha composición comprende además dicho herbicida inhibidor de GS, preferentemente, dicho herbicida inhibidor de GS se selecciona entre el grupo que consiste en glufosinato de amonio y bilafos, o dicha composición comprende además un co-herbicida.
6. Un procedimiento para reducir la expresión de un gen GS en una planta que comprende: la aplicación externa a dicha planta de una composición que comprende un polinucleótido de ARNds y un agente de transferencia, en el que dicho polinucleótido de ARNds es idéntico o complementario de un transcrito de ARN de una secuencia del gen GS, en el que dicha secuencia del gen GS se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-4, 6, 7, 9, 10, 14, 16, 17, 20, 21, 23, 27-49, 51-59, y un fragmento de polinucleótido de al menos 18 nucleótidos contiguos del mismo, en el que dicho agente de transferencia acondiciona la superficie de dicha planta para la permeación de dicho polinucleótido de ARNds, y mediante lo cual se reduce dicha expresión de dicho gen GS, con respecto a una planta en la que no se aplicó dicha composición.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que
- (i) dicho agente de transferencia es un compuesto de organosilicona; o
 - (ii) dicho polinucleótido de ARNds tiene al menos 19 nucleótidos contiguos, al menos 20 nucleótidos contiguos, o al menos 21 nucleótidos contiguos de longitud.

8. Un casete de expresión microbiana que comprende un polinucleótido que tiene al menos 18 nucleótidos contiguos, al menos 19 nucleótidos contiguos, al menos 20 nucleótidos contiguos, o al menos 21 nucleótidos contiguos de longitud que son idénticos o complementarios a al menos 18 nucleótidos contiguos de una secuencia del gen GS seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-4, 6, 7, 9, 10, 14, 16, 17, 20, 21, 23, 27-49, y 51-59.
9. Un procedimiento de preparar un polinucleótido de ARNs que comprende a) transformar dicho casete de expresión microbiana de la reivindicación 8 en un microbio; b) hacer proliferar dicho microbio; y c) recuperar un polinucleótido de ARNs de dicho microbio.
10. Un procedimiento para identificar polinucleótidos de ARNs útiles para modular la expresión del gen GS cuando se trata externamente una planta que comprende: a) proporcionar una pluralidad de polinucleótidos de ARNs que comprenden una región idéntica o complementaria de al menos 18 nucleótidos contiguos de un transcrito de ARN de una secuencia del gen GS seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-4, 6, 7, 9, 10, 14, 16, 17, 20, 21, 23, 27-49, y 51-59; b) tratar externamente dicha planta con una composición que comprende uno o más de dichos polinucleótidos de ARNs y un agente de transferencia; c) analizar dicha planta, o un extracto vegetal de la misma para modular la expresión del gen GS, en el que dicho agente de transferencia acondiciona la superficie de dicha planta para la permeación por uno o más de dichos polinucleótidos de ARNs, y d) dicha planta tratada con dicha composición tiene su crecimiento, desarrollo, o capacidad reproductora suprimido o retrasado, o dicha planta es más sensible a un herbicida inhibidor de GS como resultado de dicha composición, con respecto a una planta no tratada con dicha composición.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que
- (i) dicha planta se selecciona entre el grupo que consiste en *Abutilon theophrasti*, *Amaranthus albus*, *Amaranthus chlorostachys*, *Amaranthus graecizans*, *Amaranthus hybridus*, *Amaranthus lividus*, *Amaranthus palmeri*, *Amaranthus rudis*, *Amaranthus spinosus*, *Amaranthus thunbergii*, *Ambrosia trifida*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Chenopodium album*, *Commelina diffusa*, *Convolvulus arvensis*, *Conyza canadensis*, *Lolium multiflorum*, *Euphorbia heterophylla*, *Kochia scoparia*, *Sorghum halepense*, y *Digitaria sanguinalis*; o
 - (ii) dicha expresión del gen GS se reduce con respecto a una planta no tratada con dicha composición; o
 - (iii) dicho agente de transferencia es un compuesto de organosilicona.
12. Una composición agroquímica que comprende una premezcla de un polinucleótido de ARNs, un herbicida inhibidor de GS, un co-herbicida, y un agente de transferencia, en el que dicho polinucleótido de ARNs es idéntico o complementario de un transcrito de ARN de una secuencia del gen GS, en el que dicha secuencia del gen GS se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-4, 6, 7, 9, 10, 14, 16, 17, 20, 21, 23, 27-49, 51-59, y un fragmento de polinucleótido de al menos 18 nucleótidos contiguos del mismo, en el que dicho agente de transferencia acondiciona la superficie de una planta para la permeación de dicho polinucleótido de ARNs, y mediante lo cual dicha planta tratada con dicha composición tiene un crecimiento, desarrollo, o capacidad reproductora suprimida o retrasada, o dicha planta es más sensible a un herbicida inhibidor de dicha GS como resultado de dicha composición que comprende dicho polinucleótido de ARNs, con respecto a una planta no tratada con dicha composición.
13. La composición agroquímica de la reivindicación 12, en la que dicho co-herbicida se selecciona entre el grupo que consiste en herbicidas de amida, herbicidas de arsénico, herbicidas de benzotiazol, herbicidas de benzoilciclohexanodiona, herbicidas de alquilsulfonato de benzofuranilo, herbicidas de ciclohexeno oxima, herbicidas de ciclopropilisoxazol, herbicidas de dicarboximida, herbicidas de dinitroanilina, herbicidas de dinitrofenol, herbicidas de difenil éter, herbicidas de ditiocarbamato, herbicidas de glicina, herbicidas halogenados alifáticos, herbicidas de imidazolinona, herbicidas inorgánicos, herbicidas de nitrilo, herbicidas organofosforosos, herbicidas de oxadiazolona, herbicidas de oxazol, herbicidas de fenoxi, herbicidas de fenilendiamina, herbicidas de pirazol, herbicidas de piridazina, herbicidas de piridazinona, herbicidas de piridina, herbicidas de pirimidinadiazina, herbicidas de deprimidiniloxibencilamina, herbicidas de amonio cuaternario, herbicidas de tiocarbamato, herbicidas de tiocarbonato, herbicidas de tiourea, herbicidas de tiazina, herbicidas de triazinona, herbicidas de tiazol, herbicidas de triazolona, herbicidas de triazolpirimidina, herbicidas de uracilo, y herbicidas de urea.
14. Una composición agroquímica que comprende una premezcla de un polinucleótido de ARNs, un herbicida inhibidor de GS, un plaguicida, y un agente de transferencia, en el que dicho polinucleótido de ARNs es idéntico o complementario de un transcrito de ARN de una secuencia del gen GS, en el que dicha secuencia del gen GS se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 1-4, 6, 7, 9, 10, 14, 16, 17, 20, 21, 23, 27-49, 51-59, y un fragmento de polinucleótido de al menos 18 nucleótidos contiguos del mismo, en el que dicho agente de transferencia acondiciona la superficie de una planta para la permeación de dicho polinucleótido de ARNs, mediante lo cual, un campo de plantas de cultivo que necesita de control de malezas y plagas se trata con dicha composición, y mediante lo cual dicha planta tratada con dicha composición tiene un crecimiento, desarrollo, o capacidad reproductora suprimida o retrasada, o dicha planta es más sensible a dicho herbicida inhibidor de dicha GS como resultado de dicha composición que comprende dicho polinucleótido de ARNs, con respecto a una planta no tratada con dicha composición.

15. La composición agroquímica de la reivindicación 14, en la que dicho pesticida se selecciona entre el grupo que consiste en insecticidas, fungicidas, nematocidas, bactericidas, acaricidas, reguladores del crecimiento, quimioesterilizantes, semioquímicos, repelentes, atrayentes, feromonas, estimulantes de la alimentación, y bioplaguicidas.
- 5 16. Una composición que comprende un polinucleótido de ARNs y un agente de transferencia, en el que dicho polinucleótido de ARNs es idéntico o complementario de un transcrito de ARN de una secuencia del gen GS, en el que dicha secuencia del gen GS se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 2046 -2056 y un fragmento de polinucleótido de al menos 18 nucleótidos contiguos, en el que dicho agente de transferencia acondiciona la superficie de una planta para la permeación de dicho polinucleótido de ARNs, y mediante lo cual
- 10 dicha planta tratada con dicha composición tiene su crecimiento, desarrollo, o capacidad reproductora suprimido o retrasado o dicha planta es más sensible a un herbicida inhibidor de GS como resultado de dicha composición que comprende dicho polinucleótido de ARNs, con respecto a una planta no tratada con dicha composición.