

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 679**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2011 E 17152830 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3231872**

54 Título: **Moléculas polinucleotídicas para la regulación génica en plantas**

30 Prioridad:

08.03.2010 US 311762 P

28.05.2010 US 349807 P

10.09.2010 US 381556 P

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

05.03.2021

73 Titular/es:

MONSANTO TECHNOLOGY LLC (100.0%)
800 North Lindbergh Boulevard
Saint Louis, MO 63167, US

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 809 679 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moléculas polinucleotídicas para la regulación génica en plantas

Campo de la invención

En el presente documento se desvelan moléculas polinucleotídicas para la regulación de genes en plantas y procedimientos para preparar y utilizar dichas moléculas.

Antecedentes

La ineficacia de los herbicidas para controlar las malezas resistentes es un problema, especialmente cuando dichas malezas crecen en campos de cultivo resistentes a herbicidas que pueden tener una resistencia a herbicidas más baja que la maleza. Las malezas resistentes a herbicidas se identifican por una variedad de modos de acción. La resistencia resultante de la selección de múltiples copias de genes que producen proteínas dirigidas al herbicida en amaranto se describe en Gaines y col. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(3):1029-1034. La resistencia resultante de mutaciones en genes que producen proteínas dirigidas a herbicidas en amor de hortelano, lechuga espinaca y raigrás se describe en Baerson y col. (2002) *Plant Physiol.*, 129(3):1265-1275; Preston y col. (2006) *Pesticide Biochem. Physiol.*, 84(3):227-235; y Wakelin y col. (2006) *Weed Res. (Oxford)*, 46(5):432-440. El secuestro vacuolar del glifosato es un mecanismo que se observa en la hierba de caballo resistente al glifosato; véase Ge y col. (2010) *Pest Management Sci.*, 66:576-576. La resistencia resultante de la expresión de enzimas que metabolizan herbicidas en una forma química inactiva en garranchuelos se describe en Hidayat y col. (1997) *Pesticide Biochem. Physiol.*, 57(2):137-146. Reddy y col. (2008) *J. Agric. Food Chem.*, 56(6):2125-2130 describieron la acumulación de ácido aminometilfosfónico en especies vegetales tratadas con glifosato. Kusaba et al., (2004) *Curr Opin Biotechnol.*, 15: 139-143 informaron sobre el uso del ARNi como una herramienta para analizar la función génica y mejora de las plantas. Sin embargo, el único procedimiento para introducir ARN inhibidor en las plantas es el bombardeo de partículas. En el documento WO 03/004649 se describen procedimientos para degradar ARN vírico en células vegetales aplicando ARNbc con suficiente similitud de secuencia con el ARN vírico. El procedimiento descrito para introducir ARNbc en las células vegetales utiliza como abrasivo carburo de silicio (carborundo), un agente físico, y se aplica presión sobre la superficie foliar utilizando el inóculo y el abrasivo.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona moléculas polinucleotídicas y procedimientos para regular genes en plantas, por ejemplo, proporcionando ARN para la regulación sistémica de genes. Varios aspectos de la invención proporcionan moléculas polinucleotídicas y procedimientos para regular genes y transgenes endógenos en una célula vegetal y moléculas polinucleotídicas. Los polinucleótidos, composiciones y procedimientos divulgados en el presente documento son útiles para regular genes endógenos de una plaga o patógeno vegetal. En un aspecto de la invención, el método para regular la expresión de un gen diana endógeno en plantas en crecimiento comprende la aplicación tópica en la superficie de las plantas en crecimiento de: (a) al menos un polinucleótido de ARN bicatenario no transcribible que comprende una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en cualquiera de dicho gen diana endógeno o ARN mensajero transcrito a partir de dicho gen diana endógeno; y (b) una cantidad eficaz de un agente químico de transferencia, en el que dicho agente químico de transferencia permite que dicho al menos un polinucleótido de ARN bicatenario no transcribible se infiltre al interior de dichas plantas en crecimiento, en el que dicho agente químico de transferencia es un tensioactivo de organosilicona, y mediante lo cual dicho al menos un polinucleótido de ARN bicatenario no transcribible regula la expresión de dicho gen diana endógeno.

Las composiciones de esta invención comprenden: (a) una solución de polinucleótidos de ARN bicatenario no transcribible que comprende una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrito a partir de dicho gen endógeno; en el que dichos polinucleótidos de ARN bicatenario no transcribible son capaces de hibridar en condiciones fisiológicas en células de dicha planta con dicho gen endógeno o con dicho ARN transcrito a partir de dicho gen endógeno para efectuar el silenciamiento de dicho gen endógeno; y (b) un agente químico de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de dichos polipéptidos de ARN bicatenario no transcribible desde la superficie exterior de dicha planta al interior de las células de dicha planta, en el que dicho agente químico de transferencia es un tensioactivo de organosilicona.

Breve descripción de los dibujos

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

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

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

12) La Figura 4 ilustra la decoloración en plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas con una composición de

ARNbc.

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

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

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

16) La **Figura 8** muestra los resultados de la proteína EPSPS medidos en hojas de palmera amaranto resistente a glifosato tratadas por vía tópica con oligonucleótidos de ADNmc antisentido para EPSPS, tal como se describe en el **Ejemplo 9**; los tratamientos se indican mediante los números dentro de los círculos y en referencia a la **Tabla 2**.

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

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

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

20) La **Figura 12A** ilustra la decoloración apical de las hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas por vía tópica con tampón ("Control"), con un polinucleótido de ARNbc de 200 unidades monoméricas (meros) con una secuencia de ARN que corresponde al segmento que consiste en los nucleótidos 914 - 1113 de la **SEQ ID NO:2** ("ARNbc de 200 nt"), y una combinación de oligonucleótidos y polinucleótidos de ADN monocatenario (**SEQ ID NO:16, 17, 20, 21, 24, 25 y 26**) ("oligos de ADNmc") tal como se describe en el **Ejemplo 10**. La **Figura 12B** ilustra los resultados de un análisis de transferencia *Northern* de ARN aislado de plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas con tampón (control), con el polinucleótido de ARNbc de 200 meros y con los oligonucleótidos de ADNmc. También se muestra ARN aislado de plantas que se sometieron a estrés manteniéndolas a 4 grados Celsius y en la oscuridad durante toda la noche antes del tratamiento con los polinucleótidos de ARNbc de 200 meros.

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

22) La **Figura 14** ilustra la decoloración apical de las hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas por vía tópica con los polinucleótidos indicados en la **Tabla 5** tal como se describe en el **Ejemplo 10**.

23) La **Figura 15** ilustra la decoloración apical de las hojas observada en plantas de *Nicotiana benthamiana* después del tratamiento tópico con el ADNmc antisentido de 21 meros de PDS (**SEQ ID NO:34**, "PDS antisentido de 21 nt") o con oligonucleótidos de 22 meros antisentido de PDS sometidos anteriormente a ensayo sin un promotor T7 (**SEQ ID NO:22 y 23**) ("PDS antisentido"). No se observó o apenas se observó decoloración apical en las hojas después del tratamiento tópico solo con tampón o después del tratamiento tópico con ADNmc sentido de 21 meros de PDS (**SEQ ID NO:36**, "PDS sentido de 21 nt") tal como se describe en el **Ejemplo 10**.

24) La **Figura 16** ilustra una alineación de las secuencias de ADN de PDS de palmera amaranto y *Nicotiana benthamiana* que muestran una identidad de aproximadamente 71% (1252/1762) tal como se describe en el **Ejemplo 11**.

25) La **Figura 17** ilustra la decoloración apical de las hojas observada en plantas de palmera amaranto tratadas por vía tópica con ARNbc de PDS de palmera de 678 pb o 198 pb pero no en plantas de palmera amaranto tratadas por vía tópica con un ARNbc del gen del gusano de la raíz de maíz de 260 pares de bases, tal como se describe en el **Ejemplo 11**.

26) La **Figura 18A** ilustra la decoloración apical en hojas, tallos y flores de plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas por vía tópica primero con una solución de tensioactivo y después con un oligonucleótido de ADNmc de PDS para inducir el silenciamiento sistémico de la fitoeno desaturasa, tal como se describe en el **Ejemplo 12**. La **Figura 18B** ilustra la decoloración apical en hojas, tallos y flores de plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas por vía tópica con un oligonucleótido de ADNmc de PDS para inducir el silenciamiento sistémico de la fitoeno desaturasa, con o sin acondicionamiento con una solución de tensioactivo, tal como se describe en el **Ejemplo 12**.

27) La **Figura 19** ilustra resultados de ensayos en diferentes líneas de palmera amaranto resistentes a glifosato (3 plantas por repetición) tratadas con las condiciones indicadas en la **Tabla 6**, tal como se describe en el **Ejemplo 13**. Las fotografías se tomaron 7 días después del tratamiento con glifosato (experimentos 1 - 6) o 9 días después del tratamiento con glifosato (experimentos 7 - 9).

28) La **Figura 20** ilustra la ubicación de dos ARN pequeños identificados como abundantes en las plantas de palmera amaranto tratadas con ARNbc de EPSPS y que se muestran como nucleótidos en cursiva subrayados en las posiciones 564-588 y 743 - 767 de EPSPS de longitud completa (**SEQ ID NO:40**), tal como se describe en el **Ejemplo 14**. La secuencia de EPSPS también muestra la ubicación de las cuatro moléculas oligonucleotídicas de ARNbc de EPSPS de tamaño "corto" (texto subrayado, sin cursiva) y los tres polinucleótidos de ARN bicatenario

“largos” (texto en negrita, tal como se describe en el **Ejemplo 1**).

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

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

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

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

33) La **Figura 25A** ilustra doce polinucleótidos de ARNbc correspondientes a segmentos de ADN de aproximadamente 250 pb, cubriendo cada uno de ellos, con una disposición en mosaico (*tiling*), la secuencia codificante completa y parte de las regiones 5' y 3' no traducidas del gen EPSPS de la Palmera, tal como se describe en el **Ejemplo 21**; las cuatro moléculas oligonucleotídicas de ARNbc de EPSPS de tamaño “corto”, tal como se describe en el **Ejemplo 1** y en la **Figura 1**, están ubicadas en los segmentos 2, 3, 4 y 8 dispuestos en mosaico, respectivamente, y se muestran como barras gris claro dentro de dichos segmentos. La **Figura 25B** y la **Figura 25C** ilustran los resultados del tratamiento de plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato con ARNbc diseñado a partir de estos segmentos dispuestos en mosaico o con las cuatro moléculas de ARNbc “cortas” o con tampón.

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

35) La **Figura 27** ilustra los resultados del tratamiento de una población de campo de palmera amaranto resistente a glifosato con gran cantidad de copias con una composición que contenía una cantidad de 20X o 100X de polinucleótidos de ARNbc de EPSPS, tensioactivo, sulfato de amonio y herbicida o con una composición que contenía tensioactivo, sulfato de amonio y herbicida, tal como se describe en el **Ejemplo 23**. Para cada tratamiento, se trataron dos parcelas duplicadas de 1 pie por 5 pies.

36) La **Figura 28** representa la evolución de la decoloración y muerte de las plantas de lechuga tratadas con 1 nanomol de ADNmc por planta (de arriba a abajo) 37, 46 y 60 días después del tratamiento, tal como se describe en el **Ejemplo 24**.

37) La **Figura 29A** ilustra el silenciamiento sistémico en plantas de lechuga que se pone de manifiesto por la decoloración observada 4 o 12 días después del tratamiento tópico con polinucleótidos, tal como se describe en el **Ejemplo 24**. La **Figura 29B** muestra el silenciamiento sistémico que se pone de manifiesto por la decoloración observada 4 días después del tratamiento tópico con los cuatro ADNmc antisentido individuales (“HL287”, **SEQ ID NO:43**; “HL288”, **SEQ ID NO:44**; “HL289”, **SEQ ID NO:45**; y “HL290”, **SEQ ID NO:46**) o con una mezcla de los cuatro.

38) La **Figura 30** ilustra la decoloración de hojas (panel superior derecho) y flores (panel central derecho) de plantas de tomate tratadas con polinucleótidos de fitoeno desaturasa de tomate, tal como se describe en el **Ejemplo 25**. La **Figura 30** también ilustra el retraso en el crecimiento de las plantas de tomate tratadas con polinucleótidos de PDS (panel inferior).

39) La **Figura 31** ilustra la mejora de la actividad herbicida del glifosato en palmera amaranto con poca cantidad de copias de los polinucleótidos de EPSPS mediante polinucleótidos de TIF y que los polinucleótidos de TIF tienen actividad herbicida propia, tal como se describe en el **Ejemplo 26**. Los polinucleótidos de EPSPS “1, 3, 4” se refieren a ARNbc “cortos” que tienen una cadena antisentido que es capaz de hibridar con el ARNm transcrito a partir del gen EPSPS de palmera amaranto (**SEQ ID NO:1**) en las posiciones 14-38 (ARNbc-1 corto), 345-369 (ARNbc-3 corto) y 1105-1129 (ARNbc-4 corto), respectivamente, tal como se indica mediante los nucleótidos subrayados en la **Figura 1** (véase el **Ejemplo 1**). EPSPS “5” se refiere a IDT [5] (**SEQ ID NO:91-92**, tal como se describe en la **Tabla 11**).

40) La **Figura 32** ilustra la mejora de la actividad herbicida del glifosato en palmera amaranto con gran cantidad de copias de los polinucleótidos de EPSPS mediante polinucleótidos de TIF y que los polinucleótidos de TIF tienen actividad herbicida propia, tal como se describe en el **Ejemplo 26**. Los polinucleótidos de EPSPS “1, 3, 4” se refieren a ARNbc “cortos” que tienen una cadena antisentido que es capaz de hibridar con el ARNm transcrito a partir del gen EPSPS de palmera amaranto (**SEQ ID NO:1**) en las posiciones 14-38 (ARNbc-1 corto), 345-369 (ARNbc-3 corto) y 1105-1129 (ARNbc-4 corto), respectivamente, tal como se indica mediante los nucleótidos subrayados en la **Figura 1** (véase el **Ejemplo 1**). EPSPS “5” se refiere a IDT [5] (**SEQ ID NO:91-92**, tal como se describe en la **Tabla 11**).

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

42) La **Figura 34** ilustra una alineación del promotor del locus 1 de PDS (**SEQ ID NO:319**) y del promotor del locus

2 de PDS (**SEQ ID NO:320**) de *Nicotiana benthamiana*, tal como se describe en el **Ejemplo 30**.

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

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

45) La **Figura 37** ilustra el efecto sobre plantas monocotiledóneas de *Zea mays* (Gaspe), mediante tratamiento tóxico con polinucleótidos de ARNbc ("oligo de ADN de EPSPS") dirigidos al gen EPSPS endógeno o con tampón solo como control, tal como se describe en el **Ejemplo 34**.

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

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

Descripción detallada de la invención

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

Polinucleótidos

49) Tal como se usa en el presente documento, "polinucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que contiene múltiples nucleótidos y generalmente se refiere a "oligonucleótidos" (una molécula polinucleotídica de 18-25 nucleótidos de longitud) y polinucleótidos de 26 o más nucleótidos. Las realizaciones de esta invención incluyen composiciones que incluyen oligonucleótidos que tienen una longitud de 18-25 nucleótidos (por ejemplo, 18 meros, 19 meros, 20 meros, 21 meros, 22 meros, 23 meros, 24 meros o 25 meros) o polinucleótidos de longitud media que tienen una longitud de 26 o más nucleótidos (por ejemplo, polinucleótidos de 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100, aproximadamente 110, aproximadamente 120, aproximadamente 130, aproximadamente 140, aproximadamente 150, aproximadamente 160, aproximadamente 170, aproximadamente 180, aproximadamente 190, aproximadamente 200, aproximadamente 210, aproximadamente 220, aproximadamente 230, aproximadamente 240, aproximadamente 250, aproximadamente 260, aproximadamente 270, aproximadamente 280, aproximadamente 290 o aproximadamente 300 nucleótidos) o polinucleótidos largos que tienen una longitud mayor que aproximadamente 300 nucleótidos (por ejemplo, polinucleótidos de entre aproximadamente 300 a aproximadamente 400 nucleótidos, entre aproximadamente 400 a aproximadamente 500 nucleótidos, entre aproximadamente 500 a aproximadamente 600 nucleótidos, entre aproximadamente 600 a aproximadamente 700 nucleótidos, entre aproximadamente 700 a aproximadamente 800 nucleótidos, entre aproximadamente 800 a aproximadamente 900 nucleótidos, entre aproximadamente 900 a aproximadamente 1000 nucleótidos, entre aproximadamente 300 a aproximadamente 500 nucleótidos, entre aproximadamente 300 a aproximadamente 600 nucleótidos, entre aproximadamente 300 a aproximadamente 700 nucleótidos, entre aproximadamente 300 a aproximadamente 800 nucleótidos, entre aproximadamente 300 a aproximadamente 900 nucleótidos o aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, o incluso mayores que aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, por ejemplo hasta la longitud completa de un gen diana incluidas las porciones codificantes o no codificantes o las porciones tanto codificantes como no codificantes del gen diana). Cuando un polinucleótido es bicatenario, su longitud puede describirse de forma similar en términos de pares de bases.

51) Los polinucleótidos son ARN bicatenario.

Sin pretender vincularse a ningún mecanismo, se cree que dichos polinucleótidos son, o producirán, ARN monocatenario con al menos un segmento que se hibridará en condiciones fisiológicas en una célula con ARN transcrito del gen objeto de la supresión.

52) En algunas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos se formulan con contraiones u otras moléculas que se sabe que se asocian con moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, iones de tetraalquilamonio, iones de trialquilamonio, iones de sulfonio, iones de litio y poliaminas tales como espermina, espermidina o putrescina. En algunas realizaciones, las composiciones de polinucleótidos se formulan con un herbicida no polinucleotídico (por ejemplo, los herbicidas químicos desvelados en el presente documento en la sección titulada "Proteínas de tolerancia a herbicidas") o con un agente de transferencia o agente que potencia la permeabilidad (véase la sección titulada

“Agentes y Tratamientos para potenciar la permeabilidad”).

53) Los polinucleótidos se diseñan para inducir la regulación o supresión sistémica de un gen endógeno en una planta y se diseñan para tener una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a la secuencia (que puede ser una secuencia codificante o una secuencia no codificante) de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir de un gen endógeno de una planta. “Esencialmente idéntica” o “esencialmente complementaria” significa que los polinucleótidos (o al menos una cadena de un polinucleótido bicatenario) están diseñados para hibridar en condiciones fisiológicas en células de la planta con el gen endógeno o con ARN transcrito a partir del gen endógeno para producir la regulación o supresión del gen endógeno.

56) Normalmente, los polinucleótidos útiles en esta invención, efectúan la regulación o modulación (por ejemplo, supresión) de la expresión génica durante un período a lo largo de la vida de la planta tratada de al menos 1 semana, o un período más prolongado, y normalmente de forma sistémica. Por ejemplo, a los pocos días de tratar a una hoja de planta con una composición de polinucleótidos de esta invención, se pueden detectar ARN primarios y transitivos en otras hojas laterales y por encima de la hoja tratada y en tejido apical.

57) En la técnica se conocen procedimientos para preparar polinucleótidos. La preparación comercial de oligonucleótidos a menudo proporciona 2 desoxirribonucleótidos en el extremo 3' de la cadena sentido. Las moléculas polinucleotídicas largas pueden sintetizarse a partir de kits disponibles en el mercado, por ejemplo, los kits de Ambion tienen ADN ligado en el extremo 5' que codifica un promotor de polimerasa T7 bacteriano que fabrica cadenas de ARN que pueden ensamblarse en un ARNbc. Alternativamente, se pueden producir moléculas de ADNbc a partir de casetes de expresión en células bacterianas que tienen actividad enzimática de RNasa III regulada o deficiente. Las moléculas polinucleotídicas largas también pueden ensamblarse a partir de múltiples fragmentos de ARN o ADN. En algunas realizaciones se utilizan parámetros de diseño, tales como la puntuación de Reynolds y las reglas de Tuschl conocidas en la técnica para seleccionar secuencias de polinucleótidos eficaces para el silenciamiento génico. En algunas realizaciones, se utiliza el diseño aleatorio o la selección empírica de secuencias de polinucleótidos para seleccionar las secuencias de polinucleótidos eficaces para el silenciamiento génico. En algunas realizaciones la secuencia de un polinucleótido se explora contra el ADN genómico de la planta prevista para minimizar el silenciamiento accidental de otros genes.

58) Las composiciones de polinucleótidos de esta invención son útiles en composiciones, tales como soluciones de moléculas polinucleotídicas, a concentraciones bajas, solas o en combinación con otros componentes (por ejemplo, tensioactivos, sales y herbicidas no polinucleotídicos) en la misma solución o en soluciones aplicadas por separado. Aunque no existe un límite superior en las concentraciones y dosificaciones de moléculas polinucleotídicas que pueden ser útiles en los procedimientos de esta invención, en general se buscará la eficacia de las concentraciones y dosificaciones eficaces más bajas. Las concentraciones pueden ajustarse teniendo en cuenta el volumen de pulverización aplicado sobre las hojas de las plantas. En una realización, un tratamiento útil para plantas herbáceas utilizando moléculas de oligonucleótidos de 25 meros es de aproximadamente 1 nanomol de moléculas de oligonucleótido por planta, por ejemplo, de aproximadamente 0,05 a 1 nanomol por planta. Otras realizaciones para plantas herbáceas incluyen intervalos útiles de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 100 nanomoles o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 nanomoles o de aproximadamente 1 nanomol a aproximadamente 10 nanomoles de polinucleótidos por planta. Las plantas, árboles o viñas muy grandes pueden requerir, en consecuencia, cantidades mayores de polinucleótidos. Cuando se utilizan moléculas de ARNbc largas que pueden procesarse en múltiples oligonucleótidos, se pueden usar concentraciones más bajas. En los ejemplos más adelante para ilustrar realizaciones de la invención, cuando el factor 1X se aplica a moléculas de oligonucleótido se usa arbitrariamente para indicar un tratamiento de 0,8 nanomoles de molécula polinucleotídica por planta; 10X, 8 nanomoles de molécula polinucleotídica por planta; y 100X, 80 nanomoles de molécula de polinucleótido por planta. Por ejemplo, en el ejemplo 23, las plantas se trataron con una solución acuosa que comprende un tratamiento de 100X de ARNbc de EPSPS (264 microgramos u 80 nanomoles) por planta.

Moléculas de ARN monocatenario

59) Las moléculas polinucleotídicas para proporcionar ARN monocatenario pueden proporcionar una regulación sistémica de los genes en una célula vegetal. Más específicamente, la invención también proporciona composiciones y procedimientos para inducir la regulación sistémica (por ejemplo, supresión o silenciamiento sistémico) de un gen diana en una planta mediante la aplicación tópica en la planta de una molécula polinucleotídica con un segmento en una secuencia de nucleótidos esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en el gen diana o el ARN transcrito a partir del gen diana, mediante lo cual la composición se infiltra al interior de la planta e induce la regulación sistémica del gen diana mediante la acción de ARN monocatenario que hibrida con el ARN transcrito, por ejemplo, ARN mensajero. La molécula polinucleotídica puede ser una o más moléculas polinucleotídicas con uno solo segmento de este tipo, múltiples segmentos de este tipo, múltiples segmentos diferentes de este tipo o una combinación de los mismos.

Agentes de transferencia, agentes y tratamientos para potenciar la permeabilidad

60) Las composiciones y procedimientos de esta invención comprenden agentes de transferencia o agentes y tratamientos para potenciar la permeabilidad para acondicionar la superficie del tejido vegetal, por ejemplo, hojas,

tallos, raíces, flores o frutas, para la infiltración de las moléculas polinucleotídicas en las células vegetales. La transferencia de polinucleótidos en células vegetales puede facilitarse mediante la aplicación previa o simultánea de un agente de transferencia de polinucleótidos en el tejido vegetal. En algunas realizaciones el agente de transferencia se aplica posteriormente a la aplicación de la composición de polinucleótidos. El agente de transferencia de polinucleótidos posibilita una vía para los polinucleótidos a través de las barreras de cera de la cutícula, estomas y/o pared celular o barreras membranosas y al interior de las células vegetales. Los agentes adecuados para facilitar la transferencia de la composición a una célula vegetal incluyen agentes que aumentan la permeabilidad del exterior de la planta o que aumentan la permeabilidad de las células vegetales para oligonucleótidos o polinucleótidos. Dichos agentes para facilitar la transferencia de la composición a una célula vegetal incluyen un agente químico. Los agentes químicos para acondicionamiento incluyen tensioactivos de organosilicona. Las realizaciones del procedimiento opcionalmente pueden incluir una etapa de incubación, una etapa de neutralización (por ejemplo, para neutralizar un ácido, base o agente de oxidación o para desactivar una enzima), una etapa de aclarado o combinaciones de estas. Las realizaciones de agentes o tratamientos para acondicionar una planta para la infiltración de polinucleótidos incluyen emulsiones, emulsiones inversas, liposomas y otras composiciones similares a micelas. Las realizaciones de agentes o tratamientos para acondicionar una planta para la infiltración de polinucleótidos incluyen contraiones u otras moléculas que se sabe que se asocian con moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, iones de amonio inorgánico, iones de alquilamonio, iones de litio, poliaminas tales como espermina, espermidina o putrescina y otros cationes. Los disolventes orgánicos útiles para acondicionar una planta para la infiltración de polinucleótidos incluyen DMSO, DMF, piridina, *N*-pirrolidina, hexametilfosforamida, acetonitrilo, dioxano, polipropilenglicol, otros disolventes miscibles con agua o que disolverán fosfonucleótidos en sistemas no acuosos (tales como los que se utilizan en reacciones sintéticas). Se pueden utilizar aceites de origen natural o sintéticos con o sin tensioactivos o emulsionantes, por ejemplo, se pueden utilizar aceites de origen vegetal, aceites de cultivo (tales como los enumerados en el 9º Compendio de Adyuvantes de Herbicidas, disponibles públicamente en línea en www.herbicide.adjuvants.com), por ejemplo, aceites parafínicos, ésteres de ácidos grasos de polioli o aceites con moléculas de cadena corta modificadas con amidas o poliaminas tales como polietilenimina o *N*-pirrolidina.

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

62) Son tensioactivos útiles los tensioactivos de organosilicona, incluidos los tensioactivos de organosilicona no iónicos, por ejemplo, tensioactivos de etoxilato de trisiloxano o un copolímero de poliéster y silicona tal como un copolímero de heptametil trisiloxano modificado con óxido de polialquileño y aliloxipolipropilenglicol metiléter (disponible en el mercado como tensioactivo Silwet® L-77 que tiene el número CAS 27306-78-1 y el número EPA: CAL.REG.NO. 5905-50073-AA, actualmente comercializado por Momentive Performance Materials, Albany, Nueva York). Cuando se usa el tensioactivo Silwet L-77 como tratamiento de prepulverización de las hojas de plantas u otras superficies, las concentraciones en el intervalo de aproximadamente 0,015 a aproximadamente 2 por ciento en peso (%p) (por ejemplo, de 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 %p) son eficaces para preparar una hoja u otra superficie vegetal para la transferencia de moléculas polinucleotídicas al interior de células vegetales a partir de una aplicación tópica en la superficie.

64) Los agentes para el acondicionamiento en el laboratorio de una planta para la infiltración de polinucleótidos incluyen, por ejemplo, la aplicación de un agente químico, un tratamiento enzimático, calentamiento o enfriamiento, un tratamiento con presión negativa o positiva o un tratamiento con ultrasonido. Los agentes para acondicionar plantas en un campo incluyen tensioactivos como los descritos anteriormente.

45 **Genes diana y genes esenciales**

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

66) Los genes diana pueden incluir genes que codifican proteínas de tolerancia a herbicidas, secuencias no codificantes que incluyen ARN reguladores y genes esenciales, que son genes necesarios para sustentar la vida celular o para permitir la reproducción de un organismo. Las realizaciones de genes esenciales incluyen genes que participan en la replicación del ADN o ARN, transcripción génica, regulación génica mediada por ARN, síntesis proteica, producción de energía y división celular. Un ejemplo de un compendio de genes esenciales se describe en Zhang y col. (2004) *Nucleic Acids Res.*, 32:D271-D272 y está disponible en tubic.tju.edu.cn/deg/; versión DEG 5.4 enumera 777 genes esenciales para *Arabidopsis thaliana*. Los ejemplos de genes esenciales incluyen el factor de

5 iniciación de la traducción (TIF, *translation initiation factor*) y la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO, *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase*). Los genes diana pueden incluir genes que codifican factores de transcripción y genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis o catabolismo de moléculas en plantas tales como, pero sin limitación, aminoácidos, ácidos grasos y otros lípidos, azúcares y otros carbohidratos, polímeros biológicos y metabolitos secundarios incluidos alcaloides, terpenoides, policétidos, péptidos no ribosómicos y metabolitos secundarios de origen biosintético mixto.

Composiciones y Procedimientos

10 **67)** Las moléculas de ARN bicatenario de esta invención pueden proporcionarse directamente a la célula vegetal como ARN o pueden proporcionarse indirectamente, por ejemplo, cuando una molécula polinucleotídica en la composición de tratamiento provoca en células de una planta la producción del ARN monocatenario que es capaz de hibridar con el transcrito del gen diana. Tal como se describe anteriormente, las realizaciones y las composiciones de moléculas polinucleotídicas además incluyen uno o más agentes potenciadores de la permeabilidad para facilitar la transferencia de las moléculas polinucleotídicas a una célula vegetal, tales como agentes para acondicionar una planta para la infiltración de polinucleótidos. En aspectos de la invención, los procedimientos incluyen una o más aplicaciones de la composición de polinucleótido y una o más aplicaciones de un agente potenciador de la permeabilidad para acondicionar una planta para la infiltración mediante polinucleótidos.

Procedimientos de silenciamiento transgénico

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

Aplicaciones específicas

25 **73)** En un aspecto relacionado, las composiciones y procedimientos de la invención también son útiles para silenciar transitoriamente uno o más genes en una célula vegetal o planta entera en crecimiento para producir un fenotipo deseado en respuesta a condiciones de cultivo, estrés ambiental o abiótico o biótico, o a un cambio en la demanda del mercado durante la estación de cultivo o en el ambiente posterior a la cosecha. Por ejemplo, las composiciones y procedimientos de la invención son útiles para suprimir transitoriamente un gen biosintético o catabólico para producir una planta o producto vegetal con un fenotipo deseado, tal como una composición nutricional deseada de un producto vegetal de cultivo, por ejemplo, suprimir un gen FAD2 para producir un perfil de ácido graso deseado en soja o colza u otra semilla de aceite o suprimir genes biosintéticos de lignina tales como COMT y CCOMT para proporcionar plantas forrajeras más fáciles de digerir. De forma similar, las composiciones y procedimientos de la invención son útiles para suprimir transitoriamente una molécula reguladora de ARN tal como un micro ARN (miARN) o un señuelo de miARN endógeno tal como un miARN endógeno, un precursor de miARN o un señuelo de miARN. Las realizaciones de la invención son útiles para suprimir un gen vegetal endógeno que participa en la respuesta a una plaga o patógeno, proporcionando así control de plagas o enfermedades vegetales. Los polinucleótidos, composiciones y procedimientos de suministro divulgados en el presente documento, son útiles además para suprimir un gen diana endógeno de una plaga de invertebrados de una planta, por ejemplo, plagas de lepidópteros o coleópteros que pueden ingerir ARN de la planta, proporcionando así control de plagas vegetales o enfermedades inducidas por plagas, por ejemplo, mediante el uso de un pulverizador tópico para plantas de cultivo, hortalizas o árboles frutales, con moléculas de ADN o ARN dirigidas a un gen esencial invertebrado o un gen de un simbiote de la plaga de invertebrados. Los polinucleótidos, composiciones y procedimientos de suministro divulgados en el presente documento, son útiles además para proporcionar el control de un patógeno vírico, por ejemplo, mediante el uso de un pulverizador antivírico tópico para plantas de cultivo, hortalizas o árboles frutales con moléculas de ADN o ARN dirigidas a un gen vírico.

Composiciones herbicidas y procedimientos

Proteínas de tolerancia a herbicidas

50 **77)** Las plantas naturales (no transgénicas) y transgénicas que presentan tolerancia a herbicidas (resistencia), a menudo tienen un gen que codifica una proteína que es responsable de la tolerancia a herbicidas, por ejemplo, un transgén que proporciona la tolerancia, un gen endógeno mutado que proporciona la tolerancia o múltiples copias de un gen endógeno al cual se dirige normalmente un herbicida. Una estrategia de control de dichas plantas es aplicar un agente que suprima o al menos reduzca la expresión del gen que codifica la proteína que imparte la tolerancia a herbicidas. Los ejemplos de proteínas que proporcionan tolerancia a un herbicida incluyen, por ejemplo, una 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), una glifosato oxidoreductasa (GOX), una glifosato decarboxilasa, una glifosato-*N*-acetil transferasa (GAT), una dicamba monooxigenasa, una fosfinotricina acetiltransferasa, una ácido 2,2-dicloropropionico deshalogenasa, una ácido acetohidroxi sintasa, una acetolactato sintasa, una haloarilnitrilasa, una acetil-coenzima A carboxilasa, una dihidropteroato sintasa, una fitoeno desaturasa, una protoporfirina IX oxigenasa, una hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, una *para*-aminobenzoato sintasa, una glutamina sintasa, una celulosa sintasa, una *beta*-tubulina y una serina hidroximetiltransferasa.

78) Los ejemplos de ácidos nucleicos que codifican proteínas que confieren tolerancia a herbicidas incluyen 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasas (EPSPS; véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Números 5,627,061, 5,633,435 RE39247, 6,040,497 y 5,094,945 y las Publicaciones de Solicitudes Internacionales PCT WO04074443 y WO04009761), glifosato oxidoreductasa (GOX; Patente de los Estados Unidos Número 5.463.175), glifosato decarboxilasa (Publicación de Solicitud Internacional PCT WO05003362, Patente de los Estados Unidos Número 7.405.347 y publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos 2004/0177399), glifosato-N-acetil transferasa (GAT; Patente de los Estados Unidos Número 7,714,188) que confieren tolerancia al glifosato; dicamba monooxigenasa que confiere resistencia a herbicidas similares a auxina tales como dicamba (Patente de los Estados Unidos Número 7,105,724); fosfinotricina acetiltransferasa (pat o bar) que confiere tolerancia a la fosfinotricina o al glufosinato (Patente de los Estados Unidos Número 5,646,024); ácido 2,2- dicloropropionico deshalogenasa que confiere tolerancia al ácido 2,2-dicloropropionico (Dalapon) (Publicación de Solicitud Internacional PCT WO9927116); ácido acetohidroxi sintasa o acetolactato sintasa que confieren tolerancia a inhibidores de acetolactato sintasa tales como sulfonilurea, imidazolinona, triazolopirimidina, pirimidiloxibenzoatos y ftalida (Patente de los Estados Unidos Número 6,225,105); haloarilnitrilasa (Bxn) para conferir tolerancia a bromoxinilo (Patente de los Estados Unidos Número 4,810,648); acetil-coenzima A carboxilasa modificada para conferir tolerancia a ciclohexanodiona (setoxidim) y ariloxifenoxipropionato (haloxifop) (Patente de los Estados Unidos Número 6,414,222); dihidropteroato sintasa (sul I) para conferir tolerancia a herbicidas de sulfonamida (Patente de los Estados Unidos Número 5.719.046); polipéptido de fotosistema II de 32 kDa (psbA) para conferir tolerancia a herbicidas de triazina (Hirschberg *et al.*, 1983, *Science*, 222:1346-1349); antranilato sintasa para conferir tolerancia a 5-metiltriptófano (Patente de los Estados Unidos Número 4,581,847); ácido dihidropicolínico sintasa (dap A) para conferir tolerancia a aminoetil cisteína (Publicación de Solicitud Internacional PCT WO8911789); fitoeno desaturasa (crtl) para conferir tolerancia a herbicidas de piridazinona tales como norflurazón (Patente de Japón JP06343473); hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, una ácido 4-hidroxifenilacético oxidasa y una 4-hidroxifenilacético 1-hidrolasa (Patente de los Estados Unidos 7,304,209) para conferir tolerancia a herbicidas de ciclopropilisoxazol tales como isoxaflutol (Patente de los Estados Unidos Número 6,268,549); protoporfirinógeno oxidasa I modificada (protox) para conferir tolerancia a inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa (Patente de los Estados Unidos Número 5939602); ariloxialcanoato dioxigenasa (AAD-1) para conferir tolerancia a un herbicida que contiene un resto de ariloxialcanoato (WO05107437); una serina hidroximetiltransferasa (publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos 2008/0155716), una glutamina sintasa tolerante a glufosinato (publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos 2009/0018016). Ejemplos de dichos herbicidas incluyen fenoxi auxinas (tales como 2,4- D y diclorprop), piridiloxi auxinas (tales como fluroxipir y triclopir), ariloxifenoxipropionatos (AOPP) inhibidores de acetil-coenzima A carboxilasa (ACCasa) (tales como haloxifop, quizalofop y diclofop) e inhibidores de 5- fenoxiacetato protoporfirinógeno oxidasa IX sustituida (tales como pirafufen y flumiclorac). Las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos que codifican proteínas de tolerancia a herbicidas y las secuencias de las proteínas de tolerancia a herbicidas.

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

80) En una realización, el polinucleótido se mezcla con el herbicida correspondiente para potenciar la actividad del herbicida proporcionando una actividad herbicida mejorada. En una realización el polinucleótido se utiliza separado del herbicida pero en combinación con una aplicación del herbicida como un pre o postratamiento. En las realizaciones, el tensioactivo de organosilicona se combina de forma ventajosa con el herbicida y el polinucleótido o se combina con uno o el otro cuando las composiciones se aplican de forma secuencial. Las plantas de invernadero pueden tratarse utilizando un pulverizador agrícola o un pulverizador de laboratorio con una boquilla de pulverización 11001XR para suministrar la solución de muestra a una tasa determinada (por ejemplo, 140 l/ha) a 0,25 MPa de presión. En el campo, la solución de tratamiento puede aplicarse con un pulverizador de mochila presurizado con CO₂ calibrado para suministrar la tasa apropiada de la composición con una boquilla de pulverización de chorro plano 11015 con un ensamblaje de boquilla simple adaptado (para minimizar el desperdicio) a una presión de pulverización de 0,25 MPa; el pulverizador de boquilla simple proporciona una pulverización eficaz de 60 cm por encima de la copa de 3 a 12 pulgadas de altura de las plantas en crecimiento.

Ejemplo 1

82) Este ejemplo ilustra la utilidad de las moléculas polinucleotídicas de esta invención en el control de malezas resistentes a herbicidas. Se identificó que los genotipos de palmera amaranto resistente a glifosato tenían múltiples copias, por ejemplo, de 4 a más de 100 copias, del gen que codifica la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) a la cual se dirigen los compuestos de glifosato en los tratamientos con herbicidas.

83) En referencia a la **SEQ ID NO:1**, tal como se muestra en la **Figura 1**, se diseñaron cuatro moléculas oligonucleotídicas de ARNbc de tamaño "corto" con una cadena antisentido capaz de hibridarse con ARNm transcrito a partir del gen EPSPS de la palmera amaranto en las posiciones 14-38 (ARNbc-1 corto), en las posiciones 153-177 (ARNbc-2 corto), 345-369 (ARNbc-3 corto) y 1105-1129 (ARNbc-4 corto), tal como se indica mediante los nucleótidos

subrayados en la **Figura 1**. Los cuatro ARNbc cortos diseñados se adquirieron en Integrated DNA Technologies (IDT); los ARNbc tenían un saliente de dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido y dos desoxinucleótidos como los nucleótidos terminales en el extremo 3' de la cadena sentido.

5 **84)** Con referencia a la **SEQ ID NO:1** y la **Figura 1**, se diseñaron tres polinucleótidos de ARN bicatenario "largo" con una cadena capaz de hibridarse con el ARNm transcrito a partir del gen EPSPS de la palmera amaranto en las posiciones 16-170 (ARNbc-1 largo), 451-722 (ARNbc-2 largo) y 1109-1328 (ARNbc-3 largo), tal como se indica mediante los nucleótidos en negrita en la **Figura 1**. Los tres ARNbc largos diseñados se prepararon utilizando el kit de ARNi de Ambion MEGAscript®, Cat. No. 1626.

10 **85)** Se cultivaron clones vegetativos de palmera amaranto resistente a glifosato con 16 copias del gen endógeno que codifica EPSPS (Gaines, y col. (2010) Proceedings of the National Academy of Sciences 107(3): 1029-1034) en macetas de 3,5 pulgadas con mezcla para plántulas SunGro® Redi-earth que contenía 3,5 kg/metro cúbico de fertilizante Osmocote® 14-14-14 en un invernadero con un fotoperíodo de 14 horas y una temperatura diurna de 30 grados centígrados y una temperatura nocturna de 20 grados centígrados; las plantas se regaron con agua desionizada según fuera necesario.

15 **86)** Se preparó una solución de pretratamiento de tensioactivo para sumergir las hojas, diluyendo el tensioactivo de organosilicona de la marca Silwet L-77 con agua destilada al 0,1% (v/v). Se preparó una solución de pretratamiento de carburo de silicio al 5% (p/v) mezclando 2 g de carburo de silicio (arena 400) en 40 ml de agua destilada. Se preparó un tampón de tratamiento con 10 mM de fosfato de sodio y tensioactivo de organosilicona Silwet L-77 al 0,01% (v/v) en agua DEPC (Omega Bio-Tek) y se ajustó a un pH de 6,8. Se preparó una solución de ARNbc corto con cantidades equimolares de cada uno de los cuatro ARNbc cortos (identificados anteriormente) en el tampón de tratamiento a una concentración de 0,005 nanomoles de cada ARNbc corto por microlitro. Se preparó una solución de ARNbc largo con cantidades equimolares de cada uno de los tres ARNbc largos en el tampón de tratamiento a una concentración de 0,0006 nanomoles de cada ARNbc largo por microlitro. Se preparó una solución mixta de ARNbc (corto/largo) con 0,005 nanomoles de cada uno de los cuatro ARNbc cortos y 0,0006 nanomoles de cada uno de los tres ARNbc largos por microlitro.

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

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

30 **89)** Dos de cuatro plantas de control tratadas con carburo de silicio abrasivo (sin tratamiento con molécula de ARNbc) murieron a causa del tratamiento con glifosato.

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

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

45 **92)** Cinco de seis plantas tratadas con tensioactivo, que se trataron con glifosato 48 horas después de la aplicación de la solución mixta de ARNbc (corto/largo), murieron.

50 **93)** Tres de cuatro plantas tratadas con carburo de silicio, que se trataron con glifosato 48 horas después de la aplicación de la solución mixta de ARNbc (corto/largo), murieron.

94) Cinco de seis plantas tratadas con tensioactivo, que se trataron con la solución de ARNbc largo y posteriormente con tratamiento con glifosato después de 72 horas, murieron; véase la **Figura 3B**. Seis de seis plantas tratadas con tensioactivo, que se trataron con la solución de ARNbc corto y posteriormente con tratamiento con glifosato después de 72 horas, murieron; véase la **Figura 3C**.

5 Ejemplo 2

95) Este ejemplo ilustra la utilidad de las moléculas polinucleotídicas de esta invención para mejorar el control de malezas sensibles al herbicida glifosato. Las soluciones mixtas de ARNbc (corto/largo) preparadas en el Ejemplo 1, se aplicaron a plantas de yute chino sensibles al glifosato (un total de 40 microlitros aplicados a dos hojas) que se pretrataron con la solución de tensioactivo utilizada en el Ejemplo 1. Las plantas de control se trataron solo con tampón después del pretratamiento con la solución de tensioactivo. 48 horas después del tratamiento con ARNbc, las plantas se trataron con una solución del herbicida glifosato (53 g de equivalente ácido por hectárea del herbicida glifosato de la marca Roundup® WeatherMAX®). Se observó un aumento por duplicado de la actividad del glifosato según se estimó por la observación del crecimiento de la planta (medido como la altura de la planta) en las plantas tratadas con la composición polinucleotídica y el herbicida, en comparación con las plantas de control tratadas con tampón y herbicida. Las plantas tratadas con la composición polinucleotídica y el herbicida sobrevivieron con un retraso grave en el crecimiento; las plantas de control tratadas con tampón y herbicida sobrevivieron y se recuperaron completamente. Se obtuvieron resultados similares con otras malezas sensibles al herbicida glifosato, es decir, amaranto tuberculoso, bleado, ambrosía gigante, lechuga espinaca, tabaco y diente de león sensibles al herbicida glifosato.

20 Ejemplo 3

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

Ejemplo 4

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

Ejemplo 5

98) Este ejemplo ilustra adicionalmente la utilidad de las moléculas polinucleotídicas de la invención como agentes herbicidas. Se diseñaron moléculas oligonucleotídicas de ARNbc para dirigirse a ARN que codifica EPSPS para cada una de las siguientes plantas: ambrosía común (*Ambrosia artemisiifolia*), ambrosía gigante (*Ambrosia trifida*), sorgo de Alepo (*Sorghum halepense*), rama negra (*Conzya bonariensis*), cola de zorro (*Digitaria insularis*), urochloa (*Urochloa panicoides*), poinsettia silvestre (*Euphorbia heterophylla*), arrozillo (*Echinochloa colona*), quinoa blanca (*Chenopodium album*), almorejo (*Setaria viridis*), moha (*Setaria italic*), amor de hortelano (*Echinochloa crus-galli*), digitaria (*Digitaria sanguinalis*), cadillo (*Xanthium strumarium*), alopecuro de campo (*Alopecurus myosuroides*), avena silvestre (*Avena fatua*), palo de zorrillo (*Senna obtusifolia*), bejucos (*Ipomoea* sp.), correhuela (*Convolvulus arvensis*), sorgo (*Sorghum bicolor*), hierba del pollo (*Commelina*), amor de hombre (*Tradescantia* sp.), ryegrás (*Lolium* sp.), pata de ganso (*Eleusine indica*), cola de caballo (*Conzya canadensis*), llantén (*Plantago lanceolata*), palmera amaranto (*Amaranthus palmeri*), amaranto tuberculoso (*Amaranthus tuberculatus*), amaranto blanco (*Amaranthus albus*), amaranto híbrido (*Amaranthus hybridus*), abrebujo (*Amaranthus retroflexus*), cáñamo de agua (*Amaranthus rudis/tuberculatus*), amaranto sudamericano (*Amaranthus viridis*), amaranto de Thunberg (*Amaranthus thunbergii*), amaranto espinoso (*Amaranthus spinosis*), (*Amaranthus rubra*), (*Amaranthus lividus*), bleado (*Amaranthus graecizans*), alegría (*Amaranthus chlorostachys*), amaranto de Powell (*Amaranthus powellii*), cenizo (*Amaranthus blitoides*), rodadora (*Kochia scoparia*), abrepuño amarillo (*Centaurea solstitialis*) y abutilón (*Abutilon theophrasti*). Las hojas de la planta se pretrataron con la solución de tensioactivo preparada como en el **Ejemplo 1** y se trataron con las

soluciones de ARNbc a un tratamiento de aproximadamente 1 nanomol por planta. Después de 15 días, las plantas tratadas están muertas, moribundas o presentan un retraso en el crecimiento.

Ejemplo 6

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

10 Ejemplo 7

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

Ejemplo 8

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

Ejemplo 9

40 **102)** Este ejemplo ilustra un aspecto de la invención. En este ejemplo, las moléculas polinucleotídicas se aplicaron e infiltraron en tejido vegetal induciendo así la regulación sistémica, es decir, el silenciamiento, de un gen diana (una EPSPS endógena). Más específicamente, una composición que incluye oligonucleótidos de ADN monocatenario (ADNmc) suprimió la expresión de una EPSPS endógena en palmera amaranto tolerante a glifosato (*Amaranthus palmeri*).

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

Tabla 1: Oligonucleótidos de ADNmc antisentido

Nombre	SEQ ID NO:	Secuencia (5' a 3')	Observación
Antisentido_PO1	8	ACCCTCCACGACTGCCCTTT	
Antisentido_PO2	9	GTTTCCTTCACTCTCCAGC	
Antisentido_PO3	10	GTAGCTTGAGCCATTATTGT	
Antisentido_PO4	11	GTTGATGGTAGTAGCTTGAG	
Antisentido_PS1	12	ACCCTCCACGACTGCCCTTT	Modificación con fosforotioato de los tres nucleótidos en el extremo 5' y de los tres nucleótidos en el extremo 3'
Antisentido_PS2	13	GTTTCCTTCACTCTCCAGC	Modificación con fosforotioato de los tres nucleótidos en el extremo 5' y de los tres nucleótidos en el extremo 3'
Antisentido_Ck	14	AAGCGGTTGAGCACTGAA	Secuencia control, proteína de semilla de cebada, ID de GenBank X97636
Antisentido_PO1_488	15	ACCCTCCACGACTGCCCTTT	Marcada en 5' con Alexa Fluor 488

5 **104)** La absorción de los oligonucleótidos se demostró con los oligonucleótidos de ADNmc marcados con fluorescencia (SEQ ID NO:15), que confirmó que los oligonucleótidos de ADNmc se infiltraron en el tejido de la hoja. Peciolo de
10 hojas arrancadas de palmera amaranto resistente a glifosato se colocaron en solución de sacarosa 200 mM con oligonucleótidos de ADNmc marcados con fluorescencia (SEQ ID NO:15). Las imágenes de la hoja se obtuvieron con un generador de imágenes Bio-Rad PharosFX equipado con un láser de 488 nm de 4 h hasta 48 h después de la absorción a través del peciolo. Las hojas se incubaron con sacarosa 200 mM solo y sirvieron como control. Se observó una absorción vacuolar ligeramente dependiente del tiempo de los oligonucleótidos de ADNmc marcados con fluorescencia (véase la **Figura 6**). Los oligonucleótidos de ADNmc marcados con fluorescencia se liberaron del tejido vacuolar hacia el interior de las células en tan solo 8 h después del tratamiento y se observó que se acumulaban en el borde de la hoja a las 24 h y 48 h, lo que sugiere un efecto de transpiración.

15 **105)** La supresión de EPSPS se demostró con hojas arrancadas de palmera amaranto resistente a glifosato utilizando la técnica de absorción del peciolo. Se colocaron peciolo de hojas arrancadas de palmera amaranto resistente a glifosato en solución de sacarosa 200 mM con oligonucleótidos de acuerdo con los tratamientos indicados en la **Tabla 2**. Las hojas control se infiltraron con el control antisentido (SEQ ID NO:14) y adicionalmente se trataron con o sin 50 microgramos/ml de glifosato. Se midieron los niveles de ARNm de EPSPS, proteína EPSPS y shikimato después de 48 h de incubación. Para evaluar los efectos de los oligonucleótidos de ADNmc antisentido sobre el ARNm de EPSPS, se aisló el ARN total de la hoja y se llevó a cabo una RT-PCR cuantitativa en tiempo real para comparar los niveles de ARNm de EPSPS. Para evaluar los efectos de los oligonucleótidos de ADNmc antisentido sobre la proteína EPSPS, se aisló la proteína soluble total de la hoja, se separó mediante SDS-PAGE y se midieron los niveles de proteína EPSPS mediante transferencia Western utilizando anticuerpos contra EPSPS_TIPA de maíz. Los efectos de los oligonucleótidos de ADNmc antisentido sobre la acumulación de shikimato, como un indicador de la supresión de la EPSPS, se evaluaron en dos experimentos: en el experimento 1, las hojas tratadas con oligonucleótidos, se incubaron con 50 microgramos/ml de glifosato durante 48 h más mediante absorción de peciolo (las hojas de control se infiltraron con el control antisentido (SEQ ID NO:14) y se trataron adicionalmente con o sin 50 microgramos/ml de glifosato); en el experimento 2, se llevaron a cabo ensayos con discos de hoja en las hojas tratadas con oligonucleótidos y se midieron los niveles de shikimato mediante HPLC (en este caso los controles eran hojas que no se habían tratado con oligonucleótidos pero que se habían incubado con 50 microgramos/ml de glifosato).

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

Tratamiento	ADNmc antisentido	Concentración final
N.º 1	Antisentido_PO1 (SEQ ID NO:8)	5 microM
N.º 2	Antisentido_PO2 (SEQ ID NO:9)	5 microM

30

N.º 3	Antisentido_PS1 (SEQ ID NO:12)	5 microM
N.º 4	Antisentido_PS2 (SEQ ID NO:13)	5 microM
N.º 5	Antisentido_PS1, PS2 (SEQ ID NO:12, 13)	10 microM cada uno (20 microM en total)
N.º 6	Antisentido_PO1, PO2, PO3, PO4 (SEQ ID NO:8, 9, 10, 11)	5 microM cada uno (20 microM en total)
Control	Antisentido_ck (SEQ ID NO:14)	5 microM o 20 microM

5 **106)** En las **Figuras 7, 8 y 9**, respectivamente, se muestran los resultados de los niveles de expresión de ARNm de EPSPS, de la proteína EPSPS y de shikimato. Estos resultados demuestran que el tratamiento con los oligonucleótidos de ADNmc antisentido regularon o suprimieron sistémicamente el gen diana disminuyendo los niveles del transcrito del gen diana (ARNm de EPSPS) o de la proteína (EPSPS) codificada por el gen diana en el tejido vegetal. En este experimento específico, los tratamientos N.º 1 y N.º 6 parecieron ser más eficaces en la supresión de los niveles de ARNm de EPSPS y proteína y en el aumento de la eficacia del glifosato, tal como se pone de manifiesto por la acumulación aumentada de shikimato. Estos resultados también indican que la eficacia del glifosato mejora suprimiendo el ARNm de EPSPS y la proteína en la palmera amaranto resistente a glifosato.

Ejemplo 10

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

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

Tabla 3

Descripción	sentido/ antisentido	Secuencia	Cantidad nucleótidos	de	SEQ ID NO:
oligo 1 con promotor de T7	S	taatagcactactataggGCAAGAGATGTCCTAGGTGGG	40		16
oligo 2 con promotor de T7	S	taatagcactactataggACAGATTTCTTCAGGAGAAAACATGG	44		17
oligo 1 sin promotor de T7	S	GCAAGAGATGTCCTAGGTGGG	21		18
oligo 2 sin promotor de T7	S	ACAGATTTCTTCAGGAGAAAACATGG	25		19
mezcla de oligo 3 con promotor de T7	AS	taatagcactactataggCATCTCCCTTTAAATTGTACTGCC (SEQ ID NO:20) y taatagcactactataggTTTAAATTGTACTGCCATTATTC (SEQ ID NO:21)	41 (SEQ ID NO:20), 41 (SEQ ID NO:21)		20, 21
mezcla de oligo 3 sin promotor de T7	AS	CATCTCCCTTTAAATTGTACTGCC (SEQ ID NO:22) y TTTAAATTGTACTGCCATTATTC (SEQ ID NO:23)	22 (SEQ ID NO:22), 22 (SEQ ID NO:23)		22, 23
oligo 4 sin promotor de T7	AS	CACTTCCATCCTCATTGAGCTCGAT	25		24
oligo 5 sin promotor de T7	AS	ACACCTCATCTGTACCCCTATCAG	24		25
oligo 6 sin promotor de T7	AS	CAGTCTCGTACCAAATCTCCATCAT	24		26
mezcla de oligo de CRW con promotor de T7	S y AS	taatagcactactataggATCCATGATATCGTGAAACATC (SEQ ID NO:27) y taatagcactactataggGCAAAAGAAAAATGCCGTCCG (SEQ ID NO:28)	41 (SEQ ID NO:27), 38 (SEQ ID NO:28)		27, 28
mezcla de oligo de CRW sin promotor de T7	S y AS	ATCCATGATATCGTGAAACATC (SEQ ID NO:29) GCAAAAGAAAAATGCCGTCCG (SEQ ID NO:29)	21 (SEQ ID NO:29), 18 (SEQ ID NO:30)		29, 30

- 5 **109)** En todos los ensayos descritos en este ejemplo, se utilizó el siguiente procedimiento. En todos los ensayos se utilizaron plantas de *Nicotiana benthamiana* de cuatro semanas. Las plantas se trataron con solución de Silwet L-77 al 0,1% recién preparada con ddH₂O (agua bidestilada). Durante algunos segundos, dos hojas completamente expandidas por planta (un cotiledón, una hoja verdadera), se sumergieron en la solución de Silwet L-77 y se dejaron secar durante 15-30 minutos antes de la aplicación de la composición polinucleotídica. La concentración final para cada oligonucleótido o polinucleótido fue de 25 microM (en Silwet L-77 al 0,01%, tampón de fosfato de sodio 5 mM, pH 6,8) a menos que se indique lo contrario. Se aplicaron 20 microlitros de la solución a la superficie superior de cada una de las dos hojas pretratadas para proporcionar un total de 40 microlitros (1 nmol de oligonucleótido o polinucleótido) para cada planta. La decoloración de la hoja se observó 3 días postratamiento.
- 10 **110)** La **Figura 12A** ilustra los resultados de un ensayo donde se aplicaron por separado, a plantas de tabaco, un polinucleótido de ARNbc de 200-meros con una secuencia de ARN correspondiente al segmento “PDS de 200-meros” (nucleótidos 914 - 1113 de la **SEQ ID NO:2**) y una combinación de oligonucleótidos y polinucleótidos de ADN monocatenario (**SEQ ID NO:16, 17, 20, 21, 24, 25 y 26**). El polinucleótido de ARNbc de 200-meros se aplicó a una concentración de 0,6 microM. Después del tratamiento tópico con los polinucleótidos y oligonucleótidos, se observó decoloración de las hojas apicales, lo que indicaba la regulación o supresión sistémica del gen diana de fitoeno desaturasa.
- 15 **111)** La **Figura 12B** ilustra los resultados del análisis de transferencia Northern de ARN aislado de plantas de *Nicotiana benthamiana* tratadas con tampón (control), con el polinucleótido de ARNbc de 200 meros y con los oligonucleótidos de ADNmc. También se muestra el ARN aislado de plantas que se habían sometido a estrés manteniéndolas a 4 grados centígrados y en la oscuridad durante toda la noche antes del tratamiento con los polinucleótidos de ARNbc de 200 meros.
- 20 **112)** La **Figura 13** ilustra los fenotipos observados el día 12 después del tratamiento en otro ensayo del efecto de doce combinaciones de polinucleótidos u oligonucleótidos (véase la **Tabla 4**). La **Tabla 4** también indica observaciones de decoloración visible de las plantas el día 5 después del tratamiento y los resultados de las mediciones de clorofila llevadas a cabo los días 7 y 12 después del tratamiento. Las mediciones de clorofila son un indicador de la supresión del gen diana de fitoeno desaturasa y las mediciones que se llevaron a cabo en 6 lugares del área apical, enfocándose en hojas visiblemente blanqueadas o (en plantas sin decoloración visible) en hojas en ubicaciones equivalentes en las plantas; los valores de medición de clorofila más bajos indicaron supresión de la fitoeno desaturasa. Estos resultados muestran que las combinaciones de oligonucleótidos y polinucleótidos en los tratamientos 2, 3, 4, 8 y 11 fueron eficaces para regular (suprimir) sistemáticamente el gen diana en las plantas tratadas; el tratamiento 1 también produjo la regulación (supresión) sistemática del gen diana en menor medida. El polinucleótido de ARNbc de 200-meros también fue eficaz para regular (suprimir) sistemáticamente el gen diana en las plantas tratadas. Los oligonucleótidos de un gen no homólogo (gusano de la raíz de maíz) (tratamientos 5 y 6) no suprimieron el gen de la fitoeno desaturasa diana. Estos resultados demuestran que los oligonucleótidos y polinucleótidos de ADN monocatenario sentido y antisentido fueron eficaces para regular (suprimir) sistemáticamente el gen diana en las plantas tratadas. En este ejemplo específico, los oligonucleótidos sentido con el promotor de T7 (tratamiento 1) produjeron una supresión sistemática débil del gen de la fitoeno desaturasa, mientras que los oligonucleótidos sentido sin el promotor de T7 (tratamiento 7) no suprimieron el gen de la fitoeno desaturasa. En este ejemplo específico, los oligonucleótidos antisentido con el promotor de T7 (tratamiento 2) así como los oligonucleótidos antisentido sin el promotor de T7 (tratamiento 8), proporcionaron una decoloración intensa, indicando una regulación sistémica intensa del gen diana de la fitoeno desaturasa.
- 25
30
35
40

Tabla 4

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

4	Oligos 1, 2, 3, 4, 5 y 6	16, 17, 20, 21, 24, 25, 26	Oligos sentido y antisentido con promotor de T7, más oligos antisentido sin promotor de T7	intensa	15,1	2,5
5	Mezcla de oligo CRW con promotor de T7	27, 28	Oligos sentido y antisentido con promotor de T7	aún no	30,8	37,3
6	Mezcla de oligo CRW sin promotor de T7	29, 30	Oligos sentido y antisentido sin promotor de T7	aún no	34,2	38,2
7	Oligos 1 y 2 sin promotor de T7	18, 19	Oligos sentido sin promotor de T7	aún no	32,0	41,1
8	Oligo 3 sin promotor de T7	22, 23	Oligos antisentido sin promotor de T7	intenso	11,3	3,2
9	Oligos 1, 2 y 3 sin promotor de T7 y oligos 4, 5 y 6	18, 19, 22, 23, 24, 25, 26	Oligos sentido y antisentido sin promotor de T7	aún no	30,2	34,4
10	Polinucleótido de ARNbc de 200 meros	Secuencia de ARN correspondiente al segmento "PDS de 200-meros" que consiste en los nucleótidos 914 - 1113 de SEQ ID NO:2	Polinucleótido de ARNbc sentido y antisentido	intensa	11,3	4,0
11	Mezcla de oligonucleótidos 1/10° del Experimento 4	16, 17, 20, 21, 24, 25, 26	Oligos sentido y antisentido con promotor de T7, más oligos antisentido sin promotor de T7	intensa	11,4	4,5
12	Mezcla de oligonucleótidos 1/100° del Experimento 4	16, 17, 20, 21, 24, 25, 26	Oligos sentido y antisentido con promotor de T7, más oligos antisentido sin promotor de T7	aún no	31,0	38,0
13	Control	(ninguna)	Solo tampón	aún no	31,2	38,4

5 **113)** La **Tabla 5** muestra seis polinucleótidos: un segmento de 40 meros ("ADNmc sentido de 40 meros de PDS", **SEQ ID NO:31**) que consiste en los 40 nucleótidos que están en la posición más en 5' de la "PDS de 700 meros" (nucleótidos 1081 - 1120 de **SEQ ID NO:2**) y cuatro polinucleótidos de ADN monocatenario antisentido y un polinucleótido de ADN monocatenario sentido sintetizado basándose en la secuencia de "ADNmc sentido de 40 meros de PDS" (**SEQ ID NO:31**). La **Figura 14** ilustra los resultados del tratamiento tópico de plantas de tabaco con los polinucleótidos y oligonucleótidos. Se observó una decoloración intensa de las hojas apicales que indica la regulación o supresión sistémica del gen diana de la fitoeno desaturasa después del tratamiento tópico con el ADNmc antisentido de 21 meros

de PDS y el ADNmc antisentido de 33 meros de PDS, así como también después del tratamiento tópico con el polinucleótido de ARNbc de 700 meros amplificado por PCR y purificado en columna (“ARNbc de 700 meros de PDS”), oligonucleótidos de PDS antisentido de 22 meros sometidos a ensayo previamente con un promotor de T7 (**SEQ ID NO:20 and 21**) (“PDS antisentido de T7”) u oligonucleótidos de PDS antisentido de 22 meros sometidos a ensayo previamente sin un promotor de T7 (**SEQ ID NO:22 y 23**) (“PDS antisentido”). No se observó, o apenas se observó, decoloración de las hojas apicales después del tratamiento tópico solo con tampón (“tampón”) o después del tratamiento tópico con polinucleótido de ARNbc de 700 meros desnaturalizado por calor (5 minutos a 95 grados centígrados, a continuación conservados en hielo) (“ARNbc de 700 meros de PDS calentado”), el ADNmc antisentido de 15 meros de PDS o el ADNmc antisentido de 18 meros de PDS.

Tabla 5

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO:
ADNmc sentido de 40 meros de PDS	TGTTTTATACTGAATAATGGCAGTACAATTAAGGAGATG	31
ADNmc antisentido de 15 meros de PDS	CATCTCCTTTAATTG	32
ADNmc antisentido de 18 meros de PDS	CATCTCCTTTAATTGTAC	33
ADNmc antisentido de 21 meros de PDS	CATCTCCTTTAATTGTACTGC	34
ADNmc antisentido de 33 meros de PDS	CATCTCCTTTAATTGTACTGCCATTATTCAGTA	35
ADNmc sentido de 21 meros de PDS	GCAGTACAATTAAGGAGATG	36

114) Los resultados de otro ensayo se muestran en la **Figura 15**, se observó una decoloración intensa de las hojas apicales indicando una regulación o supresión sistémica del gen diana de la fitoeno desaturasa después del tratamiento tópico con el ADNmc antisentido de 21 meros de PDS (**SEQ ID NO:34**, “PDS antisentido de 21 nt”) o con oligonucleótidos de 22 meros antisentido de PDS sometidos a ensayo previamente sin un promotor de T7 (**SEQ ID NO:22 y 23**) (“PDS antisentido”). No se observó, o apenas se observó, una decoloración visible de las hojas apicales después del tratamiento tópico solo con tampón (“control: tampón”) o después del tratamiento tópico con ADNmc sentido de 21 meros de PDS (**SEQ ID NO:36**, “PDS sentido de 21 nt”).

Ejemplo 11

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

116) La fitoeno desaturasa (PDS) de palmera amaranto tiene la secuencia

TCAATTTTCATCTATTGGAAGTGATTTTTGGGTCATTCTGTGAGAAATTCAGTGTTAGTAAAGTTT
ATGGAGCAAAGCAAAGAAATGGGCACTGCCCTTTAAAGGTTGTTTGTATAGATTATCCTAGGCCA
GAGCTTGAAAGTACATCCAATTTCTTGAAGCCGCCTACTTATCTTCTACTTTTCGGAATTCGCCTC
GTCCTCAGAAGCCATTAGAAGTTGTAATTGCTGGAGCAGGTTTGGCTGGTCTATCCACGGCAAAGT
ATTTAGCTGATGCAGGTCACAAACCCATATTGTTGGAAGCACGAGATGTTTTAGGAGGAAAGGTT
GCAGCGTGAAGGATGAGGATGGTGAAGTATGAGACTGGGCTACATATTTCTTTGGGGCATA
TCCAAATGTCCAAAATCTATTTGGAGAAGTGGTATAAATGACCGACTGCAATGGAAGGAGCACT
CTATGATTTTTGCAATGCCAGCAAGCCCGGTGAATTCAGTCGCTTTGATTTTCCCGAAATCCTGCC
TGCACCATTAATGGCATATGGGCAATCCTAAGAAATAATGAAATGCTAACCTGGCCAGAAAAAA
TCAAGTTTGCCATTGGCTTGTTCCTGCTATGGCAGGCGGACAGTCATATGTTGAAGCACAAGATG
GTTTGAGTGTCCAAGAGTGGATGAGAAAACAAGGAGTACCCGATCGTGTAACTGATGATGTGTTT
ATTGCCATGTCAAAGGCACTGAACCTCATAAATCCCGATGAACTTCAATGCAGTGCATCTTGATT
GCTCTGAACCGATTCTGCAGGAGAAACATGGTTCTAAGATGGCCTTCCTAGACGGAAACCCCTCCAGAG

AGGCTGTGCATGCCTATTGTTAAACACATCGAGTCACTAGGTGGTGAAGTTAAACTTAACTCTCGTATACA
AAAGATTCAAGTTGGACCAGAGTGAAGCGTGAAGAGTTTTTGGCTAAATAACGGGAGGGAAATACGAGGA
GATGCCATGTTTTGCCACCCAGTTGACATCTTGAAGCTGTTACTACCTGATACTTGAAGGAA
TCAATTTTCATCTATTGGAAGTGATTTTTGGGTCATTCTGTGAGAAATTCAGTGTTAGTAAAGTTT
ATGGAGCAAAGCAAAGAAATGGGCACTGCCCTTAAAGGTTGTTGTATAGATTATCCTAGGCCA
GAGCTTAAAAGTACATCCAATTTCTGGAAGCCGCCTACTTATCTTCTACTTTTCGGAATTCGCCTC
GTCTCAGAAGCCATTAGAAGTTGTAATTGCTGGAGCAGGTTGGCTGGTCTATCCACGGCAAAGT
ATTTAGCTGATGCAGTCCAAAACCCATATTGTTGGAAGCACGAGATGTTTTAGGAGGAAAGGTT
GCAGCGTGAAGGATGAGGATGGTACTGGTATGAGACTGGGCTACATATATTCTTTGGGGCATA
TCCAAATGTCCAAAATCTATTTGGAGAAGTTGGTATAAATGACCGACTGCAATGGAAGGAGCACT
CTATGATTTTTGCAATGCCAGCAAGCCCGTGAATTCAGTCGCTTTGATTTTCCCGAAATCCTGCC
TGCACCATTAATGGCATATGGGCAATCCTAAGAAATAATGAAATGCTAACCTGGCCAGAAAAAA
TCAAGTTTGCATTGGCTTGTTCCTGCTATGGCAGGCGGACAGTCATATGTTGAAGCACAAGATG

ATCTCATACTTCAAAAACTTGAGAAATTAGTGGGCGTTCCTGTGATTAATGTTCCACATATGGTTT
 GACAGAAAATTAAGAATACATATGACCATCTACTCTTCAGCAGGAGTCCTCTTTGAGTGTCTAT
 GCTGATATGTCGGAGACATGCAAGGAATATAAGGATCCAAATAGATCCATGCTGGAATTGGTTTTT
 GCACCCGCGGAGGAATGGATTTACGAAGCGACACTGATATTATAGAGGCAACAATGAAAGAGCT
 TGCCAAGCTTTCCCGGATGAAATCGCTGCCGATGGAAGCAAGGCCAAGATCCTCAAATATCATGT
 CGTCAAACTCCAAGGTCGGTTTATAAGACTGTACCGGATTGTGAACCTTGTGCGCCGCTGCAAAG
 ATCACCATAGAGGTTTCTATTTAGCTGGTATTACACAAAACAAAAATTTGGCTTCTATGGA
 AGGTGCTGTCTTATCTGGGAAGCTTTGTGCACAGGCTATCGTACAGGATTATGATCTGCTGAGTTC TCGAG-
 CACAAAGAGAATTGGCG (**SEQ ID NO:37**).

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

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

ATGCCCCAAATCGGACTTGTATCTGCTGTTAATTTGAGAGTCCAAGGTAATTCAGCTTATCTTTGGA
 GCTCGAGGTCTTCGTTGGGAACTGAAAGTCAAGATGTTTGCTTCAAAGGAATTTGTTATGTTTTG
 GTAGTAGCGACTCCATGGGGCATAAGTTAAGGATTCTACTCCAAGTGCCACGACCCGAAGATTG
 ACAAAGGACTTTAATCCTTTAAAGGTAGTCTGCATTGATTATCCAAGACCAGAGCTAGACAATACA
 GTTAACTATTTGGAGGCGGCGTTATTATCATCATCGTTTTCGTACTTCTCACGCCAACTAAACCAT
 TGGAGATTGTTATTGCTGGTGCAGGTTGGTGGTTGTCTACAGCAAAATATCTGGCAGATGCTG
 GTCACAAACCGATATTGCTGGAGGCAAGAGATGCTCTAGGTGGGAAGGTAGCTGCATGGAAGAT
 GATGATGGAGATTGGTACGAGACTGGGTTGCACATTTCTTTGGGGCTTACCCAAATATGCAGAAC
 CTGTTTGGAGAAGTGGGATTGATGATCGTTGCAGTGGGAAGGAACATTCAATGATATTTGCGATG
 CCTAACAAAGCCAGGGGAGTTCAGCCGCTTTGATTTTCTGAAGCTCTTCTGCGCCATTAATGGA
 ATTTTGGCCATACTAAAGAACAACGAAATGCTTACGTGGCCCGAGAAAGTCAAATTTGCTATTGGA
 CTCTTGCCAGCAATGCTTGGAGGGCAATCTTATGTTGAAGCTCAAGACGGTTAAGTGTTAAGGAC
 TGGATGAGAAAGCAAGGTGTGCCTGATAGGGTGCAGATGAGGTGTTCAATGCCATGTCAAAGGC
 ACTTAACTTCATAAACCCGACGAGCTTTCGATGCAGTGCATTTTGATTGCTTTGAACAGATTTGTTG
 AGGAGAAACATGGTTCAAAAATGGCCTTTTATAGATGGTAACCCCTCTGAGAGACTTTGCATGCCGATTGTG
 GAACATATTGAGTCAAAGGTGGCCAAAGTCAGACTAAACTCACGAATAAAAAAGATCGAGCTGAATGAGG
 ATGGAAGTGCAAATGTTTTATACTGAATAATGGCAGTACAATTAAGGAGATGCTTTTGTGTTTGCCA
 CTCCAGTGGATATCTTGAAGCTTCTTTGCTGAAAGACTGGAAAGAGATCCCATATTTCCAAAAGT
 TGGAGAAGCTAGTGGGAGTTCCTGTGATAAATGTCCATATATGGTTTACAGAAAACCTGAAGAAC
 ACATCTGATAATCTGCTCTCAGCAGAAGCCGTTGCTCAGTGTGTACGCTGACATGTCTGTTACAT
 GTAAGGAATATTACAACCCCAATCAGTCTATGTTGGAATTGGTATTTGCACCCGAGAAAGAGTGA
 TAAATCGTAGTGACTCAGAAATTATTGATGCTACAATGAAGGAACTAGCGAAGCTTTTCCCTGATG
 AAATTTGCGCAGATCAGAGCAAAGCAAATAATTGAAGTATCATGTTGTCAAACCCCAAGGTCT
 GTTTATAAACTGTGCCAGTTGTGAACCCTGTCGGCCCTTCAAAGATCCCCTATAGAGGGTTTT
 TATTTAGCTGGTACTACACGAAACAGAAGTACTTGGCTTCAATGGAAGGTGCTGTCTTATCAGGA
 AAGCTTTGTGCACAAGCTATTGTACAGGATTACGAGTACTTCTTGGCCGAGCCAGAAGATGTTG GCAGAAG-
 CAAGCGTAGTTAGCATAGTGAACATAA (**SEQ ID NO:38**).

10 Se sintetizaron un polinucleótido de ARNbc de 685 pares de bases con una cadena antisentido capaz de hibridarse con el ARN codificado por los nucleótidos en las posiciones 421 - 1105 (se muestran como texto subrayado) en la **SEQ ID NO:38** y un polinucleótido de ARNbc de 192 pares de bases con una cadena antisentido capaz de hibridarse con el ARN codificado por los nucleótidos en las posiciones

914 - 1105 (se muestran como texto en cursiva y subrayado) en la **SEQ ID NO:38**.

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

5 **119)** Las plantas de palmera amaranto, que tenían 16 copias de EPSPS y 5 - 8 pulgadas de altura, se trataron con solución de Silwet L-77 al 0,1% recién preparada con H₂O bidestilada. Durante algunos segundos, cuatro hojas completamente expandidas por planta se sumergieron en la solución de Silwet L-77 y se dejaron secar durante 30 minutos hasta 1 hora antes de la aplicación de la composición polinucleotídica. Se prepararon soluciones individuales de polinucleótidos para cada uno de ARNbc de PDS de palmera de 678 pb, ARNbc de PDS de palmera de 198 pb, ARNbc de PDS de *Nicotiana benthamiana* de 685 pb y ARNbc de PDS de *Nicotiana benthamiana* de 192 pb (0,6 micromolar de polinucleótido en Silwet L-77 al 0,01%, tampón de fosfato de sodio 5 mM, pH 6,8). Se aplicaron 10 microlitros de solución de polinucleótido (o tampón como control) sobre la superficie superior de cada una de las cuatro hojas pretratadas por planta, para proporcionar un total de 40 microlitros para cada planta. Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento y la decoloración de las hojas se observó 3 días postratamiento. Las plantas tratadas por vía tópica con ARNbc de PDS de palmera de 678 pb o ARNbc de PDS de palmera de 198 pb, mostraron decoloración de las hojas (lo que indica silenciamiento de la fitoeno desaturasa endógena) pero las plantas de palmera amaranto tratadas por vía tópica con ARNbc de PDS de *Nicotiana benthamiana* de 685 pb o ARNbc de PDS de *Nicotiana benthamiana* de 192 pb no mostraron decoloración de las hojas. Esta especificidad secuencial demuestra que las composiciones polinucleotídicas y los procedimientos de la invención son útiles para el control selectivo de una especie o taxón dado que tiene una secuencia de gen diana específica, por ejemplo, para el control de plantas con crecimiento espontáneo resistentes a herbicidas que crecen en un campo de plantas de cultivo resistentes al mismo herbicida.

25 **120)** En un ensayo distinto, las plantas de palmera amaranto tratadas por vía tópica con ARNbc de PDS de palmera 678 pb (marcadas como "ARNbc de PDS de 700 nt") o ARNbc de PDS de palmera de 198 pb (marcadas como "ARNbc de PDS de 200 nt") mostraron decoloración de las hojas (lo que indica el silenciamiento de la fitoeno desaturasa endógena) pero las plantas de palmera amaranto tratadas por vía tópica con un ARNbc de 260 pares de bases de un gen de invertebrado (marcado como "ARNbc de DV49 de 260 nt", del gusano *Diabrotica virgifera* de la raíz de maíz) no dieron como resultado un fenotipo de decoloración, indicando que no hubo silenciamiento de la fitoeno desaturasa endógena (**Figura 17**). Esta especificidad secuencial demuestra que las composiciones polinucleotídicas y los procedimientos de la invención son útiles para el control selectivo de una especie o taxón dado.

Ejemplo 12

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

40 **122)** En todos los tratamientos se utilizaron plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) de cuatro semanas. Se acondicionaron dos hojas completamente expandidas (un cotiledón, una hoja verdadera) sumergiéndolas durante algunos segundos, en solución de tensioactivo recién preparada (Silwet L-77 al 0,1 % en agua bidestilada) y se dejaron secar durante 15 - 30 minutos. Se aplicaron veinte microlitros de un oligonucleótido de 22 meros de ADN monocatenario (ADNmc) con la secuencia GGCAGTACAATTAAGGAGATG (**SEQ ID NO:39**), correspondiente a los nucleótidos en las posiciones 1099 - 1120 de la fitoeno desaturasa de *Nicotiana benthamiana* (**SEQ ID NO:2**) como 25 micromolares de solución en Silwet L-77 al 0,01 % en tampón de fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8 sobre la superficie superior de cada hoja acondicionada para un total de 40 microlitros (1 nanomol de oligonucleótido) por planta. Las plantas de control se trataron con la solución de Silwet sin el oligonucleótido de ADN. Las plantas se observaron para determinar la decoloración 3 días postratamiento. Todas las hojas apicales, los tallos y las flores de las plantas tratadas con el oligonucleótido de ADN mostraron decoloración, indicando el silenciamiento sistémico de PDS (**Figura 18A**).

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

55 **124)** En un ensayo distinto utilizando un procedimiento similar, se acondicionaron plantas de tabaco sumergiéndolas en Silwet L-77 al 0,1% en agua bidestilada, se dejaron secar durante 15 - 30 minutos y se trataron con ADNmc de 22 meros de PDS (**SEQ ID NO:39**) aplicado como una solución 25 micromolar en Silwet L-77 al 0,01 % en tampón de fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8, sobre la superficie superior de cada hoja acondicionada para un total de 40 microlitros (1 nanomol de oligonucleótido) por planta. Otras plantas no se acondicionaron con tratamiento de

tensioactivo pero se trataron solo con 1 nanomol de ADNmc de 22 meros de PDS (**SEQ ID NO:39**) aplicado mediante infiltración con una jeringa sin aguja (se muestra en la Figura **18B**) o mediante aplicación manual de gotas sobre la superficie de la hoja (no se muestra en la Figura **18B**) y como una solución 25 micromolar en Silwet L-77 al 0,01 % en tampón de fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8 o como una solución 25 micromolar en tampón de fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8 (sin tensioactivo). Las plantas de control negativo se trataron con la solución tampón Silwet sin el oligonucleótido de ADN. Los resultados se muestran en la **Figura 18B**. Todas las plantas tratadas solo con aplicación directa del ADNmc de PDS (sin acondicionamiento mediante tratamiento con tensioactivo Silwet L-77), ya sea aplicado por infiltración o por aplicación manual de gotas, mostraron decoloración de las hojas apicales, de los tallos y las flores, indicando el silenciamiento sistémico de PDS.

Ejemplo 13

125) Este ejemplo ilustra procedimientos y composiciones aplicadas por vía tópica para inducir el silenciamiento sistémico que incluye el uso de agentes para acondicionar una planta para la infiltración de polinucleótidos. Más específicamente, este ejemplo describe el uso de polinucleótidos de la invención para controlar la palmera amaranto resistente a herbicidas.

126) Las plantas de palmera amaranto que tienen una cantidad menor (menos de 30) de copias de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) son susceptibles al tratamiento con ARNbc diseñado para silenciar la EPSPS con posterior tratamiento con glifosato (véanse los detalles en el **Ejemplo 1**). Sin embargo, las plantas de palmera amaranto que tienen grandes cantidades de copias de EPSPS (es decir, 30 o más copias de EPSPS) son resistentes al tratamiento con glifosato y son un desafío para la gestión de la resistencia a malezas. Por ejemplo, en un ensayo (no se muestran los resultados) en palmera amaranto resistente a glifosato con gran cantidad de copias utilizando tratamientos similares a los descritos en el **Ejemplo 1** pero donde se aumentó la dosis de ARNbc hasta diez veces (es decir, 8 nanomoles de los ARNbc cortos descritos en el **Ejemplo 1** por planta) o donde se utilizó una formulación de glifosato patentada (herbicida de la marca "Roundup® WeatherMAX®") combinada con un tensioactivo de amina de sebo, la actividad del glifosato mejoró (estimada mediante la observación del crecimiento de la planta medido por la altura de la planta) pero las plantas resistentes no murieron.

127) Utilizando las condiciones de tratamiento indicadas en la **Tabla 6**, tres líneas diferentes de palmera amaranto resistente a glifosato con gran cantidad de copias (3 plantas por repetición) se trataron con ARNbc, en las que el vehículo de suministro de ARNbc, el agente de infiltración o de acondicionamiento y el orden de las etapas se modificaron. Los resultados se muestran en la **Figura 19**. El tratamiento solo con glifosato "4X" (es decir, tratamiento con 3360 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX® que es cuatro veces mayor a la tasa estándar de aplicación de 840 g de equivalente ácido por hectárea), no causó la muerte de la palmera amaranto con 35 copias (experimento 3) ni con 57 copias (experimento 6).

128) En un conjunto de experimentos (1 - 3, **Tabla 6**), que incluían sulfato de amonio al 2% en un vehículo de suministro de ARNbc acuoso que comprendía tensioactivo de amina de sebo al 0,1% y glicerol al 10% (experimento 2), se mejoró la eficacia de una dosis 10 veces mayor de ARNbc con posterior aplicación de un glifosato 4X. También se observó una eficacia mejorada de una dosis 10 veces mayor de ARNbc con posterior aplicación de glifosato cuando se incluyó sulfato de amonio en un vehículo de suministro ARNbc sin un tensioactivo de amina de sebo (experimento 8).

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

Tabla 6

Línea de palmera amaranto	Cantidad de copias de EPSPS	Número de experimento	Etapas 1		Etapas 2	Etapas 3*
			Concentración relativa de ARNbc de EPSPS	Vehículo de suministro de ARNbc		
R31	35	1	10X	tensioactivo de amina de sebo al 0,1 % + glicerol al 10 %	Silwet L-77 al 1 %	4x WeatherMAX (48 h)

		2	10X	sulfato de amonio al 2 % + tensioactivo de amina de sebo al 0,1 % + glicerol al 10 %	Silwet L-77 al 1 %	4x WeatherMAX (48 h)
		3	Solo tampón (control)	sulfato de amonio al 2 % + tensioactivo de amina de sebo al 0,1 % + glicerol al 10 %	Silwet L-77 al 1 %	4x WeatherMAX (48 h)
Línea de palmera amaranto	Cantidad de copias de EPSPS	Número de experimento	Etapa 1	Etapa 2		Etapa 3*
				Concentración relativa de ARNbc de EPSPS	Vehículo de suministro de ARNbc	
R34	57	4	--	10X	Silwet L-77 al 1 % + sulfato de amonio al 2 %	4x WeatherMAX (48 h)
		5	Silwet L-77 al 1 %	10X	sulfato de amonio al 2 %	4x WeatherMAX (48 h)
		6	Silwet L-77 al 1 %	Solo tampón (control)	sulfato de amonio al 2 %	4x WeatherMAX (48 h)
Línea de palmera amaranto	Cantidad de copias de EPSPS	Número de experimento	Etapa 1		Etapa 2	Etapa 3*
			Concentración relativa de EPSPS ARNbc	Vehículo de suministro de ARNbc		
R28	87	7	10X	sulfato de amonio al 2 % + tensioactivo de amina de sebo al 0,1 % + glicerol al 10%	Silwet L-77 al 1 %	4x WeatherMAX (72 h)
Línea de palmera amaranto	Cantidad de copias de EPSPS	Número de experimento	Etapa 1	Etapa 2		Etapa 3*
				Concentración relativa de ARNbc de EPSPS	Vehículo de suministro de ARNbc	
R28	87	8	Silwet L-77 al 1 %	10X	sulfato de amonio al 2 %	4x WeatherMAX (72 h)
		9	Silwet L-77 al 1 %	Solo tampón (control)	sulfato de amonio al 2 %	4x WeatherMAX (72 h)

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

Ejemplo 14

130) Este ejemplo ilustra procedimientos y composiciones aplicadas por vía tópica para inducir el silenciamiento sistémico que incluyen el uso de agentes para acondicionar una planta para la infiltración mediante polinucleótidos.

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

132) La aplicación de una mezcla de cuatro moléculas oligonucleotídicas de ARNbc de EPSPS de tamaño “corto” (descritas en el **Ejemplo 1**) con posterior aplicación de glifosato repitiendo el procedimiento de tratamiento descrito en el **Ejemplo 1**, dio como resultado la muerte de 4 de 4 plantas de palmera amaranto con 16 copias de EPSPS. El uso del mismo procedimiento de tratamiento pero aplicando conjuntamente ARNbc 5 corto y ARNbc 6 corto, dio como resultado la muerte de 0 de 4 plantas de palmera amaranto. La adición de cualquiera o los dos ARNbc 5 corto y ARNbc 6 corto a la mezcla de las cuatro moléculas oligonucleotídicas de ARNbc de EPSPS de tamaño “corto” (descritas en el **Ejemplo 1**), dio como resultado la muerte de 4 de 4 plantas de palmera amaranto, es decir, no se observó ningún efecto antagonista del ARNbc 5 corto y del ARNbc 6 corto.

Ejemplo 15

133) Este ejemplo ilustra procedimientos y composiciones aplicadas por vía tópica para inducir el silenciamiento sistémico que incluyen el uso de agentes para acondicionar una planta para la infiltración mediante polinucleótidos. Más específicamente, este ejemplo describe el uso de ácido salicílico y polinucleótidos.

134) El ácido salicílico (SA) induce resistencia a virus en el tabaco; véase, por ejemplo, Chivasa y col. (1997) *Plant Cell*, 19:547 – 557. Las plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato que tienen 49 o 63 copias de EPSPS se pretrataron con SA 15 milimolar. Manualmente, se aplicó una solución de las cuatro moléculas oligonucleotídicas de ARNbc de EPSPS de tamaño “corto” (descritas en el **Ejemplo 1**) 1, 5 o 24 horas después del tratamiento con SA, con posterior pulverización de glifosato 72 horas después (1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®). 7 días después del tratamiento con glifosato, no se observó ninguna mejora de los efectos de los ARNbc y de la actividad de glifosato (estimada observando el crecimiento de la planta medido por la altura de la misma) en ninguno de los tratamientos con SA.

Ejemplo 16

135) Este ejemplo ilustra procedimientos y composiciones aplicadas por vía tópica para inducir el silenciamiento sistémico que incluyen el uso de agentes para acondicionar una planta para la infiltración mediante polinucleótidos. Más específicamente, este ejemplo describe variaciones en cuanto al orden y el momento de la aplicación de los polinucleótidos y la solución de tensioactivo.

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

Ejemplo 17

137) Este ejemplo ilustra procedimientos y composiciones aplicadas por vía tópica para inducir el silenciamiento sistémico que incluyen el uso de agentes para acondicionar una planta para la filtración mediante polinucleótidos. Más específicamente, este ejemplo describe la aplicación de polinucleótidos de la invención mediante pulverización de bajo volumen y el uso de un tensioactivo de silicona y sulfato de amonio.

5 **138)** Mediante pulverización de bajo volumen, a la palmera amaranto que tenía 16 copias de EPSPS, se la aplicó una solución de ARNbc (una solución de las cuatro moléculas oligonucleotídicas de ARNbc de EPSPS de tamaño “corto” descritas en el **Ejemplo 1**) en una solución que contenía sulfato de amonio al 2 %, con posterior pulverización con glifosato (1682 g de equivalente ácido por hectárea del herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®), que produjo la muerte de las plantas de palmera amaranto.

10 **139)** Se trataron seis plantas de palmera amaranto por tratamiento con un procedimiento de tres etapas utilizando pulverización de bajo volumen: (1) pulverización de Silwet L-77 al 1%; (2) pulverización de 2 mililitros de una solución de ARNbc que contenía las mismas cantidades de las cuatro moléculas oligonucleotídicas de ARNbc de EPSPS de tamaño “corto” descritas en el **Ejemplo 1** a una de 3 dosis (1X o 0,8 nanomoles por planta, 2X o 1,6 nanomoles por planta o 4X o 3,2 nanomoles por planta); y (3) pulverización de glifosato (1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®) a una tasa de 159 litros/acre. Nueve días después de la pulverización con glifosato, las seis plantas que se pulverizaron con 4X (3,2 nanomoles por planta) de ARNbc murieron y las plantas pulverizadas con 2X (1,6 nanomoles por planta) de ARNbc o 1X (0,8 nanomoles por planta) de ARNbc presentaban retraso en el crecimiento (**Figura 21A**).

20 **140)** Se llevaron a cabo varios ensayos en palmera amaranto resistente a glifosato cultivada a partir de semillas recogidas en el campo. Las plantas se trataron con varios protocolos descritos a continuación, tratándose por vía tópica algunas plantas con una solución de ARNbc y tratándose las plantas de control con tampón (vehículo de ARNbc); la aplicación se realizó mediante pulverización de bajo volumen. A menos que se indique lo contrario, la solución de ARNbc contenía las mismas cantidades de las cuatro moléculas oligonucleotídicas de ARNbc de EPSPS de tamaño “corto” descritas en el **Ejemplo 1** en tampón a una dosis “4X” (3,2 nanomoles por planta); el tampón consistía en fosfato de sodio 10 milimolar y tensioactivo de organosilicona Silwet L-77 al 0,01 % (v/v) en agua con dietilpirocarbonato (DEPC) (Omega Bio-Tek) y se ajustó a un pH de 6,8; y el herbicida era un herbicida de glifosato aplicado a 840 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre. Los resultados se proporcionan en la **Tabla 7**.

30 **141)** Ensayos 1 y 2: Estos ensayos se llevaron a cabo en palmera amaranto resistente a glifosato cultivada a partir de semillas obtenidas de una muestra de suelo de una explotación agrícola con plantaciones conocidas de palmera amaranto resistente a glifosato. En el ensayo 1, se trataron diez plantas por tratamiento de la siguiente forma: (1) pulverización de Silwet L-77 al 1%; (2) pulverización de 2 mililitros de la solución de ARNbc; y (3) pulverización de glifosato. En el ensayo 2, se trataron dieciocho plantas por tratamiento utilizando el mismo procedimiento que en el ensayo 1.

35 **142)** Ensayo 3: Este ensayo comparó tratamientos aplicados a diferentes fases de desarrollo y utilizó plántulas cultivadas a partir de semillas de palmera amaranto de un sitio del Condado de Macon, GA y seleccionadas por su resistencia al glifosato. El tampón incluía sulfato de amonio al 2 %. Se trataron doce plántulas pequeñas (fase de hoja 3) o doce plántulas grandes (fase de hoja 5) por tratamiento de la siguiente forma: (1) pulverización de Silwet L-77 al 1 %; (2) pulverización de 2 mililitros de la solución de ARNbc; y (3) pulverización de glifosato. Este tratamiento proporcionó mejor control (murieron más plantas) en plántulas pequeñas en comparación con plántulas más grandes. El tratamiento con ARNbc causó la muerte de, o provocó retraso en el crecimiento en, más plantas resistentes a glifosato que el tratamiento con tampón y herbicida, aunque 16 días después del tratamiento no todas las plantas tratadas con ARNbc murieron.

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

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

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

Tabla 7

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

Ejemplo 18

146) Este ejemplo ilustra procedimientos y composiciones aplicadas por vía tópica para inducir el silenciamiento sistémico que incluyen el uso de agentes para acondicionar una planta para la infiltración mediante polinucleótidos.

- 5 **147)** En este ensayo, la solución de ARNbc contenía las mismas cantidades de las cuatro moléculas oligonucleotídicas de ARNbc de EPSPS de tamaño "corto" descritas en el **Ejemplo 1** a una dosis "10X" (8 nanomoles por planta) en una solución que contenía tensioactivo de amina de sebo al 0,2 % y sulfato de amonio al 2 % (identificada en la **Figura 22** como "amina de sebo/AMS") o uno de los siguiente reactivos de transfección: (a) una poliamina (JetPRIME™, Polyplus-transfection SA, Illkirch, Francia), (b) una nanopartícula magnética (SilenceMag, OZ Biosciences, Marsella, Francia), (c) un péptido (nanopartícula N-TER™, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), (d) un lípido (siPORT™ NeoFX™, Ambion, Foster City, CA) o (e) un lípido/polímero catiónico (TransIT®, Mirus Bio, Madison, WI). Las plantas se trataron de la siguiente forma: (1) aplicación manual de la solución de ARNbc; (2) pulverización de Silwet L-77 al 1%; y (3) pulverización con glifosato aplicado a 840 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre. Cuando este protocolo se utiliza con ARNbc en la solución de tensioactivo de amina de sebo/sulfato de amonio, la palmera amaranto resistente a glifosato que tiene 35 copias de EPSPS, muere. Los resultados se muestran en la **Figura 22**. Se observó retraso en el crecimiento o muerte de las plantas en las plantas tratadas con ARNbc en soluciones que contenían poliamina (JetPRIME™), péptido (nanopartícula N-TER™), lípido/polímero catiónico (TransIT®) o tensioactivo de amina de sebo/sulfato de amonio.

Ejemplo 19

- 20 **148)** Este ejemplo ilustra procedimientos que utilizan composiciones que incluyen polinucleótidos aplicados por vía tópica para inducir el silenciamiento sistémico en una planta. Más específicamente, este ejemplo describe el uso de diferentes tipos de polinucleótidos para inducir el silenciamiento sistémico.

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

- 30 **150)** En los ensayos, se utilizaron plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato de 16 copias utilizando este procedimiento: (1) pulverización de Silwet L-77 al 1 %; (2) aplicación manual sobre cuatro hojas maduras de cada planta para un total de 0,8 nanomoles de los ARNbc de EPSPS de palmera (tal como se describió en el **Ejemplo 1**) o de los híbridos de ADN/ARN de EPSPS de palmera; y (3) pulverización con glifosato aplicada a 840 g de equivalente

ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre.

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

Ejemplo 20

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

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

Ejemplo 21

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

155) Se diseñaron doce ARNbc, cada uno de ellos con aproximadamente 250 pb y con una cadena del ARNbc correspondiente a la de las secuencias de ADN en mosaico de EPSPS de las **SEQ ID NO:41-52 (Tabla 8)** para cubrir, con una disposición en mosaico, la secuencia codificante completa y parte de las regiones 5’ y 3’ no traducidas del gen EPSPS de la palmera amaranto, tal como se muestra en la **Figura 25A**.

Tabla 8

Número de segmento dispuesto en mosaico (véase la Figura 25A)	Secuencia	SEQ ID NO.
1	CGCCAGGGCTGCAGACGCGTTACGTANTCGGATCCAGAATTCGTGATTAAC GTCACAGCATGTCATGTAACACGCGAATCAGACCGGTCCACTCTTGTTT TAATTTGAGACAATTTGATGTTGAGTCATCCCACCAACCCCAAAAAAT TCAACAACAAACTCTTATAATGATTCCTCTACTCTACTAGAGTCTACACC AACCCACTTCTCTTTGCCCCACCAAACTTTGGTTTGGTAAGAACT	41
2	CACCAACCCACTTCTCTTTGCCACCAAACTTTGGTTTGGTAAGAACTA AGCCCTCTCTTTCCCTTCTCTCTTAAAAAGCCTAAAAATCCACCTAACTTT TTCAGCCAACAACAACGCCAAATTCAGAGGAAGAATAATGATGGCTCAA GCTACTACCATCAACAATGGTGTCCATACTGGTCAATTCACCATACTTTA CCAAAACCCAGTTACCAAACTTCAAAAACTCTTAATT	42
3	CCATACTTACCAAAAACCCAGTTACCAAAATCTCAAAAACTCTTAATTT GGATCAAACTTGAGAATTTCTCCAAAGTTCAATGTCTTTAACCAATAAAGA GTTGGTGGGCAATCATCAATTGTTCCCAAGATCAAGCTTCTGTGCTGCT GCAGCTGAGAAACCTTCACTGTCCAGAAATGTGTTACAACCCATCAAA GAGATCTCTGGTACTGTCAATTGCCTGGGTCAAAGTCTTTATCC	43
4	TCAAAGAGATCTCTGGTACTGTCAATTGCCTGGGTCAAAGTCTTTATCCA ATCGAATCCTTCTTTTAGCTGCTTTGTCTGAGGGCACACAGTGGTTCGACA ACTTGCTGTATAGTGATGATATTCTTTATATGTTGGACGCTCTCAGAACTCT TGGTTTAAAAGTGGAGGATGATAGTACAGCCAAAAGGGCAGTCTGATAGGG GTTGTGGTGGTCTGTTTCTGTTGGTAAAGATGGAAAGGAAGAGAT	44
5	GAGGGTTGTGGTGGTCTGTTTCTGTTGGTAAAGATGGAAAGGAAGAGATT CAACTTTTCTTTGGTAATGCAGGAACAGCGATGCCCCATTGACAGCTGCG GTTGCCGTTGCTGGAGGAAATCAAGTTATGTGCTTGATGGAGTACCAAGA ATGAGGGAGCGCCCCATTGGGGATCTGGTAGCAGGTCTAAAGCAACTTGG TTCAGATGTAGATTGTTTTCTTGGCACAAATGGCCCTCTGTTCCGGG	45

6	TGGTTCAGATGTAGATTGTTTTCTTGGCACAAATTGCCCTCCTGTTCGGGTC AATGCTAAAGGAGGCCTTCCAGGGGGCAAGGTCAAGCTCTCTGGATCGGT TAGTAGCCAATATTTAAGTCACTTCTCATGGCTACTCCTTTGGGTCTTGGGA GACGTGGAGATTGAGATAGTTGATAAAATTGATTCTGTACCGTATGTTGAA ATGACAATAAAGTTGATGGAACGCTTTGGAGTATCCGTAGAACAT	46
7	TTGAAATGACAATAAAGTTGATGGAACGCTTTGGAGTATCCGTAGAACAT AGTGATAGTTGGGACAGGTTCTACATTCGAGGTGGTCAGAAAACAAAATCT CCTGGAAAGGCATATGTTGAGGGTGTATGCTTCAAGTGCTAGCTACTTCTTA GCCGGAGCCGCCCTCACTGGTGGGACTGTCACTGTCAAGGGTTGTGGAAC AAGCAGTTTACAGGGTGTATGTTAAATTTGCCGAAGTTCTTGAGAAGAT	47
8	ACAAGCAGTTTACAGGGTGTATGTAATAATTTGCCGAAGTTCTTGAGAAGAT GGGTTGCAAGGTCACCTGGACAGAGAATAGTGAACTGTACTGGACCAC CCAGGGATTCATCTGGAAGAAAACATCTGCGTGTCTATCGACGTCAACATG AACAAAATGCCAGATGTTGCTATGACTCTTGCAGTTGTTGCCCTGTATGCA GATGGGCCACCACCATCAGAGATGTGGCTAGCTGGAGAGTGAAGGAAA	48
9	AGATGGGCCCACCGCCATCAGAGATGTGGCTAGCTGGAGAGTGAAGGAAA CCGAACGGATGATTGCCATTTGCACAGAAGTGAAGAAAGCTTGGGGCAACA GTTGAGGAAGGATCTGATTACTGTGTGATCACTCCGCCGAAAAGCTAAAC CCCACCGCCATTGAAACTTATGACGATCACCGAATGGCCATGGCATTCTCT CTTGCTGCCCTGTGCAGATGTTCCCGTCACTATCCTTGATCCGGGATGC	49
10	CTCTTGCTGCCTGTGCAGATGTTCCCGTCACTATCCTTGATCCGGGATGCAC CCGTAAAACCTTCCCGACTACTTTGATGTTTTAGAAAAGTTTCGCCAAGCA TTGATGAGTAGCTATATACGAGATCCTTAAATTTGTACGCCGAAGGTTTTGA TTGAGTCTAATAGTAGATAAAAAGGCTATAAATAAACTGGCTTCTGCTTG AGTAATTATGAAATTTCTTTGATTATGTTTGTGAGATTTGAAGTAGCTTATA	50
11	TAATTATGAAATTTCTTTGTATTATGTTTGTGAGATTTGAAGTAGCTTATAAA TTACAATGTACTAAAGTCTAGAAAATAAGTTATGTATCTTTTAAATCAATGA GAAATGCATACCTGAAAAGGCTTGACCTTGTATTTGTGACCTAAAAGACT AACTTTGGAGTTTCCAACCTATTGTTTATCTCATTTTTTTTTAAATTTTGTAT TTAAATTTGTTATTTTATGAGTAATCATGTATCTTTCTTATTCTAACCCAA TGTAACTACTCTTC	51
12	TATGAGTAATCATGTATCTTTCTTATTCTAACCAAAATGTAATACTCCTTCCA ACTCTCTTTAAAACGTCACACTCTGGGCACAGAGTGTAAATAGTGTGGTGGT TGGAGTCTTTAAAGTGATTATAATAATTGAAAATGTGGTAGTTAGAATATT TTAAGTAATGTAGGTGGGTATTATGGTCTTGTGAAACATAGGATATTAG GTAATAAAATCTATGCAAAAAAGGAAAGTAAAGCAAAATAAGCGAATTGA CCTGAAAAGAAAAGTGGACATGTATAGTGTGAGTTGGAGGAAGTATTTT	52

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

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

Ejemplo 22

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

159) En un ensayo, las plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato que tenían 16 copias de EPSPS, se pulverizaron con glifosato aplicado a 840 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX® a una tasa de 159 litros/acre. Dos o 24 horas después de la aplicación de herbicida, las plantas se trataron con pulverización con Silwet L-77 al 1 %. De quince a 20 minutos después del tratamiento con Silwet, las plantas se trataron mediante aplicación manual con 0,8 nanomoles (“1X”) por planta de las cuatro moléculas

oligonucleotídicas de ARNbc de EPSPS de tamaño “corto”, tal como se describieron en el **Ejemplo 1**, en tampón que contenía sulfato de amonio al 2 % o en tampón que contenía sulfato de amonio al 2 %. En este ensayo, las plantas de control no tratadas (“NT”) se trataron solo con pulverización de Silwet L-77 al 1 % pero no con herbicida o ARNbc. Los resultados se muestran en la **Figura 26**. En este ensayo, la aplicación de Silwet al 1 % dio como resultado una actividad de glifosato mejorada del 60 % cuando se aplicó 2 horas después de la pulverización del herbicida y del 20 % cuando se aplicó 24 horas después de la pulverización del herbicida. En este ensayo, la aplicación de Silwet al 1 % con posterior aplicación de ARNbc de EPSPS dio como resultado una actividad de glifosato mejorada de al menos el 80 % cuando se aplicó 2 horas después de la pulverización del herbicida y del 20 % cuando se aplicó 24 horas después de la pulverización del herbicida.

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

Ejemplo 23

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

162) Este ensayo se llevó a cabo en una población de campo de plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato que se sabía que tenían cantidades muy grandes de copias de EPSPS (Gaines y col. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107:1029-1034 informaron que las plantas de este sitio de estudio tenían de 5 a más de 160 copias de EPSPS). Los polinucleótidos utilizados en este ensayo eran una mezcla equimolar de las cuatro moléculas oligonucleotídicas de ARNbc de EPSPS de tamaño “corto”, tal como se describieron en **Ejemplo 1**.

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

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

Ejemplo 24

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

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

166) La PDS de la lechuga tiene la secuencia

ATGTCTCTGTTTGGAAATGTTTCTGCCATTAECTCAAGTGGAAAGTG-
TATAGTAATGAATCTTTCAA GCACACAAATCACTTCAAGAGATTGTTTCAAGATTACCTCAGGGCAAAAAGAT-
GTTTTGTCAATTTG GATGCTGTGATGCTATGGGTAACAGATTGCAATCCCAAGTGCTCGTTCTTTACACCAA-
GATCAA AGAAGAATGTCTCCCCTCTAAAGGTAGTTTGTGTTGATTATCCAAGACCAGATCTTGATAACACAT
CTAATTTCTTGGAAGCTGCTCACTTGTCTTCAACCTCAGAAGTCCCCACGCCCATCTAAGCCATT
GAAGATTGTAATTGCTGGTGCAGGTTTAGCTGGTTTATCAACTGCTAAGTATTTAGCTGATGCAGG
TCACAAGCAAATTTTACTAGAAGCAAGAGATGTTCTTGGTGGAAAGGTGGCAGCTTGAAAGATG
ATGATGGAGATTGGTATGAGACAGGTTTACACATATTTCTTTGGAGCTTACCCAAATGTACAAAATT
TATTTGGAGAGCTAGGAATTAATGATAGATTACAGTGGAAAGGAGCATTCTATGATATTTGCAATGC
CAAATAAGCCTGGAGAATTTAGTAGTTTACTTCCAGATGTTTTACCTGCACCATTGAATGGAA
TTTTTGCTATATTGAGGAACAATGAAATGCTGACGTGGCCTGAGAAAGTGAAGTTTGCAATTGGGC
TGTTGCCTGCAATGTTAGGTGGACAGGCTTATGTTGAGGCCAAGATGGGCTTAGTGTTTCAGGACT
GGATGAGAAAGCAAGGTATACCTGATCGAGTTACTACTGAAGTGTATTGCAATGTCAAAGCA
TTAAACTTTATAAATCCAGATGAACTTTCAATGCAATGTATTCTCATTGCTCTAAACCGTTTTCTTC
AGGAAAAGCATGGTTCCAAGATGGCATTGTTTAGATGGGAGCCACCAGAAAGACTTTGCAAGCCA
ATTGTTGACCACATCGAGTCACTCGGTGGCCAAGTCAGAGTCAACTCACGAATACAAAAATTGA
GTTAAACAAGACGGAAGTGTCCGGAACCTTCTATTGAGTGATGGGAATGTTCTAGAAGCTGATGC
TTATGTTTTCGTACCCCTGTTGACATTCTCAAGCTTCTTTTACCCGAAGAATGGAAACCAATTCCA
TATTTCAAAAAATTAGAGAAGTTAGTCGGTGTTCCTGTTATAAACGTTTCATATATGGTTTGACAGA
AAGCTGAAAAACACATATGATCACTTACTTTTTCAGTAGGTCACCTCTGCTGAGTGTGTATGCTGAC
ATGTCAGTGACATGTAAGGAATATTATGATCCGAATAAGTCAATGTTGGAGTTGGTTCTTGCTCCA
GCTGAGGAATGGATTTCAAGAAGTGACACTGATATTATTGATGCAACAATGAGTGAACCTTCAAG
GCTTTTTCTGATGAAATTGCAGCTGATCAAAGTAAAGCAAAAATCTTGAATATAAAGTTGTTAA
AACACCAAGGTCTGTTTATAAACTGTTCCAGATTGTGAACCATGTCGACCCCTACAAAGATCTCC
AATTC AAGGATTTTATTTATCTGGTGATTATACTAAACAAAAGTATTTGGCTTCAATGGGGGGTGC

10 TGTTTTATCTGGAAAAATTTGTGCACAAGCTATTTTACAAGATTATGAGATGCTTGCTACA (SEQ ID NO:53). Se sintetizaron ADN monocatenarios polinucleotídicos de 21-45 nucleótidos de longitud con las siguientes secuencias: taatagactcactataggggttgagcttaccCAAATGtac ("HL286", orientación sentido, SEQ ID NO:54), taatagactcactatagggaggccacgtcagcattcattgttc ("HL287", orientación antisentido, SEQ ID NO:55), ccatcaATGgtgcaggtaaaac ("HL288", orientación antisentido, SEQ ID NO:56), catagaATGctctccactg ("HL289", orientación antisentido, SEQ ID NO:57) y caataaaatgtacattgggtaagctcaa ("HL290", orientación antisentido, SEQ ID NO:58). Se preparó una solución de ADNmc con una misma mezcla de los cinco polinucleótidos en Silwet L-77 al 0,01 % en tampón de fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8.

167) En los ensayos se utilizó la variedad de lechuga LS49 "Green Tower". Durante algunos segundos, dos hojas completamente expandidas se sumergieron en una solución recién preparada de Silwet L-77 al 0,1 % en agua bidestilada. Las hojas se dejaron secar durante 15-30 minutos. A continuación, cada planta se trató aplicando 20 microlitros de solución de ADNmc sobre la superficie superior de dos hojas tratadas con Silwet (en total 40 microlitros por planta). La **Tabla 9** indica las condiciones del ensayo utilizadas y la decoloración observada de plantas tratadas por vía tópica con polinucleótidos de ADNmc. La **Figura 28** representa (de arriba a abajo) la evolución de la decoloración y muerte de las plantas de lechuga tratadas con ADNmc 1 nanomol por planta, 37, 46 y 60 días después del tratamiento.

Tabla 9

Fase de desarrollo	Cantidad de cada ADNmc aplicado (nanomoles/planta)	Primera observación de la decoloración
4 semanas posgerminación, las plantas tienen 2 hojas completamente expandidas	1	3 semanas postratamiento
5 semanas posgerminación, las plantas tienen 4 hojas completamente expandidas	4	4 días postratamiento

168) Los ensayos se repitieron con 2 o 4 nanomoles de ADNmc aplicados por planta. La **Figura 29A** muestra el silenciamiento sistémico puesto de manifiesto por la decoloración observada 4 o 12 días después del tratamiento tópico con los polinucleótidos.

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

10 **Ejemplo 25**

170) Este ejemplo ilustra un aspecto de la invención. En este ejemplo, se trataron plantas en crecimiento con una composición aplicada por vía tópica para inducir el silenciamiento sistémico de un gen diana en una planta que incluye (a) un agente para acondicionar una planta para la infiltración mediante polinucleótidos y (b) polinucleótidos que incluyen al menos una cadena polinucleotídica que incluye al menos un segmento de 18 o más nucleótidos contiguos del gen diana en orientación antisentido o sentido. Más específicamente, este ejemplo demuestra el uso de polinucleótidos aplicados por vía tópica para inducir el silenciamiento sistémico de un gen de fitoeno desaturasa (PDS) en un cultivo de hortalizas, es decir, tomate (*Solanum lycopersicum*).

171) La PDS del tomate tiene la secuencia

```
GGGTTTATCTCGCAAGTGTGGCTATGGTGGGACGTGTCAAATTTTGGATTGTAGCCAAACATGAGA
TTTGATTTAAAGGGAATTGGCCAAATCACCGAAAGCAGGCATCTTCATCATAAAATTAGTTTGTTTA
TTTATACAGAATTATACGCTTTTACTAGTTATAGCATTTCGGTATCTTTTCTGGGTAACCTGCCAAAC
CACCACAAATTTCAAGTTTCCATTTAACTCTTCAACTTCAACCCAACCAAAATTTATTGCTTAATTG
TGCAGAACCCTCCCTATATCTTCTAGGTGCTTTCATTTCGTTCCGAGTAAAATGCCTCAAATTGGAC
TTGTTTCTGCTGTTAACTTGAGAGTCCAAGGTAGTTCAGCTTATCTTTGGAGCTCGAGGTCGTCTTC
TTTGGAACTGAAAGTCGAGATGGTTGCTTGCAAAGGAATTCGTTATGTTTGGCTGGTAGCGAATC
AATGGGTCATAAGTTAAAAGATTCTACTCCCCATGCCACGACCAGAAGATTGGTTAAGGACTTGG
GGCCTTTAAAGTTCGTATGCATTGATTATCCAAGACCAGAGCTGGACAATACAGTTAACTATTTGG
AGGCTGCATTTTTATCATCAACGTTCCGTGCTTCTCCGCGCCCAACTAAACCATTGGAGATTGTTAT
TGCTGGTGCAGGTTTGGGTGGTTTGTCTACAGCAAATATTTGGCAGATGCTGGTCAAAAACCGAT
ACTGCTGGAGGCAAGGGATGTTCTAGGTGAAAAGGTAGCTGCATGAAAAGATGATGATGGAGATT
GGTACGAGACTGGTTGCATATATTCTTTGGGGCTTACCCAAATATTCAGAACCTGTTTGGAGAAT
TAGGGATTAACGATCGATTGCAATGGAAGGAACATTCAATGATATTTGCAATGCCAAGCAAGCCA
GGAGAATTCAGCCGCTTGATTTCTCCGAAGCTTACCCGCTCCTTTAAATGGAATTTTAGCCATCT
TAAAGAATAACGAAATGCTTACATGGCCAGAGAAAGTCAAATTTGCAATTGGACTCTTGCCAGCA
ATGCTTGGAGGGCAATCTTATGTTGAAGCTCAAGATGGGATAAGTGTTAAGGACTGGATGAGAAA
GCAAGGTGTGCCGGACAGGGTGACAGATGAGGTGTTCAATTGCTATGTCAAAGGCACTCAACTTTAT
AAACCCTGACGAACTTTCAATGCAGTGCATTTTGATCGCATTGAACAGGTTTCTTCAGGAGAAACA
TGGTTCAAAAATGGCCTTTTTAGATGGTAATCCCTCCTGAGAGACTTTGCATGCCGATTGTTGAACA
CATTGAGTCAAAAAGGTGGCCAAGTCAGACTGAACTCACGAATAAAAAAGATTGAGCTGAATGAGG
ATGGAAGTGTCAAGAGTTTATACTGAGTGACGGTAGTGAATCGAGGGAGATGCTTTTGTGTTTG
CCGCTCCAGTGGATATTTCAAGCTTCTATTGCCTGAAGACTGGAAAAGAGATTCATATTTCCAAA
AGTTGGAGAAGTTAGTCGGAGTACCTGTGATAAATGTACATATATGGTTTGACAGAAAACCTGAAG
AACACATATGATCATTGCTCTCAGCAGAAGCTCAGTCTCAGTGTGTATGCTGACATGCTGTGTTA
CATGTAAGGAATATTACAACCCCAATCAGTCTATGTTGGAATTTGGTTTTTGCACCTGCAGAAGAGT
GGATATCTCGCAGCGACTCAGAAATTATTGATGCAACGATGAAGGAACTAGCAACGCTTTTTCCTG
ATGAAATTTAGCAGATCAAAGCAAAGCAAATATTGAAAGTACCATGTTGTCAAAAACCTCCGAGG
TCTGTTTATAAAAAGTGTGCCAGGTTGTGAACCTGTTCGGCTTTACAAAAGATCCCAATAGAGGGG
TTTTATTTAGCCGGTACTACACGAAACAGAAATACTTGGCTTCAATGGAAGGCGCTGTCTTATCA
```

GGAAAGCTTTGTGCTCAAGCTATTGTACAGGATTATGAGTTACTTGTGGACGTAGCCAAAAGAAG
 TTGTCGGAAGCAAGCGTAGTTTGTAGCTTTGTGGTTATTATTTAGCTTCTGTACTAAATTTATGATG
 CAAGAAGCGTTGTACACAACATATAGAAGAAGAGTGCAGGTGAAGCAAGTAGGAGAAATGTTA
 GGAAAGCTCCTATACAAAAGGATGGCATGTTGAAGATTAGCATCTTTTTAATCCCAAGTTTAAATA
 TAAAGCATATTTATGTACCCTTTCTTTATCTGGGGTTTGTAAATCCCTTTATATCTTTATGCAATCT
 TTACGTTAGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGA (SEQ ID NO:59).

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

173) Plántulas de tomate de tres semanas se trataron de la siguiente forma. Durante algunos segundos, dos hojas
 completamente expandidas se sumergieron en una solución recién preparada de Silwet L-77 al 0,1 % en agua
 15 bidestilada. Las hojas se dejaron secar durante 30 minutos a 1 hora. A continuación, cada planta se trató mediante la
 aplicación de 20 microlitros de solución de ARNbc sobre la superficie superior de dos hojas tratadas con Silwet (en
 total 40 microlitros por planta). Las plantas de control se trataron con tampón. Las plantas se mantuvieron en una
 cámara de crecimiento para su observación. La Figura 30 muestra el silenciamiento sistémico del gen PDS diana, tal
 como se pone de manifiesto por la decoloración de las plantas tratadas con ARNbc 30 días después del tratamiento
 20 tópico. Las plantas tratadas con ARNbc presentaban un retraso grave en el crecimiento en comparación con las
 plantas de control.

Ejemplo 26

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

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

- 35 (1) nDsRNA1: cadena sentido CUACCAUCAACAAUGGUGUCC (SEQ ID NO: 63) y cadena antisentido
 GGACACCAUUGUUGAUGGUAG (SEQ ID NO: 64)
- (2) nDsRNA3: cadena sentido GUCGACAACUUGCUGUAUAGU (SEQ ID NO: 65) y cadena antisentido
 ACUAUACAGCAAGUUGUCGAC (SEQ ID NO: 66)
- 40 (3) nDsRNA4: cadena sentido GGUCACCUUGACAGAGAAUAG (SEQ ID NO: 67) y cadena antisentido
 CUAUUCUCUGUCCAGGUGACC (SEQ ID NO: 68)
- (4) nDsRNA5: cadena sentido AAUGCCAGAUGUUGCUAUGAC (SEQ ID NO: 69) y cadena antisentido
 GUCAUAGCAACUUGGCAUU (SEQ ID NO: 70)

176) Una mezcla de múltiples polinucleótidos es ventajosa para prevenir la selección de resistencia en las plantas
 tratadas. En una realización, la composición herbicida incluye una mezcla de los cuatro polinucleótidos de ARNbc
 45 mencionados anteriormente que tienen las SEQ ID NO: 63-70. En otra realización, la composición herbicida incluye
 polinucleótidos de ADN monocatenario con secuencias desoxirribonucleotídicas que corresponden a una o más de
 las secuencias de ARNbc SEQ ID NO: 63-70. En otra realización, la composición herbicida incluye híbridos de
 ARN/ADN con secuencias nucleotídicas que corresponden a una o más de las secuencias de ARNbc SEQ ID NO: 63-
 70. En otra realización, la composición herbicida incluye polinucleótidos de ARNbc donde los 2' hidroxilos se metilan
 50 para proporcionar estabilidad.

177) La composición herbicida incluye un tensioactivo tal como Silwet L-77 (u otros tensioactivos eficaces tales como

los proporcionados en el **Ejemplo 36**). Opcionalmente, la composición herbicida puede incluir uno o más aditivos tales como una sal, agente quelante o un humectante (tales como los proporcionados en el **Ejemplo 35**) para mejorar el rendimiento herbicida, por ejemplo, potenciando la transferencia de polinucleótidos hacia el interior de la planta, potenciando la eficacia de los polinucleótidos o potenciando la actividad herbicida del herbicida no polinucleotídico.

- 5 **178)** Opcionalmente, la composición herbicida incluye polinucleótidos diseñados para regular múltiples genes en la planta. En una realización, la composición herbicida incluye polinucleótidos que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia de un segundo gen o a la secuencia del ARN transcrito a partir del segundo gen, en donde la regulación del segundo gen proporciona una mejora sinérgica de la actividad herbicida de la composición.
- 10 **179)** En una realización, la composición herbicida incluye polinucleótidos que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia del gen endógeno de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de la palmera amaranto o a la secuencia del ARN transcrito a partir del gen endógeno de EPSPS, así como también polinucleótidos que tienen una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia del gen endógeno del factor de iniciación de la traducción (TIF) de la palmera o a la secuencia del ARN transcrito a partir del gen
- 15 endógeno de TIF. El factor de iniciación de la traducción (TIF) es una proteína cloroplástica codificada en el núcleo que es esencial para iniciar la síntesis proteica y se expresa en toda la planta. La especie *Arabidopsis thaliana* tiene un ortólogo denominado AT1G17220,1 (descrito en la base de datos disponible al público The Arabidopsis Information Resource que se encuentra en línea en www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=AT1G17220) y con el número de registro del GenBank GI:186478573, que se ha identificado como una proteína localizada en el
- 20 cloroplasto con similitud al factor de iniciación de la traducción 2 bacteriano; véase además Miura y col. (2007) *Plant Cell*, 19:1313–1328 para una descripción de este gen. Las secuencias de TIF se identificaron a partir de la palmera amaranto (*Amaranthus palmeri*); se identificó que un gen de TIF tiene la secuencia de **SEQ ID NO:71**. En la **Tabla 10** se muestran ejemplos de polinucleótidos para la supresión de este gen de TIF en la especie *Amaranthus palmeri*.

Tabla 10

Polinucleótido	Posición en la secuencia de TIF	Secuencia	SEQ ID NO.
TIF de palmera amaranto	Secuencia completa de SEQ ID NO:71	ATGGCAACAATGGCTTCCTAGTGAGTTTGGGAAGCTCTGGAG CAACTTGCTCAGGGCAATTGGAGGTTTCCTTTTCATTGGTTAAG AAAATTACATTGCCTAGAAGAAATGTAGTTGCAATTTTAGGCA ATTAGGAGGGGGAGGAGATGGCGTTACGTTTCGGTGTGTAGA CTTTCTGTCACTACTGATTATGTTTCTGAGCAAGGAAATGCTGT TTCTCTTGAAAATGCATATAGTGAGAGTAAAAGAAGAGGGTCTC ATCTTGAAGCCTTCCTAAGCCGGTTTTGAAATCCGGGTCTGA TGGAAATCGGAAATTTGGGGAGAGTTCGGTGGCGTTTTTCGAGT AATGGGAAATTGATAATGTAGAGGAGAGGAAGAAGGTTATTG ATTCAATTGGATGAGGTATTAGAAAAGGCCGAGAGATTAGAAAC GGCGAACTTACAAGCAGATAATAGAAAAGGATAGCAGCAAAATGTA AATAAACCGTCTCCGAGTGTAAAGTAGTTCAACCAATGGTAAAC CTGTAAATAATTTGAACAAAAGGGAAGCCTAAAAGCTGCGAAGAG CGTTTGGAGAAAAGGGAATCCAGTTTCTACTGTGCAAAAAGTA GTGCAAGAATCTCCGAAGATTGAAAAGGTTGAGAGAGTGGAAAG CTCGAACGACCAGCCAATCGTCTGAAACGATAAAGACCCCAAGT GCCACTACAGAGGCTGAGATTAAGTTGCAGGCAAAAGCCTTCT ACTGCTCCTCCACCCATGCCATAAGAAGCCGGTTTTGAAGGATGT GGGGATGTCTCCAGAGCTGATGGGAAGGACCAGTCTGTGAAA TCTAAAAGAGAGGAAGCCTATTCTAGTGGACAAATTTGCCACCA AGAAGGCATCAGTTGATCCGTCGATTGCTCAAGCAGTAATTGC CCCACAAAACCTGCTAAAATTTCTTCTGGAAAAGTTTAAAGATG ATTATCGGAAGAAGGGTCTTGCAGCTGGTGGCCGAAGAGGCG TATGGTCAATGATGATGATATTGAAATGCATGAAGACACTTCA GAGCTCGGTCTTCTATTCTCGGTGCTGCTACGGCTCGGAAAGG CAGGAAATGGAGTAAGGCAAGTCGCAAGGCTGCCAGACGCCA AGCAGCTAGAGATGCCGCTCCTGTAAAAGTGGAAATCTTAGAG GTTGAAGAAAAGGCATGTCCAGCCGAAGAATTAGCATACAAC TGGCTATTAGCGAAGGTGAAATCTTGGGTACCTGTATTCTAAG GGGATAAAAACCAGATGGTGTGCAAACTCTTGACAAGGCAATGG TAAAGATGATATGTGAAAGATATGACGTGGAGGTTTTGGACGC ACTTCTGAAACAAATGGAAAGAAATGGCTCGAAAAGAAGGAAAT TTCGACGAAGATGACCTTGACAAGCTTGAAGATAGGCCCTCCTG TGCTTACTATAATGGGTCATGTAGATCATGGCAAGACGACCCCT CTGGATTATATACGGAAGAGCAAGGTTGCTGCTTCTGAAAGTGT GTGGGATTACACAAGGTATTGGTGTATATAAGTGGAAAGTACC GGTGATGGCAAGTTGCTGCCCTGTGTCTTCTTGACACTCCCG GACACGAGGCGTTCGGGGCAATGAGGGCTCGTGGAGCAAGAGT GACAGATATTGCTATTATAGTTGTAGCTGCTGACGATGGGATCC GTCCTCAAACAAATGAAGCCATAGCACATGCAAAAAGCAGCTGG	71

		TGTACCTATTGTGGTTGCAATTAATAAGATTGACAAGGATGGG GCTAATCCGGACCGTGTGATGCAAGAGCTTTCATCAATTGGTCT AATGCCAGAGGATTGGGGTGGTGATACCCCAATGGTCAAGATA AGTGCTCTAAAAGGTGAAAATGTGGACGAGTTACTCGAGACAG CCATGCTTGTGCGCGAGTTGCAAGAGTTAAAGGCTAATCCTCAG AGGAACGCTAAGGGCACTGTAATTGAGGCTGGTCTTCATAAAT CAAAAAGGACCCATTGCCACTTTTATTGTGCAGAATGGTACCCTC AAACAAGGGGATACTGTAGTTTGTGGGAAGCATTGGGAAGG TTCGTGCCCTATTTGATCACGGAGGGAATCGCGTTGATGAAGCT GGTCCATCTATTCCCGTGCAGGTTATTGGATTGAATAATGTTC TTTTGCCGGTGTGAGTTCGAGGTAGTGAGTTCCTTGATATAG CTCGTAAAAGGCAGAGGTCCGTGCAGAGTCTTACGAAAATGA GCGTATAGCTGCTAAGGCCGAGACGAAAAGGTTACGCTGTCA TCCTTGGCATCGGCTGTTTCTCAGGGAAGATGGCTGGTTTGA TTGGCACCAGTAAATATCATTTTGAAGGTTGATGTTTCAGGAT CAATCGAGGCATTGAGGCAAGCTCTAGAAGTTCTTCTCAAGA TAACGTCACTTTGAAAGTTCTTACAAGCGACCGGAGATGTTA CTACAAGTGATGTTGATCTTGCAGTTGCTAGTAAAGCTATTATC TTGGGGTTCAATGTGAAGGCACCAGGTTCTGTGAAAAATTAG CAGATAACAAAGGTGTTGAAATTCGGCTTTATAAAGTCATTTAT GATCTAATTGACGACATGCGGAGTGCAATGGAAGGAATGTAG ATCCCCTTGAGGAACAAGTTGCAATTGTTTCAGCCGAAGTGC GGCTACATTCAGTAGTGGTAGTGCCGTGTGCTGGATGCATG GTGACCGAGGAAAAGATTACCAAAGGCTGTGGGATTTCGAGTGA TACGGAAGGGAAAAACTGTCCACGTTGGAGTTCTTGATTCTGTTG CGTCGAGTAA	
ADN de 200 pb	341-541	TTTCGAGTAATGGGAAAATTGGATAATGTAGAGGAGAGGAAGAA GGTTATTGATTCATTGGATGAGGTATTAGAAAAGGCCGAGAGA TTAGAAAACGGCGAACTTACAAGCAGATAATAGAAAGGATAGCA CAAATGTAAATAAAACCGTCTCCGAGTGAAGTAGTTCAACCAA TGGTAAACCTGTAATAATTTGAACAAA	72
ARNbc de 160 pb	342-501	Sentido: UUCGAGUAAUUGGGAAAUUGGAUAAUGUAGAGGAGAGGAAGA AGGUUAUUGAUUCAUUGGAUGAGGUAAUUGAAAAGGCCGAG AGAUUAGAAAACGGCGAACUUACAAGCAGAUAAUAGAAAGGA UAGCACAAAUGUAAAUAACCGUCUCCGAGUGUAAGU	73
		Antisentido: ACUUAACACUCGGAGACGGUUUUAUUACAUUUGUCUAUCCUU UCUAUUUAUCUGCUUGUAAGUUCGCGUUUCUAAUCUCUCGGC CUUUUCUAAUACCUCAUCCAAUGAAUCAAUAAACCUUCUUCU CUCCUCUACAUAUCCAUAUUCCCAUUAUCUGAA	74
ADN antisentido de TIF_AS1	555-576	ATTTCTCCAAACGCTCTTCGCA	75
ADN antisentido de TIF_AS2	342-363	ATCCAATTTCCATTACTCGAA	76
ADN antisentido de TIF_AS3	412-433	GTTTCTAATCTCTCGGCCTTTT	77
ADN antisentido de TIF_AS4	488-509	TTGAACTACTTACACTCGGAG	78
ADN antisentido de TIF_AS5	368-389	TAACCTTCTTCTCTCCTCTA	79
ADN antisentido de TIF_AS6	790-811	GTCCTTCCCATCAGCTCTGGA	80
ADN antisentido de TIF_AS7	1052-1073	CGTAGCAGCACCAGGAATAG	81
ADN antisentido de TIF_AS8	1655-1676	CAGCAGCTACAACCTATAATAG	82

180) En una realización, la composición herbicida incluye una mezcla de al menos dos de los polinucleótidos de ARNbc de EPSPS mencionados anteriormente que tienen las **SEQ ID NO: 63-70** y también al menos un polinucleótido que tiene una secuencia esencialmente idéntica o complementaria a la secuencia del gen endógeno del factor de iniciación de la traducción (TIF) de palmera o a la secuencia del ARN transcrito a partir del gen endógeno de TIF, tales como los proporcionados en la **Tabla 10**. En una realización específica, la composición herbicida incluye una mezcla de los

cuatro polinucleótidos de ARNbc de EPSPS que tienen las **SEQ ID NO: 63-70** y un polinucleótido de ARN bicatenario de TIF de 160 pares de bases que tiene la secuencia sentido de

5 UUCGAGUAAUGGGAAAUUGGAUAAUGUAGAGGAGAGGAAGAAGGUUUAUUGAUUCAUUGGAUGAGGUAAUAG
 AAAAGGCCGAGAGAUUAGAAACGGCGAACUUACAAGCAGAUAAUAGAAAGGAUAGCACAAAUGUAAAUAACC
 GUCUCCGAGUGUAAGU (**SEQ ID NO. 73**) y la secuencia antisentido de
 10 ACUUACACUCGGAGACGGUUUUAUUUACAUUUGUGCUAUCCUUUCUAAUUAUCUGCUUGUAAGUUCGCCGUUU
 CAAUUCUCUCGGCCUUUUCUAAUACCUCAUCCAAUGAAUCAUAACCUUCUUCUCCUCUACAUUAUCCAA
 UUUCCCAUUACUCGAA (**SEQ ID NO. 74**).

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

15 **182)** Los polinucleótidos indicados en la **Tabla 11** se produjeron mediante síntesis o mediante transcripción *in vitro*.

Tabla 11

Nombre	Comentarios	Secuencias nucleotídicas
IDT [1]	ARNbc de EPSPS de palmera con dos 2-desoxirribonucleótidos (en texto en negrita subrayado) en el extremo 3' de la cadena sentido (25 meros) y un saliente de 2 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido (27 meros); sintetizado químicamente mediante IDT	Sentido: CUACCAUCAACAUGGUGUCCAU <u>AC</u> (SEQ ID NO. 83) Antisentido: GUAUGGACACCAUUGUUGAUGGUAGUA (SEQ ID NO. 84)
IDT [2]		Sentido: AGUUGGUGGGCAAUCAAAUUG <u>IT</u> (SEQ ID NO. 85) Antisentido: AACAAUUGAUGAUUGCCACCACCAACUCU (SEQ ID NO. 86)
IDT [3]		Sentido: GGUCGACAACUUGCUGUAUAGUG <u>AT</u> (SEQ ID NO. 87) Antisentido: AUCACUAUACAGCAAGUUGUCGACCUC (SEQ ID NO. 88)
IDT [4]		Sentido: UGCAAGGUCACCCUGGACAGAGA <u>TA</u> (SEQ ID NO. 89) Antisentido: UAUUCUCUGUCCAGGUGACCUUGCAAC (SEQ ID NO. 90)
IDT [5]	ARNbc de EPSPS de palmera (21 mer) con extremos romos; sintetizado químicamente mediante IDT	Sentido: AACAUGAACAAAUGCCAGAU (SEQ ID NO. 91) Antisentido: AUCUGGCAUUUUUUAUGUUGU (SEQ ID NO. 92)
IDT romo [1]	ARNbc de EPSPS de palmera (27 mer) con extremos romos; sintetizado <i>in vitro</i> a través de transcripción T7	1S-Antisentido GUAUGGACACCAUUGUUGAUGGUAGUA (SEQ ID NO. 93) 1S-Sentido UACUACCAUCAACAAGGUGUCCAUAC (SEQ ID NO. 94)
IDT romo [2]		2S-Antisentido AAUAAUUUGAUUGCCACCACCAACUCU (SEQ ID NO. 95) 2S-Sentido AGAGUUGGUGGCAAUCAUAAUUUUU (SEQ ID NO. 96)
IDT romo [3]		3S-Antisentido AUCACUAUACAGCAAGUUGUCGACCAC (SEQ ID NO. 97) 3S-Sentido GUGGUCGACAACUUGCUGUAUAGUGAU (SEQ ID NO. 98)
IDT romo [4]		4S-Antisentido UAUUCUCUGUCCAGGUGACCUUGCAAC (SEQ ID NO. 99) 4S-Sentido GUUGCAAGGUCACCUGGACAGAGAAUA (SEQ ID NO. 100)

(continuación)

Nombre	Comentarios	Secuencias nucleotídicas
3OH [1]		1S-Antisentido gGUAUGGACACCAUUGUUGAUGGUAGUAC (SEQ ID NO. 101) 1S-Sentido GCUACCAUCAACAAGGUGUCCAUACCAC (SEQ ID NO. 102)
3OH [2]	ARNbc de EPSPS de palmera (27 mer) con salientes en 3' ; sintetizado <i>in vitro</i> a través de transcripción T7	2S-Antisentido gAAGAAUUGAUGAUUGCCCCACCAACUCAC (SEQ ID NO. 03) 2S-Sentido GAGUUGGUGGGCAUCAUCAUUUUUUCAC (SEQ ID NO. 104)
3OH [3]		3S- Antisentido gAUCACUAUACAGCAAGUUGUCGACAC (SEQ ID NO. 105) 3S-Sentido GUCGACAACUUGCUGUAUAGUGAUCAC (SEQ ID NO. 106)
3OH [4]		4S-Antisentido gUAUUCUCUGUCCAGGUGACCUUGCACAC (SEQ ID NO. 107) 4S-Sentido GUGCAAAGGUCACCCUGGACAGAGAAUACAC (SEQ ID NO. 108)
IDT HP [1]	Cadena sencilla de ARN de EPSPS de palmera diseñada para autohibridarse en una horquilla , que contiene una secuencia antisentido en el brazo 5' y una secuencia antisentido en el brazo 3', con un bucle tetranucleotídico intermedio GAAA; sintetizado químicamente mediante IDT	1S-GUAUGGACACCAUUGUUGAUGGUAAGAAUACUACCAUCAACAUGGUGUCCAUAC (SEQ ID NO. 109)
IDT HP [2]		2S-AAUAAUUGAUGAUUGCCCCACCAACUCUGAAAAAGAGUUGGGGCAUCAUCAUUUAUU (SEQ ID NO. 110)
IDT HP [3]		3S- AUCACUAUACAGCAAGUUGUCGACCACGAAAGUGGUCGACAAACUUGCUGUAUAGUGAU (SEQ ID NO. 111)
IDT HP [4]		4S- UAUUUCUCUGUCCAGGUGACCUUGCAACGAAAGUUUGCAAGGUCACCUUGGACAGAGAAUA (SEQ ID NO. 112)

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

Tabla 12

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

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

Tabla 13

Polinucleótidos aplicados en combinación	SEQ ID NO.	Protocolo	Cantidad aplicada de cada polinucleótido (g/acre)	Total de polinucleótidos aplicados (g/acre)	Cantidad de copias de EPSPS*	Resultados**
IDT [1] IDT [3] IDT [4]	83,84, 87,88 89,90	1	0,29 0,29 0,29	0,87	112	75% de muerte (27 DDT)
IDT [1] IDT [3] IDT [4] [TIF]	83,84, 87,88 89,90 73,74	1	0,29 0,29 0,29 0,50	1,4	112	100% de muerte (27 DDT)
IDT [1] IDT [3] IDT [4] [ddATPasa]	83,84, 87,88 89,90 113,114	1	0,29 0,29 0,29 0,50	1,37	112	11,2% de retraso en el crecimiento (27 DDT)
IDT [1] IDT [3] IDT [4] [TIF] [ddATPasa]	83,84, 87,88 89,90 73,74 114,114	1	0,29 0,29 0,29 0,50 0,50	1,87	112	100% de muerte (27 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3] IDT [4]	83,84, 85,86 87,88 89,90	1	0,29 0,29 0,29 0,29	1,2	112, 36	0% control (11 DDT); 0% control (31 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3] IDT [4]	83,84, 85,86 87,88 89,90	1	1,4 1,4 1,4 1,4	5,8	112, 36	0% control (11 DDT); 15% de retraso en el crecimiento (31 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3] IDT [4]	83,84, 85,86 87,88 89,90	1	2,9 2,9 2,9 2,9	12	112, 36	0% control (11 DDT); 35% de retraso en el crecimiento (31 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3] IDT [4]	83,84, 85,86 87,88 89,90	1	5,8 5,8 5,8 5,8	23	112, 36	51% de retraso en el crecimiento (11 DDT); 100% de retraso en el crecimiento (31 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3] IDT [4]	83,84, 85,86 87,88 89,90	2	0,29 0,29 0,29 0,29	1,2	33, 54	9% de retraso en el crecimiento (6 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3] IDT [4]	83,84, 85,86 87,88 89,90	2	5,8 5,8 5,8 5,8	23	33, 54	100% de muerte (6 DDT)

ES 2 809 679 T3

IDT [1] IDT [3] IDT [4]	83,84, 87,88 89,90	2	0,29 0,29 0,29	0,87	33, 54	20% de retraso en el crecimiento (6 DDT)
IDT [1] IDT [3] IDT [4]	83,84, 87,88 89,90	2	5,8 5,8 5,8	17	33, 54	100% de muerte (6 DDT)
IDT [5]	91,92	1	0,29	0,29	34, 36, 54	14,1% de retraso en el crecimiento (22 DDT)
IDT [5]	91,92	1	2,9	2,9	34, 36, 54	100% de muerte (22 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3] IDT [4]	83,84, 85,86 87,88 89,90	1	2,9 2,9 2,9 2,9	12	34, 36, 54	100% de muerte (22 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3] IDT [4] IDT [5]	83,84, 85,86 87,88 89,90 91,92	1	2,9 2,9 2,9 2,9 2,9	14	34, 36, 54	100% de muerte (22 DDT)
IDT [1] IDT [3] IDT [4]	83,84, 87,88 89,90	1	2,9 2,9 2,9	8,7	34, 36, 54	100% de muerte (22 DDT)
IDT [1] IDT [3] IDT [4] IDT [5]	83,84, 87,88 89,90 91,92	1	2,9 2,9 2,9 2,9	12	34, 36, 54	100% de muerte (22 DDT)
IDT [5]	91,92	1	0,29	0,29	33, 54, 55	71% de retraso en el crecimiento (18 DDT)
IDT [5]	91,92	1	2,9	2,9	33, 54, 55	100% de muerte (18 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3] IDT [4] IDT [5]	83,84, 85,86 87,88 89,90 91,92	1	0,29 0,29 0,29 0,29 0,29	1,4	33, 54, 55	100% de muerte (18 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3] IDT [4]	83,84, 85,86 87,88 89,90	1	0,29 0,29 0,29 0,29	1,2	33, 54, 55	100% de muerte (18 DDT)
IDT HP [1] IDT HP [2] IDT HP [3] IDT HP [4]	109 110 111 112	3	0,29 0,29 0,29 0,29	1,2	16, 33	100% de muerte (18 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3] IDT [4]	83,84, 85,86 87,88 89,90	3	0,29 0,29 0,29 0,29	1,2	16, 33	100% de muerte (18 DDT)
IDT [1] IDT [3] IDT [4]	83,84, 87,88 89,90	3	0,29 0,29 0,29	0,87	16, 36	100% de muerte (18 DDT)

ES 2 809 679 T3

IDT [1] IDT [3] IDT [4]	83,84, 87,88 89,90	3	5,8 5,8 5,8	17	16, 36	100% de muerte (18 DDT)
IDT [1] IDT [3] IDT [4]	83,84, 87,88 89,90	3	29 29 29	87	16, 36	100% de muerte (18 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3] IDT [4]	83,84, 85,86 87,88 89,90	3	0,29 0,29 0,29 0,29	1,1	16, 36	100% de muerte (18 DDT)
3'-OH [1] 3'-OH [2] 3'-OH [3] 3'-OH [4]	101,102 103,104 105,106 107,108	3	No corresponde	22-26 microlitros (en volumen)	16	100% de muerte (10 DDT)
IDT romo [1] IDT romo [2] IDT romo [3] IDT romo [4]	93,94 95,96 97,98 99,100	3	0,29 0,29 0,29 0,29	1,1	16	75% de muerte (10 DDT)
IDT romo [1] IDT romo [2] IDT romo [3] IDT romo [4]	93,94 95,96 97,98 99,100	3	5,8 5,8 5,8 5,8	23	16	100% de muerte (10 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3]	83,84, 85,86 87,88	3	29 29 29	87	16	34% de retraso en el crecimiento (14 DDT)
IDT [2] IDT [3] IDT [4]	85,86 87,88 89,90	3	29 29 29	87	16	48% de retraso en el crecimiento (14 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [4]	83,84, 85,86 89,90	3	29 29 29	87	16	25% de retraso en el crecimiento (14 DDT)
IDT [1] IDT [4]	83,84, 89,90	3	29 29	58	16	44% de retraso en el crecimiento (14 DDT)
IDT [3] IDT [4]	87,88 89,90	3	29 29	58	16	41% de retraso en el crecimiento (14 DDT)
IDT [2] IDT [4]	85,86 89,90	3	29 29	58	16	40% de retraso en el crecimiento (14 DDT)
IDT [1]	83,84	3	29	29	16	51% de retraso en el crecimiento (13 DDT)
IDT [2]	85,86	3	29	29	16	0% control (13 DDT)
IDT [3]	87,88	3	29	29	16	51% de retraso en el crecimiento (13 DDT)

IDT [4]	89,90	3	29	29	16	51% de retraso en el crecimiento (13 DDT)
IDT [1] IDT [2] IDT [3] IDT [4]	83,84, 85,86 87,88 89,90	3	29 29 29 29	116	16	75% de muerte (13 DDT)

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

**DDT = días después del tratamiento; "0% de control" significa que no se observaron diferencias entre las plantas tratadas y las de control; el % de retraso en el crecimiento se calcula como $[100 - (\text{promedio de altura de las plantas de ensayo} / \text{promedio de altura de las plantas de control}) * 100]$

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

Tabla 14

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
TIF_ARNbc1	antisentido: 5'-UUUUCUAAUACCUCAUCCAAUGAAU-3'	115
	sentido: 5'-AUUCAUUGGAUGAGGUUUAGAAAA-3'	116
TIF_ARNbc2	antisentido: 5'-UAUCUGCUUGUAAGUUCGCCGUUUC-3'	117
	sentido: 5'-GAAACGGCGAACUUACAAGCAGAU-3'	118
TIF_ARNbc3	antisentido: 5'-GGAGACGGUUUUAUUACAUUUGUC-3'	119
	sentido: 5'-GCACAAAUGUAAAUAACCGUCUCC-3'	120
TIF_ARNbc4	antisentido: 5'-UAUUUACAGGUUUACCAUUGGUUGA-3'	121
	sentido: 5'-UCAACCAAUGGUAAAACCGUAAAUA-3'	122

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

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

- 188)** Las plantas con baja cantidad de copias, se trataron con una mezcla de 4 ARNbc cortos de EPSPS (ARNbc-1 corto, ARNbc-3 corto, ARNbc-4 corto, tal como se describió en el **Ejemplo 1** e IDT [5] (**SEQ ID NO:91-92** tal como se describió en la **Tabla 11**)) a 0,23 gramos/acre y un ARNbc de TIF individual a 5,8 gramos/acre o con cada ARNbc de TIF individual de 25 meros a 5,8 gramos/acre; las soluciones de polinucleótidos se formularon en tampón de fosfato de sodio 10 milimolar (pH 6,8) que contenía sulfato de amonio al 2 % y Silwet L-77 al 1 %. Treinta minutos después del tratamiento con los polinucleótidos, las plantas se pulverizaron, o no, con glifosato (1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®).
- 20

- 189)** Los resultados se representan en las **Figuras 31 y 32** y muestran que los polinucleótidos de TIF potencian la actividad de los polinucleótidos de EPSPS y que los polinucleótidos de TIF tienen actividad herbicida propia.
- 25

Ejemplo 27

- 190)** Los aspectos de la invención incluyen composiciones polinucleotídicas y procedimientos de uso para potenciar la actividad de un herbicida no polinucleotídico en una planta. Por ejemplo, una composición polinucleotídica diseñada para regular un gen diana herbicida o un gen de desactivación del herbicida o un gen de respuesta al estrés o una combinación de dichos genes diana, se aplica a una maleza o a una planta con crecimiento espontáneo, simultáneamente o posteriormente o antes de la aplicación de un herbicida no polinucleotídico (por lo general, un herbicida químico convencional), dando como resultado la mejora de la actividad del herbicida no polinucleotídico. La combinación de una composición polinucleotídica con un herbicida no polinucleotídico (por ejemplo, un herbicida químico convencional) proporciona un efecto sinérgico, es decir, el efecto herbicida de la combinación es mayor que la suma del efecto herbicida de la composición polinucleotídica y del efecto herbicida del herbicida no polinucleotídico.
- 30
- 35

191) En la **Tabla 15** se proporcionan ejemplos de herbicidas químicos convencionales y sus genes diana herbicidas correspondientes.

Tabla 15

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

5 **192)** En la **Tabla 16** se proporcionan ejemplos de herbicidas químicos convencionales y sus genes de desactivación del herbicida correspondientes.

Tabla 16

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

Ejemplo 28

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

15 **194)** Se diseñaron polinucleótidos de ARN bicatenario o ADNmc antisentido para los genes dirigidos al herbicida 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), fitoeno desaturasa (PDS), protoporfirina IX oxigenasa (PPO), fenilalanina amoniaco liasa (PAL), hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HPPD), acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase), acetolactato sintasa (ALS) y glutamina sintasa (GS). Para cada gen dirigido a herbicida, se aplicó una solución que contenía una mezcla de 8 polinucleótidos de ADNmc antisentido en sulfato de amonio al 2 % en tampón de fosfato de sodio 10 milimolar, pH 6,8, a una tasa de 2,32 g/acre con posterior aplicación de Silwet L-77 al 0,5 % por pulverización
20 (10 galones/acre). En la **Tabla 17** se indican los polinucleótidos analizados y las observaciones del fenotipo resultante.

Tabla 17

Gen	Nombre	Tamaño (nt)	Secuencia	SEQ ID NO:	Fenotipo
EPSPS			(Véanse las secuencias proporcionadas en los Ejemplos de trabajo 1, 9, 13, 14, 21, 26)	--	El ARNbc aplicado por vía tópica con posterior aplicación de glifosato, causó la muerte a la palmera resistente a glifosato (hasta 60 copias de EPSPS) en 7-10 días
PDS	PDS sentido	185	GACGAAACCCUCCAGAGAGGCUGU GCAUGCCUAAUUGUAAAACACAUCGA GUCACUAGGUGGUGAAGUAAAACUU AACUCUCGUAAUACAAAAGAUUCAGU UGGACCAGAGUGGAAGCGUGAAGAG UUUUUUGCUAAAUAACGGGAGGGAA AUACGAGGAGAUGCCUAUGUUUUUG CCACCCAGU	123	El ARNbc aplicado por vía tópica provocó decoloración y fenotipo de retraso en el crecimiento, y es sistémico.
	PDS antisentido	185	ACUGGGUGGCAAAAACAUAGGCAU CUCCUCGUUUUCCUCCCGUUAUUU AGCAAAAAACUCUUCACGCUUCCAC UCUGGUCCAACUGAAUCUUUUGUAU ACGAGAGUUAAGUUUAACUUCACCA CCUAGUGACUCGAUGUGUUUAACAA UAGGCAUGCACAGCCUCUCUGGAGG GUUCCGUC	124	

ES 2 809 679 T3

PPO	PPO_OLIGO1	21	GTGATATTACCTCCAACACGAT	125	Los ADN antisentido aplicados por vía tópica provocaron retraso en el crecimiento vegetal.
	PPO_OLIGO2	21	ATAGTAAGCACAGGATCGGAG	126	
	PPO_OLIGO3	21	CTTTCAATCCACTGTCAACCG	127	
	PPO_OLIGO4	21	ATCAAGCGTTCTGAAGACCTCAT	128	
	PPO_OLIGO5	21	CAGCAATGGCGGTAGGTAACA	129	
	PPO_OLIGO6	21	GCAATTGCCCGAATCCTTTTA	130	
	PPO_OLIGO7	21	TAGCTCAATATCAAGGTCCTA	131	
	PPO_OLIGO8	21	TCATAAGCACCTCTATACAC	132	
PAL	PAL_OLIGO1	21	TTCTTAACCTCGTCGAGATG	133	Los ADN antisentido aplicados por vía tópica provocaron retraso en el crecimiento vegetal.
	PAL_OLIGO2	21	ATACCCGAGTATCCTTGCAAA	134	
	PAL_OLIGO3	21	TAGGGCCCACGGCCTTGGAGT	135	
	PAL_OLIGO4	21	AGCGGATATAACCTCAGCTAG	136	
	PAL_OLIGO5	21	CTTCGTGGCCCAACGAATGAC	137	
	PAL_OLIGO6	21	CAAGCTCGGGTCCCTGCTTGC	138	
	PAL_OLIGO7	21	GGAAGGTAGATGACATGAGTT	139	
	PAL_OLIGO8	21	GATGGCATAGTTACCACTGTC	140	
HPPD	HPPD_OLIGO1	21	TCCGTAGCTTACATACCGAAG	141	Los ADN antisentido aplicados por vía tópica provocaron retraso en el crecimiento vegetal.
	HPPD_OLIGO2	21	TCCAAGTGAATAGGAGAAACA	142	
	HPPD_OLIGO3	21	AGCAGCTTCTGCGTCTTCTAC	143	
	HPPD_OLIGO4	21	ACAGCACGCACGCCAAGACCG	144	
	HPPD_OLIGO5	21	CGATGTAAGGAATTTGGTAAA	145	
	HPPD_OLIGO6	21	CGAGGGGATTGCAGCAGAAGA	146	
	HPPD_OLIGO7	21	GTAGGAGAATACGGTGAAGTA	147	
	HPPD_OLIGO8	21	GACCCCAAGAAAATCGTCTGC	148	
ACCasa	ACCA_OLIGO1	20	GTCTTACAAGGGTTCTCAA	149	El ADN antisentido aplicado por vía tópica provocó retraso en el crecimiento vegetal.
	ACCA_OLIGO2	21	ATCTATGTTACCTCCCTGTG	150	
	ACCA_OLIGO3	21	ATAAACCATTAGCTTTCCCGG	151	
	ACCA_OLIGO4	21	TTTATTGGAACAAGCGGAGTT	152	
	ACCA_OLIGO5	21	TATAGCACCACTTCCCGATAG	153	
	ACCA_OLIGO6	21	GCACCACGAGGATCACAAGAA	154	
	ACCA_OLIGO7	21	CCACCCGAGAAACCTCTCAA	155	
	ACCA_OLIGO8	21	CAGTCTTGACGAGTGATTCT	156	
ALS	ALS-OLIGO1	22	GTTCTTCAGGGCTAAATCGGGA	157	Sin fenipo significativo
	ALS-OLIGO2	22	GTTCAAGAGCTTCAACGAGAAC	158	
	ALS-OLIGO3	22	ATACAAACTCCAACGCGTCCAG	159	
	ALS-OLIGO4	22	CTCTTGAAAGCATCAGTACCA	160	
	ALS-OLIGO5	22	CTAGAAAGATACCCACCCAATT	161	
	ALS-OLIGO6	22	ACTAGAATTCAAACACCCACCC	162	

	ALS-OLIGO7	22	TTTCTGCTCATTCAACTCCTCC	163	
	ALS-OLIGO8	22	TATGTATGTGCCCGGTTAGCTT	164	
GS (glutamina sintasa)	GS_OLIGO1	21	TCATATCCAAGCCAGATCCTC	165	Sin fenotipo significativo
	GS_OLIGO2	21	TGCATCACACATCACCAAGAT	166	
	GS_OLIGO3	21	GTA CTCTGTTCAATGCCATA	167	
	GS_OLIGO4	21	ATTGATACCAGCATAGAGACA	168	
	GS_OLIGO5	21	AGCAATTCTCTCTAGAATGTA	169	
	GS_OLIGO6	21	CATCATTCTCATCGACTTAG	170	
	GS_OLIGO7	21	CTCTCGTTGCCCTCTCCATAA	171	
	GS_OLIGO8	21	CAACGCCCCAGGAGAAAGTTC	172	

195) Se investigaron la actividad herbicida de los polinucleótidos de ADNmc que se dirigen a las enzimas 4-hidroxifenilpiruvato (HPPD) y protoporfirinógeno oxidasa (PPO), y un factor de iniciación de transcripción (TIF) y su efecto sobre la actividad herbicida cuando se usan en combinación con los herbicidas mesotriona, fomesafén y atrazina en palmera amaranto. Los polinucleótidos utilizados en este experimento eran 8 oligonucleótidos de ADNmc antisentido de HPPD (SEQ ID NO:**141-148**), 8 oligonucleótidos antisentido de PPO (SEQ ID NO:**125-132**) y 8 oligonucleótidos de ADNmc antisentido de TIF (SEQ ID NO:**75-82**, véase el **Ejemplo 26**).

196) En un invernadero se cultivaron plantas de palmera amaranto (*Amaranthus palmeri*) sensibles a glifosato en macetas cuadradas de 4 pulgadas con mezcla para plántulas Sun Gro® Redi-Earth que contenía 3,5 kg/metro cúbico de fertilizante Osmocote® 14-14-14, con un fotoperíodo de 14 h y una temperatura diurna de 30 grados centígrados y una temperatura nocturna de 20 grados centígrados. Las plantas se sub-irrigaron según fue necesario.

197) Las plantas de 10 a 15 cm de altura se pretrataron manualmente con 40 microlitros (se trataron 4 hojas maduras completamente expandidas con 10 microlitros de solución por hoja en cada planta) de una solución de tampón-tensioactivo (como control; Silwet L-77 al 0,5 % y sulfato de amonio al 2 %) o con una mezcla de tampón-tensioactivo-polinucleótido de ADNmc de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a HPPD, PPO o TIF. Algunas plantas se dejaron sin tratamiento y se usaron como controles. Veinticuatro horas después, las plantas sin tratamiento, las plantas tratadas con tampón-tensioactivo y las plantas tratadas con tampón-tensioactivo-ADNmc, se trataron utilizando un pulverizador agrícola equipado con una boquilla 9501E y calibrado para administrar 93 litros de solución por hectárea con un inhibidor de HPPD, mesotriona (4 libras de principio activo por galón;) o con un inhibidor de PPO, fomesafén (2 libras de principio activo por galón) o con un inhibidor de Fotosistema II, atrazina (90 % de principio activo) tal como se indica en la **Tabla 18**. Se añadió concentrado de aceite de cultivo (CAC) a 1 % a todos los tratamientos con herbicida. Para poder detectar cualquier mejora en la actividad herbicida con la mezcla oligonucleotídica, se usó una tasa baja de cada herbicida (mesotriona: 13 g por acre, equivalente a 1/8X de la tasa de campo recomendada; fomesafén: 16 g por acre, equivalente a 1/22X de la tasa de campo recomendada; y atrazina: 170 g por acre, equivalente a 1/8X de la tasa de campo recomendada).

Tabla 18

Número de tratamiento	Pretratamiento	Principio activo	Tasa (gramos por hectárea de principio activo)
0	Tampón-tensioactivo	--	
1	Sin tratamiento	Mesotriona	13
2	Tampón-tensioactivo	Mesotriona	13
3	Tampón-tensioactivo-ADNmc-HPPD		
4	Tampón-tensioactivo-ADNmc-HPPD	Mesotriona	13
5	Sin tratamiento	Fomesafén	16
6	Tampón-tensioactivo	Fomesafén	16
7	Tampón-tensioactivo-ADNmc-		

	PPO		
8	Tampón-tensioactivo-ADNmc-PPO	Fomesafén	16
9	Sin tratamiento	Atrazina	170
10	Tampón-tensioactivo-ADNmc-TIF		
11	Tampón-tensioactivo-ADNmc-TIF	Atrazina	170

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

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

Tabla 19

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

10	ADNmc-TIF			115	17
11	ADNmc-TIF	Atrazina	170	121	16

Ejemplo 29

5 **200)** Este ejemplo ilustra secuencias de polinucleótidos de ARN bicatenario analizadas, diseñadas para determinar el efecto de la secuencia analizada sobre el fenotipo observable de diferentes genes esenciales. Para cada gen esencial, se aplicó una solución que contenía el polinucleótido de ARNbc en sulfato de amonio al 2 % en tampón de fosfato de sodio 10 milimolar, pH 6,8, a la palmera amaranto a una tasa de 240 picomoles por planta con posterior aplicación de Silwet L-77 al 0,5 % por pulverización (10 galones/acre). En la **Tabla 20** se muestran los polinucleótidos analizados y las observaciones del fenotipo resultante.

Tabla 20

Gen	Nombre	Tamaño (nt)	Secuencia	SEQ NO:	ID	Fenotipo
Factor de iniciación de la traducción (TIF)	sentido	160	UUCGAGUAAUUGGGAAAUUGGAUUAUUGAUAGAGAGAGA GGAAGAAGGUUUAUUGAUUCAUUGGAUUGAGGUUAUUA GAAAAGGCCGAGAGAUUAGAAACGGCGAACUUACA AGCAGAUAAUAGAAAGGAUAGCACAAAUGUAAAUA ACCGUCUCCGAGUGUAAGU	73		El ARNbc aplicado por vía tópica provocó retraso en el crecimiento vegetal.
	antisentido	160	ACUACACUCGGAGACGGUUUUUUUACAUUUUGUC UAUCCUUUCUAUUAUCUGCUUGUAAGUUUCGCCGUU UCUAAUCUCUGGCCUUUUUUAUUACCUCAUCCAA UGAAUCAAAACCUUCUUCUCCUCUACAUUAUC CAUUUCCCAUUAUCUGAA	74		
ATPasa dependiente de ADN (ddATPasa)	sentido	168	GAUCACAAAUUUGCCGGUUUAUUGAUCAAAAUCGGGA ACAUAGACAGAUACACUUGAACACCAUGAUUCGCA UUGGGGUGUGUUACUCGUCGUUCUGGAGUAUU CCUCAGUUGAUGCAGGUAAGUAUGACUGCAUA AAUGUGGGCUAUCCUGGGUCCUUUUU	113		El ARNbc aplicado por vía tópica provocó retraso en el crecimiento vegetal.
	antisentido	168	AAAAAGGACCCAGGAUAGCCCCACAUUUUUUGCA GUCAUACUUCACCCUGCAUCAACUGAGGAAUACUC CAGAACGACGAGUAACCAACCCCAUUGCGAAUCA UGGUGUACAAGUUAUCUGCUUAUUGUCCGUUU UGAUCAUAAAACCCGGCAAAUUUGUGAUC	114		
Hidroxi-3-Metilbut-2-enil difosfato sintasa (HMEDS)	sentido	200	CUGAAGCUGGGUAGGUAAGGUAAGGACGAAUUGAAA UCUGCGAUUUGGAAUUGGGACCCUUCUUCAGGAUGG CUUGGGAGUAACGAUCAGGGUGUCUUAACAGAAC CACCAGAAAGAGAGAUAGACCCUUGCAGAAGGUUG GCAAAUCUUGGAAACAAAAGCAGCUGAAAUUCAGCAA GGAGUGGCCACCAUUUGAAG	173		Sin fenotipo significativo
	antisentido	200	CUUCAAUUGGUGCCACUCCUUGCUAAUUUCAGCU GCUUUUGUJCCAAGAUUUGCCCAACCUUCUGCAAGG GUCUAUCUCCUUCUGGGUUGUUGUAGAGACA CCUUGAUCGUUUCUCCCAAGCCAUCCUUGAAGAGG GUCCCAAUCCAAUCCGAGAUUUAUUCUGUCCAU UUCACCCUUCACCCAGCUUCAG	174		

(continuación)

Gen	Nombre	Tamaño (nt)	Secuencia	SEQ NO:	ID	Fenotipo
TF (FIE) independiente de fertilización	sentido	183	UCCCAUCAAAGUUCUCCUACAAAUAUUGCAGUUU CCUACUUCUUCUUCGCGCCAUUCAUACAACUAGU UGAUUGUACAAGGCUUGGUAUUUUUUUUUUUU CUAAGAGUGUUUAGACAAUAGAGAUUGACUGUGGGAG CCAAUUUAGAAAGGAGCAAUCUCCUGGAGAGGGUUC AGUUGACA	175		Sin fenotipo significativo
	antisentido	183	UGUCAACUGAAACCCUCCAGGAGAUUGCUCCUUC AUAUUUGGCUCUCCACAGUACAUAUCUUAUUGACA CUCUUAGAAGAACAUAUCCACCAAGCCACCUUGUA CAAUCAACUAGUUUUUUAUAAUUGGCGGCAAGGAA GAUAGGAAACUGCACAUUUUUUUAUAGGGAACUUUG AUGGGA	176		
subunidad 26S de RPT5B de proteasoma de ATPasa (RPTB)	sentido	143	UUUGCUUAAAACAUCGACCAGACAGACAAUUAUUC UUCUUGUUGGACUAGUUGAUCCUGAUACGCUG AAACCGUGAUUUAGUUUGGUGUCAACAAAGAUAG UUUAUUUUAUCCUGGACACUCUGCCGUCGGAAUUG AU	177		Sin fenotipo significativo
	antisentido	143	AUCAUUUCCGACGGCAGAGUGUCCAGGAUAAGAU AACUAUCUUUGUUGACACCAACUAAAUCACCCAGGU UCAGCGUAUCAGGAUCAACUAGUCCAACACAGGA AGAAUUUUUGUCUGUCUGGUCGAUUAUUUAAGCAC AA	178		
ligasa 1 (LIG1)	sentido	159	CGCUGCAGUUGGUGAAGUAGAUCCCGCAAGGGG AUUUCACUCCGGUUUCCACGUCUGGUUCGUUCCG AGAGGAUAAUUCUCCAGAGGACGCCACAUCUUCUG AGCAGGUGGCGGAUUGUACAGAUUCUCAAGCAAAAC AAUCCACACCCGAAAAAGAG	179		Sin fenotipo significativo
	antisentido	159	CUCUUUUUGCGGUGGUAUUUUUUUUUUUGAUAUC UGUACAUUCCGCCACUCCUGCUCAGAUUGUUGGCG UCCUCUGGAGAUUUUUCUUCUGGAUACGAACCCAG ACGUGGAAACCGGAGUAAAUCUCCUUGCCCGGGAU CUACUUCAACCAACUGCAGCG	180		

(continuación)

Gen	Nombre	Tamaño (nt)	Secuencia	SEQ NO:	ID	Fenotipo
ARNt sintetasa (tS)	sentido	159	UAAAGAUGGCGGAAAAUUCGACUAUGAUAAAUUUGAU UGACAAAUUUCGGCUUCAGCGACUUGAUUUUUCGC UCAUUACAGAAUUUGAGCGCAUCACUCGUCGUCU GCUCAGUAUUUCUUCGCGCCGCAACGUAUUUCUUCGC UCACCGUAUUUGAAUGA	181		Sin fenotipo significativo
	antisentido	159	UCAUUCAAAUCACGGUGAGCGGAAGAAAAACGUUGCG GCGAAGAAUAUCAUGAGCAGGACGAGCAGUGAUUGC GCUCAAUUCUCUGAAUUGAGCGAUAAAUCAAAGUCGC UGACAGCCGAAUUUGUCAAUCAUUUUUCAUAGUC GAUUUUUCCGCCAUCUUUA	182		
Proteasa 14 específica de ubiquitina (UBP)	sentido	150	UGAAGCUGAUGCUGAAGGAAAGGAUUAUUGAUGCUA GUGAAGUAGUUCGCCAAGGGUGCCAUUAGAAGCU UGCCUAGCUAGCUACUCAGCUCCGGAGGAGGUGAU GGACUUCUACAGCACUGCAUUGAAGGCCAAAGGCAA CUGCUACAAA	183		Sin fenotipo significativo
	antisentido	150	UUUGUAGCAGUUGCCUUUGCCUUCAAUUGCAGUGCU GUAGAAGUCCAUACCUCCUCCGGAGCUGAGUAGC UAGCUAGGCAAGCUUCAUUGGCACCCUUGGGCGA ACUACUUCACUAGCAUCAAAUCCUUUCCUUUCAGCA UCAGCUUCA	184		
Serina hidroximetil transferasa 2 (SHMT)	sentido	155	ACACCUGCCUAAACAUUCGCGGGUUUUCUCGAAGA AGAUUUUGUAAAAGUGGCGGAGUUAUUUGAUGCUG CUGUUAAAGCUGGCUUAAAUAUCAAGGCUGACACA AAAGGAACAAGUUGAAGGACUUCGUUGCCACCUU GCAGUCUGGUGUUUU	185		Sin fenotipo significativo.
	antisentido	155	AAAACACCAGACUGCAAGGUGGCAACGAAAGUCCUU CAACUUUGUCCUUUGUGUCAGCCUUGAUUUUUUA GAGCCAGCUUAAACAGCAGCAUCAAAUAUCUCGGCC ACUUUAACAAAUCUUCUUCGAGAAAACCCCGGAGU GUUAGGGCAGGUGU	186		

Ejemplo 30

5 **201)** Este ejemplo ilustra polinucleótidos diseñados para dirigirse a una región de homología secuencial baja específica y son útiles, por ejemplo, para seleccionar un alelo específico de un gen diana o un gen de una especie específica. Los polinucleótidos diseñados para dirigirse a secuencias no codificantes son útiles para regular ARN no codificantes que participan en regulaciones génicas, por ejemplo, regular ARN no codificantes que se procesan en ARNip en una vía regulada por iARN. La **Figura 34** muestra una alineación del promotor de locus 1 de PDS de *Nicotiana benthamiana* (**SEQ ID NO:319**) y del promotor de locus 2 de PDS (**SEQ ID NO:320**); en el caso del locus 1 que contiene múltiples sitios de inicio de la transcripción, la secuencia promotora usada en esta alineación es la que tiene el sitio de inicio de la transcripción más en posición 5'. Se descubrió que los genes PDS1 y PDS2 de *Nicotiana benthamiana* tienen baja homología secuencial en la región promotora pero alta homología secuencial en la región codificante.

10

202) En la **Tabla 21** se muestran polinucleótidos diseñados para dirigirse a partes diferentes de los promotores de PDS1 y PDS2.

Tabla 21

Mezcla	Polinucleótido	promotor diana	Secuencia	SEQ ID NO.	posición/dir
2	HL419	Motivo del promotor 1 de PDS diana	TCCCATCTCCCACATGGGTACTG	189	590-567
2	HL420	Motivo del promotor 1 de PDS diana	CAGTAACCCCATGTGGAGATGGGA	190	567-590
2	HL421	Motivo del promotor 1 de PDS diana	GGCTGATGAAATTC AAGTGCTA	191	557-536
2	HL422	Motivo del promotor 1 de PDS diana	AAACTGAGCTTGGAAATAATC	192	517-497
2	HL423	Motivo del promotor 1 de PDS diana	GAACCCAAAAATGTCACITTTT	193	448-427
3	HL424	Motivo del promotor 1 de PDS diana	ATGCACCTTGTTTATACTCTTGCA	194	403-438
3	HL425	Motivo del promotor 1 de PDS diana	ATTTATTAGTGTCTTAAAGAA	195	357-337
3	HL426	Motivo del promotor 1 de PDS diana	TGTAGTAGCTTATAAGATTAGCTT	196	287-264
3	HL427	Motivo del promotor 1 de PDS diana	GTTGTCCCTTTTATGGGTCITTT	197	240-183
3	HL428	Motivo del promotor 1 de PDS diana	CCCGTGCAATTTCTGGGAAGC	198	86-66
5	HL429	Motivo del promotor 2 de PDS diana	ATTAGTTTTTATACACGAAAGAT	199	1313-1336
5	HL430	Motivo del promotor 2 de PDS diana	ATCTTTCGTGTATAAAAAAACTAAT	200	1336-1313
5	HL431	Motivo del promotor 2 de PDS diana	TGGTGGTTTTGGCCACTTCCGT	201	1291-1270
5	HL432	Motivo del promotor 2 de PDS diana	TTTTGTTGCTATTAGCTGGA	202	1256-1236
5	HL433	Motivo del promotor 2 de PDS diana	CAATTTGCAGCAACTCGCACTGGA	203	1205-1182
6	HL434	Motivo del promotor 2 de PDS diana	TCCCACCATGGCTATTCCGAC	204	1156-1135
6	HL435	Motivo del promotor 2 de PDS diana	CTGTCTCTCTTTTTAATTTCT	205	1105-1085
6	HL436	Motivo del promotor 2 de PDS diana	CCACTTTGCACACATCTCCCACIT	206	1056-1033
6	HL437	Motivo del promotor 2 de PDS diana	GAGGATCCACGTATAGTAGTAG	207	1016-995
6	HL438	Motivo del promotor 2 de PDS diana	TTTAAATAAAGAAATTTATTTA	208	889-869
1	HL439	Promotor 1 de PDS	TAAACGACTCACTATAGGGCTTGAGTTTATAACGGAAGCT	209	

(continuación)

Mezcla	Polinucleótido	promotor diana	Secuencia	SEQ ID NO.	posición/dir
1	HL440	Promotor 1 de PDS	TAATACGACTCACTATAGGGCTTCTAATTTTCAAGGACG	210	
1	HL441	Promotor 1 de PDS	AGCTTCTAATTTTCAAGGACGATA	211	Antisentido
1	HL442	Promotor 1 de PDS	GTCATGTGACTCCACTTTGATTTTG	212	Antisentido
1	HL443	Promotor 1 de PDS	CTCAATTCCGATAAAATTTAAGAAAT	213	Antisentido
1	HL444	Promotor 1 de PDS	CGAAGCTATTGGACCGACCTAATTTTC	214	Sentido
1	HL445	Promotor 1 de PDS	GGAATTGAGGGCTTCCCAGAAATTGC	215	Sentido
1	HL446	Promotor 1 de PDS	ATGACTTTTTGATTGGTGAAACTAA	216	Sentido
4	HL447	Promotor 2 de PDS	TAATACGACTCACTATAGGTGGAACCTCCAACACACAAAAAATTTTC	217	Sentido
4	HL448	Promotor 2 de PDS	TAATACGACTCACTATAGGTTGAAAAATAATCATAATTTTA	218	Antisentido
4	HL449	Promotor 2 de PDS	GCATAATATATTGATCCGGTAT	219	Antisentido
4	HL450	Promotor 2 de PDS	CTGAAAAGTTCATACATAGGTACTC	220	Antisentido
4	HL451	Promotor 2 de PDS	GGTACTCCAATTTTTCAGTATAT	221	Antisentido
4	HL452	Promotor 2 de PDS	CTGAAAATTTGGAGTACCTATGTAT	222	Sentido
4	HL453	Promotor 2 de PDS	ATGTATGAACTTTCAGAAATATTATACC	223	Sentido
4	HL454	Promotor 2 de PDS	TACCGGATCAATATATTATGCT	224	Sentido

- 203) Se analizaron seis combinaciones diferentes de polinucleótidos (1 nanomol/planta de cada polinucleótido aplicado) tal como se indica en la **Tabla 21** y se ilustra en la **Figura 35**, en plantas de *Nicotiana benthamiana* de 4 semanas usando un procedimiento similar al descrito en el **Ejemplo 12**. Las soluciones polinucleotídicas se prepararon en Silwet L-77 al 0,01 % (v/v) y sulfato de amonio al 2 % (p/v) en fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8. Durante algunos segundos, dos hojas completamente expandidas por planta, se sumergieron en solución de Silwet L-77 al 0,1 % recién preparada con H₂O bidestilada y se dejaron secar. Aproximadamente 30 minutos después, se aplicaron 20 microlitros de solución polinucleotídica a cada una de las dos hojas pretratadas. Las plantas de control positivo se trataron de forma similar con un oligonucleótido de ADN dirigido a un segmento conservado de la región codificante de PDS1 y PDS2; las plantas de control negativo se trataron de forma similar con un oligonucleótido de ADN diseñado para silenciar la proteína verde fluorescente (GFP). Las seis combinaciones de polinucleótidos diseñados para dirigirse a las regiones promotoras de PDS1 o PDS2, indujeron el silenciamiento sistémico en las plantas tratadas tal como se puso de manifiesto por la decoloración. El tratamiento con polinucleótidos de ARNbc o ADNbc de aproximadamente 200 pb y dirigidos a las regiones promotoras de PDS1 o PDS2, también indujo el silenciamiento sistémico en las plantas tratadas tal como se puso de manifiesto por la decoloración.
- 204) Se identificaron las siguientes secuencias genómicas adicionales (incluidos el promotor y la secuencia del intrón y exón transcrita) indicadas en la **Tabla 22** para los genes de *Amaranthus palmeri* para su uso en el diseño de polinucleótidos para aplicación tópica:

Tabla 22

Nombre del gen	Secuencia	SEQ ID NO.
ACC1	TTCAAAATGAATTTAAAATTATATAAAAATCAATATGGACACAAGACGGGAT ATCAATCCGACCCGAAATAGTTGACTTGAATCAACCTGATGACCCGAATGA ACACCTCTAGTTATCACTAAACAAGGGTCAGATTGCGTACATCAAACCCCTCA AATCTGCTTAGGTGGGAGCTTGTCAATGGCTTAGGGGTAACGGGAATGTGT GTGCTATGTACATTGTGCATCTATTCTTATGCTTATTTATGTTGAGTTAGTTTT TTTTTTGGATCAAATATAAAGAGCTTAACTTTTGTATTTCTTGATGTGGTGT AGTGGTGATGAAGATCAGGCTGAGAGAACTAAAATTGGCCAAAATTCTGAG AGAACAAGAAGTGAGTTCAGCCCTTCGTGCTGCTGGTGTGGTGTGATTAGT TGCATCATAACAGAGAGATGAAGGGCGAACTCCGATGAGGCATTCACTTATT GGTCAGCAGAAAAACAATATTATAGTGAGGAGCCTTACTACGTCATTTGGA ACCCCTCTATCTATGTATCTCGAGCTGGTACTAGTCTCTGAACCGATTGCCT TTCTTCTGCTTTGTTATTTTGTGTGATATTTTCGACTTAAGTCTAATTTACATCG TTTTGTACATTTGTTATC	225
ACC3	TTTTGCTTTTTACTATTATTTCCTCTTTTCAAGGATTTGAGTTGTTTATTGCT GACTGCTTCCATGTATTACCCATATGTCTCTGTATAGGCATTACGGGAGCTG TACCTACATCTAACTCCTATACAACGTGTGAATATTGCCCGGCATCCTAATCG CCCCACTTTTCTTGACCACGTAATCAGCATCACAGAAAAAGGTTTCTGATTTAT TATAATTTTGTTCATTGTATTCACTCTTCAATAAAGTACATCCATTATCAAT CTTTACGGAGGTTGTTACACAACCTCTTGTTCATTTTGCATAATTAGTTTGT GGAATACATGGAGATCGTGTGTTATGATGACCCTGCTATAGTTACTGGC CTTGGTACGATAGATGGTAGGCGTTATATGTTTCAATTTGGTTCATCAAAGGGAA GAAATACGAAGGAAAAATTGCACGGAATTTCCGGGATGCTACTCTCATGG GTAATGCTTTACTATAATGTTTTACTTTAATTTAATTACCTATGTTATTTAGG ATGAAAATGAATCTTTCTTATTACTATTACTTAGGTTCCATATGCACAAAA ACCGTAATTAATGTACCCTAATGGAATTAACACATGGTAATTAAGCTCT CCGCTTTGTGTAATTAATCCAATTTTATAGAGAGTCAAATAGTTCAGGTTAAA CTAGAGCTTTTCATACCCAAATAATAAAACCAAGGGTAAATTTCCAAAA	226
ACC4	ATGTGATCAATTAAGAAAAAGTCTAATTATATGAGCCCGTCTCACAGTGAC GGAGCTATCATAGAGCCCATGGGGTCACGTGCCCTTCGGGGTTTTTAGAAAA AATCAAAGTATACTTTTCTATTAATAAGAGTAAAAATGTAATAATTAAT AAACTCTTTTGATAATAAATACTCTCTCACTTTAGTAATTTTGTCTTATTTATT TATTTTATCTCATGTGTTAATAAGGTCAGTTGACTTATTTTGTTCATTTCT TTTATGGTATGCCGATTTAAAAATTTAGCAAGTAAAGATAAAAAATAGTTGTT AATCTTACAAAATAAACTCTATCGAAATTTTCATCCATTAGTTAATGTCACCAA AAAGTCCGAACACTACAAATCGACCACTGTCTATCATATGGTGTGAGATAGTCTCAT ATAAAACGAGTTCAGTTATTAAAGGAAAAATAGGAAACACGAAACAGTTAAT TTAGGGGGGGCTATGTATTATCCAAATGTGATACTCCAGTCCACATTAATCTC AGTCTTCCAAATGAACAGTTGGCTTAATCTACCAAGCGGTGGCCATAAAT GCCTCTAACACTTTTCAATCTCTCAGATAACTCTCACACCACTTATCATCACA ATCACAATTAATCTAATTTCTTTTATTCCTTTCCATGTCGTAATTTTCTACT GATTCAGGTTTTATTCTCAGCTTTTATCAATTTTATTTTCATGCTTTTTATGTC ATTTCTGTTTCGCATTTTGTCTTCCACTTGCTGCTGTTTTTATTAATCAATTT GTATGATTGTTGGAATAATGTATGTATTTTTTCATGATTTTCTCTTATGGAG GTTTCATAATGTATTGCTAGATTTGTTACTTTTAC	227

ES 2 809 679 T3

<p>ACC5</p>	<p>AATTTGAGCGGGAAAATTTAATATCATTAAATAGTCITTTGCTTTAGTATATA GAATAGTTAAAAATTAATAGTCAAACCTTATTGTAATAGCATGCACTAATCTAT AATAATCTTATCCTGAAAAGCTATAATAAAATTATAAAAAATATATGTGAAA AACTAATTTGAGCGGGAAAATTTTAACCAAGGGCTAACACGTATCATTAAAT AGTCTTFACTTTAGTATATAGAATGATAATTAACGATCATAAAACAAAATTG TCACITTCAGTAGCAAACTTACAAAATGAGCAGAGTACCTCATATCATAAAA TTGCTTCTTCTCATTGTTGTGTTGCTCTCATTITTAGGAGTTCATCGITTTATA TCGTCGCTTACCACTCAATCACTITTTAGATTTATTAGTAGCACTTCCTCAAT CTACAGCAGCAATTTCTACAGTTCAACAACCTC</p>	<p>228</p>
<p>ACC6</p>	<p>GGAAAATTTACCTAGAATAATCCAATTTATTTCGTGATITTTCTACAAATCCA ACTTCAAGGGGTATTTGCCTAAAGTAATTAACCTGGATACCCCGATGACCT GCTATAGTAGATAATTTACCAGAAAATTA AAAATGAAAATTAATTTAAAAAT AGAGAAAAATTTTGAAAATTTTCATATAAAAAATTTTAAATAATAAAAAATA TAAATITTTTTGAAACATTTTATTTAATCTATCTITTTTGAAAAAATAAAACTT AGTTATAGCAAGTGATCTGGTCACCGGGTTACTCTAGGAAAATATCCCTCA AAGITGAGATTATTCATGGTTAATAAATAGGTGAGATTATTATAGAAAAAT ACGAATAAATGGATTATTGTTGGTAATITTTTTTTTCAAAAATATCCCTAGGA AGGACCTTATTAGTGATCTCCCTCTACTTTGGAGGAGTATATTGTGGACTTC CCATCTTCCTTAATTTGATTGTAACITTTAACTATTGATTCTTTAAAAAAAAG AACTATAAAAATTTGAGGGTTAATAAATCTAAGATTTTATCTAATTTCACTT TGATTATTCCGATTTTGTATTACATTATTTTAAATGACATTTCGTCAAAATAAA AAAAAATAGTTTCATTGCATTCCAATTTTGTGACTAGGGGGATTAAAGAAA</p>	<p>229</p>

	<p>GAATAGTATCAATAATCGTAATGTAGCAAGTAGTACAAAAAGAGTATATTTCC AATATGTCAAACCTTTGATCTCGTTGTAACCTGTAATTTGTACGATGCGGTGTG AATGACATACTTCACCTTTTTCATTATTTTATACTGGTAGTGACATGGGATTA TTATTGCGATATTTGCAGTAATGAAAAATTTTTTGGTTGTTGCTTTTACAAAC AAAAATTCACCGAATTTTTTATTAATTTAATTCAACACGTTGGTGTACCCA TGATTTATAGGTCTGGGTCCGCCACTGCTAGCTAACATTAACAATTTAACA AACTCAATACACCAACCTAAAAATAAAAATTTTTTGGCCATAATTTTTAGAA TTTTAGTTTTTAAACATTATATTTGGGAATTTTTTTCCTTTTATATATATAAA ATAAAAAAAATCCAAAAAGGGGACACACATTAATACACACTTGAAAGCA TCGATGATATCGAAGAAAAACCAGATGGGGTGCCCAATTATCTTCGTCTCCT TCGATATTATCGAATTCATTAACAACATTATATCAAAAAACCAACCAAAATAC CAACTTCGAAACCAATATTCGCCGTATTTTCTCTATTCAACAATCCCTACA ATGGCGGCATTGGCCAGCTTCTTCTCCTGCAATTCGGAATCACCCACTG CAATTTTCTCCTATTCAAAAAATCACTACCCTCGCTTTCTAAGGTTTCATT CGGTTTTACTCCCAAGCCTAAAATTTGGCCTTTTCTCCAAGGTTTATTTTCTATC TCTTTTTAATTGGTTAATCAATTGGATTGTTGAATTTTTCAGGGTTTAAACGG TATAATTTTGGGGTTTTTTCGAGTACATTCTGGGTTTGTAGTATTGGATTT GGCATTGCTTTAATTTTTGAGATTGGGTTTTTGGGTTTTATTTGGTTCTTGT GATTCAGGTTTATTGATTGCTGCATTAACCTGTATTTATGGAATGATGTCAA TTAACTGTTACATTACATTGCTTTATGGTTTTCATCATGCTGATTAGTGATTA CTGTGTTGAAATCTTGGCTTCTATGTACTATTTAATCTGATACAACAAGT ACAACCTAGAAAAACAGGTTAAAGGGAAATCTATAAGCTTAGTAAATTAACA CTTGAAAGAAGCTAATGACGGAGAGAGGGGCTTTTTTGGAGAAGGCAGTTTT CATATTATGCTCAGTTCTCTAGTGCAGCTTTACTTCACCTAGACACTCTAA GTAGAGGTCATAGGTGTTTCAAGATAGATCCAAAGACCCGATATTTACCCGAC TTTGTAAACAACCTAACCCGACTTCAAAATGAATTTACAATCATATAAAAGC AATATGGACTTAAACCGATTTTGAACCGACTTGACCCGGTTGATCCGAATGA ATGCCCTACTCTTAAGCATGTCAACTGTAATATGAAATAGAATTATAAT AAACTAAGTTCATGTTTTCTTCAACTACAAATGAAATTTTATGACCCAAATA ATGTGTGAATACCCCGCAATAGGTTGAATGGCATTAGTTCAGTTGATTTT AGCAGACCACATCTGCCCTCATATCCATTGTTTCAAGTTTATGTTAGTAGCT GTACATAATAGACTAATTAAGTTGTCATTTTATGATCCATGTTATGGTTGTCGG GATAAACCGATTGGAATTTGATAATAAAAAGTTTGGGTTAGTTTATTTTGTCTCT AGGAGGGGTTATGTCATATGTGACTCTGTTGGCAACCCGACAATGCAAAAC ATTTTCATACTTGGTACGTTGTTGCGTGTTTTTGTGCCCTTCGATTTTGTAACT GTTGATGAATGTGTAATAATAACTACATGATCATATGCTAGTAGGCTTCTT CACCTAGTAAAGAAATTTTTCTAACACGAGAAGTTCAAAACATATTTCCATT ACCATTATCCAAACATCAGTACCCGAGTCCAAGTAACATAGGGTGTCCCTTA TGATAGTATAAGAATTTGGTGCATGAAAAACCGGTGATTGTAGCGAGGATAG TAGCCGGGAGAGGTACAGGATTTGAAAAATTTGAAATTTGCTAAAACGATCA GGATCTTGTTTTTCTTACTTTGATGTTGCTTTTTTGAATTTGATCCAAATTTG TAAATTATTGAGACTAATTCCTGTTGATCCTGTCGTGAACCTTTGTAGAATCTT TCAGGCCGATTTCTACAGTGAAGGCTCAATTAACAAGGTGAGTCTTTTTT TGCTTAACTCTTATGCAAGTTCATTATCTCTTCTACTGATGAGAAAAACATA TTTGGCCTAATTTCAATTTCTTCTAGGTTGCTTTGGATGGTTCAAAATCATGC TCCATCACCTTCGCACGAAAAATCTGGGCTACCAGCCCAAGAAAAGAAAGAA CGATGAGCCGCTAGTGAATCTTCTCCTGCAGCATCAGTGTCTGAAGAACGA GTCTCCGAATTTCTGAGCCAAAGTTGCCGGTCTTGTCAAGTATGTAACATCTT TATTTTCTATTCTTCCACACACTCGCAATTTGGATAACGAGATGTCTTTAGAGA CGTCTGGGGAACAAGGGAGAAATGAGTCTAGAGGTTGCTAGAGAGAACGAG ATAAATACTAATATATATGAATATTTTCAATCCACATTAAAAAAATACAAAT TGAATTTGCATTATGGTGAACCTACCAAGAATCGAATTTTTTAAATCTCCA TGTTTTGTGGTCTAGACTTTGGGATTTCTAGAGACATTGTAGAGTTGCAATTA AACAACTGGACTGTGAGATATTGATCCGCAAGCAGGAAGCTATTCTCAACC ACAAATTCCTAATCTACACATGTCGTTGCAATGCAACCACCACCCTGCT GTAGCGTCTGCCAGCTCCCGTCTTCCAGCCACTCTCGTCTGCGTT ACCTGCCCCAGCGCTGCTGCCACGTCAGCTAAGCCATCACTTCCACCCTCTC AAGAGCCCTATGTAGGCACATTTACCGTAGTCCAGCTCTGGCGAGCCGC CTTTCGTGAAGGTAAGTGTATACCCCTTTTTTAGTGTGATTTCTGTGTTATA TCAATTTTTGCATTTTGTGAAGCTGAAAATAAATCTTTCATTTCCATAGGTT GGAGATAAAGTTAAGAAAAGGACAAGTCATATGCATTATCGAGGCTATGAAG TTGATGAATGAAATCGAGGTACGTATGTTATTGCTTTAACTTCATGCCTTAG GCCGTGAAGTT</p>	
<p>ALS1</p>	<p>ACAAAAAGCACAAATCAATAATATACTCTTAAAGTTGTTTATCTTCTAATT AGTTCGGTTAAAAACGGTTCCCACTTTCTTCTCCGACTCTCACAATTATCTTC CCATTTCAATTTTCCACCCTCTCTAATGGCGGCTGTTTCTTCAATATCA ATGGTGGAAAGATTTGAACTTTATGTTCAAGACACGAATTCGTTTGGGGTT TGTAAGAAAAATTTCAATTTAGAACTCATACTCTATATTTGAAAAACATATGC CAAAAACTTCAAGGTTTAAAGCAATGGAAGTTTCTGCAAAATGCAACAGTAA ATATAGTTCCCTGTTTCAAGCTCATTCTAGGTAATTTTATTTCTGAAAAATTTCC GATTTACAATTAATAATCTTGTTTTTGTAGGTAATGAATTCAGAAAGAAAT AGATGGATTCTTATTTGTTTATTGGTATTGTTTATAAATTTTTGTTTATATTA GTTTCTGAATTTGATGATTCTGATTGTATGTCAGGTTTATAGGTTGTTATTA TAAATGTAATTTGATTGATTGAAAGTTGCAATAAGGTTGATGGCGTATGCTG ATTGTTGTAATTTT</p>	<p>230</p>

<p>ALS2</p>	<p>CAACATGAGAATTTAGAATCCATATCAATCTTGATATTCAAGGGTATTTAA GTAATTAAGAACAACCATTTGTTAAGCGCCTCCACTATCTTCTTCTCAT TCFCCATTCTCGCTTAGCTTTCCTCTCGCACTAATTACCTCCATTTGCAACCTT TCAAGCTTTCAACAATGGCGTCCACTTCTTCAAACCCACCATTTTCTCTTTT ACTAAACCTAACAAAAATCCCTAATCTGCAATCATCCATTTACGCTATCCCTT GTCCAATTTCTTAAACCCACTTCTTCTTCAATCTCCGCCGCCCTTCA AATCTCATCATCTTCTTCAATCACCTAAACCTTCTTCCGCTACTA TAACTCAATCACCTTCTCTCACCGATGATAAACCTTCTTTTGTTCCTC GATTTAGCCCTGAAGAACCAGAAAAGTTGCGATGTTCTCGTTGAAGCTCT TGAACGTGAAGGTGTTACCGATGTTTGTGCTTACCCTGGTGGAGCATCCATG GAAATCCATCAAGCTCTTACTCGTTCTAATATCATTAGAAATGTTCTTCTCG ACATGAAACAAGGTGGGGTTTTCGCTGCTGAAGGCTACGCTCGTCTACTGGA CGCGTTGGAGTTTGATTGCCACTTGGTCC</p>	<p>231</p>
<p>EPSPS1</p>	<p>ATTTGGATAACTTTTCTTTGATTGCAATCGGATTTATTTTAAATACAGTATT ATGAACTGATTTAATGAAAGTGGAGGAAGTTTCAATTTTAAAGTTGTAGGT GTAATGTTTTCTCATTTTGGATATGAAAGTGGAGGAAGTTTCAATTTGCAATC ATGTTTGCCAGTTGATTCAATGAATGCTTGGAAATGACCAAGAGTTCAAG GCTTCTGTTATAAAACATTTCAATTTGATCTAAGAATGAACTATTTAGAAC TTAAAGTAAATAAATTTAGTTATAACTTATAAAAAAATTTCAATTTAACT TAAATTTATAAATTTAGACTTAAAAAGATCAAGTATTGAACGCATATTTAG AAAAATTATAATTCGGCTTATCAGTCTCATATTGAGACGGTCTCGTCCAAGA CAAGTTGTATCATTTATAAATCAATATAAATGAGTGTATTGATGTTAGTTAG TTCAACTTAAAGCTTGGTGAAGATATGTTGATGATCTTTGTGAAAGTC AGCCTATAACTTGGTTCTAAAAATTTGAAGCATAACCATATAGTCCCTCGAA TTCATTCAAGTTGTCCAATTTACTTTTTATACTTGGCGAGACAACATTTAAA CCCTTAATTTCTAATTAATCTTAATTTAAAAATTTGAAAAATTTGATATTA TAATCTTTGATTGAAACGAATTTAACAAAGATCTCACATGACTATGTTTAAAC TTATAGATTAAAAAAATACAAATTAAGAGTGATAAGTGAATAGTGCCCC AAAACAAATGGGACAACCTTAGATGAATTTGGAGGTAATATTAGGTAGCAAGT GATCACTTTAACATCAAAATTTGATCACTTATAGGTTCAAATTTGAAACTTTTAC TTAATTTGATATGTTTAAATACTACTTTAAATTTGAAATTTGATATTTTAAAGT CAAAATTTGAAACCTTTAAGATTATAAATTTGAAATTTGGCAGAAAGAAAAACA AGAGAAAGAATATAAGACACGCAAAATTTGACCGATCTACTCTTATTTCAATT TGAGACGGTCTCGCCCAAGACTAGATGTTCCGGTCACTTACACCAACCCCAA AAAATTCACAACAAGTCTTATAATGATTTCCCTCTAATCTACTACAGTCTA CACCAACCCACTTTCTCTTTGCCCCCAAAAATTTGGTTTGGTAAGAATAAG CCCTCTCTTTCCCTTCTCTCTCTTAAAAAGCCTGAAAAATCCACCTAACCTT TTTTTAAAGCCAACAACAACGCCAAATTTAGAGAAAAGAAATAGGCTCAAG CTACTACCATCAACAATGGTGTCCAAACTGGTCAATTTGCACCATACTTTACC CAAATCCCAGTTACCCAAATCTTCAAAAATCTTAAATTTGGATCAAACTTG AGAATTTCTCAAAGTTGATGTTTAAACCAATAAAAAAGAGTTGGTGGGCA ATCATTCAATTTGTTCCAAAGATTCAAGCTTCTGTTGCTGCTGCAGCTGAGAAA CCTTCATCTGTCCAGAAATTTGTTTACAACCCATCAAAGAGATCTCTGGTA CTGTTCAATTTGCTGGTCAAAGTCTTATCCAATCGAATCCTTCTTTTAGCT GCTTTGCTGAGGATTTATTTCTCAACTGCGAAAACAATCTCTATTTGATAT TGGAATTTATATTACATACTCCATCTTGTGTAATTTGCATTAGTAGACTTAA TGTTTTGACCTTTGTTTCAATTTGTTTGTGTAATTTGGTAGTGTGAGAATTTGAAT GTAATTTATTTGTTTTCCATGTTGAATTTAATCTGATTTAAATCCACTTCTTATTT ATGTTAAGTTGCAATGATGTTTGCCTAAATGGTTATCATTGAAGGATAAGTTT GCCTACTTTGACCTCCCAACTTCGCGGTGGTAGAGCCATTTTATGTTATTG GGGAAATTAGAAAGATTTATTTGTTTTCGCTTTGAAATAGTAGCGTTCTGT GATTTGATTTGGGTGCTTTATAGATATGATATATGGGTTATTCATGTAATG TGTAGGTTTATGCATTATGTTGGATGCATGCTGGTGTATTGCTGTAATGG ATGAATGTTGTTATTTGGAGACATTTTTCATTCATTTTTCCTTTTAAATG GAACTGGAAGAGGAAAGTTATTGGGAGTAATTTAAAGGTTGTGAGTTTCA TACACTGCATCAAAGACGAAGAATTTGACATAGATGTTGAAGGCTAATCCTT ATCACTGCTTGAATCAATATGATCTGAAAAATTTACCCCTCTATATGCATC TGTTTTGCTAATAAAGTGTGTTTGGACTATCATGTTTTGTGATGCTTAAAGAG GGTGATATTACTGAGATAAATGGAATATCAAATAACATCTATTGTGAAGT</p>	<p>232</p>

<p>EPSPS2</p>	<p>CAAGCTCAATTATCGTTTTCAAATAAGTATTTCAAAGTCTATAAAGATATT GTATAAGTTTTAGTTCAAATTTAATAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TGAAAATCCAAATGAATAAGTTAATARTTAAATTATGACATATAAATTATGA CATATAATTTGACCATGATATTTACAATCTAACTTAATTTTGAACCTTATTAT TTCTAATATCAATTATCGTTCTAAAAATAAGTATTTAAATTGTATAGATATA TTGTATAACATTTAGTTCAAATTTAATTATTGATAGTTTTATTGACTATTTATT TGGKGTGGAAATTCATCCATAGAATGATAGAATAACACCATTTTTTATATA ACTTCGTTCTAAAAATTTGAAGCATAACCATATACTCCCTCCAATTCATCCAA GTTGTCCAATTTACTTTTTCATACTTGCCGAGGCAACATTTAAACCCTTAATA TTTTCTAATTAATGTTAATTTAAAAATTTATGAAAAATTTGATATTAATAATCCTTG TATTGAAACAAATCTAACAAGATCCACATGACTATGTTTAACTTATAGAT TAAGAATAAAATACAAATTAAGAGTAATAAGTGAATAGTGTCCCAAAAACAA ATAGGACAACCTGGATGAATTGGAGGTAGTATTAGGTAGCAAGTGAACCTT TAAACATCAAAATTGATCAGTTACAGGTTCAAATTTGAAACTTTTACTTTAATTG ATATGTTTAAATACTACTTTAAATTGAAATTGATATCTTAAGGTCAAAAATTG AAAACTTTAAGATTATAATTGAAAAATGCCAGAGATGAAAAAACAGAGA GAAAGCATGTAAGACACGCAAAATTGAACCAGTCTACTCTTGTTCATTTGA GACGGTCTCGCCCAAGACCAGATGTTCAATCCTACACCAACCCCAAAAA ATTCAACAACAACTCTTATAATGATTCCCTCTAATCTACTAGAGTCTACACC AACCCACTTTCTCTTTGCCACCAAAAACTTTGGTTTGGTGAGAACTAAGCCCT CTTCTTTCCCTTCTCTCTTAAAAAGCCTAAAACCCCAACTTTTTCAGTCA AGAAAACAACGCGAAATTCAGAGGAAGAATAATGGCTCAAGCTACTACCATC ACAATGGTGTCCATACTGGTCAATTGCACCATACTTTACCCAAAACCCAGT TACCCAAATCTTCAAAAACTCTTAATTTTGGATCAAACCTTGAGAATTTCTCCA AAGTTCATGTCTTTAACCAATAAAAAGAGTTGGTGGGCAATCATCAATTGTTC CCAAGATTCAAGCTTCTGTGTGCTGCTGACGCTGAGAAAACCTTCTATCTGTCCA GAAATTGTGTTACAACCCATCAAGAGATCTCTGGTACTGTTCAATTGCCTG GGTCAAAAGTCTTTATCCAATCGAATCCTCTTTTATAGCTGCTTTGTCTGAGGGC ACAACAGTGGTGCACAACCTTGTGTATAGTATGATGATATTCTTTATATGTTGG ACGCTCTCAGAACTCTTGGTTTAAAAGTGGAGGATGATAGTACAGCCAAAAAG GGCAGTCGTAGAGGGTGTGGTGGTCTGTTTCTGTTGGTAAAGATGGAAAG GAAGAGATTCAACTTTTCTTGGTAATGCAGGAACAGCGATGCGCCCATTTGA CAGCTGCGGTGCGCTTGTGCTGGAGGAAATCAAGTTATGTGCTTGAAGAGT ACCAAGAATGAGGGAGCGCCCATTTGGGGATCTGGTAGCAGGTCTAAAGCA ACTTGGTTCAGATGTAGATTGTTTTCTTGGCACAAATGCCCCTCTGTTCCGGG TCAATGCTAAAAGGAGGCCTTCCAGGGGGCAAGGTCAAGCTCTCTGGATCGGT TAGTAGCCAATATTTAATGCACTTCTCATGGCTACTCCTTTGGGTCTTGGAG ACGTGGAGATTGAGATAGTTGATAAATTGATTCTGTACCGTATGTTGAAAT GACAATAAAGTTGATGGAACGCTTTGGAGTATCCGTAGAACATAGTATAGT TGGGACAGGTTCTACATTCGAGGTGGTCAGAAAATACAAATCTCCTGGAAAGG CATATGTTGAGGGTATGCTTCAAGTGCTAGCTACTTCTAGCCGGAGCCGC CGTCACTGGTGGGATGTCACTGTCAAGGGTGTGGAACAAGCAGTTTACAG GTATAATGTTAACCCCTTACCCTTACATTTGTTCTGCTAAAATCTAGAGGACCC TTTCAATCTGGGTGGGATAAGCACGGCAATTTGACCGCAAAAAAATTGCAA AATTATTCTGCTGATAGAACATCTCGAGATGAGATCATATTGAGTTTTGGCG TCAACATAAACCTAATCAATAATGAAAAATACAAACATCATATGGTTTTCTT TTGTCTTTATGACTAGACACTCTCTATTATTCTTGGATTGGGATCTTATTTGAA ATTGCTGTGTAGCCTACACCTCATGTTTCAAGATTTTGTTCGTATACCAGACTTT TCTTGATTGGGATCTTATTTGTCCCTGGATTTTGCATAGGGTGTATGAAAAAT TTGCCGAAGTCTTGAGAAGATGGGTGCAAGGTACCTGGACAGAGAATA GTGTAACCTGTTACTGGACCACCCAGGGATTCATCTGGAAAAGAAACATCTGCG TGCTATCGACGTCAACATGAACAAAAATGCCAGATGTTGCTATGACTCTTGCA GTTGTTGCCTTGTATGCAGATGGGCCACCCGATCAGAGATGTGGCTAGCT GGAGAGTGAAGGAAACCGAACGGATGATTGCCATTTGCACAGAAGTGAAGAA AGCTTTGGGGCAACAGTTGAGGAAGGATCTGATTACTGTGTGATCACTCCGCC TGAAAAGCTAAACCCACCCGCAATTGAACTTATGACGATCACCAGATGGCC ATGGCATTCTCTTGTGCTGCTGTGCAGATGTTCCCGTCACTATCCTTGATCC GGGATGCACCCGTAACAACTTCCCGACTACTTTGATGTTTTAGAAAAGTTCC GCCAAGCATTGA</p>	<p>233</p>
---------------	---	------------

<p>GS3</p>	<p>TCCTAATTTGATTTTTATTATTAATCTATAAGTTAAAACATAGTCAAGTGAGA TCCTGTTTGATTTCGTCTCTATGCAAGGATTTTCATATCAACTTTTCATAATTTT TGATTATACACAATTACAAATATTAACGAACGAATAAGTGCATTA AAAAAGA GTGCAAAAAGCAAATGGGACACTTGTGTGAATAGGAGGGAGTATACATTA AGATGAATCTAACGAGATCTCACATGGATATAAATTTGTCTTCTATATATGCT AAAAAATCTTGATCAAAATTTCTCTTTCCAAAAATAGAATATCTCAAATGGGAA GAACATTAAGAAAACGGAGGGAGTACTTATAAGTTAAGATAGTTGGGGGTAT TTAGGTA AAAAAATCTATGCCAAAAGTAGAAAAGTGGACAATTAGAGTGACT TTAATAAATAAGGAAAGTGGACATTTAAAATGAATCGGAGGGAGCATATTA ACTTTATTTCAAAAGTGTGAAAACATAATCATATTTAGGTA AAAAAATTATCA ATTTAACGTCAAAATTGATCACAAATAGGTTAAAAATGAAAATTTTATGTTA ATTTGATCTATTTGTTCACTTTAAATTTGAAAATTTGATATCCTTTAAGGTTAAAAAT AATACCTCAAAAATTAAGAATTATTAAGGCCAGAAAATAAAAAAAAAGAA AGACAGGCTATTAGTAAAATTTAAGTATGTAAGGTTGATACACGCGCGAA TTGAGCCGGCCACTTTTAGTTCAATTTGAAACAGTCTCAATCAAGACCAA TTATTTATTTTATTATTTTATTGTTTAAAGCTCAATGGGTTGGACTTGATA AATTATTTTGGAGGACGGGCTATTAGTAAAATAATAGTTGGAATCTTT TTTGATATACTATAAAAAAGAGGTATCTGGTGGAGCCTTAAATCTGCGCAATT GAAGTCTCAATACACATCTCGTCTTCTTATTCTCTTTCATCTATTTCCTCT TTGATCAAACTACGCCATGTCTCTTAAATGATCTCGTTAACCTTAATCTCT CTGAACTACCGATAAGATTATCGCTGAATACATATGGTAATACAACAATCC TTCTCTTTTTCATTT</p>	<p>234</p>
<p>GS5</p>	<p>AAAAAACCGTCTTATTTGTAGAAAAATAAAAACTAAAAAGTAGTATCAACTT TTAGACTAGTCATAAGTGAGTGGCATCAAACCTTGTCTATAAAAAGGGAAGA GTTCCTCAAACCTTGAGATTCATATTTTTTGTGATTTCTAAATAGAAGAACATAC TCATCTCCACTTCTCTTATTCATCAAAATTTTATTGTTCCCAAAAAAACAT GTCTCTTCTTACAGATCTCATCAATCTTAATCTTTCTGACTCCACTGAGAAGA TCATTGCTGAATACATATGGTCAGTTTTCATCCCTTTTTTTTACCTTAATCCC ACTTTTTGTTTTTACCACCATTTTTTTCATCTATTTTCTCTTAAAGATTTTAA CTTTTACTTTTTTGTGATATAACATTCATTTTTTCAATTGGGTAGGTAGAA AATTTCTATAAAATAAAATAAAATNNTNNNNNNNTACCTTAATCCCCTTTT TGTTTCTACCACCATTTTTTTCATCAATTTTCTTAAAGATTTTAACTTTTTT AACTTTTTCTTGGTTTTTGTGATATACCAATCATTTATTTTCACTAGTGTAGG TTA AAAAAATCTAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA TTAACCCATGAATTATTTCCCTTGTTTTTACTCAAACCTTTTTACCCTTGTTAAA AAAATAATGATATAAATAAATTTTTGAGGGTTTGTAAACCCATATGTAATC TATATCGAAAAAATTAGATAGCGGGTTTTGTTGTGGACAAAATAAATAACAA ATTTAGGAATAAACTTTGAGGGTTTATTGAAAAAATAACCCATATTTAATC TATATCGAAAAAATGATAGCGAGCTTTGTATAGAT</p>	<p>235</p>
<p>HPPD</p>	<p>CGTCGAAGTAGAAGACGCGGAAGCTGCTTTTAAACATCAGCGTTTCGCATGGG GCTATTCCTGTGTTTTCTCTATTCAATTTGGAAAACGGTGTCTGTTTTATCTGA GGTTCAATTTATATGGGGATGTTGTGCTTCGGTATGTAAGCTACGGAATGAA TGTGGGGATGTGTTTTTCTTCCCTGGGTTTGGAGAAATGCCGGAGGAATCAT CGTTTAGAGGACTTGATTTTGGCATTGAAAGTTGGATCATGCTGTAGGGAA TGTCCCTGAGTTGGCTCCTGCAATTGCTTATTTGAAGAAGTTTACTGGGTTTC ATGAGTTTGTGAGTTTACAGCTGAAGATGTTGGGACGAGTAAAAGTGGATT GAATTCAGCCGTATTGGCAAACAATGATGAAATGGTGTGTTTCCGATGAAT GAACCTGTGTATGGGACAAAAGGAAGAGCCAAATTCAAACTTATTTGGAG CATAATGAAGGGGCTGGTGTACAGCATTTGGCTTTGATGAGTGAAGACATAT TTTGGACTTTAAGGGAGATGAGGAAGAGAAAGTGTCTTGGTGGGTTTGGATT TATGCCGTCGCCGCTCCGACTTATTACCGGAATTTGAGGAACAGAGCTGCT GATGTATTGAGTGAGGAGCAGATGAAGGAGTGTGAAGAGTTGGGGATTTTG GTGGATAAAGATGATCAGGGCACTTGCTTCAAATCTTCAACCAACCTATTG GAGACAGGTAAATTTAATCTTGCTTTCAATTTGCTTTTGTGATGGATTGAC TAGCAAATTTGATCGCATTTTGTGCTTATATGACTTGATGATACTTCTCTG TTTGAAATACTCGCTACATTCGCTACATTTTGTGTTTGTGCACTATTCACTGTT CAAGCTTATTTACATATTTGCGACTAATGTGTAACATAAATAATAGTCAAGT GGGATCTTGTGTAATCGTCTAATGGCATACTTTTCATCATATTTAAATTTTTAT AATTTTTAGATTAGTGTAGTTAAGATATTAATGCTCAAAATTTGTGATTGGA TTGCGTAAAAAAGTGAATGTAGCAAGTATTATGAAA</p>	<p>236</p>

<p>PDS</p>	<p>AAAACCAAAGGAAATAAGTTATAGGTAGGAAAAATGTTATTGAAGTTAAT GTAGTAAACTAGTAACCTAAACTGTGATACCCCGGATTTAGCTTAAAAAGAG ATTGATAGACTACTCATATCAAC AAGGTGCATCTTCTTTTCTAGGGAGCCCAT TTGCTAAGAACTCTACAGTTAAGCGTGCTTGGTGGGGAGCAATCTTAGGATG GGTGACCTCCTGGGAAGTTTCTGGGTGCGCACGGGTGAGGCCAAAAGTGCG TAAAAAAGACTTGTGTTGGTCTGTGGGGCTGTCTACAGTCTCCATGAGTAGT CACCGCGGTACGAGAGGCCGGGGTGTACATAAACAGACTCAAAGGCGCT AAGCCAAGTAGCCAATAGCAACATGTGTGGCTGCGGACAGTCACAAAAAC ACACAATTTCTTATTTTACTCTCTTTATCTCTTTTAGGCTTTAGCCATCAAC AATAAAAAACATGATAAAAGCAATTCATTTACTGCTAAAATCCAACAATTTG GTCCCTTTTCTGTTCTTTCAGTTTCACATACCCTCTTATCAATCTATATCCA AAACTATTTCAATTTTCCAAACTCTTTTAAACCCAAAAATCAAAAACTTTTGAT GAAGAACAACTTTGGGGGTTTGGAAAAATGAGTCATTTGGATATGTTGT GCTACTCAATCCACATCAAGATATGTTCTTTTAGGAAAATCAAAATAACCCCA CTTCAATTTTCTATTTGGAAGTGATTTTGGGGTCAATCTGTGAGAAAATTC AGT</p>	<p>237</p>
<p>PPOX</p>	<p>TGGTACCTACCCTGTTTACATTTTCAATTTCCCTTTTCTCTACTACTCCT ACTTTATTGATTCTTATCCATGTGTGTTCTATGGGAATTGACATTAATTTGTC AGGTGTGTATGCTGGTGATCCTTCTAAGTTGAGTATGAAAAGCTGCATTTGGA AAGGTCTGGACCTTAGAGCAAAAAGGGTGGTAGTATCATTGCCGGTACTCA AAACTATTCAGGAAAAGGAAGAATAAATCTCCACCGCTCGAGACCCGTCCGT AATCACCATTACTCATTTGCTTTCCCTTACCTTGTATCTTACCTTAATATACATG TATTTAAATTGATAATGTACATTGCCCTCATTGTCAGCCGCCTTCTAAACCTA AGGGCCAGACTGTTGGATCCTTTAGGAAAGGGCTCATTATGTTACCTACCGC CATTGCTGCTAGGTATCTTTGACTCTCAAATCTTAAATATTTCTCATCTTCTC CTTCTGCTAATACTAGTATGTTTACCATCTTTTATTTTTTAGGCTTGGCAGT AAAGTCAAACATATCGTGGACACTTCTAAATATTGATAAGTCGCTCAATGGTG AATACAATCTCACTTATCAAAACACCCGATGGACCGTTTTCTGTTAGGACCAA AGCGGTTGTCATGACTGTCCCTTCATACATTGCAAGTAGCCTGCTTCGTCCGC TCTCAGTGAGTATCATTTCTTCTTCTTCTTTCTGTTTATTTGTTGTTCAATG TCTTGTTAAACACCAGTTTGGCCTTGTGCTCGTGAATTTATGGCTACAATGTTA ACTGATTCAGGCACTGTGGGAGATGCCTAAGTTTCTAAAACTCTGCGCATA ATGTTTGTGTTGGATGTTAGGAATTGCATTGAAAAATTGCTTTTGTGATGTTGA TGTTAATAACCAATTACAAGTGTGTTCTTCAACTTCTGCAATACCTTGTTCGAG TGAGCTTGAGGGGTTTAGATTAGTGTCCAATGTGAAACTAGCAAATGGTA CCAAGCGCTGGGATAGGTCCCTTGGGATGGAGCCCTGATACCCAAGACAGT ATTCAAACCTCTAAGTAGAGTGAAGATCAAGGAAAGAACTGGGTGGTT CCTCAAATCGTAAAAAATGAATACAGTGTATGATTGCTAATCTTATCACAA ATCGTAAAAAATGAATTATGGTTCGATTTTGGACTATTTTGGGTCAATTTGAG TGAATCTCGAACTTAAAAAGCGAGTCTTCTAGCAGTTCCTGTTACAGCGGGG CATACATAGGTAGGAATTTGGTTTTTACTATTTGAGCCTTTTACTGTTGTG GCCGGTAATATGGAATAGTCTAGCACTTCTGCGTGTGTACAACTAGTATTTA TTGTAATTTATGTGATCGCACTTAACTCTCAGATAAAAACCTTAAAGCACTAACA TTTTGTTTTGGTTGAAGGAATCAGGAGGAAAGAAAATTGAGGGATTTGTTGG TATATAGATTCCTTTGTTGGATAACAAAATTTGGAGTGGAGAGATTTGGAAG GAAGAATTTATAGGGATTAGTCCCATTACACTTATGTTGATTACAAAATTT CTCCAAAAGTGGAAAAGATTTGAGTGAAAATGTTTTTTATTTCTCTCTCTC CCTTTCTTCCCTCTTAAACAAAACAGGAAAAGTTAATCTTATCATTCCGTACC TTCCCTTCTGTTCTTTTTTTCTCTCCAAAATCTTATCCAAACGTAGTGTGA TTGCTACTGTCTTATGAACGAGAATCTTTCTTCTAATACTGCTTGTGTTGC ACAGTCAATGATTTAGCTAGATCATCTTTGGTTAGCTACTCAAAATATTTACA TAAAATACTTGTAGAAAATAAATACCAATAGGTCTTGTCAAGAAGTAGTTTCA ATGCTATAAGTTTTAAACCAATCTCAAATTTACACCATGGAGATATCTGCG GATAAGAACTAGTAACTGTAGCAGCTGTAACCTGTTGCAATCAGTTTTATGGT TTGCCTTGCAAATCAAACCTTGGATGTTGTTGCTTACAATTTGTTACTATT ACGTGAAGTTTGTGTTGCTCCCTTACATTTGACTTTGGTTTTTGTTCCTTG CAATTTGCTCTTTGAAGTATAAAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTGAGTGTG CTTCTCTGCTCAGGATGTTGCTGCAGATTTCTTCTTCTCAATTTTACTATCCACC AGTGCAGCAGTGTCCCTTCTTATCCAAAAGAAAGCAATTAGACCAGAATGC TTGATCGATGGAGAATAAAGGATTCGGGCAATTGCATCCTCGCAGCCAGG GTGTGGAAAACCTTGGGTATATGCTCCCATTCAACTATATCTCAATTTTATGA GTATTTTCTTCTCTGAATTTTCAATTTGGTGACGTTAAATTTTGTATTGTAC TCGACAGGAACAAATTTATAGTTCATCTCTTTCCCTGGTTCGAGCACCACCTGG TAGGACCTTGATCTTGTAGCTACATTGGAGGTGTACAAATGTTGGCATATTA CAAAAAGCAAGTCAATTTATACAAATATATCTGTTGTATCCTCAAAATAAGTGG GTATCAATCCTGACGACATGCTTGTGTTATCGATGCAGAGTGAAGATGA</p>	<p>238</p>

Ejemplo 31

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

5

Tabla 23

Especie/gen o secuencia consenso	Región 1	SEQ ID NO:	Región 2	SEQ ID NO:
Euphorbia_heterophylla_1Contig1	AGTTTACAGGGAGATG TAAAGTT	239	TCGATGTGAACATGAACAAAA TGCCAGATGTCGCTATGACATT GGCTGTGGTTG	251
Euphorbia_heterophylla_2Contig1	AGTTTGCAGGGAGATG TGAAATT	240	TCGATGTGAATATGAACAAAAT GCCAGATGTTGCTATGACATTA GCTGTGGTTGC	252
Ambrosia_trifida_1Contig1	AGTTTACAGGGGGATG TAAAGTT	241	TCGATGTTAACATGAACAAAAT GCCAGATGTTGCCATGACGCTT GCAGTCGTTGC	253
velvetleaf_1Contig1	AGTTTGCAGGGTGATG TAAAATT	242	TTGATGTCAACATGAACAAAAT GCCAGATGTTGCCATGACTCTC GCTGTTGTTGC	254
Xanthium_strumarium_2Contig1	AGTTTGCAGGGTGATG TGAAATT	243	TTGATGTCAACATGAACAAAAT GCCTGATGTCGCAATGACTCTT GCTGTGGTTGC	255
Ipomoea_hederacea_1Contig1	AGTTTACAGGGGGATG TAAAGTT	244	TTGATGTCAACATGAACAAAAT GCCAGATGTTGCCATGACTCTT GCTGTAGTTGC	256
Chenopodium_album_1Contig1	AGTTTACAGGGTGATG TAAAATT	245	TTGATGTCAACATGAACAAAAT GCCAGATGTCGCAATGACTCTT GCTGTTGTTGC	257
Digitaria_sanguinalis_1Contig1	AGTTTGCAGGGTGATG TGAAATT	246	TTGACGTCAACATGAACAAAAT GCCTGATGTCGCAATGACTCTT GCTGTGGTTGC	258
Senna_obtusifolia_1Contig3	AGTTTACAGGGAGATG TAAAATT	247	TTGATGTCAACATGAACAAGAT GCCAGATGTTGCCATGACGCTT GCTGTAGTTGC	259
Waterhemp_EPSPS	AGTTTACAGGGTGATG TAAAATT	248	TCGACGTCAACATGAATAAAAT GCCAGATGTTGCTATGACTCTT GCAGTTGTTGC	260
Palmer_EPSPS	AGTTTACAGGGTGATG TAAAATT	249	TCGACGTCAACATGAACAAAA TGCCAGATGTTGCTATGACTCT TGCAGTTGTTGC	261
palmer_1Contig1	AGTTTACAGGGTGATG TAAAATT	250	TCGACGTCAACATGAACAAAA TGCCAGATGTTGCTATGACTCT TGCAGTTGTTGC	262

206) En la **Tabla 24** se muestran secuencias de polinucleótidos de ARNbc de 21, 22, 24, 35, 45 y 55 meros, diseñadas basándose en la secuencia consenso de EPSPS para la región 2, TNGANGTcAAcAtGAAcAAaATGCCaGATGTNGcNATGACNcTtGCNGTNGTTGC (**SEQ ID NO:263**).

Tabla 24

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO.
Consenso_ARNbc de 21 meros	Sentido: AACAUAGAACAAAAUGCCAGAU	264
	Antisentido: AUCUGGCAUUUUGUUCAUGUU	265
Consenso_ARNbc de 22 meros	Sentido: AACAUAGAACAAAAUGCCAGAUG	266
	Antisentido: CAUCUGGCAUUUUGUUCAUGUU	267
Consenso_ARNbc de 24 meros	Sentido: CAACAUGAACAAAAUGCCAGAUGU	268
	Antisentido: ACAUCUGGCAUUUUGUUCAUGUUG	269
Consenso_ARNbc de 35 meros	Sentido: UCGACGUCAACAUGAACAAAAUGCCAGAUGUUGCU	270
	Antisentido: AGCAACAUCUGGCAUUUUGUUCAUGUUGACGUCGA	271
Consenso_ARNbc de 45 meros	Sentido: UCGACGUCAACAUGAACAAAAUGCCAGAUGUUGCUAUGACUCUUG	272
	Antisentido: CAAGAGUCAUAGCAACAUCUGGCAUUUUGUUCAUGUUGACGUCGA	273
Consenso_ARNbc de 55 meros	Sentido: UCGACGUCAACAUGAACAAAAUGCCAGAUGUUGCUAUGACUCUUGC AGUUGUUGC	274
	Antisentido: GCAACAACUGCAAGAGUCAUAGCAACAUCUGGCAUUUUGUUCAUGU UGACGUCGA	275

207) Los polinucleótidos de ARNbc consenso de EPSPS se sintetizaron mediante transcripción *in vitro* y se aplicaron por vía tópica como preparaciones de ARN en bruto. Malezas resistentes a glifosato (palmera amaranto y hierba de caballo de 16 copias) se trataron con los seis ARNbc consenso individuales (21, 22, 24, 35, 45, 55 meros); malezas no resistentes a glifosato (amaranto tuberculoso, palo de zorrillo, digitaria, bejuco colorado, quínoa blanca, poinsettia silvestre) se trataron con los tres ARNbc consenso individuales más cortos (21, 22, 24 meros). Después del tratamiento con los polinucleótidos, las plantas resistentes a glifosato se trataron con glifosato (1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®) y las plantas no resistentes a glifosato se trataron con glifosato (105 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®). Después de 7 días de tratamiento, se descubrió que los seis polinucleótidos de ARNbc consenso de la región 2 de EPSPS, proporcionaban 100 % de control (plantas muertas) de palmera amaranto resistente a glifosato; las plantas de palmera amaranto de control tratadas solo con glifosato no murieron. Después de 7 días de tratamiento, se descubrió que los tres polinucleótidos de ARNbc consenso más cortos (21, 22, 24 meros) de la región 2 de EPSPS evaluados individualmente, proporcionaban 95%, 80% y 65% de control (combinación de plantas muertas y con lesiones), respectivamente, de amaranto tuberculoso; las plantas de amaranto tuberculoso tratadas solo con glifosato proporcionaron aproximadamente un 40 % de control (combinación de plantas muertas y lesionadas); y una mezcla de los tres polinucleótidos de ARNbc consenso más cortos (21, 22, 24 meros) proporcionó aproximadamente el mismo control que el glifosato solo. Los polinucleótidos de ARNbc consenso de la región 2 de EPSPS no causaron ningún efecto observable sobre las otras especies de maleza (amaranto tuberculoso, palo de zorrillo, digitaria, bejuco colorado, quínoa blanca, poinsettia silvestre) analizadas.

Ejemplo 32

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

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

Tabla 25

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

5 **210)** Se trataron plantas de lechuga de tres semanas (variedad SVR3603 L4) de la siguiente forma. Dos hojas originarias (hojas que son más viejas y que tienen ~60 % de su tamaño en la madurez) de cada planta, se pretrataron con Silwet-L-77 al 0,1% (v/v) y se dejaron secar (~15 minutos). A cada hoja se aplicaron en pequeñas gotas 20 microlitros de una mezcla de los polinucleótidos antisentido de polifenol oxidasa en una solución de Silwet L-77 al 0,01 % (v/v) y sulfato de amonio al 2 % (p/v) en fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8; cada planta se trató con 6,7 nanomoles de cada uno de los tres polinucleótidos HH07, HH09 y HH11 (para un total de 20 nanomoles por planta). Las plantas de control se trataron con un polinucleótido HH02-05 no relacionado (antisentido para fitoeno desaturasa) o solo con tampón (Silwet L-77 al 0,01 % (v/v) y sulfato de amonio al 2 % (p/v) en fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8).

10 **211)** Aproximadamente, 3 semanas después del tratamiento con los polinucleótidos tópicos, las hojas de lechuga “no tratadas” (es decir, las que no fueron tratadas con los polinucleótidos tópicos) se cortaron debajo del agua del cogollo de la lechuga y se incubaron en un recipiente con jasmonato de metilo 1,33 milimolar en etanol al 5 %. Las hojas se inspeccionaron para determinar el pardeamiento de las nervaduras centrales y se fotografiaron cada 24 horas. Se tomaron muestras de las plantas restantes y se congelaron para análisis de ARN pequeño y ARNm.

15 **212)** Las plantas tratadas con los polinucleótidos antisentido de polifenol oxidasa HH07, HH09 y HH11 mostraron reducción significativa en el pardeamiento en las nervaduras centrales después del tratamiento con jasmonato de metilo. Las plantas tratadas con HH02-05 (antisentido para fitoeno desaturasa) como control mostraron una leve reducción en el pardeamiento de las nervaduras centrales en comparación con las de control tratadas con tampón.

Ejemplo 33

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

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

```

ATGCCCAAATCGGACTTGTATCTGCTGTTAATTTGAGAGTCCAAGGTAATTCAGCTTATCTTTGGA
GCTCGAGGTCTTCGTTGGGAACTGAAAGTCAAGATGTTTGCTTGCAAAGGAATTTGTTATGTTTTG
GTAGTAGCGACTCCATGGGGCATAAGTTAAGGATTTCGTACTCCAAGTGCCACGACCCGAAGATTG
ACAAAGGACTTTAATCCTTTAAAGGTAGTCTGCATTGATTATCCAAGACCAGAGCTAGACAATACA
GTTAACTATTTGGAGGCGCGTTATTATCATCATCGTTTTCGTACTTCCTCACGCCAACTAAACCAT
TGGAGATTGTTATTGCTGGTGCAGGTTTGGGTGGTTTGTCTACAGCAAAATATCTGGCAGATGCTG
GTCACAAACCGATATTGCTGGAGGCAAGAGATGTCTAGGTGGGAAGGTAGCTGCATGGAAAGAT
GATGATGGAGATTGGTACGAGACTGGGTTGCACATATTCTTTGGGGCTTACCCAAATATGCAGAAC
CTGTTTGGAGAACTAGGGATTGATGATCGGTTGCAGTGGAAAGGAACATTCAATGATATTTGCGATG
CCTAACAAAGCCAGGGGAGTTCAGCCGCTTTGATTTTCTGAAAGCTTTCCTGCGCCATTAATGGA
ATTTTGGCCATACTAAAGAACAACGAAATGCTTACGTGGCCCGAGAAAGTCAAATTTGCTATTGGA
CTCTTGCCAGCAATGCTTGGAGGGCAATCTTATGTTGAAGCTCAAGACGGTTTAAGTGTTAAGGAC
TGGATGAGAAAGCAAGGTGTGCCTGATAGGGTGACAGATGAGGTGTTTCATTGCCATGTCAAAGGC
ACTTAACCTCATAAACCCTGACGAGCTTTCGATGCAGTGCATTTTGATTGCTTTGAACAGATTTCTT
CAGGAGAAACATGGTTCAAAAATGGCCTTTTATGATGGTAACCCTCCTGAGAGACTTTGCATGCCG
ATTGTGGAACATATTGAGTCAAAGGTGGCCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAG
GCTGAATGAGGATGGAAGTGTCAAATGTTTTATACTGAATAATGGCAGTACAATTAAGGAGATG
CTTTTGTGTTTGGCACTCCAGTGGATATCTTGAAGCTTCTTTTGCCTGAAGACTGGAAAGAGATCCC
ATATTTCCAAAAGTTGGAGAAGCTAGTGGAGTTCCTGTGATAAATGTCCATATATGTTTGGACAG
AAAACCTGAAGAACACATCTGATAATCTGCTTTCAGCAGAAAGCCCGTTGCTCAGTGTGTACGCTGA
CATGTCTTGTACATTAAGGAATTACAACCCCAATCAGTCTATGTTGGAATTGGTATTTTGCACC
CGCAGAAAGATGGATAAATCGTAGTACTCAGAAATTATTGATGCTACAATGAAGGAAGTACGCGA
AGCTTTTCCCTGATGAAATTCGGCAGATCAGAGCAAAGCAAATAATTGAAGTATCATGTTGTCA
AAACCCCAAGGTCTGTTTATAAACTGTGCCAGGTTGTGAACCCTGTCCGCCCTTGCAAAGATCCC
CTATAGAGGGTTTTTATTAGCTGGTACTACACGAAACAGAAGTACTTGGCTTCAATGGAAGGTG
CTGTCTTATCAGGAAAGCTTTGTGCACAAGCTATTGTACAGGATTACGAGTTACTTCTTGGCCGGA
    
```

5 GCCAGAAGATGTTGGCAGAAGCAAGCGTAGTTAGCATAGTGAECTAA (SEQ ID NO:38). Se diseñaron polinucleótidos antisentido con las secuencias CTGTGATCATCATATGTATCA (SEQ ID NO:279), CCTTAACTCTCCAGCTAGCAA (SEQ ID NO:280), CAGCCCGCAAATGTTTCATTC (SEQ ID NO:281), GCCGTCAATGGCCGCATTGCT (SEQ ID NO:282), TCCTTCCCTCAGAAAGGGCAG (SEQ ID NO:283) y TTGCCTCATGCTGCTAATCTG (SEQ ID NO:284) para el gen endógeno de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de *Nicotiana benthamiana*, basándose en la secuencia de ADNc de EPSPS de *Nicotiana benthamiana*

CTTATATGTGCTTAAGCCTAACGTGCACCCGGCCCCCTTAACCCAGCAGTTTTCAATCTACCTACCG
TCTCTACCATTTTTCTTCTAGTTGGTGAAAATTTCTAACTTTTGAGAAAACAAGCCAAAGTTTTTTGTTT
CTAAGAACGCAAAAATGAGTGAAATTTTTTGCAGCAATGGCACAGATTAGCAGCATGAGGCAAGGG

ATACAGACCCCTAATCTTAATTCCTATTTTCCTAAAACCCAAAAGGTTCCCTCTTTTTTCGCATTCTA
TCTTCTTTGGATCAAAGAAAATAACCCAAAATTCAGCAAAAATCTTTGTGGGTGTGTAAGAAAGATT
CAGTTTTGAGGGTGGCAAAGTCACCTTTTAGGATTTGTGCATCAGTGGCCACTGCACAGAAGCCCCA
ACGAGATTGTGCTGCAACCCATCAAAGATATATCAGGCACCTGTTAAATTGCCTGGTTCTAAATCCC
TTTCCAACCGTATTCTCCTTCTTGCTGCCCTTTCTGAGGGAAGGACTGTTGTTGACAATTTACTGAG
TAGTGATGACATTCATTACATGCTTGGTGCCTTAAAACACTTGGACTTCATGTAGAAGATGACAA
TGAAAACCAACGAGCAATTGTGGAAGGTTGTGGTGGGCAGTTTCCTGTGCGGCGAGAAGTCTGAGG
AAGAAATCCAATTCCTTGGAAATGCAGGAACAGCAATGCGGCCATTGACGGCAGCAGTTACT
GTAGCTGGAGGACATTCAGATATGTACTTGATGGAGTTCCTAGGATGAGAGAGAGACCGAT
(SEQ ID NO:285),

CACTGACGTTGGATTAGAGGTAGGCTCCTTATATGTGCTTAAGCCTAACGTGCAGCCGGCCCCCAA
CCCCAGCAGTTTTCAATCTACCTACCGTCTCTACCATTTTTCTTATAGTAGTTGAAAATTTCTAACTTT
GAGAAAACAAGCCAAAGTTTTGTTTCTAAGAACACAAAGGGAGTGAAATTTTTTGCAGCAATGGC
ACAGATTAGCAGCATGAGGCAAGGGATACAGACCCCTAATCTTAATTCCTATTTTCCTAAAACCCA
AAAGGTTCCCTCTTTTTTCGCATTCTATCTTCATTGGATCAAAGAAAATAACCCAAAATTCAGCAAA
ATCTTTGTGGGTGTGTAAGAAAGATTCAGTTTTGAGGGTGGCAAAGTCACCTTTTAGGATTTGTGC
ATCAGTGGCCACTGCACAGAAGCCTAACGAGATTGTGCTGCAACCTATCAAAGATATATCAGGCA
CTGTTAAATTACCTGGTTCTAAATCCCTTTCCAATCGTATTCTCCTTCTTGCTGCCCTTTCTGAGGGA
AGGACTGTTGTTGACAATTTACTGAGTAGTGATGACATTCATTACATGCTTGGTGCATTGAAAACA
CTTGGACTTCATGTAGAAGATGACAATGAAAACCAACGAGCAATCGTAGAAGGTTGTGGTGGGCA
GTTTCCTGTGCGCAAGAAGTCTGAGGAAGAAATCCAATTCCTTGGAAATGCAGGAACAGCAA
TGCGGCCATTGACGGCAGCAGTTACTGTAGCTGGTGGACATTCTAGATATGTACTTGATGGAGTTC
CTAGGAT (SEQ ID NO:286), y

AAATTCTTGTTTCGAGGAGGTGAGAAGTACAAGTCTCCTGGAAAAGCATATGTTGAAGGAGATGC
 CTCAAGTGCTAGCTACTTTTTGGCGGGTGCAGCTGTACAGGTGGAAGTGTCACTGTTGAAGGTTG
 TGGAACAAGCAGTTTACAGGGGGATGTTAAGTTTGTGAGGTCCTCGAAAAGATGGGGGCAGAAG
 TTACATGGACAGAGAACAGTGTACGGTTAAAGGACCTCCAAGGAAGTCTTCTGGAATGAAACAT
 TTGCGGGCTGTTGACGTTAACATGAACAAAATGCCAGATGTTGCCATGACTCTTGCTGTAGTTGCA
 CTTTTGCTGATAGTCCACTGCCATAAGAGATGTTGCTAGCTGGAGAGTTAAGGAAACTGAGCGG
 ATGATTGCCATATGCACAGAAGTTAGGAAGTTGGGTGCAACAGTTGTAGAAGGGCCAGACTACTG
 CATAATCACTCCACCTGAAAAGTTAAAAGTAGCGGAAATTGATACATATGATGATCACAGAATGG
 CCATGGCTTTCTCTCTTGCGGCTTGTGCTGATGTTCCAGTCAACATTAAGGACCCCGTTGACTCG
 CAAAACCTTCCCAACTACTTTGACGTTTCCAGCAGTATTCCAAGCATTAAACCACTTTCCATTAA
 GAATTTGAAAAGAGAGACTTTGACAACAATGGTGTACATACCGGAAGAGAAAAGCTTTGATCCA
 AGCTTTCAACTCCTTTTCATTTGTCATGTGATGATCATTGTATTTGTTGAAGTTGAGCTGCTTTTCTT
 TTGTCCAGAAGACATGTATGGATACTATTACTATATAGTTAAGGTGAACTCAGCA (SEQ ID NO:287).

5 Se
 diseñaron polinucleótidos antisentido con las secuencias CCACATGGTCCAGTATCTGCC (AK195, RBCS_1-2-3-4,
SEQ ID NO:288), CAAGCAAGGAACCCATCCATT (AK196, RBCS_1-2-3-4, **SEQ ID NO:289**),
 GGCCACACCTGCATGCATTGC (AK197, RBCS_1-2-3-4, **SEQ ID NO:290**), GTGTTCACGGTAGACAAATCC
 (AK198, RBCS_1-2, **SEQ ID NO:291**), TGCATGCACTTGACGCACGT (AK199, RBCS_1-2, **SEQ ID NO:292**),
 AACTGATGCATTGCACTTGAC (AK200, RBCS_3-4, **SEQ ID NO:293**), CAAATCAGGAAGGTATGAGAG (AK201,
 RBCS_3-4, **SEQ ID NO:294**) y TGCAAGGTTTTGTTTCCTGG (AK202, RBCS_3-4, **SEQ ID NO:295**) para el gen
 10 endógeno de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO) de *Nicotiana benthamiana*, basándose en los
 fragmentos de secuencia de ADNc 2A de cadena pequeña de RuBisCO cloroplástico de *Nicotiana benthamiana*

GCAATGGCTTCCTCAGTTCCTTCCTCAGCAGCAGTTGCCACCCGAGCAATGTTGCTCAAGCTAAC
 ATGGTTGCACCTTTCACAGGTCTTAAGTCTGCTGCCTCATTCCCTGTTTCAAGAAAGCAAAAACCTTG
 ACATCACTTCCATTGCCAGCAACGGCGGAAGAGTGCAATGCATGCAGGTGTGGCCACCAATTAAC
 ATGAAGAAGTATGAGACTCTCTCATACCTTCCCATTGAGCCAGGAGCAATTGCTCTCCGAAATT
 GAGTACCTTTGAAAAGTGGATGGGTTCTTGTCTTGAATTCGAGACTGAGAAAGGATTTGTCTAC
 CGTGAACACCACAAGTCAACAGGATACTATGATGGCAGATACTGGACCATGTGGAAGCTACCTAT
 GTTCGGATGCACTGATGCCACCCAAGTGTGGCTGAGGTGGGAGAGGCGAAGAAGGAATACCCAC
 AGGCTGGGTCCGTATCATTGGATTGACAACGTGCGTCAAGTGCAGTGCATCAGTTTCATTGCCT
 CCAAGCCTGACGGCTAC (SEQ ID NO:296),

ACAATGGCTTCCTCAGTTCCTTCCTCAGCAGCAGTTGCCACCCGAGCAATGTTGCTCAAGCTAAC
 ATGGTTGCACCTTTCAGTGGTCTTAAGTCAAGTGCCTTTTTCCCTGTTTCAAGGAAGCAAAAACCTTG
 ACATCACTTCCATTGCCAGCAACGGCGGAAGAGTGCAATGCATGCAGGTGTGGCCACCAATTAAC
 AAGAAGAAGTACGAGACTCTCTCATACCTTCCCTGATCTGAGCGTGGAGCAATTGCTTAGCGAAATT
 GAGTACCTCTTGAAGAATGGATGGGTTCTTGTCTTGAATTCGAGACTGAGCGCGGATTTGTCTAC
 CGTGAACACCACAAGTCAACGGGATACTATGACGGCAGATACTGGACCATGTGGAAGTTGCCTAT
 GTTCGGATGCACTGATGCCACCCAAGTGTGGCCGAGGTGGAAGAGGCGAAGAAGGCATACCCAC
 AGGCTGGATCCGTATTATTGGATTGACAACGTGCGTCAAGTGCAGTGCATCAGTTTCATTGCCT
 ACAAGCCAGAAGGCTAC (SEQ ID NO:297),

CAAGCCAACATGGTTGCACCTTCACTGGCTCAAGTCCGCTCCTCCTTCCCTGTTACCAGGAAA
 CAAAACCTTGACATTACCTCCATTGCTAGCAATGGTGAAGAGTTCAATGCATGCAGGTGTGGCCA
 CCAATTAACATGAAGAAGTACGAGACTCTCATACCTTCCCTGATTGAGCCAGGAGCAATTGCTT
 AGTGAAGTTGAGTACCTTTGAAAAGTGGATGGGTTCTTGTCTTGAATTCGAGACTGAGCGTGGAA
 TTCGTCTACCGTGAACACCACAACCTCAACAGGATACTACGATGGCAGATACTGGACCATGTGGAA
 GTTGGCCATGTTGCGGTGCACTGATGCCACTCAGGTGTGGCTGAGGTGAGGAGGCAAGAAGG
 CTTACCCACAAGCTGGGTTAGAATCATTGGATTGACAACGTCCGTCAAGTGCATGCATCAGTT
 TTATCGCCTCCAAGCCAGAAGGCTAC (SEQ ID NO:298), y

GGCTCAGTTATGTCCTCAGCTGCCGCTGTTTCCACCGGCGCCAATGCTGTTCAAGCCAGCATGGTC
 GCACCCCTTCACTGGCCTCAAGGCCGCTCCTCCTTCCCGGTTTCCAGGAAACAAAACCTTGACATT
 ACTTCCATTGCTAGAAATGGTGGAAGAGTCCAATGCATGCAGGTGTGGCCGCCAATTAACAAGAA
 GAAGTACGAGACACTCTCATACCTTCTGATTTGAGCGTGGAGCAATTGCTTAGCGAAATTGAGTA

 CCTTTTGAAAAATGGATGGGTTTCCTTGCTTGAATTCGAGACTGAGCATGGATTTCGTCTACCGTGA
 ACACCACCACTACCAGGATACTACGATGGCAGATACTGGACGATGTGGAAGTTGCCCATGTTTCG
 GGTCACCGATGCCACTCAGGTCTTGGCTGAGGTAGAGGAGGCCAAGAAGGCTTACCCACAAGCC
 TGGGTCAGAATCATTGGATTGACAACGTCCTCAAGTGCAATGCATCAGTTTCATCGCCTACAAG
 CCCGAAGGCTAT (SEQ ID NO:299).

215) Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se trataron utilizando un procedimiento similar al descrito en el **Ejemplo 12**. La solución polinucleotídica (o de polinucleótidos mezclados en el caso de EPSPS y RuBisCO) se preparó en Silwet L-77 al 0,01 % (v/v) y sulfato de amonio al 2 % (p/v) en fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8. Durante algunos segundos, dos hojas completamente expandidas por planta, se sumergieron en una solución de Silwet L-77 al 0,1 % recién preparada con H2O bidestilada y se dejaron secar. Aproximadamente 30 minutos después, se aplicaron 20 microlitros de solución polinucleotídica a cada una de las dos hojas pretratadas. Para PDS, cada una de las 5 plantas recibió 25 nanomoles del polinucleótido antisentido de PDS (SEQ ID NO:34); para EPSPS, cada una de las 5 plantas recibió 50 nanomoles de cada polinucleótido antisentido de EPSPS (SEQ ID NO:279-284); y para RuBisCO, cada una de las 5 plantas recibió 50 nanomoles de cada polinucleótido antisentido de RuBisCO (SEQ ID NO:288-295). Las plantas de control emparejadas se trataron con tampón (Silwet L-77 al 0,01 % (v/v) y sulfato de amonio al 2 % (p/v) en fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8). Los resultados se midieron como la altura de la planta después de 12 días (PDS y EPSPS) o 10 días (RuBisCO) del tratamiento y se muestran en las **Figuras 36A - 36B**. Las plantas tratadas con el polinucleótido antisentido de PDS mostraron retraso grave en el crecimiento (**Figura 36A**) y decoloración. Las plantas tratadas con el polinucleótido antisentido de EPSPS mostraron retraso grave en el crecimiento (**Figura 36B**) y daños importantes en los tejidos del meristemo y del tallo. Las plantas tratadas con los polinucleótidos antisentido de RuBisCO mostraron retraso grave en el crecimiento (**Figura 36C**) y tejidos apicales deformes.

216) Se diseñó un segundo conjunto de experimentos para investigar los efectos del silenciamiento de un componente de la vía de silenciamiento de iARN endógeno en una planta. Las proteínas Argonauta (AGO) son componentes del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, *RNA-induced silencing complex*) que une pequeños ARN en el proceso de silenciamiento de iARN. Se esperaba que la supresión de Argonauta redujera el efecto fenotípico observado causado por un proceso de silenciamiento con iARN. Se diseñaron polinucleótidos antisentido de AGO1 con las secuencias GGAGGCAAAATACGAGCCTCA (HL510, SEQ ID NO:300), CACTAATCTTAATACCAAAC (HL511, SEQ ID NO:301), TATGGGTCATTAGCATAGGCATTAT (HL512, SEQ ID NO:302), TCTCAAGAATATCAGCTCCC (HL513, SEQ ID NO:303), CCCTTGGGACGCTGGCAGGTCAC (HL514, SEQ ID NO:304), TAATACGACTCACTATAGGGGAGAGAGCTAGATCTTTG (HL515, SEQ ID NO:305), TAATACGACTCACTATAGGCACAGTATTTCTTCCCTCCAACC (HL516, SEQ ID NO:306), TTGCTCATCTTAAATACATGT (HL517, SEQ ID NO:307), TCATCTTAAATACATGTTTTGTCA (HL518, SEQ ID NO:308), TTATCTTCAGGATACATTAGC (HL519, SEQ ID NO:309), AATACTGCTTGCTCATCTTAAATA (HL520, SEQ ID NO:310), GACAATTCCAAGTTCAGTTTC (HL521, SEQ ID NO:311), CCGTTTTAGATCACCATAAAGAGA (HL522, SEQ ID NO:312), TTGTCTGGTAATATCACAATC (HL523, SEQ ID NO:313) para el gen endógeno de Argonauta-1 (AGO1) de *Nicotiana benthamiana*, basándose en dos secuencias de ADNc parcial de AGO1-2 de *Nicotiana benthamiana*.

ATGGTGAGGAAGAGGAGAAGTACCTGGTTCTGGTGAGAGCTCTGGGTCTCAAGAACTGG
 CGGACAGGGTCGTGGCCAGCATCCACAGCAGCTGCACCAAGCTACCTCCCAGACTCCATATCAAA
 CTGCAATGACTACTCAGCCAATACCTTATGCAAGACCAACTGAAACATCCTCCGAAGCTGGTTCCT
 CATCTCAGCCACCTGAGCAGGCAGCTCTACAAGTGACACAACAGTTCCAGCAACTTGCTTTGCAAC
 AAGAAGCGGCTACAACGCAAGCAGTTCCACCTGCATCAAGCAAATTACTAAGGTTTCCCCTGCGTC
 CAGGGAAGGGGAGCAATGGTATGAGATGCATAGTCAAAGCCAATCACTTCTTCGAGAGCTGCCT
 GACAAAGACTTGCACCAGTATGATGTCACAATTTCTCCAGAGGTGTCATCACGTGGCGTCAACCGT
 GCTGTCATGGCGCAACTGGTGAAGCTGTACCAAGAATCTCATCTTGGGAAGAGACTTCCAGCATAT
 GATGGAAGGAAAAGTCTATACACTGCAGGGCCCCCTTCCATTTGTTCAAAAAGACTTCAAAAATAACT
 CTTATTGATGATGAGGATGGGCCTGGTGGTGCTAGAAGGGAAAGGGAATTTAAAGTTGTGATCAA
 ATTGGCTGCCCGTCTGATCTTCATCACTTGGGAATGTTTTTAGAAGGGAAACAGGCTGATGCACC
 TCAAGAGGCGCTTCAAGTTCTGGATATTGTTCTGCGTGAGTTGCCAACATCTAGGTTTTGTCCTGTG
 GGTCGTTCTTTCTATTCCCCTGATTTAGGGCGAAAGCAACCATTTGGGTGAAGGTTTAGAAAAGTTGG
 CGTGGGTTCTATCAAAGCATTCGCCCCACACAAATGGGCTTATCACTGAACATCGATATGTCTTCC
 ACTGCATTCATTGAGCCACTGCCAGTCATTGATTTTGTGACACAGCTTCTGAACCGAGATGTGCCA
 TCTAGACCACTGTCTGATGCTGGCCGTGTAAGATAAAAAAAGCTCTGAGAGGTGTGAAGGTGGA
 GGTTACTCATCGTGAAATATGCGGAGGAAGTACCGCATTTCGGGTTTAACATCTCAAGCAACAA
 GAGAGTTGACCTTCCCTGTTGATGAAAATGGTACAGTGAAATCTGTAATTGAGTATTTTCGAGAAA
 CATATGGGTTTGTAATTCAGCATACTCAGTGGCCTTGTCTACAAGTTGGAAATCAGCAGAGACCTA
 ATTACTTGCCAATGGAAGTCTGCAAGATTGTGGAGGGACAAAGGTAAGTCAAGCGCTTGAATGAG
 AGACAGATTACTGCACTTCTGAAAGTGACCTGCCAGCGTCCCCAAGGGAGGGAGCGTGATATTCTT
 GAGACCGTACATCATAATGCCTATGCTAATGACCCATATGCCAAGGAGTTTGGTATTAAGATTAGT
 GACAAGTTGGCACAAGTTGAGGCTCGTATTTTGCCTCCACCTCGGCTTAAATATCATGATAACGGT
 CGAGAAAAGGACTGCCTGCCACAAGTTGGCCAATGGAATATGATGAATAAGAAAATGGTAAATGG
 AGGGACGGTGAACAATTGGATCTGCATAAACTTCTCTCGCAATGTGCAAGATAGTGTGCTCATGG
 GTTTTGTCTGAGCTTGCACAAATGTGCCAGATATCTGGCATGAATTTCAATCCAAATCCTGTTCTG
 CCACCTTCGAGTGCACGCCCTGATCAGGTCGAAAGAGTATTGAAAACCTCGATTTTCATGATGCTATG
 ACTAAGTTGCAGCTGCATGGGAGAGAGCTTGATTTGCTAGTTGTGTCATCTTGCCAGACAATAATGGA
 TCTCTTTATGGTGATCTGAAGCGCATTGTGTGAGACTGAACTAGGAGTCGTCTCACAGTGCTGTTTG
 ACAAACATGTATTTAAGATGAGCAAACAGTATCTAGCCAATGTAGCGCTGAAAATCAATGTGAA
 GGTGGGAGGGAGAAACACTGTGCTTGTGATGCAATATCGAGGCGAATTCCTCTTGTGAGCGACC
 GGCCTACCATCATTTTTGGTGCAGATGTCACCCACCTCACCTGGGGAGGACTCTAGCCCATCCA

TTGCCGCGGTGGTTGCTTCTCAAGATTGGCCTGAGATTACAAAGTATGCTGGTCTAGTTTCTGCTCA
AGCCCATAGGCAAGAGCTTATTCAGGATCTGTACACGACTAGGCAAGATCCTGTTAAGGGGACAG
TTGCTGGTGAATGATTAAGGACTTACTTATATCCTTCCGAAGAGCTACTGGACAAAAGCCCCAGA
GAATAATTTTCTATAGGGATGGTGTAGTGAAGGACAATTTTATCAAGTGCTTCTGTTTCGAACCTG
ATGCGATCCGCAAAGCATGTGCGTCTTTGGAGCCAAATTATCAGCCCCAGTCACATTTGTTGTGG
TTCAGAAACGACATCACACAAGGCTTTTTGCCAATAACCACCGTGACAGAAATGCAGTTGACAGG
AGCGGGAACATTATACCTGGTACTGTTGTAGATTCAAAGATATGCCACCCGACAGAGTTTGATTC
TATCTTTGTAGCCATGCCGGCATAACAGGGTACGAGCCGTCCAGCTCACTACCATGTTCTATGGGAC
GAGAACAAATTCACAGCCGATGCGCTGCAGTCTTTGACCAACAACCTCTGCTATACATATGCAAGG
TGCACGCGTTCCGTCTCCATCGTTCCCCCTGCATATTATGCACATTTGGCAGCTTTCCGTGCTCGAT
TTTATATGGAGCCGGAGACATCTGACGGTGGTTCAGTAACAAGTGGGGCTGCTGGTGGCAGAGGG
GGTGGTGCAGGAGCTGCTGGAAGGAACACCCGAGCCCCAAGTGCTGGTGCTGCTGTTAGACCTCT
TCCTGCGCTCAAGGATAATGTGAAGAGGGTTATGTTCTACTGC (SEQ ID NO:314) y

TATTAAGATCAGTGAGGAGCTTGCTCAAGTTGAGGCTCGCGTTTTGCCTGCACCTTGGCTTAAATA
 CCATGATACAGGTCGAGAGAAAGACTGTCTGCCACAAGTGGGCCAGTGGAATATGATGAATAAGA
 AAATGGTTAATGGAGGAACAGTGAACAACCTGGATCTGTGTAAACTTTTCTCGCAATGTGCAAGAC
 ACAGTTGCACGTGGATTTTGTTCGAGCTTGCACAAATGTGCATGATATCCGGAATGAACTTCAAT
 CCCAATCCTGTTCTACCACCAGTGAGTGTCTCGCCCTGATCAAGTTGAGAGAGTCTTGAAAACCTCGA
 TTTCACGATGCTATGACAAAAGTTGCAGCCAAATGGGAGAGAGCTAGATCTTTTGATTGTGATATTA
 CCAGACAATAACGGCTCTCTTTATGGTGATCTAAAACGGATTTGTGAAACTGAACTTGAATTTGTC
 TCACAATGCTGCTTGACAAAACATGTATTTAAGATGAGCAAGCAGTATTTAGCTAATGTATCCCTG
 AAGATAAATGTGAAGTTGGAGGAAGAAATACTGTGCTGGTTGATGCGCTCTCTAGACGAATTCC
 CCTTGTGACGACCGCCCAACTATCATTTTTGGTGCAGATGTCACCCATCCCACCCTGGGGAGGA
 TTCTAGCCCGTCAATTGCTGCGGTGGTTGCTTCTCAAGATTGGCCTGAAATTACAAAGTATGCTGG
 TTTGGTTTCTGCTCAAGCGCATAGGCAAGAGCTTATACAAGATCTGTACAAGACTTGGCAAGATCC
 AGTTAGAGGACCTGTGACTGGTGGCATGATAAAGGAATTACTTATTTCCCTCCGTCGAGCAACTGG
 ACAGAAGCCGCAGAGAATTATATTCTACAGAGATGGTGTTAGTGAAGGACAATTTTACCAAGTTCT
 TCTTTTTGAACTTGATGCAATCCGCAAGGCATGTGCATCTTTAGAACCCA ACTATCAGCCCCCGGTT
 ACGTTTGTGTGGTCCAGAAACGGCATCATACTAGGTTGTTTGCCAATAACCACCACGACAGAAAT
 GCAGTTGATCGGAGTGGAACATTTTGCCTGGTACCGTTGTAGATTCAAAGATATGCCACCCTACT
 GAATTTGATTTCTATCTCTGTAGCCATGCCGGCATAACAGGGTACTAGCCGCCAGCTCATTATCAT
 GTTCTGTGGGATGAGAACAATTTTACTGCTGACGCCCTGCAGTCTTTGACTAACAACTTTTGCTATA
 CATATGCTAGGTGTA CTGTTCTGTCTCCATTGTTCCACCAGCATATTATGCACATTTGGCAGCTTT
 CCGTGCTCGGTTTTACATGGAGCCAGAGACATCTGATAATGGATCAGTCACAAGCGCAGCTGCTTC
 AAACAGAGGAGGTTTTAGGAGCTATGGGAAGGAGCACGCGAGCACCAGGTGCTGGTGTGCTGTAA
 GGCCCCCTCCTGCTCTCAAGGAGAATGTTAAGAGGGTTATGTTTTATTGT (SEQ ID NO:315).

217) Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se trataron utilizando un procedimiento similar al descrito en el **Ejemplo 12**. La solución polinucleotídica (o de polinucleótidos mezclados en el caso de AGO1) se preparó en Silwet L-77 al 0,01 % (v/v) y sulfato de amonio al 2 % (p/v) en fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8. Durante algunos segundos, dos
 5 hojas completamente expandidas por planta se sumergieron en una solución de Silwet L-77 al 0,1 % recién preparada con H₂O bidestilada y se dejaron secar. Aproximadamente 30 minutos después, a cada una de las dos hojas pretratadas se aplicaron 20 microlitros de solución polinucleotídica. Para PDS, cada una de las 5 plantas recibió 25 nanomoles del polinucleótido antisentido de PDS (SEQ ID NO:34); para AGO1, cada una de las 5 plantas recibió 50
 10 nanomoles de cada uno de los 14 polinucleótidos antisentido de AGO1 (SEQ ID NO:300-313); para los tratamientos combinados con PDS y AGO, cada una de las 5 plantas recibió 25 nanomoles del polinucleótido antisentido de PDS (SEQ ID NO:34) y 50 nanomoles de cada uno de los 14 polinucleótidos antisentido de AGO1 (SEQ ID NO:300-313) aplicados en hojas distintas. Las plantas de control emparejadas se trataron con tampón (Silwet L-77 al 0,01 % (v/v) y sulfato de amonio al 2 % (p/v) en fosfato de sodio 5 milimolar, pH 6,8). No se observaron diferencias entre las plantas tratadas con los polinucleótidos antisentido de AGO1 y las plantas tratadas solo con tampón. Las plantas tratadas con el polinucleótido antisentido de PDS mostraron decoloración sistémica. Las plantas tratadas con el polinucleótido antisentido de PDS y los polinucleótidos antisentido de AGO1 aplicados por separado, no presentaron decoloración sistémica, indicando que la supresión de AGO1 bloqueó la propagación sistémica de la señal de silenciamiento.

Ejemplo 34

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

219) Una secuencia genómica del gen endógeno de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de *Zea mays* se identificó como ACCTACTTCCCCCTCGCCCCCTCTCATGGTCTCTCTCGCGCCCAGATCTGCTACTA-GACGGCACCGCT GCAGCGCGTGTGTCGCGGGGGTGGTGGCAGGCAGCGAGAGCTTGCCGTTCCCTCTCTCT-CAGTTG TCAGGTCTAGGCTCACCTCACGGCTCCCAGCCGCTTCTATTTCTTCTCCCCGACCCCGTGCAG GTGGCAGTCCAGTCCACGCCACCAACCGCGAGGCGAACCACCAACCCACTCTCCCCAACCCCG CGCGCCCAGGCCGCCGCCCTACCAACCATCGGCGTGGCAATGGCGGCCATGGCGACCAAGGCC GCCGCGGGCACCCTGTCGCTGGACCTCGCCGCGCCGCGGCGGCGGCGAGCGGCGGCGGCGGTGCA GCGGGGTGCCGAGGAGATCGTGTGTCAGCCCATCAAGGAGATCTCCGGCACCGTCAAGCTGCCGG GGTCCAAGTCGCTTTCCAACCGGATCCTCCTGCTCGCCGCCCTGTCCGAGGTGAGCGATTTTGGTG CTTGCTGCGCTGCCCTGTCTACTGCTACCTAAATGTTTTGCCTGTGCAATACCATGGATTCTCGGT GTAATCCATCTCACGATCAGATGCACCGCATGTGCGATGCCTAGCTCTCTCTAATTTGTCTAGTAGT TTGTATACGGATTAATATTGATAAATCGGTACCGCAAAGCTAGGTGTAATAAACACTAGAAAA TTGGATGTTCCCTATCGGCCTGTAICTCGGCTACTCGTTCTTGATGGCATGCTGTCTTTCTTGGT GTTTTGGTGAACAACCTTATGAAATTTGGGCGCAAAGAACTCGCCCTCAAGGGTTGATCTTATGCCA TCGTCATGATAAACAGTGGAGCACGGACGATCCTTACGTTGTTTTAACAAACTTTGTCAGAAAA CTAGCATCATTAACCTTCTAATGACGATTTCAACAACAAAAAAGGTAACCTCGCTACTAACATAAC AAAATACTTGTGTTGCTTATTAATTATGTTTTTAATCTTTGATCAGGGGACAACAGTGGTTGATAA CCTGTTGAACAGTGGAGTGTCCACTACATGCTCGGGGCCCTTGAGGACTCTTGGTCTCTCTGTGCGA AGCGGACAAAGCTGCCAAAAGAGCTGTAGTTGTTGGCTGTGGTGAAAGTTCCAGTTGAGGATT CTAAGAGGAAGTGCAGCTCTTCTTGGGAATGCTGGAAGTCAATGCGGCCATTGACAGCAGCT GTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACGTATGTTTCTCTCTTCTCTCTACAATACTTGCTGGAGTT AGTATGAAACCCATGGGTATGTCTAGTGGCTTATGGTGTATTGGTTTTTGAACCTCAGTTACGTGCT TGATGGAGTACCAAGAATGAGGGAGAGACCCATTGGCGACTTGGTTGTCCGATTGAAGCAGCTTG GTGCAGATGTTGATTGTTTCTTGGCACTGACTGCCACCTGTTGCGTCAATGGAATCGGAGGGC TACCTGGTGGCAAGGTTAGCTACTAAGGGCCACATGTTACATTCTTCTGTAATGGTACAACCTATT GTCGAGCTTTTGCATTTGTAAGGAAAGCATTGATTGATCTGAATTTGATGCTACACCACAAAATAT CCTACAAATGGTCACTCCCTAACCTAGCAAAACATGAAGTAATACTTGGCATGTGTTTATCAAATTA TTTCCATCTTCTGGGCGATTGCCTGTTTTCTAGTCTAATAGCATTGTTTTTAGCATTAAATAGCTCT TACAATTGTTATGTTCTACAGGTCAAGCTGTCTGGCTCCATCAGCAGTCAGTACTTGAGTGCCTTGC TGATGGCTGCTCCTTGGCTCTTGGGATGTGGAGATTGAAATCATTGATAAATTAATCTCCATTCC CTACGTCGAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTTTTGGTGTGAAAGCAGAGCATTCTGATAGCTG GGACAGATTCTACATTAAGGGAGGTCAAAAATACAAGTAAGCTCTGTAATGTATTTCACTACTTTG ATGCCAATGTTTCAGTTTTTCAGTTTTCCAAACAGTCGCATCAATATTTGAATAGATGCACTGTAGA AAAAAAATCATTGCAGGGAAAACTAGTACTGAGTATTTTACTGTAAATATTTTACCAGTCGGA ATATAGTCAGTCTATTGGAGTCAAGAGCGTGAACCGAAATAGCCAGTTAATTATCCATTATACAG AGGACAACCATGTATACTATTGAACTTGGTTTATAAGAGAATCTAGGTAGCTGGACTCGTAGCTG CTTGGCATGGATACCTTCTTATCTTTAGGAAAAGACACTTGATTTTTTTTTTCTGTGGCCCTCTATG ATGTGTGAACCTGCTTCTCTATTGCTTTAGAAGGATATATCTATGTCGTTATGCAACATGCTTCCCT TAGCCATTTGACTGAAATCAGTTTCATAAGTTTCGTTAGTGGTTCCCTAACGAAACCTTGTTTTTT TTTGCAATCAACAGGTCCCCTAAAAATGCCTATGTTGAAGGTGATGCCTCAAGCGCAAGCTATTTT TGGCTGGTGTGCAATTACTGGAGGACTGTGACTGTGGAAGGTTGTGGCACCACCAGTTGCGA GTAAAGATTTCTTGGCTGGTGTGCTACAATAACTGCTTTTGTCTTTTTGGTTTCAGCATTGTTCTCAGA GTCACTAAATAACATTATCATCTGCAAATGTCAAATAGACATACTTAGGTGAATTCATGTAACCGT TTCCTTACAAATTTGCTGAAACCTCAGGGTGTGATGTGAAGTTTGTGAGGTACTGGAGATGATGGGA GCGAAGGTTACATGGACCGAGACTAGCGTAACTGTTACTGGCCCACCGCGGGAGCCATTTGGGAG GAAACACCTCAAGGCGATTGATGTCAACATGAACAAGATGCCTGATGTCGCCATGACTCTTGCTGT GGTGCCCCTTTGCCGATGGCCGACAGCCATCAGAGACGGTAAACATTCTCAGCCCTACAACC ATGCCTCTTCTACATCACTACTTGACAAGACTAAAACTATTGGCTCGTTGGCAGTGGCTTCCCTGG AGAGTAAAGGAGACCGAGAGGATGGTTGCGATCCGACGGAGCTAACCAAGGTAAGGCTACATA CTTACATGTCTCACGTCGTCTTCCATAGCTCGCTGCCTTTAGCGGCTTGCCTGCGGTGCGTCCA TCCTCGGTTGCTGTCTGTGTTTTCCACAGCTGGGAGCATCTGTTGAGGAAGGGCCGGACTACTGCA TCATCACGCCGCCGAGAGCTGAACGTGACGGCGATCGACACGTACGACGACCACAGGATGGCC ATGGCCTTCTCCCTTGGCGCTGTGCCGAGGTCCCCGTGACCATCCGGGACCCCTGGGTGCACCCGG AAGACCTTCCCCGACTACTTCGATGTGCTGAGCACTTTTCGTCGAAGATTAATAAAGCGTGCGATAC TACCACGCAGCTTGATTGAAGTATAGGCTTGTGCTGAGGAAATACATTTCTTTTGTCTGTTTTT CTCTTTCACGGGATTAAGTTTTGAGTCTGTAACGTTAGTTGTTGTAGCAAGTTTCTATTTCCGATC

TTAAGTTTGTGCACTGTAAGCCAAATTTTCATTTCAAGAGTGGTTTCGTTGGAATAATAAGAATAATA
AATTACGTTTTCAGTGGCTGTCAAGCCTGCTGCTACGTTTATAGGAGATGGCATTAGACATTCATCAT
CAACAACAATAAAAACCTTTTAGCCTCAAACAATAATAGTGAAGTTATTTTTAGTCCTAAACAAGT
TGCATTAGGATATAGTAAAAACACAAAAGAAGCTAAAGTTAGGGTTTAGACATGTGGATATTGTTTCCAT (**SEQ ID
NO:316**), con una región 5' no traducida ubicada en las posiciones nucleotídicas 1 - 306 y una región 3' no traducida
ubicada en las posiciones nucleotídicas 3490 - 3907. La secuencia de ADNc de EPSPS se identificó como
ACCTACTTCCCCCTCGCCCCTCTCATGGTCTCTCTCGCGCCAGATCTGCTACTAGACGGCACCGCT
GCAGCGCGTGTGTCGCGGGGTTGGTGGCAGGCAGCGAGAGCTTGCCGTTCTCTCTCAGTTG
TCAGGTCCTAGGCTCACCTCACCGGCTCCCAGCCGCTTCTATTTCTTCTCCCGACCCCGTGCAG
GTGGCAGTCCAGTCCACGCCACCAACCGCGAGGCCAACCACCAACCCACTCTCCCCAACCCCG
CGCGCCCAGGCCGCCGCCCTACCAACCATCGGCGTGGCAATGGCGGCCATGGCGACCAAGGCC
GCCGCGGGCACCGTGTGCTGGACCTCGCCGCGCCGCCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGGTGCA
GGCGGGTGGCAGGAGATCGTGTGCTGCAGCCCATCAAGGAGATCTCCGGCACCGTCAAGCTGCCGG
GGTCCAAGTCGCTTTCCAACCGGATCCTCCTGCTCGCCGCCCTGTCCGAGGGGACAACAGTGGTTG
ATAACCTGTTGAACAGTGAAGGATGTCCACTACATGCTCGGGGCCTTGAGGACTCTTGGTCTCTCTG
TCGAAGCGGACAAAGCTGCCAAAAGAGCTGTAGTTGTTGGCTGTGGTGGAAAGTTCCAGTTGAG
GATTCTAAAGAGGAAGTGCAGCTCTTCTTGGGGAATGCTGGAAGTCAATGCGGCCATTGACAGC
AGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTACGTGCTTGATGGAGTACCAAGAATGAGGGAGA
GACCCATTGGCGACTTGGTTGTCGGATTGAAGCAGCTTGGTGCAGATGTTGATTGTTTCTTGGCA
CTGACTGCCACCTGTTGCTGTAATGGAATCGGAGGGCTACCTGGTGGCAAGGTCAAGCTGTCTG
GCTCCATCAGCAGTCACTTGGTGCCTTGTGATGGCTGCTCCTTGGCTCTTGGGGATGTGG
AGATTGAAATCATTGATAAATAATCTCCATTCCCTACGTGAAATGACATTGAGATTGATGGAGC
GTTTTGGTGTGAAAGCAGAGCATTCTGATAGCTGGGACAGATTCTACATTAAGGGAGGTCAAAAA
TACAAGTCCCCTAAAAATGCCTATGTTGAAGGTGATGCCTCAAGCGCAAGCTATTTCTTGGCTGGT
GCTGCAATTAAGTGGAGGGACTGTGACTGTGGAAGTTGTGGCACCACCAGTTTGCAGGGTGTGAT
GAAGTTTGCTGAGGACTGGAGATGATGGGAGCGAAGTTACATGGACCGAGACTAGCGTAAGT
TACTGGCCACCGCGGGAGCCATTTGGGAGGAAACACCTCAAGGCGATTGATGTCAACATGAAC
AAGATGCCTGATGTGCGCATGACTCTTGTGTTGCCCTTTGCCGATGGCCCGACAGCCATC
AGAGACGTGGCTTCTGAGAGTAAAGGAGACCGAGAGGATGGTTGCGATCCGGACGGAGCTAA
CCAAGCTGGGAGCATCTGTTGAGGAAGGGCCGGACTACTGCATCATCACGCCGCCGGAGAAGCTG
AACGTGACGGCGATCGACACGTACGACGACCACAGGATGGCCATGGCCTTCTCCCTTGGCCGCTGT
GCCGAGGTCCCCGTGACCATCCGGGACCCTGGGTGCACCCGGAAGACCTTCCCCGACTACTTCGAT
GTGCTGAGCACTTTCGTCAAGAATTAATAAAGCGTGCGATACTACCACGCAGCTTGATTGAAGTGA
TAGGCTTGTGCTGAGGAAATACATTTCTTTTGTCTGTTTTTCTTTTACGGGATTAAGTTTTGAG
TCTGTAACGTTAGTTGTTGTAGCAAGTTTCTATTTCCGATCTTAAGTTTGTGCACTGTAAGCCAAA
TTTCATTTCAAGAGTGGTTGTTGGAATAATAAGAATAATAAATTACGTTTTCAGTGGCTGTCAAGC
CTGCTGCTACGTTTATAGGAGATGGCATTAGACATTCATCATCAACAACAATAAAAACCTTTTAGCCT
CAAACAATAATAGTGAAGTTATTTTTAGTCCTAAACAAGTTGCATTAGGATATAGTTAAACACA
AAAGAAGCTAAAGTTAGGGTTTAGACATGTGGATATTGTTTTCCAT (**SEQ ID NO:317**). Se diseñó un
polinucleótido de ARN bicatenario de 240 pares de bases con una cadena correspondiente a la secuencia de ADN
TACTTGAGTGCCTTGTGATGGCTGCTCCTTTGGCTCTTGGGGATGTGGAGATTGAAATCATTGATA
AATTAATCTCCATTCCGTACGTGAAATGACATTGAGATTGATGGAGCGTTTTGGTGTGAAAGCAG
AGCATTCTGATAGCTGGGACAGATTCTACATTAAGGGAGGTCAAAAATACAAGTCCCCTAAAAAT
GCCTATGTTGAAGGTGATGCCTCAAGCGCAAGCTATTTCTTGG (**SEQ ID NO:318**) que corresponde a un segmento
de 240 nucleótidos ubicado en las posiciones nucleotídicas 937 - 1176 de la secuencia de ADNc de EPSPS.

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

Ejemplo 35

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

Tabla 26

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

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

Tabla 27

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

223) En la **Tabla 28** se muestra el efecto del humectante glicerina sobre la actividad herbicida (presentada como porcentaje del control/muerte de la maleza y como la altura de la planta) de polinucleótidos (ARN) aplicados por vía tópica sobre plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato. Se descubrió que la glicerina mejoraba la eficacia de los polinucleótidos, potenciando la actividad herbicida del glifosato.

Tabla 28

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

224) En la **Figura 38** se muestra el efecto de la variación de los contraiones de glifosato sobre la actividad herbicida (presentada como un porcentaje del control/muerte de la maleza y como la altura de la planta) de polinucleótidos (ARN) aplicados por vía tópica sobre plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato. Se preparó una mezcla de polinucleótidos de EPSPS (IDT [1] (**SEQ ID NO:83-84**), IDT [2] (**SEQ ID NO:85-86**), IDT [3] (**SEQ ID NO:87-88**) e IDT [4] (**SEQ ID NO:89-90**)) en Silwet L-77 al 0,5 %, sulfato de amonio al 2 % en tampón de fosfato de sodio 10 milimolar, pH 6,8 con portador Roundup® WeatherMax® al 0,2 % (MON56151 tensioactivo de amina de sebo mezcla de amina de sebo (16-18C) y cocoamina (12-14C) en la relación de 55:45) y 1682 g de equivalente ácido por hectárea de una de las sales de glifosato; K+ glifosato, isopropilamonio + glifosato o monoetanolamonio + glifosato a 215 litros/acre mediante pulverizador Milli en 3 copias de palmera amaranto resistente a glifosato de 4-6 pulgadas que contenían 16 copias de EPSPS. La altura de la planta se puntuó 21 días después del tratamiento con glifosato. En la **Tabla 29** se proporcionan los resultados (presentados como porcentaje del control/muerte de la maleza y como la altura de la planta). Las sales de isopropilamonio y monoetanolamonio de glifosato proporcionaron mejor actividad herbicida en comparación con la sal de potasio.

Tabla 29

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

225) Se investigó el efecto de los cationes de poliamina de espermina (*N,N*-bis(3-aminopropil)butano-1,4-diamina) y espermidina (*N*-(3-aminopropil)butano-1,4-diamina) sobre la actividad herbicida de polinucleótidos (ARN) aplicados por vía tópica sobre plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato. Las soluciones polinucleotídicas se prepararon utilizando una mezcla de las mismas cantidades de las cuatro moléculas oligonucleotídicas de ARNbc de tamaño "corto" descritas en el **Ejemplo 1**, que tienen una cadena antisentido diseñada para hibridarse con el ARNm transcrito a partir del gen de EPSPS de la palmera amaranto (**SEQ ID NO:1**) en las posiciones 14-38 (ARNbc-1 corto), posiciones 153-177 (ARNbc-2 corto), 345-369 (ARNbc-3 corto) y 1105-1129 (ARNbc-4 corto) tal como se indica mediante los nucleótidos subrayados en la **Figura 1**; los ARNbc tenían un saliente de dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido y en el extremo 3' de la cadena sentido tenían, como nucleótidos terminales, dos desoxinucleótidos. Las soluciones de polinucleótidos de ARNbc se prepararon con espermina o espermidina 1 o 10 milimolar o con sulfato de amonio al 2%, en un tampón de fosfato de sodio 10 milimolar (pH 6,8). Las soluciones de control (sin polinucleótidos) se prepararon con espermina o espermidina 1 o 10 milimolar o con sulfato de amonio al 2%, en un tampón de fosfato de sodio 10 milimolar (pH 6,8). Las plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato (33, 36 o 57 copias de EPSPS) se prepulverizaron con Silwet L-77 al 1 %. Las soluciones de polinucleótido de ARNbc (11,6 gramos/acre) o las soluciones tampón se aplicaron en forma de gotas con una pipeta en cuatro hojas inferiores completamente expandidas de palmera amaranto resistente a glifosato. Dos días después del tratamiento con polinucleótidos las plantas se pulverizaron con glifosato (3360 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®). Las plantas se fotografiaron 14 días después del tratamiento con glifosato; los resultados se muestran en la **Figura 39**. El tratamiento con ARNbc y con espermina 10 milimolar con posterior tratamiento con glifosato, causó la muerte de la palmera amaranto resistente a glifosato con 33 copias de EPSPS, la lesionó gravemente y produjo retraso en el crecimiento en la palmera amaranto resistente a glifosato con 36 copias de EPSPS. El tratamiento solo con espermidina 10 mM produjo retraso en el crecimiento en la palmera amaranto resistente a glifosato con 33 copias. En este experimento particular, ni la espermina ni la espermidina a 1 o 10 milimolar

tuvieron el mismo rendimiento que el sulfato de amonio al 2%.

Ejemplo 36

5 **226)** Se evaluó la eficacia de diferentes tensioactivos como agentes de transferencia de polinucleótidos en soluciones de polinucleótidos para pulverización aplicadas a la palmera amaranto resistente a glifosato. Se adquirieron tensioactivos Break-Thru de Evonik Industries; se adquirieron tensioactivos Silwet de Momentive. Las soluciones para pulverización se prepararon el mismo día de la pulverización. Se añadió una mezcla de polinucleótidos de EPSPS (IDT [1] (**SEQ ID NO:83-84**), IDT [3] (**SEQ ID NO:87-88**) e IDT [4] (**SEQ ID NO:89-90**)) a las soluciones de pulverización, 15 a 50 minutos antes de la pulverización y utilizando un pulverizador común de bajo volumen muerto ("milli"), se aplicaron de 1 a 2 mililitros a plantas de palmera amaranto resistentes a glifosato de una a cuatro pulgadas (R-22) cultivadas a partir de esquejes. Se aplicó un total de entre 10 y 225 microgramos de polinucleótidos a cada planta, dependiendo del experimento; por lo general, se aplicó un total de 23 microgramos de polinucleótidos por planta. Las plantas tratadas se colocaron en un invernadero con una programación fijada de temperatura de 26,7/21,1 grados centígrados o 29,4/21,1 grados centígrados durante 14/10 horas y luz complementaria. Después de 2 a 3 días, las plantas se pulverizaron con glifosato ("2X Wmax" o 1682 g de equivalente ácido por hectárea de herbicida de la marca Roundup® WeatherMAX®) con un pulverizador común (10 galones/acre) y se volvieron a colocar en el invernadero. La cantidad de control (lesión visual) con respecto a los tratamientos sin pulverización, la altura de las plantas y las fotografías de la palmera amaranto se tomaron a diferentes intervalos de tiempo de hasta 21 días después del tratamiento con glifosato. El peso fresco del material vegetal por encima del suelo se recogió en el último punto temporal. A cada tratamiento se le otorgó una puntuación global de lesión de la planta entre 0 y 3 basándose en el análisis combinado de Control, Altura, Peso fresco y Fenotipo vegetal visual, donde "3" es actividad herbicida intensa, "2" es actividad moderada, "1" es actividad leve y "0" es sin actividad observada después de la corrección de cualquier lesión observada causada con el tratamiento solo con glifosato; los resultados se muestran en la **Tabla 30**.

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

35

Tabla 30

Nombre del tensioactivo	Número CAS	Composición química	Tipo de tensioactivo	Clase de tensioactivo	Puntuación de lesión de la palmera	Tensión superficial		HLB	
						bibliografía	1250 ms		
Break-Thru S 321	nc	polisiloxano modificado con poliéter	organosilicona	no iónico	3	nc	22,7	27,1	40,0
Break-Thru S 200	67674-67-3	polisiloxano modificado con poliéter	organosilicona	no iónico	3	22	26,9	23,0	
Break-Thru OE 441	68937-55-3	polisiloxano modificado con poliéter	organosilicona	no iónico	1	nc	43,8	2,9	40,0
Break-Thru S 278	27306-78-1	polisiloxano modificado con poliéter	organosilicona	no iónico	2	21	24,2	23,4	
Break-Thru S 243	nc	polisiloxano modificado con poliéter	organosilicona	no iónico	2	47	50,3	7,7	16,7
Silwet L-77	27306-78-1	trisiloxano; polimetilsiloxano modificado con óxido de polialquileno	organosilicona	no iónico	3	20,5	26,4	23,4	13,5
Silwet 429	nc	silicona hidrolíticamente estable	organosilicona	no iónico	3	32-40	40,1	12,1	
Silwet 312	nc	silicona	organosilicona	no iónico	3	26,7	29,5	11,3	
Break-Thru S 233	134180-76-0	trisiloxano	organosilicona	no iónico	3	23	26,1	10,0	

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Sammons, Robert D.
Ivashuta, Sergey I.
Liu, Hong
Wang, Dafu
Feng, Paul C.C.
Kouranov, Andrei Y.
Andersen, Scott E.

<120> MOLÉCULAS POLINUCLEOTÍDICAS PARA LA REGULACIÓN GÉNICA EN PLANTAS

10 <130> P 101471

<140> vacío
<141> 08-03-2011

<150> 61/311.762
<151> 08-03-2010

15 <150> 61/349.807
<151> 28-05-2010

<150> 61/381.556
<151> 10-09-2010

<160> 320

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1557
<212> ADN
<213> *Amaranthus palmeri*

25 <400> 1

atggctcaag ctactacat caacaatggt gtccatactg gtcaattgca ccatacttta	60
cccaaaaccc agttacccaa atcttcaaaa actcttaatt ttggatcaaa cttgagaatt	120
tctccaaagt tcatgtcttt aaccaataaa agagttggtg ggcaatcatc aattgttccc	180
aagattcaag cttctgttgc tgctgcagct gagaaacctt catctgtccc agaaattgtg	240
ttacaaccca tcaaagagat ctctggtact gttcaattgc ctgggtcaaa gtctttatcc	300
aatcgaatcc ttcttttagc tgctttgtct gagggcacia cagtggcga caacttgctg	360
tatagtgatg atattcttta tatgttggac gctctcagaa ctcttggttt aaaagtggag	420
gatgatagta cagccaaaag ggcagtcgta gagggttgtg gtggtctggt tcctgttggg	480
aaagatggaa aggaagagat tcaacttttc cttggtaatg caggaacagc gatgccccca	540
ttgacagctg cggttgccgt tgctggagga aattcaagtt atgtgcttga tggagtacca	600
agaatgaggg agcgcccat tggggatctg gtagcaggtc taaagcaact tggttcagat	660
gtagattggt ttcttggcac aaattgccct cctgttcggg tcaatgctaa aggaggcctt	720
ccagggggca aggtcaagct ctctggatcg gttagtagcc aatatttaac tgcacttctc	780
atggctactc ctttgggtct tggagacgtg gagattgaga tagttgataa attgatttct	840

ES 2 809 679 T3

gtaccgtatg ttgaaatgac aataaagttg atggaacgct ttggagtatc cgtagaacat 900
 agtgatagtt gggacaggtt ctacattcga ggtggtcaga aatacaaadc tcctggaaag 960
 gcatatgttg agggatgatgc ttcaagtgc agctacttcc tagccggagc cgccgtcact 1020
 ggtgggactg tcaactgtcaa gggttgtgga acaagcagtt tacaggggtga tgtaaaatth 1080
 gccgaagttc ttgagaagat gggttgcaag gtcacctgga cagagaatag tgtaactgth 1140
 actggaccac ccagggattc atctggaaaag aaacatctgc gtgctatcga cgtcaacatg 1200
 aacaaaatgc cagatgttgc tatgactctt gcagttgttg cttgtatgc agatgggccc 1260
 accgccatca gagatgtggc tagctggaga gtgaaggaaa ccgaacggat gattgccatt 1320
 tgcacagaac tgagaaagct tggggcaaca gttgaggaag gatctgatta ctgtgtgatc 1380
 actccgcctg aaaagctaaa ccccaccgcc attgaaactt atgacgatca ccgaatggcc 1440
 atggcattct ctcttgctgc ctgtgcagat gttcccgta ctatccttga tccgggatgc 1500
 acccgtaaaa ccttcccga ctactttgat gtttagaaa agttcgccaa gcattga 1557

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

5

<400> 2
 atgccccaaa tgggacttgt atctgctgth aatttgagag tccaaggtaa ttcagcttat 60
 ctttgagact cgaggtcttc gttgggaact gaaagtcaag atgtttgctt gcaaaggaat 120
 ttgttatgth ttggtagtag cgactccatg gggcataagt taaggattcg tactccaagt 180
 gccacgacc ccagattgac aaaggactth aatcctthaa aggtagtctg cattgattat 240
 ccaagaccag agctagacaa tacagttaac tatttgaggc cggcgthatt atcatcatcg 300
 tttcgtactt cctcacgccc aactaaacca ttggagattg ttattgctgg tgcaggtthg 360
 ggtggthtth ctacagcaaa atatctggca gatgctggtc acaaaccgat attgctggag 420
 gcaagagatg tcctaggtgg gaaggtagct gcatggaaaag atgatgatgg agattggtac 480
 gagactgggt tgcacatatt ctttggggct taccxaaata tgcagaacct gthtggagaa 540
 ctagggattg atgatcgtht gcagtggaag gaacattcaa tgatattthc gatgcctaac 600
 aagccagggg agttcagccg cthtgattth cctgaagctc thcctgccc attaaatgga 660
 atthtggcca tactaaagaa caacgaaatg cttacgtggc ccgagaaagt caaattthct 720
 attggactct tgccagcaat gcttggaggc caatcttatg ttgaagctca agacggtthta 780
 agtgthtaagg actggatgag aaagcaaggc gtgcctgata gggtgacaga tgagggtthc 840
 attgccatgt caaaggcact taacttcata aacctgacg agctthcgat gcagtgcatt 900
 ttgattgctt tgaacagatt tcttcaggag aaacatgtht caaaaatggc cththtagat 960

ES 2 809 679 T3

ggtaaccctc ctgagagact ttgcatgccg atttgtggaac atattgagtc aaaaggtggc 1020
 caagtcagac taaactcacg aataaaaaag atcgagctga atgaggatgg aagtgtcaaa 1080
 tgttttatac tgaataatgg cagtacaatt aaaggagatg cttttgtggt tgccactcca 1140
 gtggatatct tgaagcttct tttgcctgaa gactggaaag agatcccata tttccaaaag 1200
 ttggagaagc tagtgggagt tcctgtgata aatgtccata tatggtttga cagaaaactg 1260
 aagaacacat ctgataatct gctcttcagc agaagcccgt tgctcagtgt gtacgctgac 1320
 atgtctgtta catgtaagga atattacaac cccaatcagt ctatgttgga attggtatct 1380
 gcacccgcag aagagtggat aaatcgtagt gactcagaaa ttattgatgc tacaatgaag 1440
 gaactagcga agcttttccc tgatgaaatt tcggcagatc agagcaaagc aaaaatattg 1500
 aagtatcatg ttgtcaaac cccaaggtct gtttataaaa ctgtgccagg ttgtgaacct 1560
 tgtcggccct tgcaaagatc ccctatagag ggtttttatt tagctggtga ctacacgaaa 1620
 cagaagtact tggcttcaat ggaaggtgct gtcttatcag gaaagctttg tgcacaagct 1680
 attgtacagg attacgagtt acttcttggc cggagccaga agatggtggc agaagcaagc 1740
 gtagttagca tagtgaacta a 1761

<210> 3
 <211> 559
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 3

ggcccatagg cctttttcta aaataggccc atttaagcta ttaacaatct tcaaaagtac 60
 cacatcgctt aggtaaagaa agcagctgag tttatatatg gttagagacg aagtagtgat 120
 tgcgacgagc gacgtctcgc cctcatcgca atccacgcca ttgagcttga ggccattggc 180
 gacggccgag aggcggtcgc ttaagattag catgtccttg acgcggagtt cttccagacc 240
 gttcatcacg gtcgcccctt ccgcgaaggc ggcggcgaca gcgagaatcg gatattcgtc 300
 gatcatcgaa ggcgcgcggt cttccggcac cgtgacgcat aaacacggtg ccggaagacc 360
 gcgcgcttc gatgatcgac gaatatccga ttctcgctgt cgccgcccgc ttcgcggaag 420
 gggcgaccgt gatgaacggt ctggaagaac tccgcgtcaa ggaaagcgac cgcctctcgg 480
 ccgtcgccaa tggcctcaag ctcaatggcg tggattgcca tgagggcgag acgtcgctcg 540
 tcgttttttt tggcaaaaa 559

10

<210> 4
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 4		
	tcccacatcg		10
5	<210> 5		
	<211> 13		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Construcción sintética		
	<400> 5		
	aagattagca cgg		13
	<210> 6		
	<211> 11		
15	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 6		
20	acgcataaaaa t		11
	<210> 7		
	<211> 6		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 7		
	tttttt		6
	<210> 8		
30	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>		
	<400> 8		
	accctccacg actgcccttt		20
35	<210> 9		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>		
	<400> 9		
40	gtttccttca ctctccagc		19
	<210> 10		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>		
45	<400> 10		
	gtagcttgag ccattattgt		20
	<210> 11		
	<211> 20		
	<212> ADN		
50	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>		

	<400> 11 gttgatggta gtagcttgag	20
5	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Amaranthus palmeri</i>	
	<400> 12 accctccacg actgcccttt	20
10	<210> 13 <211> 19 <212> ADN <213> <i>Amaranthus palmeri</i>	
	<400> 13 gtttccttca ctctccagc	19
15	<210> 14 <211> 18 <212> ADN <213> <i>Hordeum vulgare</i>	
20	<400> 14 aagcggttga gcactgaa	18
	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Amaranthus palmeri</i>	
25	<400> 15 accctccacg actgcccttt	20
30	<210> 16 <211> 40 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 16 taatacgact cactataggg caagagatgt cctaggtggg	40
35	<210> 17 <211> 44 <212> ADN <213> secuencia artificial	
40	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 17 taatacgact cactatagga cagatttctt caggagaaac atgg	44
45	<210> 18 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
50	<400> 18 gcaagagatg tcctaggtgg g	21

	<210> 19	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 19	
	acagatttct tcaggagaaa catgg	25
10	<210> 20	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
15	<400> 20	
	taatacgcact cactataggc atctccttta attgtactgc c	41
20	<210> 21	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 21	
	taatacgcact cactataggt ttaattgtac tgccattatt c	41
25	<210> 22	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 22	
	catctccttt aattgtactg cc	22
35	<210> 23	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
40	<400> 23	
	ttaattgta ctgccattat tc	22
45	<210> 24	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 24	
	cacttccatc ctcatcagc tcgat	25
50	<210> 25	
	<211> 24	

	<212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
5	<400> 25 acacctcatc tgtcaccta tcag	24
	<210> 26 <211> 24 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 26 cagtctcgta ccaatctcca tcat	24
15	<210> 27 <211> 41 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
20	<400> 27 taatacgact cactataggg atccatgata tcgtgaacat c	41
	<210> 28 <211> 38 <212> ADN <213> secuencia artificial	
25	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 28 taatacgact cactataggg gcaaagaaaa atgcgtcg	38
	<210> 29 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
30	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 29 atccatgata tcgtgaacat c	21
35	<210> 30 <211> 18 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
40	<400> 30 gcaaagaaaa atgcgtcg	18
	<210> 31 <211> 40 <212> ADN <213> secuencia artificial	
45		
50		

	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 31		
	tgttttatac tgaataatgg cagtacaatt aaaggagatg		40
5	<210> 32		
	<211> 15		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Construcción sintética		
	<400> 32		
	catctccttt aattg		15
	<210> 33		
	<211> 18		
15	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 33		
20	catctccttt aattgtac		18
	<210> 34		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 34		
	catctccttt aattgtactg c		21
	<210> 35		
30	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
35	<400> 35		
	catctccttt aattgtactg ccattattca gta		33
	<210> 36		
	<211> 21		
	<212> ADN		
40	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 36		
	gcagtacaat taaaggagat g		21
45	<210> 37		
	<211> 1614		
	<212> ADN		
	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>		
50	<400> 37		

ES 2 809 679 T3

tcaatttcat ctattggaag tgatTTTTTg ggtcattctg tgagaaattt cagtgttagt 60
aaagtttatg gagcaaagca aagaaatggg cactgccctt taaaggttgt ttgtatagat 120
tatactaggc cagagcttga aagtacatcc aatttcttgg aagccgccta cttatcttct 180
acttttcgga attcgcctcg tcctcagaag ccattagaag ttgtaattgc tggagcaggt 240
ttggctggtc tatccacggc aaagtattta gctgatgcag gtcacaaacc catattgttg 300
gaagcacgag atgttttagg aggaaaggtt gcagcgtgga aggatgagga tggtgactgg 360
tatgagactg ggctacatat attccttggg gcatatccaa atgtccaaaa tctatttgga 420
gaacttggtg taaatgaccg actgcaatgg aaggagcact ctatgatttt tgcaatgccc 480
agcaagcccg gtgaattcag tcgctttgat tttcccgaaa tcctgcctgc accattaat 540
ggcatatggg caatcctaag aaataatgaa atgctaacct ggccagaaaa aatcaagttt 600
gccattggct tgttgctgc tatggcaggc ggacagtc atgttgaagc acaagatggg 660
ttgagtgtcc aagagtggat gagaaaaca ggagtaccg atcgtgtaac tgatgatgtg 720
tttattgcca tgtcaaaggc actgaacttc ataaatccc atgaactttc aatgcagtgc 780
atcttgattg ctctgaaccg attcctgcag gagaaacatg gttctaagat ggccttcta 840
gacggaaacc ctccagagag gctgtgcatg cctattgtta aacacatcga gtcactaggt 900
ggtgaagtta aacttaactc tcgtatacaa aagattcagt tggaccagag tgggaagcgtg 960
aagagttttt tgctaaataa cgggagggaa atacgaggag atgcctatgt ttttgccacc 1020
ccagttgaca tcttgaagct gttactacct gatacttggg aggaaatctc atacttcaaa 1080
aaacttgaga aattagtggg cgttcctgtg attaatgttc acatatggtt tgacagaaaa 1140
ttaaagaata catatgacca tctactcttc agcaggagtc ctcttttgag tgtctatgct 1200
gatatgtcgg agacatgcaa ggaatataag gatccaaata gatccatgct ggaattgggt 1260
tttgaccccg cggaggaatg gatttcacga agcgacactg atattataga ggcaacaatg 1320
aaagagcttg ccaagctttt cccgatgaa atcgctgccg atggaagcaa ggccaagatc 1380
ctcaaatac atgtcgtcaa aactccaagg tcggtttata agactgtacc ggattgtgaa 1440
cctgtcggc cgctgcaaag atcaccaata gagggtttct atttagctgg tgattacaca 1500
aaacaaaaat atttgcttc tatggaaggt gctgtcttat ctgggaagct ttgtgcacag 1560
gctatcgtac aggattatga tctgctgagt tctcgagcac aaagagaatt ggcg 1614

5 <210> 38
<211> 1761
<212> ADN
<213> *Nicotiana benthamiana*
<400> 38

ES 2 809 679 T3

atgccccaaa tcggacttgt atctgctggt aatttgagag tccaaggtaa ttcagcttat 60
ctttggagct cgaggtcttc gttgggaact gaaagtcaag atgtttgctt gcaaaggaat 120
ttgttatggt ttggtagtag cgactccatg gggcataagt taaggattcg tactccaagt 180
gccacgaccc gaagattgac aaaggacttt aatcctttaa aggtagtctg cattgattat 240
ccaagaccag agctagacaa tacagttaac tatttggagc cggcgttatt atcatcatcg 300
tttcgtactt cctcacgccc aactaaacca ttggagattg ttattgctgg tgcaggtttg 360
ggtggtttgt ctacagcaaa atatctggca gatgctggtc acaaaccgat attgctggag 420
gcaagagatg tcctaggtgg gaaggtagct gcatggaaaag atgatgatgg agattggtac 480
gagactgggt tgcacatatt ctttggggct taccxaaata tgcagaacct gtttggagaa 540
ctagggattg atgatcgggt gcagtggaag gaacattcaa tgatatttgc gatgcctaac 600
aagccagggg agttcagccg ctttgatttt cctgaagctc ttcttgcgcc attaaatgga 660
atthtggcca tactaaagaa caacgaaatg cttacgtggc ccgagaaagt caaatttgcct 720
attggactct tgccagcaat gcttggaggg caatcttatg ttgaagctca agacggttta 780
agtgttaagg actggatgag aaagcaagggt gtgcctgata gggtgacaga tgaggtgttc 840
attgccatgt caaaggcact taacttcata aaccctgacg agctttcgat gcagtgcatt 900
ttgattgctt tgaacagatt tcttcaggag aaacatgggt caaaaatggc ctttttagat 960
ggtaaccctc ctgagagact ttgcatgccg attgtggaac atattgagtc aaaaggtggc 1020
caagtcagac taaactcacg aataaaaaag atcgagctga atgaggatgg aagtgtcaaa 1080
tgthttatac tgaataatgg cagtacaatt aaaggagatg cthttgtgtt tgccactcca 1140
gtggatatct tgaagcttct tttgcctgaa gactggaaaag agatcccata tttccaaaag 1200
ttggagaagc tagtgggagt tcctgtgata aatgtccata tatggtttga cagaaaactg 1260
aagaacacat ctgataatct gctcttcagc agaagcccgt tgctcagtgt gtacgctgac 1320
atgtctgtta catgtaagga atattacaac cccaatcagt ctatgttgga attggtatth 1380
gcacccgcag aagagtggat aaatcgtagt gactcagaaa ttattgatgc tacaatgaag 1440
gaactagcga agctthtccc tgatgaaatt tcggcagatc agagcaaagc aaaaatattg 1500
aagtatcatg ttgtcaaaac cccaaggtct gthttataaaa ctgtgccagc ttgtgaaccc 1560
tgtcggccct tgcaaagatc ccctatagag ggtthttatt tagctggtga ctacacgaaa 1620
cagaagtact tggcttcaat ggaagggtgct gtcttatcag gaaagctthg tgcacaagct 1680
attgtacagg attacgagtt acttcttggc cggagccaga agatgthggc agaagcaagc 1740
gtagttagca tagtgaacta a 1761

<210> 39
<211> 22
<212> ADN

<213> *Nicotiana benthamiana*

<400> 39

ggcagtacaa ttaaaggaga tg

22

<210> 40

<211> 1557

<212> ADN

<213> *Amaranthus palmeri*

<400> 40

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

5

10

ES 2 809 679 T3

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

5

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

<400> 41
 cgccagggct gcagacgcgt tacgtantcg gatccagaat tcgtgattaa cgtcacagca 60
 tgtcatgtaa aacacgcgaa tcagaccggg cactcttctg ttttaatttga gacaattttg 120
 atgttgagtc atccccacacc aacccccaaaa aattcaacaa caaactotta taatgattcc 180
 ctctactcta ctagagtcta caccaaccca ctttctcttt gcccaccaaa actttggggtt 240
 ggtaagaact 250

10

<210> 42
 <211> 244
 <212> ADN
 <213> *Amaranthus palmeri*

15

<400> 42
 caccaaccca ctttctcttt gcccaccaaa actttggggtt ggtaagaact aagccctctt 60
 ctttcccttc tctctcttaa aagcctaaaa tccacctaac tttttcagcc aacaacaac 120
 gccaaattca gaggaagaat aatgatggct caagctacta ccatcaacaa tgggtgtccat 180
 actgggtcaat tgcaccatac tttacccaaa acccagttac ccaaactctt aaaaactctt 240
 aatt 244

20

<210> 43
 <211> 250
 <212> ADN
 <213> *Amaranthus palmeri*

<400> 43
 ccatacttta cccaaaaccc agttacccaa atcttcaaaa actcttaatt ttggatcaaa 60
 cttgagaatt tctccaaagt tcatgtcttt aaccaataaa agagttgggtg ggcaatcatc 120
 aattgttccc aagattcaag cttctgttgc tgctgcagct gagaaacctt catctgtccc 180
 agaaattgtg ttacaaccca tcaaagagat ctctgggtact gttcaattgc ctgggtcaaa 240
 gtctttatcc 250

25

<210> 44
 <211> 250
 <212> ADN
 <213> *Amaranthus palmeri*

<400> 44
 tcaaagagat ctctgggtact gttcaattgc ctgggtcaaa gtctttatcc aatcgaatcc 60

ES 2 809 679 T3

	ttcttttagc tgctttgtct gagggcacia cagtggtcga caacttgctg tatagtgatg	120
	atattcttta tatgttgac gctctcagaa ctcttggtt aaaagtggag gatgatagta	180
	cagccaaaag ggcagtcgta gagggttgtg gtggctctgtt tcctgttggt aaagatggaa	240
	aggaagagat	250
	<210> 45	
	<211> 250	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>	
	<400> 45	
	gagggttgtg gtggctctgtt tcctgttggt aaagatggaa aggaagagat tcaacttttc	60
	cttggtaatg caggaacagc gatgcgccca ttgacagctg cggttgccgt tgctggagga	120
	aattcaagtt atgtgcttga tggagtacca agaagtgagg agcgccccat tggggatctg	180
	gtagcaggtc taaagcaact tggttcagat gtagattggt ttcttggcac aaattgcct	240
	cctgttcggg	250
	<210> 46	
10	<211> 250	
	<212> ADN	
	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>	
	<400> 46	
	tggttcagat gtagattggt ttcttggcac aaattgcct cctgttcggg tcaatgctaa	60
	aggaggcctt ccagggggca aggtcaagct ctctggatcg gttagtagcc aatatttaac	120
	tgcacttctc atggctactc ctttgggtct tggagacgtg gagattgaga tagttgataa	180
	attgatttct gtaccgtatg ttgaaatgac aataaagttg atggaacgct ttggagtatc	240
	cgtagaacat	250
15	<210> 47	
	<211> 250	
	<212> ADN	
	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>	
	<400> 47	
	ttgaaatgac aataaagttg atggaacgct ttggagtatc cgtagaacat agtgatagtt	60
	gggacagggt ctacattcga ggtggtcaga aatacaaatc tcctggaaag gcatatggtg	120
	agggtgatgc ttcaagtgct agctacttcc tagccggagc cgccgtcact ggtgggactg	180
	tcactgtcaa gggttgtgga acaagcagtt tacagggtga tgtaaaattt gccgaagttc	240
20	ttgagaagat	250
	<210> 48	
	<211> 250	
	<212> ADN	
	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>	

ES 2 809 679 T3

	<400> 48	
	acaagcagtt tacaggggtga tgtaaaatth gccgaagttc ttgagaagat gggttgcaag	60
	gtcacctgga cagagaatag tgtaactgth actggaccac ccagggattc atctggaaa	120
	aaacatctgc gtgctatcga cgtcaacatg aacaaaatgc cagatgthgc tatgactctt	180
	gcagttgthg ccttgthtgc agatggggccc accgccatca gagatgtggc tagctggaga	240
	gtgaaggaaa	250
	<210> 49	
5	<211> 250	
	<212> ADN	
	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>	
	<400> 49	
	agatggggccc accgccatca gagatgtggc tagctggaga gtgaaggaaa ccgaacggat	60
	gattgccatt tgcacagAAC tgagaaagct tggggcaaca gttgaggaag gatctgatta	120
	ctgtgtgatc actccgctg aaaagctaaa cccaccgcc attgaaactt atgacgatca	180
	ccgaatggcc atggcattct ctcttgctgc ctgtgcagat gttcccgthca ctatccttga	240
	tccgggatgc	250
	<210> 50	
10	<211> 257	
	<212> ADN	
	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>	
	<400> 50	
	ctcttgctgc ctgtgcagat gttcccgthca ctatccttga tccgggatgc acccgtaaaa	60
	ccttcccgga ctactttgat gttttagaaa agttcgccaa gcattgatga gtagctatat	120
	acgagatcct taaattgtac gccgaaggth ttgatttgag tctaatagta gataaaaggc	180
	tataaataaa ctggctttct gcttgagtaa ttatgaaatt ctttgtatta tgtttgtgag	240
	atthgaagta gcttata	257
	<210> 51	
15	<211> 273	
	<212> ADN	
	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>	
	<400> 51	
	taattatgaa attctthgta ttatgththg gagatthgaa gtagcttata aattacaatg	60
	tactaaagth tagaaataag ttatgtatct thtaaatcaa tgagaaatgc atacttgaaa	120
	ggcttgacct tgtatththg acctaaagag tactaactth ggagththcca actcattthg	180
	ttatctcatt thththththth thththththth aatthththth thththththth aatcatgth	240
	ctthctththth thththththth thththththth thththththth thththththth	273
20	<210> 52	

ES 2 809 679 T3

<211> 301
 <212> ADN
 <213> *Amaranthus palmeri*

<400> 52

tatgagtaat	catgtatctt	tcttattcta	accaaagtga	atactccttc	caactctctt	60
taaacgtcca	cactctgggc	acagagtgta	atagtgtggt	ggttggagtc	ttttaagtga	120
ttataataat	tgtaaagtgtg	gtagttagaa	tattttaagt	aatgtaggtg	gggtattatg	180
gtcttgttga	acataggata	tttaggtaaa	aatctatgc	aaaaaaagga	aagtaagcaa	240
ataaagcgaa	ttgacctgaa	aagaaaagtg	gacatgtata	gtgagttgga	ggaagtattt	300
t						301

5

<210> 53
 <211> 1710
 <212> ADN
 <213> *Lactuca sativa*

<400> 53

atgtctctgt	ttggaaatgt	ttctgccatt	aactcaagtg	gaaagtgtat	agtaatgaat	60
ctttcaagca	cacaaatcac	ttcaagagat	tgtttcaaga	ttacctcagg	gcaaaaagat	120
gttttgatcat	ttggatgctg	tgatgctatg	ggtaacagat	tgcaattccc	aagtgctcgt	180
tcttttacac	caagatcaaa	gaagaatgtc	tcccctctaa	aggtagtttg	tgttgattat	240
ccaagaccag	atcttgataa	cacatcta	ttcttgggaag	ctgctcactt	gtcttcaacc	300
ttcagaactt	ccccacgcc	atctaagcca	ttgaagattg	taattgctgg	tgtaggttta	360
gctgggttat	caactgctaa	gtatttagct	gatgcaggtc	acaagccaat	tttactagaa	420
gcaagagatg	ttcttgggtg	aaaggtggca	gcttggaaag	atgatgatgg	agattggtat	480
gagacaggtt	tacacatatt	ctttggagct	tacccaaatg	tacaaaattt	atttgagag	540
ctaggaatta	atgatagatt	acagtggaag	gagcattcta	tgatatttgc	aatgccaaat	600
aagcctggag	aatttagtag	gtttgacttc	ccagatgttt	tacctgcacc	attgaatgga	660
atTTTTgcta	tattgaggaa	caatgaaatg	ctgacgtggc	ctgagaaagt	gaagtttgca	720
attgggctgt	tgcttgcaat	gttaggtgga	caggcttatg	ttgaggcca	agatgggctt	780
agtgttcagg	actggatgag	aaagcaaggt	atacctgatc	gagttactac	tgaagtgttt	840
attgcaatgt	caaaagcatt	aaactttata	aatccagatg	aactttcaat	gcaatgtatt	900
ctcattgctc	taaaccgttt	tcttcaggaa	aagcatgggt	ccaagatggc	atTTTTtagat	960
gggagcccac	cagaaagact	ttgcaagcca	attggtgacc	acatcgagtc	actcggtggc	1020
caagtcagag	tcaactcacg	aatacaaaaa	attgagttaa	acaagacgg	aactgtccgg	1080

10

ES 2 809 679 T3

	aactttctat tgagtgatgg gaatgttcta gaagctgatg cttatgtttt cgctaccct	1140
	gttgacattc tcaagcttct tttaccogaa gaatggaaac caattccata tttcaaaaaa	1200
	ttagagaagt tagtcggtgt tcctgttata aacgttcata tatggtttga cagaaagctg	1260
	aaaaacacat atgatcactt acttttcagt aggtcacctc tgctgagtgt gtatgctgac	1320
	atgtcagtga catgtaagga atattatgat ccgaataagt caatgttgga gttggttctt	1380
	gctccagctg aggaatggat ttcaagaagt gacactgata ttattgatgc aacaatgagt	1440
	gaactttcaa ggctttttcc tgatgaaatt gcagctgatc aaagtaaagc aaaaatcttg	1500
	aaatataaag ttgttaaaac accaaggtct gtttataaaa ctgttccaga ttgtgaacca	1560
	tgctgacccc tacaagatc tccaattcaa ggattttatt tatctggtga ttatactaaa	1620
	caaaagtatt tggcttcaat ggggggtgct gttttatctg gaaaaatttg tgcacaagct	1680
	attttacaag attatgagat gcttgctaca	1710
5	<210> 54 <211> 42 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 54 taatacgact cactataggg tttggagctt acccaaagt ac	42
10	<210> 55 <211> 45 <212> ADN <213> secuencia artificial	
15	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 55 taatacgact cactataggg aggccacgtc agcatttcat tgttc	45
20	<210> 56 <211> 23 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
25	<400> 56 ccattcaatg gtgcaggtaa aac	23
30	<210> 57 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 57	

	catagaatgc tccttcact g	21
	<210> 58	
	<211> 33	
5	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 58	
	caaataaatt ttgtacattt gggtaagctc caa	33
10	<210> 59	
	<211> 2349	
	<212> ADN	
	<213> <i>Solanum lycopersicum</i>	
	<400> 59	
	gggtttatct cgcaagtgtg gctatggtgg gacgtgtcaa attttggatt gtagccaaac	60
	atgagatttg atttaaaggg aattggccaa atcaccgaaa gcaggcatct tcatcataaa	120
	ttagtttggt tatttataca gaattatacg cttttactag ttatagcatt cggtatcttt	180
	ttctgggtaa ctgccaaacc accacaaatt tcaagtttcc atttaactct tcaacttcaa	240
	cccaacccaaa tttatattgct taattgtgca gaaccactcc ctatatcttc taggtgcttt	300
	cattcgttcc gagtaaaatg cctcaaattg gacttgtttc tgctgttaac ttgagagtcc	360
	aaggtagttc agcttatctt tggagctcga ggctcgtcttc tttgggaact gaaagtcgag	420
	atggttgctt gcaaaggaat tcgttatggt ttgctggtag cgaatcaatg ggtcataagt	480
	taaagattcg tactccccat gccacgacca gaagattggt taaggacttg gggcctttaa	540
	aggtcgtatg cattgattat ccaagaccag agctggacaa tacagttaac tatttgagg	600
	ctgcattttt atcatcaacg ttccgtgctt ctccgcgcc aactaaacca ttggagattg	660
	ttattgctgg tgcaggtttg ggtggtttgt ctacagcaaa atatttgga gatgctggtc	720
	acaaaccgat actgctggag gcaagggatg ttctaggtgg aaaggtagct gcatggaaag	780
	atgatgatgg agattggtac gagactggtt tgcatatatt ctttggggct taccxaaata	840
	ttcagaacct gtttgagaa ttagggatta acgatcgatt gcaatggaag gaacattcaa	900
	tgatatttgc aatgccaaagc aagccaggag aattcagccg ctttgatttc tccgaagctt	960
	taccgctcc tttaaatgga attttagcca tcttaaagaa taacgaaatg cttacatggc	1020
	cagagaaagt caaatgtgca attggactct tgccagcaat gcttgagggg caatcttatg	1080
15	ttgaagctca agatgggata agtggttaagg actggatgag aaagcaaggt gtgccggaca	1140

ES 2 809 679 T3

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

<210> 60
<211> 200
<212> ADN
<213> secuencia artificial

5

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 60

tcgcagcgac tcagaaatta ttgatgcaac gatgaaggaa ctagcaacgc tttttcctga 60
tgaaatttca gcagatcaaa gcaaagcaaa aatattgaag taccatggtg tcaaaaactcc 120
gaggtctggt tataaaaactg tgccagggtg tgaaccctgt cggcctttac aaagatcccc 180
aatagagggg ttttatttag 200

10

<210> 61
<211> 43
<212> ADN

	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 61	
5	taatacgact cactataggg tcgcagcgac tcagaaatta ttg	43
	<210> 62	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 62	
	taatacgact cactataggg gtaaaggccg acagggttca caacc	45
	<210> 63	
15	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
20	<400> 63	
	cuaccaucaa caaugguguc c	21
	<210> 64	
	<211> 21	
25	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 64	
	ggacaccauu guugauggua g	21
30	<210> 65	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Construcción sintética	
	<400> 65	
	gucgacaacu ugcuguauag u	21
	<210> 66	
	<211> 21	
40	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 66	
45	acuauacagc aaguugucga c	21
	<210> 67	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	

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

ES 2 809 679 T3

ttggaggttt ccttttcatt ggттааgааа attacattgc ctagaagaaa ttgtagttgc 120
 aatттtaggc aattaggagg ggggaggaga tggcgttacg tttcggtgtg tagactttct 180
 gtcactactg attatgtttc tgagcaagga aatgctgttt ctcttgaaaa tgcatatagt 240
 gagagtaaag aagagggtct catcttgaag ccttctccta agccggtttt gaaatccggg 300
 tctgatggaa atcggaatt tggggagagt tccgtggcgt tttcgagtaa tgggaaattg 360
 gataatgtag aggagaggaa gaaggттatt gattcattgg atgaggтatt agaaaaggcc 420
 gagagattag aaacggcgaa cttacaagca gataatagaa aggatagcac aatgтааat 480
 aaaccgtctc cgagtgтааg tagttcaacc aatggтааac ctgтааataa tttgaacaaa 540
 gggaaгccta aagctгcгaa gagcgттtgг agaaaggгaa atccagттtc tactgtгcaa 600
 aaagtagtgс ааgаatctcc gaagattgaa aaggттgaga gagtggaagc tcgaaгcacc 660
 agccaatcgt ctgaaacgat aagacccccca gtgсcactac agaggсctga gattaagттg 720
 caggcaaagc cttctactgc tcctccaccc atgcctaaga agccggттtt gaaggatgtg 780
 gggatgtcct ccagagctga tgggaaggac cagtctgtga aatctaaaga gaggaagсct 840
 attctagtgg аcaaatттgc caccaagaag gcatcagттg atccgtcgat tgctcaagca 900
 gтаattgccc caccaaaacc tgctaaatтт ccttctggaa agтттааaga tgattatcgg 960
 ааgаaggгtc ttgсagctgg tgggсcгaaг aggcgtatgg tcaatgatga tgatattgaa 1020
 atgсatgаag асacttcaga gctcggtctt tctattcctg gtgctgctac ggctcgгaaa 1080
 ggcaggaaat ggagтаaggс аagtcгcaag gctгccagac gccaaгcagc tagagatgсc 1140
 gctcctgtta aagtggaaat cttagaggтт gaagaaaagg gсatgtгgac cгааgаatta 1200
 gcatacaact tggctattag cгаaggтgaa attcttgggt acctgtattc таaggгgata 1260
 aaaccagatg gtgtгcaaac tcttgacaag gcaatggтаa агatgatatg тgaaagatat 1320
 gacgtggagg tттtgгacгc actттctgaa caaatggaaг аaatggctгг ааgаaggгaa 1380
 atттtcгacг аagatгacct тgacaagctt gaagataggc ctсctgtгct tactataatg 1440
 ggtcatgtag atcatggcaa gacгaccctt ctggattata tacggaaгag caaggттgct 1500
 gcttctgаag ctggтgggгat tacacaaggт attggтgctt ataaagtгgа агtaccгgtt 1560
 gatggcaagt тgctгccttg тgtctттctt gacactccгг gacacгaggc gttcggгггca 1620
 atgaggггctc gtggagcaag агtgacagat attgctatta tagттgtagc тgctгacгat 1680
 gggatccгtc ctcaaacaaa тgaaгccata gcacatгcaa аagcagctгг тgtacctatt 1740
 gtggттgcaa ттаатаagat тgacaaggat gggгctaatc cggaccгgtg gatгcaagag 1800
 cттtcatcaa тtgгtctaат gccagaggat tggгgtгgtg atacccccaat ggtcaagata 1860
 агtgctctaa аaggтgаaaa тgtggacгag тtactгgaga cagccatgct тgtгcгcгag 1920

ES 2 809 679 T3

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

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

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 72

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

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

15 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 73

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

	ggauagcaca aauguaaaua aaccgucucc gaguguaagu	160
	<210> 74 <211> 160 <212> ARN <213> secuencia artificial	
5	<220> <223> Construcción sintética <400> 74	
	acuuacacuc ggagacgguu uauuuacauu ugugcuaucc uuucuaauau cugcuuguaa	60
	guucgccgguu ucuaauncucu cggccuuuuc uauuaccuca uccaugaau caauaacuu	120
	cuuccucucc ucuacauuau ccaauuuccc auuacucgaa	160
10	<210> 75 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
15	<220> <223> Construcción sintética <400> 75	
	atttctcaa acgctcttcg ca	22
20	<210> 76 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética <400> 76	
25	atccaatttc ccattactcg aa	22
	<210> 77 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
30	<220> <223> Construcción sintética <400> 77	
	gtttctaadc tctcggcctt tt	22
35	<210> 78 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética <400> 78	
40	ttgaactact tacactcggg g	21
	<210> 79 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
45	<220>	

	<223> Construcción sintética	
	<400> 79	
	taaccttctt cctctcctct a	21
5	<210> 80 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
10	<400> 80	
	gtccttccca tcagctctgg a	21
	<210> 81 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial	
15	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 81	
	cgtagcagca ccaggaatag	20
20	<210> 82 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
25	<400> 82	
	cagcagctac aactataata g	21
	<210> 83 <211> 25 <212> ARN <213> secuencia artificial	
30	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 83	
	cuaccaucaa caaugguguc cauac	25
35	<210> 84 <211> 27 <212> ARN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
40	<400> 84	
	guauggacac cauuguugau gguagua	27
	<210> 85 <211> 23 <212> ARN <213> secuencia artificial	
45	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 85	
50		

	aguuggugg caaucauca uug	23
	<210> 86	
	<211> 27	
5	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 86	
	aacaauugau gauugcccac caacucu	27
10	<210> 87	
	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Construcción sintética	
	<400> 87	
	ggucgacaac uugcuguaua guga	24
	<210> 88	
20	<211> 27	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 88	
25	aucacuaauac agcaaguugu cgaccuc	27
	<210> 89	
	<211> 24	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 89	
	ugcaagguca ccuggacaga gaaa	24
35	<210> 90	
	<211> 27	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
40	<400> 90	
	uauucucugu ccaggugacc uugcaac	27
	<210> 91	
	<211> 21	
45	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 91	
	aacaugaaca aaaugccaga u	21
50	<210> 92	

	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 92	
	aucuggcauu uuguucaugu u	21
10	<210> 93	
	<211> 27	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
15	<400> 93	
	guauggacac cauuguugau gguagua	27
	<210> 94	
	<211> 27	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 94	
	uacuaccauc aacauggug uccauc	27
25	<210> 95	
	<211> 27	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
30	<400> 95	
	aauaauugau gauugcccac caacucu	27
35	<210> 96	
	<211> 27	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 96	
	agaguuggug ggcaaucauc aauuauu	27
40	<210> 97	
	<211> 27	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 97	
	aucacuauac agcaaguugu cgaccac	27
50	<210> 98	
	<211> 27	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 98		
	guggucgaca acuugcugua uagugau		27
5	<210> 99		
	<211> 27		
	<212> ARN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Construcción sintética		
	<400> 99		
	uauucucugu ccaggugacc uugcaac		27
	<210> 100		
	<211> 27		
15	<212> ARN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 100		
20	guugcaaggu caccuggaca gagaaua		27
	<210> 101		
	<211> 29		
	<212> ARN		
	<213> secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 101		
	gguauggaca ccuuuguuga ugguguac		29
	<210> 102		
30	<211> 29		
	<212> ARN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
35	<400> 102		
	gcuaccauca acauggugu ccuaccac		29
	<210> 103		
	<211> 29		
	<212> ARN		
40	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 103		
	gaagaauga uguaugccca ccaacucac		29
45	<210> 104		
	<211> 29		
	<212> ARN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> Construcción sintética		

	<400> 104 gaguuggugg gcaaucauca auuauucac	29
5	<210> 105 <211> 27 <212> ARN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
10	<400> 105 gaucacuaua cagcaaguug ucgacac	27
15	<210> 106 <211> 27 <212> ARN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
20	<400> 106 gucgacaacu ugcuguauag ugaucac	27
25	<210> 107 <211> 29 <212> ARN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
30	<400> 107 guauucucug uccaggugac cuugcacac	29
35	<210> 108 <211> 29 <212> ARN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
40	<400> 108 gugcaagguc accuggacag agaauacac	29
45	<210> 109 <211> 58 <212> ARN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
50	<400> 109 guauggacac cauuguugau gguaguagaa auacuaccu caacaauggu guccauac	58
	<210> 110 <211> 58 <212> ARN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
	<400> 110 aauaauugau gauugcccac caacucugaa aagaguuggu gggcaucau cauuuuu	58

ES 2 809 679 T3

	<210> 111 <211> 58 <212> ARN <213> secuencia artificial	
5	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 111 aucacuaauac agcaaguugu cgaccacgaa aguggucgac aacuugcugu auagugau	58
10	<210> 112 <211> 58 <212> ARN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
15	<400> 112 uaauucucugu ccaggugacc uugcaacgaa aguugcaagg ucaccuggac agagaaua	58
20	<210> 113 <211> 168 <212> ARN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 113 gaucacaaau uugccgguuu augaucaau acggaacaua agacagauac acuugaacac	60
	caugauucgc auugggggug ugguuacucg ucguucugga guauuccuc aguugaugca	120
	ggugaaguau gacugcaaua aauguggggc uauccugggu cccuuuuu	168
25	<210> 114 <211> 168 <212> ARN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
30	<400> 114 aaaaagggac ccaggauagc cccacauua uugcaguc auucaccug caucaacuga	60
	gggaauacuc cagaacgacg aguaaccaca cccccaugc gaaucauggu guucaagugu	120
	aucugucuua uguuccguau uugaucauaa accggcaau uugugauc	168
35	<210> 115 <211> 25 <212> ARN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
40	<400> 115 uuuucuaaua ccucauccaa ugaau	25
	<210> 116 <211> 25	

	<212> ARN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
5	<400> 116 auucauugga ugagguauua gaaaa	25
	<210> 117 <211> 25 <212> ARN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 117 uauucugcuug uaaguucgcc guuuc	25
15	<210> 118 <211> 25 <212> ARN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
20	<400> 118 gaaacggcga acuuacaagc agaua	25
	<210> 119 <211> 25 <212> ARN <213> secuencia artificial	
25	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 119 ggagacggguu uauuuacauu ugugc	25
30	<210> 120 <211> 25 <212> ARN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
35	<400> 120 gcacaaaugu aaauaaaccg ucucc	25
	<210> 121 <211> 25 <212> ARN <213> secuencia artificial	
40	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 121 uauuuacagg uuuaccauug guuga	25
45	<210> 122 <211> 25 <212> ARN <213> secuencia artificial	
50		

ES 2 809 679 T3

	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 122		
	ucaaccaaug guaaaccugu aaaua		25
5	<210> 123		
	<211> 185		
	<212> ARN		
	<213> secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 123		
	gacggaaacc cuccagagag gcugugcaug ccuauuguua aacacaucga gucacuaggu		60
	ggugaaguua aacuuaacuc ucguauacaa aagauucagu uggaccagag uggaagcgug		120
	aagaguuuuu ugcuaaaaua cgggagggaa auacgaggag augccuangu uuuugccacc		180
	ccagu		185
15	<210> 124		
	<211> 185		
	<212> ARN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 124		
	acuggggugg caaaaacaua ggcaucuccu cguauuuccc ucccguuauu uagcaaaaaa		60
	cucuucacgc uuccacucug guccaacuga aucuuuugua uacgagaguu aaguuaacu		120
	ucaccaccua gugacucgau guguuuaaca auaggcaugc acagccucuc uggaggguuu		180
20	ccguc		185
	<210> 125		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 125		
	gtgatattac ctccaacacg at		22
30	<210> 126		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
35	<400> 126		
	atagtaagca caggatcgga g		21
	<210> 127		
	<211> 21		

	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
5	<400> 127 ctttcaatcc actgtcaacc g	21
	<210> 128	
	<211> 22	
10	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 128 atcaagcgtt cgaagacctc at	22
15	<210> 129	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Construcción sintética	
	<400> 129 cagcaatggc ggtaggtaac a	21
	<210> 130	
25	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 130 gcaattgccc gaatcctttt a	21
30	<210> 131	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 131 tagctcaata tcaaggtcct a	21
40	<210> 132	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
45	<400> 132 tcataagcac cctctataca c	21
	<210> 133	
	<211> 20	
50	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 133		
	ttcttaacct cgtcggagatg		20
5	<210> 134		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Construcción sintética		
	<400> 134		
	atacccgagt atccttgcaa a		21
	<210> 135		
	<211> 21		
15	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 135		
20	tagggccac ggccttgag t		21
	<210> 136		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 136		
	agcggatata acctcagcta g		21
	<210> 137		
	<211> 21		
30	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
35	<400> 137		
	cttcgtggcc caacgaatga c		21
	<210> 138		
	<211> 21		
	<212> ADN		
40	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 138		
	caagctcggg tcctgcttg c		21
45	<210> 139		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> Construcción sintética		

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

	cgatgtaagg aatttggtaa a	21
	<210> 146 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
5	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 146 cgaggggatt gcagcagaag a	21
10	<210> 147 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
15	<400> 147 gtaggagaat acggtgaagt a	21
	<210> 148 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 148 gacccaaga aaatcgtctg c	21
25	<210> 149 <211> 19 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
30	<400> 149 gtcttacaag ggttctcaa	19
	<210> 150 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
35	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 150 atctatgttc acctccctgt g	21
40	<210> 151 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
45	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 151 ataaaccatt agctttcccg g	21

	<210> 152	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 152	
	tttattggaa caagcggagt t	21
10	<210> 153	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
15	<400> 153	
	tatagcacca cttcccgata g	21
20	<210> 154	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 154	
	gcaccacgag gatcacaaga a	21
25	<210> 155	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 155	
	ccacccgaga aacctctcca a	21
35	<210> 156	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
40	<400> 156	
	cagtcttgac gagtgattcc t	21
45	<210> 157	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 157	
	gttcttcagg gctaaatcgg ga	22
50	<210> 158	
	<211> 22	

	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
5	<400> 158 gttcaagagc ttcaacgaga ac	22
	<210> 159	
	<211> 22	
10	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 159 atacaaaactc caacgcgtcc ag	22
15	<210> 160	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Construcción sintética	
	<400> 160 ctcttggaaa gcatcagtac ca	22
	<210> 161	
	<211> 22	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
30	<400> 161 ctagaaagat acccaccxaa tt	22
	<210> 162	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 162 actagaattc aaacaccac cc	22
40	<210> 163	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
45	<400> 163 tttctgctca ttcaactcct cc	22
	<210> 164	
	<211> 22	
	<212> ADN	
50	<213> secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 164		
	tatgtatgtg cccggttagc tt		22
5	<210> 165		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Construcción sintética		
	<400> 165		
	tcatatccaa gccagatcct c		21
	<210> 166		
	<211> 21		
15	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 166		
20	tgcatcacac atcaccaaga t		21
	<210> 167		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 167		
	gtactcctgt tcaatgccat a		21
	<210> 168		
30	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
35	<400> 168		
	attgatacca gcatagagac a		21
	<210> 169		
	<211> 21		
	<212> ADN		
40	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 169		
	agcaattctc tctagaatgt a		21
45	<210> 170		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> Construcción sintética		

	<400> 170 catcattcct catcgactta g	21
5	<210> 171 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
10	<400> 171 ctctcgttgc cctctccata a	21
15	<210> 172 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
20	<400> 172 caacgccccca ggagaaagt c	21
25	<210> 173 <211> 195 <212> ARN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
	<400> 173 cugaagcugg ugaaggugaa gauggacgaa ugaaaucugc gauuggaauu gggacccuuc	60
	uucaggaugg cuugggagau acgaucaggg ugucucuaac agaaccacca gaagaggaga	120
	uagacccuug cagaagguug gcaaaucuuug gaacaaaagc agcugaaaau cagcaaggag	180
	uggcaccuu ugaag	195
30	<210> 174 <211> 195 <212> ARN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
	<400> 174 cuucaaaugg ugccacuccu ugcugaauuu cagcugcuuu uguuccaaga uuugccaacc	60
	uucugcaagg gucuaucucc ucuucuggug guucuguuag agacaccug aucguaucuc	120
	ccaagccauc cugaagaagg gucccaauuc caaucgcaga uuucauucgu ccaucuucac	180
35	cuucaccagc uucag	195
	<210> 175 <211> 183 <212> ARN <213> secuencia artificial	

ES 2 809 679 T3

	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 175		
	ucccaucaa guucccuaca aaauaugugc aguuuccuau cuuccuugcc gccauucaua	60	
	caaacuaugu ugauuguaca agguggcuug gugauuuugu ucuuucuaag aguguugaca	120	
	augagauugu acugugggag ccaauuauga aggagcaauc uccuggagag gguucaguug	180	
	aca	183	
5	<210> 176		
	<211> 183		
	<212> ARN		
	<213> secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 176		
	ugucaacuga acccucucca ggagauugcu ccuucauaau uggcuccac aguacaaucu	60	
	cauugucaac acucuuaaga agaacaaaau caccaagcca ccuuguacaa ucaacauagu	120	
	uuguaugaau ggcggcaagg aagauaggaa acugcacaua uuuuguaggg aacuuugaug	180	
	gga	183	
15	<210> 177		
	<211> 143		
	<212> ARN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 177		
	uugugcuuaa aacaucgacc agacagacaa uauuucuucc uguuguugga cuaguugauc	60	
	cugauacgcu gaaaccuggu gauuuaguug gugucaacaa agauaguau cuuaaccugg	120	
20	acacucugcc gucggaauau gau	143	
	<210> 178		
	<211> 143		
	<212> ARN		
	<213> secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 178		
	aucauauucc gacggcagag uguccaggau aagauaacua ucuuuguuga caccaacuaa	60	
	aucaccaggu uucagcguau caggaucaac uaguccaaca acaggaagaa auauugucug	120	
	ucuggucgau guuuuaagca caa	143	
30	<210> 179		
	<211> 159		
	<212> ARN		

ES 2 809 679 T3

	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 179	
	cgucgucaguu ggugaaguag aucccgga ggggauuuc cuccgguuc cacgucuggu	60
	ucguauccga gaggauaaa cuccagagga cgccacauc ucugagcagg uggcggauau	120
5	guacagaucu caagcaaaca auccacaccg caaaaagag	159
	<210> 180	
	<211> 159	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 180	
	cucuuuuugc gguguggauu guuugcuuga gaucuguaca uaucgccac cugcucagau	60
	gauguggcgu ccucuggaga uuuauccucu cggauacgaa ccagacgugg aaaccggagu	120
	gaaaucuccu ugccgggauc uacuucacca acugcagcg	159
	<210> 181	
15	<211> 159	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
20	<400> 181	
	uaaagauggc ggaaaaaucg acuaugauaa auugauugac aaauucggcu gucagcgacu	60
	ugauuuauucg cucauucaga gaaugagcg caucacugcu cguccugcuc auguauuuu	120
	ucgccgcaac guuuucuucg cucaccguga uuugaauga	159
	<210> 182	
	<211> 159	
	<212> ARN	
25	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 182	
	ucauucaaau cacggugagc gaagaaaacg uugcggcgaa gaaauacaug agcaggacga	60
	gcagugaugc gcucauuuc cugaaugagc gauaaaucg gucgcugaca gccgaauuug	120
	ucaaucauu uaucauaguc gauuuuuccg ccaucuua	159
30	<210> 183	
	<211> 150	
	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	

ES 2 809 679 T3

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

ES 2 809 679 T3

	<400> 187	
	ugaacuacga agcaggcaaa uucuccaaaa guaaaggcau uggaguuuuu gggaaugacg	60
	ccaagaauuc uaauauaccu guagaagugu ggagauacua ucugcuaaca aacaggccug	120
	agguaucaga cacauuguuc acuugggcgg aucuucaag	159
	<210> 188	
	<211> 159	
5	<212> ARN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 188	
	cuugaagauc cgcccaagug aacaaugugu cugauaccuc aggccuguuu guuagcagau	60
	aguaucucca cacuucuaca gguauuuuag aauucuuggc gucauucca aaaacucca	120
10	ugccuuuacu uuuggagaau uugccugcuu cguaguuca	159
	<210> 189	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 189	
	tcccatctcc cacatgggtt actg	24
20	<210> 190	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
25	<400> 190	
	cagtaaccca tgtgggat gggg	24
30	<210> 191	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 191	
	ggctgatgaa attcaagtgc ta	22
35	<210> 192	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Construcción sintética	
	<400> 192	
	aaactgagct tggaaataat c	21

	<210> 193 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
5	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 193 gaacccaaaa ttgtcacttt tt	22
10	<210> 194 <211> 24 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
15	<400> 194 atgcacttgt ttatactctt gtca	24
20	<210> 195 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 195 atttattagt gttctaaaga a	21
25	<210> 196 <211> 24 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
30	<400> 196 tgtagtagct tataagatta gctt	24
35	<210> 197 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
40	<400> 197 gttgtccctt ttatgggtct tt	22
45	<210> 198 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 198 cccgtgcaat ttctggaag c	21
50	<210> 199 <211> 24	

	<212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
5	<400> 199 attagttttt tatacacgaa agat	24
	<210> 200 <211> 24 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 200 atctttcgtg tataaaaaac taat	24
15	<210> 201 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
20	<400> 201 ttggtggttt ggccacttcc gt	22
	<210> 202 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
25	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 202 tttgtttgct atttagctgg a	21
30	<210> 203 <211> 24 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
35	<400> 203 caatttgcag caactcgcac tgga	24
	<210> 204 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
40	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 204 tcccaccatt ggctattccg ac	22
45	<210> 205 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
50		

	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 205 ctgtctctct ttttaatttc t	21
5	<210> 206 <211> 24 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 206 ccactttgca cacatctccc actt	24
15	<210> 207 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 207 gaggatccac gtatagtagt ag	22
25	<210> 208 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial	
30	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 208 tttaaataaa gaaattattt a	21
35	<210> 209 <211> 40 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 209 taatacgact cactataggg cttgagttta taacgaagct	40
40	<210> 210 <211> 39 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 210 taatacgact cactataggg cttctaattt tcaaggacg	39
45	<210> 211 <211> 24 <212> ADN <213> secuencia artificial	
50	<220> <223> Construcción sintética	

	<400> 211 agcttctaataat tttcaaggac gata	24
5	<210> 212 <211> 25 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
10	<400> 212 gtcatgtgac tccactttga ttttg	25
15	<210> 213 <211> 25 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
20	<400> 213 ctcaattccg ataaatttaa gaaat	25
25	<210> 214 <211> 26 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
30	<400> 214 cgaaagctatt ggaccgacct aatttc	26
35	<210> 215 <211> 26 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
40	<400> 215 ggaattgagg gcttcccaga aattgc	26
45	<210> 216 <211> 25 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
	<400> 216 atgacttttt gattggtgaa actaa	25
	<210> 217 <211> 45 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
	<400> 217	

	taatacgact cactataggt ggaactccaa cacacaaaaa atttc	45
	<210> 218 <211> 41 <212> ADN <213> secuencia artificial	
5	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 218 taatacgact cactataggt tgaaaaataa tcataatfff a	41
10	<210> 219 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
15	<400> 219 gcataatata ttgatccggt at	22
	<210> 220 <211> 24 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 220 ctgaaagttc atacataggt actc	24
25	<210> 221 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
30	<400> 221 ggtactccaa ttttcagtat at	22
	<210> 222 <211> 24 <212> ADN <213> secuencia artificial	
35	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 222 ctgaaaattg gagtacctat gtat	24
40	<210> 223 <211> 27 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
45	<400> 223 atgtatgaac tttcagaata ttatacc	27

	<210> 224	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 224	
	taccggatca atatattatg ct	22
10	<210> 225	
	<211> 647	
	<212> ADN	
	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>	
	<400> 225	
	ttcaaaatga attttaaatt atataaaaat caatatggac acaagaccgg atatcaatcc	60
	gacccgaaat agttgacttg aaatcaacct gatgaccoga atgaacacct ctagttatca	120
	ctaacaaggg tcagattgcg tacatcaaac ccctcaaate ctgottaggt gggagcttgt	180
	caatggctta ggggtaacgg gaatgtgtgt gctatgtaca ttgtgcatct attcctatgc	240
	ttatattatgt tgagttagtt ttttttttgg atcaaatata aagagcttaa cttttgtatt	300
	ttccttgatgt ggtgtagtgg tgatgaagat caggctgaga gaatctaaat tggccaaaat	360
	tctgagagaa caagaagtga gttcagccct tctgtctgct ggtggtggtg tgattagttg	420
	catcatacag agagatgaag ggcgaactcc gatgaggcat tcattctatt ggtcagcaga	480
	aaaacaatat tatagtgagg agcctttact acgtcatttg gaacccctc tatctatgta	540
	tctcgagctg gtactagtct ctgaaccgat tgcctttctt ctgctttggt attttgtgtg	600
	atatttcgac ttaagtctaa tttacatcgt tttgtacatt tgttatac	647
15	<210> 226	
	<211> 738	
	<212> ADN	
	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>	
	<400> 226	
	ttttgctttt ttactattat ttccttcttt tcaaggattt gagttgttta ttgctgactg	60
	cttcctatgt attacccata tgtctctgta taggcattac gggagctgta cctacatcta	120
20	actcctatac aacgtgtgaa tattgcccgg catcctaate gcccacttt tcttgaccac	180

ES 2 809 679 T3

gtattcagca tcacagaaaa ggtttctgat ttattataat ttttgtcatt tgtattcact 240
 cttcaataaa gtacatccat tatcaatctt tacggagggt gttcacacaa cttcttgttt 300
 cattttgcat aattagtttg tggaactaca tggagatcgt gctggttatg atgaccctgc 360
 tatagttact ggccttggtg cgatagatgg taggcggtat atgttcattg gtcacaaaa 420
 gggaagaaat acgaaggaaa atattgcacg gaatttcggg atgcctactc ctcatgggta 480
 aatgctttac tataatgttt tactttaatt taattaccta tgttatttag gatgaaaatg 540
 aatacttttc ttattactat tacttaggtt cctaatagcac aaaaaccgta attattaatg 600
 taccctaata gaattaacac atggtaatta agctctccgc tttgtgtaat taatccaatt 660
 ttttagagag tcaaatagtt caggttaaac tagagctttt catacccaaa taataaaacc 720
 aagggtaaat ttccaaaa 738

<210> 227
 <211> 880
 <212> ADN
 <213> *Amaranthus palmeri*

5

<400> 227
 atgtgatcaa ttaaagaaaa agtctaatta tatgagcccg tctcacagtg acggagctat 60
 catagagccc atggggtcac gtgcccttcg ggttttttag aaaaaattca aagtatactt 120
 ttctattaat aagagtaaaa atgtaaaatt aatattaac tcttttgata ataaatactc 180
 tctcacttta gtaattttgt cttatttatt tattttatct catgtgttta ataaggctcg 240
 ttgacttatt ttgttcatt ttcttttatg gtatgccgta tttaaaattt tagcaagtaa 300
 agataaaata gttgttaatc ttacaaataa aactctatcg aaatttcac cattagttaa 360
 tgtcccaaaa aagtccgaac tacaatcga ccactgtcat cacatggtga gatagtctca 420
 tataaaacga gttcagttat taaagaaaa taggaaacac gaaacagtta atttaggcgg 480
 ggcctatgta ttatccaaat gtgatactcc agtccacatt actcagtcct tccaattgaa 540
 cagttggctt aatctaccaa gcgcgtggcc ataaatgcct ctaacacttt tcaatctctc 600
 agataactct cacaccactt atcatcacia ttcacaatta ctctaattct ttttattoct 660
 ttccatgtcg ctaattttct actgattcag gttttattct cagcttttat caattttatt 720
 tcatgctttt tatgtcaatt tcttgtttcg cattttgtct tccacttgct gtctgtttta 780
 ttaatcaatt ttgtatgatt gttggaataa ttgtatgtat ttttcatgat tttcctotta 840
 tggaggttca taatgtattg ctagatttgt ttactttcac 880

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

10

<400> 228

ES 2 809 679 T3

aatttgagcg ggaaaattht aatataatta aatagtctth gctthtagtat atagaatagt 60
 taaaattaat agtcaaactt attgtaatag catgcaactaa tctataataa tcttatcctg 120
 aaagctataa taaaattata aaaaaatata tgtgaaaaac taatttgagc gggaaaatth 180
 taaccaaggg ctaacacgta tcattaaata gtctthactt tagtatatag aatgataatt 240
 aacgatcata aaacaaaatt gtcactthca gtagcaaaact tacaaaatga gcagagtacc 300
 tcatatcata aaattgcttc thtctcattt gttgtgttgc tctcattthta ggagttcatc 360
 gthtatatcg tegtcttacc actcaatcac thtttagattt attagtagca ctctctcaat 420
 ctacagcagc aattthctaca gttcaacaac ctc 453

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

5

<400> 229
 ggaaaatthta cctagaataa tccaatthtat tegtgatttht tctacaaatt ccaactthcaa 60
 ggggtatttg cctaaagtaa thaaactthgg ataccccgat gacctgctat agtagataat 120
 ttaccagaaa attaaaaatg aaaatthatt taaaattaga gaaaatthtt gaaatthcat 180
 ataaaaaatt thaaataata aaaaaaatat aaatththtt gaacatthta ththaatcta 240
 tctthththga aaaaataaaa cttagthtata gcaagtgatc tggtcaccgg gththactcta 300
 ggaaaatata cctcaaagth gagattatth atggtthata aataggtgag attattatag 360
 aaaaattacg aataaattgg attattgthg gtaatththtt thtcaaaact atccctagga 420
 aggaccttat tagtgattct ccctctactt tggaggagta tattgtggac thcccatctt 480
 ccttaattgt attgthaactt thaaactatth attctththaa aaaaagaact tataaaattg 540
 tagggtthaat aaaatctaag atththtacta atthcactth gattattccg atththgtatt 600
 cacattatth taaatgacat tegtcaaata aaaaaaata gththcattgc attccaatth 660
 tgttgactag ggggattthaa gaaagaatag tatcaataat cgtaatgtag caagtagtac 720
 aaaagaagta taththcaata tgtcaaactt tgatctcgtt gthaactthga atthgtacga 780
 tgcggtgtga atgacatact tcacctthtt cattatththta tactggtagt gacatgggat 840
 tattattgag atattthgag thaatgaaaat ththththggt gthgctththta caaacaaaaa 900
 thctaccgaa ththththatta atthtaattca acacgththgt gththcccatg atththtaggt 960
 ctgggtccgc cactgctagc thaacatthaa caatththaca aactcaatac accaacctaa 1020
 aaataaaaatt ththththgcca thaatththtag aatththtagth ththaaacatt atattthggga 1080
 atththththct ctthththata ththaaataa aaaaaaatcc aaaaaagggg acacacatta 1140
 atacacactt gaaagcatcg atgatatcga agaaaaacca gatggggtgc ccaattatct 1200

ES 2 809 679 T3

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

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

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

5

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

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

10

<400> 231

ES 2 809 679 T3

caacaatgag aatttagaat ccatatcaat cttgatattc aagggtatth aagtaattaa 60
 agaacaacca ttgtaagcg cctccactat cttcttcctt ctcatctcc attctcgctt 120
 agctttcctc tcgcactaat tacctccatt tgcaacctth caagctthca acaatggcgt 180
 ccacttcttc aaaccaccca ttttctctt ttactaaacc taacaaaatc cctaatctgc 240
 aatcatccat ttacgctatc cctttgtcca attctcttaa acccacttct tcttcttcaa 300
 tcctccgccg ccccttcaa atctcatcat cttcttctca atcacctaaa cctaaacctc 360
 cttccgctac tataactcaa tcaccttcat ctctcaccga tgataaaccc tcttcttttg 420
 tttcccgatt tagccctgaa gaaccagaa aagggtgcga tgttctcgtt gaagctcttg 480
 aacgtgaagg tgttaccgat gtttttgctt accctgggtg agcatccatg gaaatccatc 540
 aagctcttac tcgttctaata atcattagaa atgttcttcc tcgacatgaa caagggtggg 600
 ttttcgctgc tgaaggctac gctcgtgcta ctggacgcgt tggagtttgt attgccactt 660
 ctggtcc 667

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

5

<400> 232
 atttggataa ctttttctt tgattcgaat cggattatth ttaatacagt attatgaact 60
 gatttaatga aagtggagga agtttcaatt tttaaagttg taggtgtaat gttttctcat 120
 tttggatatg aaagtggagg aagtttcaat ttcgaatcat gtttgccagt tgattcaatg 180
 aatgctcttg gaaatgacca agagttcaag gcttcttggt ataaaacatt tcaatthtga 240
 tctaagaatg aactatthtag aacttaaagt aattaaatta ttagttataa cttataaaaa 300
 aattcaatth taaccttaaa tttataaatt atgaccttaa aaagatcaag tattgaacgc 360
 atatthtagaa aaattataat tcggcttctc agtctcatat tgagacggctc tcgtccaaga 420
 caagttgtat catttatata atcaaatata attatgagtg tattcatgta ggthtcaact 480
 ttaaagccta ggtgaaagat atgttgtagc atctttgtga aagtcagcct ataacttgg 540
 tctaaaatth tgaagcataa ccatatagtc cctcgaattc attcaagttg tccaatthac 600
 tttttatatac ttgccgagac aacatthtaa cccttaatat ttctaattaa tcttaattaa 660
 aaattatgaa aatthgatata taataatctt tgtattgaaa cgaatthaac aagatctcac 720
 atgactatgt tthtaacttat agatthaaaa aaaatacaaa ttaagagtga taagtgaata 780
 gtgccccaaa acaaatggga caacttagat gaattggagg taatattagg tagcaagtga 840
 tcactthaac atcaaatthg atcacttata ggttcaaatt gaaactthta cthtaattga 900
 tatgtthtaa tactactthta aattgaaatt gatatthttht aggtcaaat tgaaacctth 960

ES 2 809 679 T3

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

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

5

<400> 233
 caagcttcaa ttatcgtttt caaaataagt atttcaaagt ctataaagat attgtataag 60
 ttttagttca aatttaataa gttttttttt tttttttttt tttttttttg aaaatccaaa 120
 ttgaataagt taatarntaa attatgacat ataattatga catataattt gaccatgata 180

ES 2 809 679 T3

ttttacaatc taacttaatt ttgaacttat tattttctaatt attcaattat cgttctaaaa	240
ataagtattt aaattgtata gatataattgt ataacattta gttcaaattt aattattgat	300
agttttattg actatatttatt tggkgtttga aattcatcca tagaatgata gaataacacc	360
atTTTTtata taacttcggt ctaaaatttt gaagcataac catatactcc ctccaattca	420
tccaagttgt ccaatttact ttttcatact tgccgaggca acatttaaac ccttaatatt	480
tctaattaat gtaattaaa aattatgaaa atttgatatt aataatcctt gtattgaaac	540
aatctaaca agatcccaca tgactatggt ttaacttata gattaagaat aaaatacaaa	600
ttaagagtaa taagtgaata gtgtcccaaa acaaatagga caacttggat gaattggagg	660
tagtattagg tagcaagtga tcaacttaac atcaaaattg atcagttaca ggttcaaatt	720
gaaactttta cttaattga tatgtttaaa tactacttta aattgaaatt gatattctta	780
aggtcaaaat tgaaaacttt aagattataa ttgaaaaatg cccagaagat gaaaaaacag	840
agagaaagca tgtaagacac gcaaattgaa ccagtctact cttgtttcaa tttgagacgg	900
tctcgcccaa gaccagatgt tcagtcatcc tacaccaacc ccaaaaaatt caacaacaaa	960
ctcttataat gattccctct aatctactag agtctacacc aaccacttt ctctttgccc	1020
acaaaactt tggtttggtg agaactaagc cctcttcttt cccttctctc tcttaaaagc	1080
ctaaaacca ccaacttttt cagccaagaa acaacgcgaa attcagagga agaataatgg	1140
ctcaagctac taccatcaac aatgggtgcc atactggtca attgcacat actttacca	1200
aaaccagtt acccaaactc tcaaaaactc ttaattttgg atcaaaactg agaatttctc	1260
caaagttcat gtctttaacc aataaaagag ttggtgggca atcatcaatt gttcccaaga	1320
ttcaagcttc tgttgctgct gcagctgaga aaccttcac tgcccagaa attgtgttac	1380
aaccatcaa agagatctct ggtactgttc aattgcctgg gtcaaagtct ttatccaatc	1440
gaatccttct tttagctgct ttgtctgagg gcacaacagt ggtcgacaac ttgctgtata	1500
gtgatgatat tctttatatg ttggacgctc tcagaactct tggtttaaaa gtggaggatg	1560
atagtacagc caaaagggca gtcgtagagg gttgtggtgg tctgtttcct gttggtaaag	1620
atggaaagga agagattcaa cttttccttg gtaatgcagg aacagcgatg cgccattga	1680
cagctgcggt tgccgttgct ggaggaaatt caagttatgt gcttgatgga gtaccaagaa	1740
tgagggagcg cccattggg gatctggtag caggtctaaa gcaacttgg tccagatgtag	1800
attgttttct tggcacaat tgccctctg ttcgggtcaa tgctaaagga ggccttccag	1860
ggggcaaggt caagctctct ggatcgggta gtagccaata ttaactgca cttctcatgg	1920
ctactccttt gggctttgga gacgtggaga ttgagatagt tgataaattg atttctgtac	1980
cgtatgttga aatgacaata aagttgatgg aacgctttgg agtatccgta gaacatagtg	2040

ES 2 809 679 T3

atagttggga caggttctac attcgaggtg gtcagaaata caaatctcct ggaaaggcat 2100
 atgttgaggg tgatgcttca agtgctagct acttcctagc cggagccgcc gtcactgggt 2160
 ggactgtcac tgtcaagggt tgtggaacaa gcagtttaca ggtataatgt taacccttac 2220
 ccttcacatt gttctgctaa attctagagg accctttcaa ttctgggtgg gataagcacg 2280
 gcaatttgac cgcaaaaaaa ttgcaaaatt attctgctga tagaacatct cgagatgaga 2340
 tcatattgag ttttggcgtc aacataaacc taatcaaata atgaaaaata caaacatcat 2400
 atggtttctt ttgtctttat gactagacac tctctattat tccttgattg ggatcttatt 2460
 tgaaattgct gtgtagccta cacctcatgt tcagattttg ttcgtatacc agacttttct 2520
 tgattgggat cttatttgtc ccctggattt tgcatagggg gatgtaaaat ttgccgaagt 2580
 tcttgagaag atggggttga aggtcacctg gacagagaat agtgtaactg ttactggacc 2640
 acccagggat tcatctggaa agaaacatct gcgtgctatc gacgtcaaca tgaacaaaat 2700
 gccagatgtt gctatgactc ttgcagttgt tgccttgtat gcagatgggc ccaccgcat 2760
 cagagatgtg gctagctgga gagtgaagga aaccgaacgg atgattgcca tttgcacaga 2820
 actgagaaaag cttggggcaa cagttgagga aggatctgat tactgtgtga tcaactccgc 2880
 tgaaaagcta aaccccaccg ccattgaaac ttatgacgat caccgaatgg ccatggcatt 2940
 ctctcttgct gcctgtgcag atgttcccgt cactatcctt gatccgggat gcacccgtaa 3000
 aaccttcccg gactactttg atgttttaga aaagttcgcc aagcattga 3049

<210> 234

<211> 1113

<212> ADN

<213> *Amaranthus palmeri*

5

<400> 234

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

aaataaaaaa aaaagaagac aggctattag taaaattatt aagtatgtaa ggttgataca 720
 cgcgcggaatt gagccggccc acttttagtt tcaatttgaa acagtctcaa tcaagaccaa 780
 ttatttatta ttttattatt ttattgtttt aagctcaatg ggttgactt gataaattat 840
 attttgagga gacgggctat tagtaaaatt aatagttgga atcttttttg atatactata 900
 aaaagaggta tctgggtggag ccttaaactc gcgcaattga agtcctcaat acacatctcg 960
 ctcttcttat tctctttcat ctatttcctc ctttgatcaa actacgccat gtctctctta 1020
 aatgatctcg ttaaccttaa tctctctgaa actaccgata agattatcgc tgaatacata 1080
 tggtaataca acaatccttc ctctttttca ttt 1113

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

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (451)..(459)
 <223> n es a, c, g, o t

10 <400> 235

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

15 <210> 236
 <211> 1083
 <212> ADN
 <213> *Amaranthus palmeri*

<400> 236

cgtcgaagta gaagacgcgg aagctgcttt taacatcagc gtttcgcatg gggctattcc	60
ctgtgtttct cctattcaat tggaaaacgg tgtcgtttta tctgaggttc atttatatgg	120
ggatgttggtg cttcggtagt taagctacgg aatgaatgt ggggatgtgt tttttcttcc	180
tgggtttgag gaaatgccgg aggaatcatc gtttagagga cttgattttg gcattcgaag	240
gttgatcat gctgtaggga atgtccctga gttggctcct gcaattgctt atttgaagaa	300
gtttactggg tttcatgagt ttgctgagtt tacagctgaa gatgttggga cgagtgaaag	360
tggattgaat tcagccgat tggcaaaaa tgatgaaatg gtgttgtttc cgatgaatga	420
acctgtgtat gggacaaaa ggaagagcca aattcaaact tatttggagc ataatgaagg	480
ggctggtgta cagcatttgg ctttgatgag tgaagacata ttttggactt taagggagat	540
gaggaagaga agtgttcttg gtgggtttga gtttatgccg tcgccgcctc cgacttatta	600
ccggaatttg aggaacagag ctgctgatgt attgagtgag gagcagatga aggagtgtga	660
agagttgggg attttgggtg ataaagatga tcagggcact ttgcttcaaa tcttcaccaa	720
acctattgga gacaggtaaa ttttaactct gctttcaatt gcttttgctt gatggattga	780
ctagcaaatt tgatcgcatt ttgttgctta tatgacttga tgatacttcc tctgtttcga	840
aatactcgct acattcgcta cttttgttt tgtgcactat tcatcgttca agcttatttt	900
acatattgcg actaatgtgt aactaaaaat atagtcaagt gggatcttgt ttgaatcgtc	960
taatggcata ctttcatcat attaaatfff tataatfff agattagtgt agtttaagat	1020
attaatgctc aaaattgtgc attggattgc gtaaaaaagt gaaatgtagc aagtattatg	1080
aaa	1083

<210> 237

<211> 788

<212> ADN

<213> *Amaranthus palmeri*

<400> 237

aaaaccaaag gaaataagtt ataggtagga aaaattgtta ttgaagttaa tgtagtaaac	60
tagtaactta aactgtgata ccccggattt agcttaaaaa gagattgata gactactcat	120
atcaacaagg tgcattcttct tttctagggg gccatttgc taagaactct acagttaagc	180
gtgcttggtg gggagcaatc ttaggatggg tgacctcctg ggaagttttc ctgggtgctc	240
acgggtgagg ccaaagtgcg ttaaaaagac ttgtgttggt ctgtggggct tgtctacagt	300
ctccatgagt agtcaccggc ggtacgagag gccggggtgt tacataaaca gactcaaagg	360
cgctaagcca agtagccaat agcaacatgt gtggcctgcg gacagtcaca aaaacacaca	420
atctcttatt tttactctct tttatctctt ttaggcttta gccatcaaca ataaaacaac	480

5

ES 2 809 679 T3

atgataaagc aattcattta ctgctaaatt ccaacaatth ggtccctttt tctgttctt 540
tcagttttcac atacctctt atcaatctat atccaaaact atttcatttt ccaaactctt 600
ttaaacccaa aatcaaaac ttttgattga agaacaaact ttgggggttt tggaaaatga 660
gtcattttgg atatgcttgt gctactcaat ccacatcaag atatgttctt ttaggaaatt 720
caaataaacc cacttcaatt tcatctattg gaagtgattt tttgggtcat tctgtgagaa 780
atthcagt 788

<210> 238

<211> 2631

<212> ADN

<213> *Amaranthus palmeri*

5

<400> 238

ES 2 809 679 T3

tggtacctac cctgtttaca ttttcaattt cccccttttt tctctactac tcctacttta	60
ttgattctta tccatgtgtg ttctatggga attgacatta attgttcagg tgtgtatgct	120
ggtgatcctt ctaagttgag tatgaaagct gcatttggaa aggtctggac cttagagcaa	180
aagggtggtg gtatcattgc cggtaactc aaaactattc aggaaaggaa gaataatcct	240
ccaccgcctc gagaccgctc cgtaatcacc attactcatt gctttccttc accttgatc	300
ttaccttaat atacatgat ttaattgata atgtcacatt gcctcatttg cagccgcctt	360
cctaaaccta agggccagac tgttggatcc tttaggaaag ggctcattat gttacctacc	420
gccattgctg ctaggtatct tttgactctc aaatcttaa tatttctcat cttctccttc	480
tgctaatact agtatgttta ccatcttttt attttttag gcttggcagt aaagtcaaac	540
tatcgtggac actttctaatt attgataagt cgctcaatgg tgaatacaat ctcaattatc	600
aaacaccgga tggaccggtt tctgttagga ccaaagcggg tgtcatgact gtcccttcat	660
acattgcaag tagcctgctt cgtccgctct cagtgagtat cattctttcc ttcatttctt	720
ttcgtttatt gttgtccaat gtcttgtaa acaccagttt ggccttgtgc tctgtgaatta	780
tggtacaat gtttaactgat tcaggcactg tgggagatgc ctaagtttct aaaacctctg	840
cgcataatgt ttgtttgat gtttaggaatt gcattgaaaa attgcttttg tgatggtgat	900
gtaataacca attacaagtg tgttcttcaa cttctgcaat acctgttcg agtgagcttg	960
agggggttta gattagtgtc caatgtgaaa ctagcaaatg aactccaagc gctgggatag	1020
gtccttggga tggagcccct gataccaag acagtattca aacctctaa gtagagtgag	1080
agatcaagga aagaaactgg gtggttcctc aaatcgtaa aaatgaatac agtgtcatga	1140
ttgctaactc tatcacaat cgtaaaaaat gaattatggt cgattttgga ctatttttg	1200
gtcattttga gtgaatctcg aacttaaaaa gcgagtcttc tagcagttct tgttacagcg	1260
gggcatacat aggtaggaat ttggtttttt actatttgag ccttttgact gttgtggccg	1320

ES 2 809 679 T3

gtaatatgga atagtctagc acttctgCGT gtgtacaact agtatttatt gtaattatgt 1380
gatcgcaactt aactctcaga taaaacctta agcactaaca ttttgTTTTG gttgaaggaa 1440
tcaggaggaa agaaaattga gggatttGTT ggtatataga ttcctttGTT tggataacaa 1500
aattggagtG gagagatttG gaaggaagaa ttttataggG attagttccc attacactta 1560
tgttgattac aaaatttctc caaaagtGga aagatttGta gtgaaaatgt tttttatttc 1620
tcttctctc cctttctttc cctcttaaac aaacaaggaa agttaatctt atcattccgt 1680
accttcccct tctgttcttt tttttctctc caaaattctt atcctaacgt agtgttattg 1740
tcaactgtctt atgaacgaga attcttttct tcctaatact gcttGtGttg cacagtcaat 1800
gatttagcta gatcatcttt ggtagctac tcaaaatatt tacataaaat acttGtagaa 1860
ataaatacca ataggtcttg tcaagaagta gtttcaatgc tataagtttt aaccaatcct 1920
caaaatttac accatggaga tatctgCGga taagaactag taactgtagc agctgtaact 1980
gttgcaatca gttttatggT ttgccttgca aatcaaactt tggatgttGt ttgccttaca 2040
atgtgttact attacgtgaa gtttagtGtt cgcccttcac attgtacttt ggTTTTGtt 2100
ttccttgcaa tttgctcttt gaagtataaa gtgctgagtG ctgagtGctg agtgctgacc 2160
tttctgctc aggatgttGc tgcagattct ctttctcaat ttactatcc accagtcgca 2220
gcagtgtccc tttcttatcc caaagaagca attagaccag aatgcttgat cgatggagaa 2280
ctaaaaggat tCGggcaatt gcatcctcGc agccagggtG tggaaacctt gggatatGc 2340
tccattcaa ctatatctca atttttatga gtatttttct ttctctgaat tattcaattt 2400
ggtgacgtta aattttgatt gtactcGaca ggaacaattt atagttcatc tcttttcct 2460
ggtcgagcac cacctggtag gaccttgatc ttgagctaca ttggaggtGc taaaatgtt 2520
ggcatattac aaaaggcaag tcatttatac aattatatct gttgtatcct caaataagtG 2580
ggtatcaatc ctgacgacat gcttgcttGt atcgatGcag agtgaagatG a 2631

5 <210> 239
<211> 23
<212> ADN
<213> *Euphorbia heterophylla*

<400> 239
agtttacagg gagatgtaaa gtt 23

10 <210> 240
<211> 23
<212> ADN
<213> *Euphorbia heterophylla*

<400> 240
agtttgCagg gagatgtgaa att 23

15 <210> 241
<211> 23
<212> ADN

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

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

ES 2 809 679 T3

	<210> 258		
	<211> 55		
	<212> ADN		
	<213> <i>Digitaria sanguinalis</i>		
5	<400> 258		
	ttgacgtcaa catgaacaaa atgcctgatg tcgcaatgac tcttgctgtg gttgc		55
	<210> 259		
	<211> 55		
	<212> ADN		
10	<213> <i>Senna obtusifolia</i>		
	<400> 259		
	ttgatgtcaa catgaacaag atgccagatg ttgccatgac gcttgctgta gttgc		55
	<210> 260		
	<211> 55		
	<212> ADN		
15	<213> <i>Amaranthus rudis/tuberculatus</i>		
	<400> 260		
	tgcacgtcaa catgaataaa atgccagatg ttgctatgac tcttgcagtt gttgc		55
	<210> 261		
	<211> 55		
	<212> ADN		
20	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>		
	<400> 261		
	tgcacgtcaa catgaacaaa atgccagatg ttgctatgac tcttgcagtt gttgc		55
25	<210> 262		
	<211> 55		
	<212> ADN		
	<213> <i>Amaranthus palmeri</i>		
	<400> 262		
30	tgcacgtcaa catgaacaaa atgccagatg ttgctatgac tcttgcagtt gttgc		55
	<210> 263		
	<211> 55		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (2)..(2)		
40	<223> n es a, c, g, o t		
	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (5)..(5)		
	<223> n es a, c, g, o t		
45	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (32)..(32)		
	<223> n es a, c, g, o t		
50	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (35)..(35)		
	<223> n es a, c, g, o t		

	<220> <221> misc_feature <222> (41)..(41) <223> n es a, c, g, o t	
5	<220> <221> misc_feature <222> (47)..(47) <223> n es a, c, g, o t	
10	<220> <221> misc_feature <222> (50)..(50) <223> n es a, c, g, o t	
	<400> 263 tngangtcaa catgaacaaa atgccagatg tngcnatgac ncttgcngrn gttgc	55
15	<210> 264 <211> 21 <212> ARN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 264 aaaugaaca aaaugccaga u	21
25	<210> 265 <211> 21 <212> ARN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
30	<400> 265 aucuggcauu uuguucaugu u	21
	<210> 266 <211> 22 <212> ARN <213> secuencia artificial	
35	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 266 aaaugaaca aaaugccaga ug	22
40	<210> 267 <211> 22 <212> ARN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
45	<400> 267 caucuggcau uuuguucaug uu	22
	<210> 268 <211> 24 <212> ARN <213> secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> Construcción sintética	
	<400> 268 caacaugaac aaaaugccag augu	24
5	<210> 269 <211> 24 <212> ARN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
10	<400> 269 acaucuggca uuuuguucau guug	24
	<210> 270 <211> 35 <212> ARN <213> secuencia artificial	
15	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 270 ucgacgucaa caugaacaaa augccagaug uugcu	35
20	<210> 271 <211> 35 <212> ARN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
25	<400> 271 agcaacaucu ggcauuuugu ucauguugac gucga	35
	<210> 272 <211> 45 <212> ARN <213> secuencia artificial	
30	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 272 ucgacgucaa caugaacaaa augccagaug uugcuugac ucuug	45
35	<210> 273 <211> 45 <212> ARN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
40	<400> 273 caagagucau agcaacaucu ggcauuuugu ucauguugac gucga	45
	<210> 274 <211> 55 <212> ARN <213> secuencia artificial	
45	<220> <223> Construcción sintética	

ES 2 809 679 T3

	<400> 274 ucgacgucaa caugaacaaa augccagaug uugcuaugac ucuugcaguu guugc	55
5	<210> 275 <211> 55 <212> ARN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
10	<400> 275 gcaacaacug caagagucau agcaacaucu ggcauuuugu ucauguugac gucga	55
15	<210> 276 <211> 45 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
20	<400> 276 taatacgact cactataggg ctttattgaa tttagctatg taatc	45
25	<210> 277 <211> 41 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
30	<400> 277 taatacgact cactataggg tttatcaacc aaatgtgcag c	41
35	<210> 278 <211> 49 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
40	<400> 278 taatacgact cactataggg ttgtctgtac ataattgtga gatttgtgg	49
45	<210> 279 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
	<400> 279 ctgtgatcat catatgtatc a	21
	<210> 280 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
	<400> 280	

	ccttaactct ccagctagca a	21
	<210> 281	
	<211> 21	
5	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 281	
	cagccccgcaa atgtttcatt c	21
10	<210> 282	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Construcción sintética	
	<400> 282	
	gccgtcaatg gccgcattgc t	21
	<210> 283	
20	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 283	
25	tccttccctc agaaagggca g	21
	<210> 284	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 284	
	ttgcctcatg ctgctaactct g	21
35	<210> 285	
	<211> 789	
	<212> ADN	
	<213> <i>Nicotiana benthamiana</i>	
	<400> 285	

ES 2 809 679 T3

cttatatgtg cttaagccta acgtgcaccc ggccccttaa cccagcagt tttcaatcta 60
 cctaccgtct ctaccattht cttctagtgt gtgaaaatth ctaactttga gaaaacaagc 120
 caaagththt gthtctaaga acgcaaatg agtgaaaatth tttgcagcaa tggcacagat 180
 tagcagcatg aggcaaggga tacagacccc taatcttaat tcctatthtc ctaaaacca 240
 aaaggttct cthththtgc attctatctt cthtggatca aagaaaataa cccaaaattc 300
 agcaaatct ttgtgggtgt gtaagaaaga ttcagththt aggggtggca agtcacctth 360
 taggattgt gcatcagtgg ccactgcaca gaagcccaac gagattgtgc tgcaaccat 420
 caaagatata tcaggcactg ttaaattgcc tggthtctaaa tccctthtcca accgtattht 480
 cctthtctgct gccctthtctg agggaaggac tgtthtggac aatthtactga gtagtgatga 540
 cattcattac atgctthtggc cgttgaaaac actthtggactt catgtagaag atgacaatga 600
 aaaccaacga gcaattgtgg aaggtthtgg tgggcagtht cctgtcggcg agaagtctga 660
 ggaagaaatc caactatthc ttggaatgc aggaacagca atgcggccat tgacggcagc 720
 agthtactgta gctggaggac attcaagata tgtactthgat ggagthtcta ggatgagaga 780
 gagaccgat 789

<210> 286

<211> 799

<212> ADN

<213> *Nicotiana benthamiana*

5

<400> 286

cactgacgtt ggattagagg taggctcctt atatgtgctt aagcctaacg tgcagccggc 60
 cccaacccc agcagththt aatctaccta ccgtctctac caththtctta tagtagttga 120
 aaathtctaa cthttagaaa acaagccaaa gththtthtct taagaacaca aagggagtga 180
 aathththtgc agcaatggca cagattagca gcatgaggca agggatacag acccctaathc 240
 ttaathtcta ththtctaaa acccaaaagg thtctcttht thtgcattct atctthcattg 300
 gatcaaagaa aataacccaa aathcagcaa aathctthtgt ggtgtgtaag aaagattcag 360
 ththttaggggt ggcaagtca cththttagga thtthtgcathc agtggccact gcacagaagc 420
 ctaacgagat tgtgctgcaa cctatcaaag atatatcagg cactgttaaa ttacctggtt 480
 ctaaatccct thccaatcgt attctccttc thtthtgcct thtthttaggga aggactgtht 540
 thgacaatht actgagtagt gatgacathc attacatgct tggthtcattg aaaacactth 600
 gactthcatgt agaagatgac aatgaaaacc aacgagcaat cgtagaagggt tgtggthtggc 660
 agththtctgt cggcaagaag thtthttaggaa aathcctaact atthtctthgga aathcagga 720
 cagcaatgct gccattgacg gcagcagtht ctgtagctgg thgacathtct agatathtac 780
 thgatggagt thcttaggat 799

ES 2 809 679 T3

	<210> 287	
	<211> 845	
	<212> ADN	
	<213> <i>Nicotiana benthamiana</i>	
5	<400> 287	
	aaattcttgg ttcgaggagg tcagaagtac aagtctcctg gaaaagcata tgttgaagga	60
	gatgcctcaa gtgctagcta ctttttggcg ggtgcagctg tcacaggtgg aactgtcact	120
	gttgaagggtt gtggaacaag cagtttacag ggggatgtta agtttgctga ggtcctcgaa	180
	aagatggggg cagaagttac atggacagag aacagtgca cggtaaagg acctccaagg	240
	aactcttctg gaatgaaaca tttgcgggct gttgacgtta acatgaaca aatgccagat	300
	gttgccatga ctcttgctgt agttgcactt tttgctgata gtcctactgc cataagagat	360
	gttgctagct ggagagttaa ggaaactgag cggatgattg ccatatgcac agaacttagg	420
	aagttgggtg caacagttgt agaagggcca gactactgca taatcactcc acctgaaaag	480
	ttaaagtag cggaaattga tacatatgat gatcacagaa tggccatggc tttctctctt	540
	gcggttctgt ctgatgttcc agtcaccatt aaggaccccg gttgtactcg caaaccttc	600
	cccaactact ttgacgttct ccagcagtat tccaagcatt aaaccacttt ccattaagaa	660
	ttttgaaaa gagagacttt gacaacaatg gtgtcatacc ggaagagaaa agctttgatc	720
	caagctttca actcctttc atttgtcatg tgatgatcat tgtatttgtt gaagttgagc	780
	tgcttttctt ttgtccagaa gacatgtatg gatactatta ctatatagtt aaggtgaact	840
	cagca	845
	<210> 288	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 288	
	ccacatggtc cagtatctgc c	21
15	<210> 289	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Construcción sintética	
	<400> 289	
	caagcaagga acccatccat t	21
	<210> 290	
	<211> 21	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	

	<400> 290 ggccacacct gcatgcattg c	21
5	<210> 291 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
10	<400> 291 gtgttcacgg tagacaaatc c	21
15	<210> 292 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
20	<400> 292 tgcaactgcac ttgacgcacg t	21
25	<210> 293 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
30	<400> 293 aactgatgca ttgcacttga c	21
35	<210> 294 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
40	<400> 294 caaatcagga aggtatgaga g	21
45	<210> 295 <211> 21 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Construcción sintética	
	<400> 295 tgtcaagggt ttgtttcctg g	21
	<210> 296 <211> 543 <212> ADN <213> <i>Nicotiana benthamiana</i> <400> 296	

ES 2 809 679 T3

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

<210> 297

<211> 543

<212> ADN

5 <213> *Nicotiana benthamiana*

<400> 297

acaatggctt cctcagttct ttcctcagca gcagttgcc cccgcagcaa tgttgctcaa 60
gctaacaatgg ttgcaccttt cactggtctt aagtcagctg cctttttccc tgtttcaagg 120
aagcaaaacc ttgacatcac ttccattgcc agcaacggcg gaagagtgca atgcatgcag 180
gtgtggccac caattaacaa gaagaagtac gagactctct cataccttcc tgatctgagc 240
gtggagcaat tgcttagcga aattgagtac ctcttgaaaa atggatgggt tccttgcttg 300
gaattcgaga ctgagcgcgg atttgtctac cgtgaacacc acaagtcacc gggatactat 360
gacggcagat actggaccat gtggaagtgg cctatgttcg gatgcactga tgccacccaa 420
gtgttggccg aggtggaaga ggcgaagaag gcatacccac aggctggat ccgtattatt 480
ggattcgaca acgtgCGTca agtgcagtgc atcagtttca ttgcctaaa gccagaaggc 540
tac 543

<210> 298

<211> 486

<212> ADN

10 <213> *Nicotiana benthamiana*

<400> 298

ES 2 809 679 T3

caagccaaca tggttgcacc cttcactggc ctcaagtccg cctcctcctt ccctgttacc 60
 aggaaacaaa accttgacat tacctccatt gctagcaatg gtggaagagt tcaatgcatg 120
 caggtgtggc caccaattaa catgaagaag tacgagacac tctcatacct tcctgatttg 180
 agccaggagc aattgcttag tgaagttgag taccttttga aaaatggatg ggttccttgc 240
 ttggaattcg agactgagcg tggattcgtc taccgtgaac accacaactc accaggatac 300
 tacgatggca gatactggac catgtggaag ttgcccatgt tcgggtgcac tgatgccact 360
 caggtgttgg ctgaggtcga ggaggcaaaag aaggcttacc cacaagcctg ggtagaatc 420
 attggattcg acaacgtccg tcaagtgcaa tgcatacagt ttatcgcctc caagccagaa 480
 ggctac 486

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

5

<400> 299
 ggctcagtta tgtcctcagc tgccgctggt tccaccggcg ccaatgctgt tcaagccagc 60
 atggtcgcac cttcactgg cctcaaggcc gcctcctcct tcccggtttc caggaaacaa 120
 aaccttgaca ttacttccat tgctagaaat ggtggaagag tccaatgcat gcaggtgtgg 180
 ccgccaatta acaagaagaa gtacgagaca ctctcatacc ttctgattt gagcgtggag 240
 caattgctta gcgaaattga gtaccttttg aaaaatggat gggttccttg cttggaattc 300
 gagactgagc atggattcgt ctaccgtgaa caccaccact caccaggata ctacgatggc 360
 agatactgga cgatgtggaa gttgcccatg ttccgggtgca ccgatgccac tcaggtcttg 420
 gctgaggtag aggaggccaa gaaggcttac ccacaagcct gggtcagaat cattggattc 480
 gacaacgtcc gtcaagtgca atgcatcagt ttcatcgcct acaagccoga aggctat 537

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

10

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 300
 ggaggcaaaa tacgagcctc a 21

15

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

20

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 301
 cactaatctt aataccaaac t 21

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

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

ES 2 809 679 T3

<400> 314

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

ES 2 809 679 T3

ggtttagaaa gttggcgtgg gttctatcaa agcattcggc ccacacaaat gggcttatca 900
 ctgaacatcg atatgtcttc cactgcattc attgagccac tgccagtcac tgatTTTTGTG 960
 acacagcttc tgaaccgaga tgtgccatct agaccactgt ctgatgctgg ccgtgtaaag 1020
 ataaaaaaag ctctgagagg tgtgaagggtg gaggttactc atcgtggaaa tatgCGGagg 1080
 aagtaccgca tttcgggttt aacatctcaa gcaacaagag agttgacctt ccctgttgat 1140
 gaaaatggta cagtgaaatc tgtaattgag tattttcgag aaacatatgg gtttGtaatt 1200
 cagcactctc agtggccttg tctacaagtt ggaaatcagc agagaccta tTacttgcca 1260
 atggaagtct gcaagattgt ggagggacaa aggtactcaa agcgttgaa tgagagacag 1320
 attactgcac ttctgaaagt gacctgccag cgtccccaag ggaggagcg tgatattctt 1380
 gagaccgtac atcataatgc ctatgcta at gaccatag ccaaggagt ttggtattaag 1440
 attagtgaca agttggcaca agttgaggct cgtatTTTgc ctccacctcg gcttaaatat 1500
 catgataacg gtcgagaaaa ggactgcctg ccacaagttg gccaatggaa tatgatgaat 1560
 aagaaaatgg taaatggagg gacggtgaac aattggatct gcataaactt ctctcgcaat 1620
 gtgcaagata gtgttGctca tgggtTTTgc tctgagcttg cacaaatgtg ccagatatct 1680
 ggcatgaatt tcaatccaaa tcctgttctg ccaccttoga gtgcacgccc tgatcaggtc 1740
 gaaagagtat tgaaaactcg atttcatgat gctatgacta agttgcagct gcatgggaga 1800
 gagcttgatt tgctagtTgt catcttgcca gacaataatg gatctcttta tgggtgatctg 1860
 aagcgcattt gtgagactga actaggagtc gtctcacagt gctgTTTgac aaaacatgta 1920
 tttAagatga gcaaacagta tctagccaat gtagcgtga aaatcaatgt gaaggTggga 1980
 gggagaaaca ctgtgctTgt tgatgcaata tcgaggcga ttcctctTgt cagcgaccgg 2040
 cctaccatca ttttggTgc agatgtcacc caccctcacc ctggggagga ctctagccca 2100
 tccattgccc cggTggtTgc ttctcaagat tggcctgaga ttacaaagta tgctggtcta 2160
 gtttctgctc aagcccatag gcaagagctt attcaggatc tgtacacgac taggcaagat 2220
 cctgttaagg ggacagTgc tggTggaatg attaaggact tacttatatc cttccgaaga 2280
 gctactggac aaaagcccca gagaataatt ttctatagg atggtgTtag tgaaggacaa 2340
 ttttatcaag tgcttctTgt cgaactTgat gcgatccgca aagcatgtgc gtcttTggag 2400
 ccaaattatc agccccagt cacattTgtt gtggttcaga aacgacatca cacaaggctt 2460
 tttgccaata accaccTga cagaaatgca gttgacagga gcgggaacat tatacctggt 2520
 actgtTgtag attcaaagat atgccaccg acagagTttg atttctatct ttgtagccat 2580
 gccggcatac aggttacgag ccgtccagct cactaccatg ttctatggga cgagaacaaa 2640
 ttcacagccc atgcgctgca gtcttTgacc aacaacctct gctatacata tgcaaggTgc 2700
 acgcgttccc tctccatcgt tccccTgca tattatgcac atttggcagc tttccgtgct 2760

ES 2 809 679 T3

cgatthtata tggagccgga gacatctgac ggtggttcag taacaagtgg ggctgctggt 2820
 ggcagagggg gtggtgcagg agctgctgga aggaacaccc gagccccaag tgctgggtgct 2880
 gctgttagac ctcttcctgc gctcaaggat aatgtgaaga gggttatggt ctactgc 2937

<210> 315
 <211> 3274
 <212> ADN
 <213> *Nicotiana benthamiana*

5

<400> 315
 cacctatcac tctctttctc tctctacaaa catatcgtgc cgtttctctc tcggcctctc 60
 ttcgtgtttt agggcaccgt ggtggttggt atccaggcgg cggttttgag ttattacat 120
 ggtgcggaag aagaggactg atgttcctgg tggtgctgag agttttgagt cccatgaaac 180
 tggaggggca cgaggtggtg cccaacgccc atcacagcag cagcaacatc agcatcagca 240
 aggcggagga agaggctggg cacctcagca tggaggacat ggtggccgtg gtggtggggg 300
 agctccacgt ggtggaatgg cccctcaaca atcctatggt ggacctcctg aatactacca 360
 acagggcagg ggaactcaac agtatcaacg aggtggagga caaccccagc gccgtggtgg 420
 catggggggc cgtggggcac ggccaccagt acccgagctg caccaagcaa cccagactcc 480
 acatcagcct gtacatgatg gaagaccatc agaaacatac tcagaggctg gttcctcgtc 540
 tcagccacct gaaccaacga cacagcaagt gactcagcaa ttccagcaac ttggtgtgca 600
 gccagaagca gctgcaacc aagcaataca accagcatcg agcaagtcga tgaggtttcc 660
 actccggcca ggaaagggtg gtactggtat tagatgcata gttaaggcca atcacttctt 720
 tgccgagtta cctgacaaaag atctgcacca gtatgatggt tcaattactc ctgaggctgc 780
 ctctcggggg gtcaaccggg ccgtcatgga gcagctggtg aagctttata gagaatccca 840
 tcttggaag aggcttccag cctatgacgg aagaaaaagt ctatacacag cagggcccct 900
 cccttttggt caaaaggatt ttaaaatcac tctaattgat gatgatgatg gacctggtgg 960
 tgctaggagg gaaagagagt ttaaagtgt gatcaagctg gcggctcgtg ctgatcttca 1020
 tcacttgggg atgttcttac aaggagaca ggctgatgca ccgcaagaag cacttcaggt 1080
 gctggatatt gtgctacgtg agtgccaac atctaggtat tgcctgtgg gccgctcttt 1140
 ctattcccct catttaggac gaagacaacc actgggtgaa ggtttagaga gctggcgtgg 1200
 cttctatcaa agtattcgtc ctacacagat gggattatcc ctgaatattg atatgtcttc 1260
 cacggctttc attgagccac tgccgattat tgacttcgtg agccagcttc tgaatcggga 1320
 tatctcttct agaccactgt ctgatgctga ccgcgttaag ataaagaagg cactgagagg 1380
 tgtaaagggt ggggtcactc atcgtggaaa tatgcccagg aagtatcgca tttctggctt 1440
 gacgtctcaa gcaacaagag agttgacttt tcctgtcgat gaaaggggta cgatgaaagc 1500

ES 2 809 679 T3

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

<210> 316
<211> 3907
<212> ADN
<213> *Zea mays*

ES 2 809 679 T3

<400> 316

acctacttcc ccctcgcccc tctcatggtc tctctcgcgc ccagatctgc tactagacgg	60
caccgctgca gcgcgtcgtg tcgcgggggt tggtaggcagg cagcgagagc ttgccgttcc	120
tctctctcag ttgtcaggtc ctaggctcac ctcaccggct cccagcccgc ttctatttct	180
tcctccccga ccccgctgag gtggcagtcc agtccacgcc accaaccgcg aggcgaacca	240
aaccaacca ctctcccca ccccgcgcgcc ccaggccgcc cgccctacca accatcggcg	300
tcggcaatgg cggccatggc gaccaaggcc gccgcgggca ccgtgtcgtc ggacctcgcc	360
gcgccgccgg cggcggcagc ggcggcggcg gtgcaggcgg gtgccgagga gatcgtgctg	420
cagcccatca aggagatctc cggcaccgtc aagctgccgg ggtccaagtc gctttccaac	480
cggatcctcc tgctcgcgc cctgtccgag gtgagcgatt ttggtgcttg ctgcgctgcc	540
ctgtctcact gctacctaaa tgttttgcct gtcgaatacc atggattctc ggtgtaatcc	600
atctcacgat cagatgcacc gcatgtcgca tgcctagctc tctctaattt gtctagtagt	660
ttgtatacgg attaatattg ataaatcggc accgcaaag ctaggtgtaa ataaacacta	720
gaaaattgga tgttccccta tcggcctgta ctcggctact cgttcttgtg atggcatgct	780
gtctcttctt ggtgtttggc gaacaacctt atgaaatttg ggcgcaaaga actcgcctc	840
aagggttgat cttatgcat cgtcatgata aacagtggag cacggacgat cctttacggt	900
gtttttaaca aactttgtca gaaaactagc atcattaact tcttaatgac gatttcacaa	960
caaaaaaagg taacctcgct actaacataa caaaatactt gttgcttatt aattatatgt	1020
tttttaactc ttgatcaggg gacaacagtg gttgataacc tgttgaacag tgaggatgtc	1080
cactacatgc tcggggcctt gaggactctt ggtctctctg tcgaagcggc caaagctgcc	1140
aaaagagctg tagttgttg ctgtggtgga aagttcccag ttgaggattc taaagaggaa	1200
gtgcagctct tcttggggaa tgctggaact gcaatgcggc cattgacagc agctgttact	1260
gctgctgggtg gaaatgcaac gtatgtttcc tctctttctc tctacaatac ttgctggagt	1320
tagtatgaaa cccatgggta tgtctagtg cttatggtgt attgggtttt gaacttcagt	1380
tacgtgcttg atggagtacc aagaatgagg gagagacca ttggcgactt ggttgtcgga	1440
ttgaagcagc ttggtgcaga tgttgattgt ttccttggca ctgactgccc acctgttcgt	1500
gtcaatggaa tcggagggct acctggtggc aaggtagct actaagggcc acatgttaca	1560
ttcttctgta aatggtacaa ctattgtcga gcttttgcac ttgtaaggaa agcattgatt	1620
gatctgaatt tgatgctaca ccacaaaata tcctacaaat ggtcatccct aactagcaaa	1680
caatgaagta atacttgga tgtgtttatc aaattaattt ccatcttctg gggcattgcc	1740

ES 2 809 679 T3

tgttttctag tctaatagca tttgttttta gcattaatta gctcttacia ttgttatggt 1800
 ctacaggcca agctgtctgg ctccatcagc agtcagtact tgagtgcctt gctgatggct 1860
 gctcctttgg ctcttgggga tgtggagatt gaaatcattg ataaattaat ctccattccc 1920
 tacgtcgaaa tgacattgag attgatggag cgttttggtg tgaaagcaga gcattctgat 1980
 agctgggaca gattctacat taagggaggt caaaaataca agtaagctct gtaatgtatt 2040
 tcaactacttt gatgccaatg tttcagtttt cagttttcca aacagtgcga tcaatatttg 2100
 aatagatgca ctgtagaaaa aaaatcattg cagggaaaaa ctagtactga gtattttgac 2160
 tghtaaattat tttaccagtc ggaatatagt cagtctattg gagtcaagag cgtgaaccga 2220
 aatagccagt taattatccc attatacaga ggacaacat gtatactatt gaaacttggg 2280
 ttataagaga atctaggtag ctggactcgt agctgcttgg catggatacc ttcttatctt 2340
 taggaaaaga cacttgattt ttttttctg tggccctcta tgatgtgtga acctgcttct 2400
 ctattgcttt agaaggatat atctatgtcg ttatgcaaca tgcttccctt agccatttgt 2460
 actgaaatca gtttcataag ttcgttagt gttccctaaa cgaaacctg tttttcttg 2520
 caatcaacag gtcccctaaa aatgcctatg ttgaaggga tgcctcaagc gcaagctatt 2580
 tcttggtgg tgctgcaatt actggagga ctgtgactgt ggaaggttgt ggcaccacca 2640
 gtttgcaggt aaagatttct tggctggtgc tacaataact gcttttgtct ttttggttc 2700
 agcattgttc tcagagtcac taaataacat tatcatctgc aaatgtcaa tagacatact 2760
 taggtgaatt catgtaaccg tttccttaca aatttgctga aacctcaggg tgatgtgaag 2820
 tttgctgagg tactggagat gatgggagcg aaggttacat ggaccgagac tagcgtaact 2880
 gttactggcc caccgcggga gccatttggg aggaaacacc tcaaggcgat tgatgtcaac 2940
 atgaacaaga tgcctgatgt cgccatgact cttgctgtgg ttgccctctt tgccgatggc 3000
 ccgacagcca tcagagacgg taaaacattc tcagccctac aacctgcct cttctacatc 3060
 actacttgac aagactaaaa actattggct cgttggcagt ggcttcctgg agagtaaagg 3120
 agaccgagag gatggttgcg atccggacgg agctaaccaa ggtaaggcta catacttcac 3180
 atgtctcacg tcgtctttcc atagctcgt gcctcttagc ggcttgctg cggtcgtctc 3240
 atcctcgggt gctgtctgtg ttttccacag ctgggagcat ctgttgagga agggccggac 3300
 tactgcatca tcacgccgcc ggagaagctg aacgtgacgg cgatcgacac gtacgacgac 3360
 cacaggatgg ccatggcctt ctcccttggc gcctgtgccc aggtccccgt gaccatccgg 3420
 gaccctgggt gcaccggaa gaccttccc gactacttcg atgtgctgag cactttcgtc 3480
 aagaattaat aaagcgtgcg atactaccac gcagcttgat tgaagtgata ggcttgtgct 3540
 gaggaaatac atttcttttg ttctgttttt tctctttcac gggattaagt tttgagtctg 3600
 taacgttagt tgtttgtagc aagtttctat ttcggatctt aagtttgtgc actgtaagcc 3660

ES 2 809 679 T3

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

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

5

<400> 317

acctacttcc ccctcgcccc tctcatggtc tctctcgcgc ccagatctgc tactagacgg 60
 caccgctgca gcgcgctcgtg tcgcgggggt tgggtggcagg cagcgagagc ttgccgttcc 120
 tctctctcag ttgtcaggtc ctaggctcac ctcaccggct ccagcccgc ttctatttct 180
 tcctccccga ccccgctgag gtggcagtcc agtccacgcc accaaccgagc aggcgaacca 240
 aaccaacca ctctcccca ccccgcgcgc ccagggccgc cgccctacca accatcggcg 300
 tcggcaatgg cggccatggc gaccaaggcc gccgcgggca ccgtgtcgtc ggacctcgcc 360
 gcgccgcccg cggcggcagc ggcggcggcg gtgcaggcgg gtgccgagga gatcgtgctg 420
 cagcccataca aggagatctc cggcaccgtc aagctgccgg ggtccaagtc gctttccaac 480
 cggatcctcc tgctcgccgc cctgtccgag gggacaacag tggttgataa cctggtgaac 540
 agtgaggatg tccactacat gctcggggcc ttgaggactc ttggtctctc tgtcgaagcg 600
 gacaaagctg ccaaaagagc tgtagttggt ggctgtggtg gaaagttccc agttgaggat 660
 tctaaagagg aagtgcagct cttcttgggg aatgctggaa ctgcaatgcg gccattgaca 720
 gcagctgtta ctgctgctgg tggaaatgca acttacgtgc ttgatggagt accaagaatg 780
 agggagagac ccattggcga cttggttgtc ggattgaagc agcttgggtc agatggtgat 840
 tgtttccttg gcaactgactg cccacctgtt cgtgtcaatg gaatcggagg gctacctggt 900
 ggcaagggtca agctgtctgg ctccatcagc agtcagtact tgagtgcctt gctgatggct 960
 gctcctttgg ctcttgggga tgtggagatt gaaatcattg ataaattaat ctccattccc 1020
 tacgtcgaaa tgacattgag attgatggag cgttttggtg tgaaagcaga gcattctgat 1080
 agctgggaca gattctacat taagggaggt caaaaataca agtcccctaa aatgcctat 1140
 gttgaagggtg atgcctcaag cgcaagctat ttcttggctg gtgctgcaat tactggaggg 1200
 actgtgactg tggaaaggtg tggcaccacc agtttgcagg gtgatgtgaa gtttgctgag 1260
 gtactggaga tgatgggagc gaaggttaca tggaccgaga ctagcgtaac tgttactggc 1320
 ccaccgcccg agccatttgg gaggaaacac ctcaaggcga ttgatgtcaa catgaacaag 1380

ES 2 809 679 T3

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

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

5

<400> 318

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

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

10

<400> 319

gctgtatcat atcttcttct ttagaacact aataaattaa acttogagat aatgatttct 60
gacaagagta taaacaagtg catctatgaa gatttgaggt tgtccaaaa agtgacaatt 120
ttgggttctct ataaactgta tttacattat tgttatttgc aactataaaa attttagatt 180
atttccaagc tcagtttctt caacttaaat gaaggtagca cttgaatttc atcagcctct 240
atgaccagtg aaccatgtg ggagatggga gcaaagtggt caaactttag aaggaat 297

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

15

ES 2 809 679 T3

<400> 320

gtatgaactt tcagaatatt ataccggatc aatatattat gctgaaatat ttttcggact	60
ttaaataatt tctttattta aatttatttt tatacaaaaa taactaaatt tcaattactt	120
ttaaattat gattattttt caattaccac ttatacatcc tgctattttg aatttcaccc	180
gaaagaacta ctactatacg tggatcctca atgaccaggc aaccaagtg ggagatgtgt	240
gcaaagtggc caaatcttag aaggaatga	269

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para regular la expresión de un gen diana endógeno en plantas en crecimiento, que comprende: aplicar por vía tópica sobre la superficie de dichas plantas en crecimiento:

- 5 (a) al menos un ARN bicatenario no transcribible que comprende una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos en cualquiera de dicho gen diana endógeno o ARN mensajero transcrito a partir de dicho gen diana endógeno; y
- 10 (b) una cantidad eficaz de un agente químico de transferencia, en el que dicho agente químico de transferencia permite que dicho al menos un ARN bicatenario no transcribible se infiltre al interior de dichas plantas en crecimiento, en el que dicho agente químico de transferencia es un tensioactivo de organosilicona, y mediante lo cual dicho al menos un ARN bicatenario no transcribible regula la expresión de dicho gen diana endógeno.

2. Una composición que comprende:

- 15 (a) una solución de ARN bicatenario no transcribible que comprende una secuencia esencialmente idéntica o esencialmente complementaria a una secuencia de 18 o más nucleótidos contiguos de un gen endógeno de una planta o a la secuencia de ARN transcrita a partir de dicho gen endógeno; en el que dicho ARN bicatenario no transcribible es capaz de hibridarse en condiciones fisiológicas en las células de dicha planta con dicho gen endógeno o con dicho ARN transcrito a partir de dicho gen endógeno para efectuar el silenciamiento de dicho gen endógeno; y
- 20 (b) un agente químico de transferencia eficaz para facilitar la transferencia de dicho ARN bicatenario no transcribible desde la superficie exterior de dicha planta al interior de las células de dicha planta, en el que dicho agente químico de transferencia es un tensioactivo de organosilicona.

3. El procedimiento de la reivindicación 1,

- 25 en el que dicha expresión de dicho gen diana endógeno se regula en células vegetales distintas de las que han recibido la aplicación tópica;
- en el que dicho gen diana endógeno se regula por vía sistémica en al menos un órgano vegetal;
- 25 en el que dichos polinucleótidos no transcribibles se dirigen a diferentes segmentos de un gen endógeno o a diferentes genes endógenos;
- en el que dichas plantas se cultivan en un campo abierto;
- en el que dichas plantas se cultivan en un invernadero;
- 30 en el que dichas plantas también se pulverizan con un herbicida no polinucleotídico; o una combinación de uno o más de los mismos.

4. La composición de la reivindicación 2,

- 35 en la que dicho tensioactivo de organosilicona es un copolímero de poliéter y silicona; en la que dicho copolímero de poliéter y silicona es un copolímero de heptametil trisiloxano modificado con óxido de polialquileo y aliloxipolipropilenglicol metiléter (disponible como tensioactivo Silwet® L-77); comprendiendo además una molécula herbicida no polinucleotídica; o una combinación de los mismos.

Figura 1

ATGGCTCAAGCTACTACCATCAACAATGGTGTCCATACTGGTCAATTGCACCATACTTTACCCAAA
CCCAGTTACCCAAATCTTCAAAAACTCTTAATTTTGGATCAA**ACTTGAGAATTTCTCCAAAGTTCAT**
GTCTTTAACCAATAAAAGAGTTGGTGGGCAATCATCAATTGTTCCCAAGATTCAAGCTTCTGTTGCT
 GCTGCAGCTGAGAAACCTTCATCTGTCCCAGAAATTGTGTTACAACCCATCAAAGAGATCTCTGGTA
 CTGTTCAATTGCCTGGGTCAAAGTCTTTATCCAATCGAATCCTTCTTTTAGCTGCTTTGTCTGAGGG
 CACAACAGTGGTCGACAAC**TGCTGTATAGTGAT**GATATTCTTTATATGTTGGACGCTCTCAGA**ACT**
 CTTGGTTTAAAGTGGAGGATGATAGTACAGCCAAAAGGGCAGTCGTA**GAGGGTTGTGGTGGTCTGT**
TTCTGTTGGTAAAGATGGAAAGGAAGAGATTCAACTTTTCTTGGTAATGCAGGAACAGCGATGCG
CCCATTGACAGCTGCGGTTGCCGTTGCTGGAGGAAATTCAAGTTATGTGCTTGATGGAGTACCAAGA
ATGAGGGAGCGCCCCATTGGGGATCTGGTAGCAGGTCTAAAGCAACTTGGTTCAGATGTAGATTGTT
TTCTTGGCACAAATTGCCCTCCTGTTCCGGTCAATGCTAAAGGAGGCCTTCCAGGGGGCAAGGTCAA
 GCTCTCTGGATCGGTTAGTAGCCAATATTTAACTGCACTTCTCATGGCTACTCCTTTGGGTCTTGGA
 GACGTGGAGATTGAGATAGTTGATAAATTGATTTCTGTACCGTATGTTGAAATGACAATAAAGTTGA
 TGGAACGCTTTGGAGTATCCGTAGAACATAGTGATAGTTGGGACAGGTTCTACATTGAGGTGGTCA
 GAAATACAAATCTCCTGGAAAGGCATATGTTGAGGGTGATGCTTCAAGTGCTAGCTACTTCTAGCC
 GGAGCCGCCGTCACTGGTGGGACTGTCACTGTCAAGGGTTGTGGAACAAGCAGTTTACAGGGTGATG
 TAAAATTTGCCGAAGTTCTTGAGAAGATGGGTTGCAAGGTCACCTGGACAGAGAATAGTGTA**ACTGT**
TACTGGACCACCCAGGGATTCATCTGGAAGAAACATCTGCGTGCTATCGACGTCAACATGAACAAA
ATGCCAGATGTTGCTATGACTCTTGCAAGTTGTTGCCTTGTATGCAGATGGGCCACC GCCATCAGAG
ATGTGGCTAGCTGGAGAGTGAAGGAAACCGAACGGATGATTGCCATTTGCACAGAACTGAGAAAGCT
 TGGGGCAACAGTTGAGGAAGGATCTGATTACTGTGTGATCACTCCGCCTGAAAAGCTAAACCCACC
 GCCATTGAAACTTATGACGATCACCGAATGGCCATGGCATTCTCTCTTGTGCTGCCTGTGCAGATGTTT
 CCGTCACTATCCTTGATCCGGGATGCACCCGTAAAACCTTCCCGGACTACTTTGATGTTTTAGAAAA
 GTTCGCCAAGCATTGA

SEQ ID NO:1

Figura 2

GGCCCATAGGCCTTTTTCTAAAATAG**GGCCC**ATTTAAGCTATTAACAATCTTCAAAG**TACCACATCG**
CTTAGGTAAAGAAAGCAGCTGAG**TTTATATA**TGGTTAGAGACGAAGTAGTGATT**GCGACGAGCGACG**
TCTCGCCCTCATCGCAATCCACGCCATTGAGCTTGAGGCCATTGGCGACGGCCGAGAGGCGGTGCT
***TAAGATTAGCATG**TCCTTGACGCGGAGTTCTTCCAGACCGTTCATCACGGTCGCCCCCTCCGCGAAG*
GCGGCGGCGACAGCGAGAATCGGATATTCGTCGATCATCGAAGGCGCGGGTCTTCCGGCACCGTGA
CGCATAAAcacggtgcccgaagaccgcgcgccttcgatgatcgacgaatatccgattctcgtgctcg
ccgccccttcgcggaaggggacgacctgatgaacggctctggaagaactccgctcaaggaaagcga
ccgctctcggccgctcgccaatggcctcaagctcaatggcgtggattgcgatgagggcgagacgtcg
ctcgtcg**TTTTTTTT**GGCAAAA

SEQ ID NO:3

Figura 3



3A



3B



3C

Figura 4

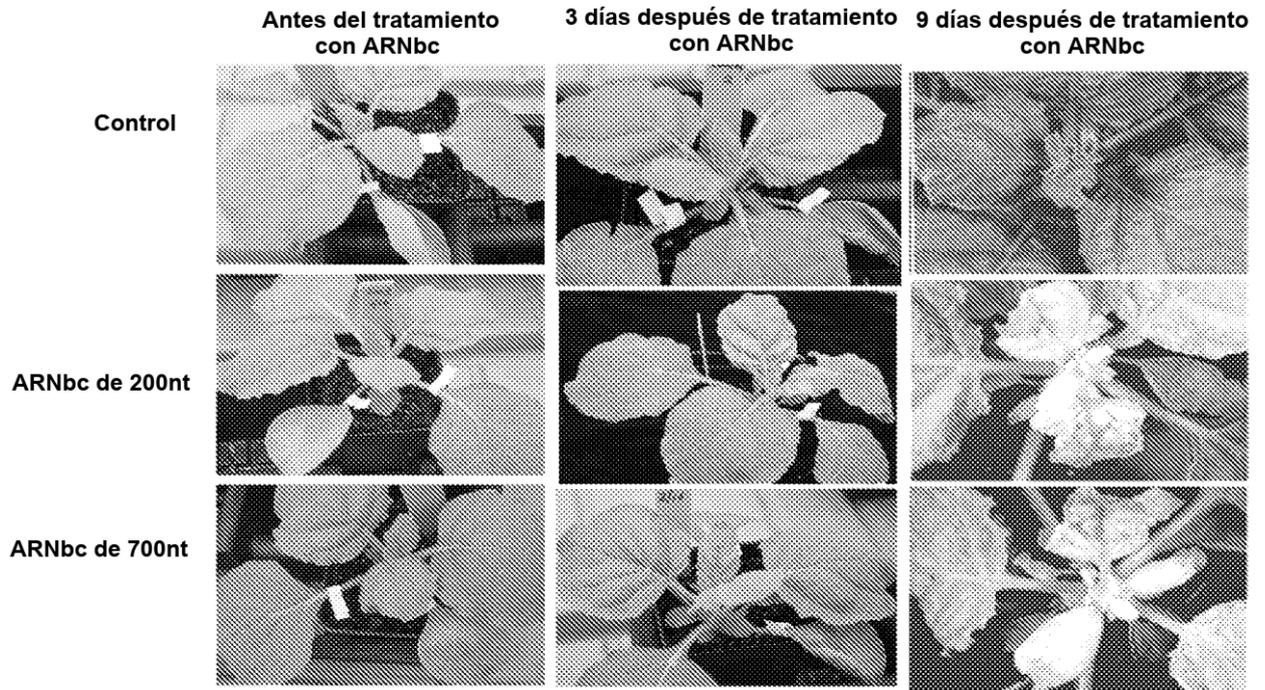


Figura 5

ATGCCCCAAATCGGACTTGTATCTGCTGTTAATTTGAGAGTCCAAGGTAATTCAGCTTATCTTTGGA
 GCTCGAGGTCTTCGTTGGGAACTGAAAGTCAAGATGTTTGCTTGCAAAGGAATTTGTTATGTTTTGG
 TAGTAGCGACTCCATGGGGCATAAGTTAAGGATTCGTACTCCAAGTGCCACGACCCGAAGATTGACA
 AAGGACTTTAATCCTTTAAAGGTAGTCTGCATTGATTATCCAAGACCAGAGCTAGACAATACAGTTA
 ACTATTTGGAGGCGGCGTTATTATCATCATCGTTTTCGTACTTCCTCACGCCCAACTAAACCATTGGA
 GATTGTTATTGCTGGTGCAGTTTTGGGTGGTTTTGTCTACAGCAAAATATCTGGCAGATGCTGGTCAC
 AAACCGATATTGCTGGAGGCAAGAGATGTCTAGGTGGGAAGGTAGCTGCATGGAAAGATGATGATG
GAGATTGGTACGAGACTGGGTTGCACATATTCTTTGGGGCTTACCCAAATATGCAGAACCTGTTTGG
AGAACTAGGGATTGATGATCGGTTGCAGTGGAAAGAACATTC AATGATATTTGCGATGCCTAAC AAG
CCAGGGGAGTT CAGCCGCTTTGATTTTCTTGAAGCTCTTCTTGCGCCATTAAATGGAATTTTGGCCA
TACTAAAGAACAACGAAATGCTTACGTGGCCCGAGAAAAGTCAAATTTGCTATTGGACTCTTGCCAGC
AATGCTTGGAGGGCAATCTTATGTTGAAGCTCAAGACGGTTTTAAGTGTTAAGGACTGGATGAGAAAAG
CAAGGTGTGCCTGATAGGGTGACAGATGAGGTGTTT CATTGCCATGTCAAAGGCACTTAACTTCATAA
ACCCTGACGAGCTTTCGATGCAGTGCATTTT GATTGCTTTGAACAGATTTCTTCAGGAGAAACATGG
TTCAAAAATGGCCTTTTTTAGATGGTAACCCTCCTGAGAGACTTTGCATGCCGATTGTGGAACATATT
GAGTCAAAGGTGGCCAAGTCAGACTAAACTCACGAATAAAAAAGATCGAGCTGAATGAGGATGGAA
GTGTCAAATGTTTTATACTGAATAATGGCAGTACAATTAAAGGAGATGCTTTTGTGTTTGCCACTCC
 AGTGGATATCTTGAAGCTTCTTTTGCCTGAAGACTGGAAAGAGATCCCATATTTCCAAAAGTTGGAG
 AAGCTAGTGGGAGTTCCTGTGATAAATGTCCATATATGGTTTTGACAGAAAACCTGAAGAACACATCTG
 ATAATCTGCTCTTCAGCAGAAGCCCGTTGCTCAGTGTGTACGCTGACATGTCTGTTACATGTAAGGA
 ATATTACAACCCCAATCAGTCTATGTTGGAATTGGTATTTGCACCCGCAGAAGAGTGGATAAATCGT
 AGTGACTCAGAAATTATTGATGCTACAATGAAGGAACTAGCGAAGCTTTTCCCTGATGAAATTTCCG
 CAGATCAGAGCAAAGCAAAAATATTGAAGTATCATGTTGTCAAACCCCAAGGTCTGTTTATAAAAC
 TGTGCCAGGTTGTGAACCTGTTCGGCCCTTGCAAAGATCCCCTATAGAGGGTTTTTTATTTAGCTGGT
 GACTACACGAAACAGAAGTACTTGGCTTCAATGGAAGGTGCTGTCTTATCAGGAAAGCTTTGTGCAC
 AAGCTATTGTACAGGATTACGAGTTACTTCTTGGCCGGAGCCAGAAGATGTTGGCAGAAGCAAGCGT
 AGTTAGCATAGTGAACTAA

SEQ ID NO:2

Figura 6

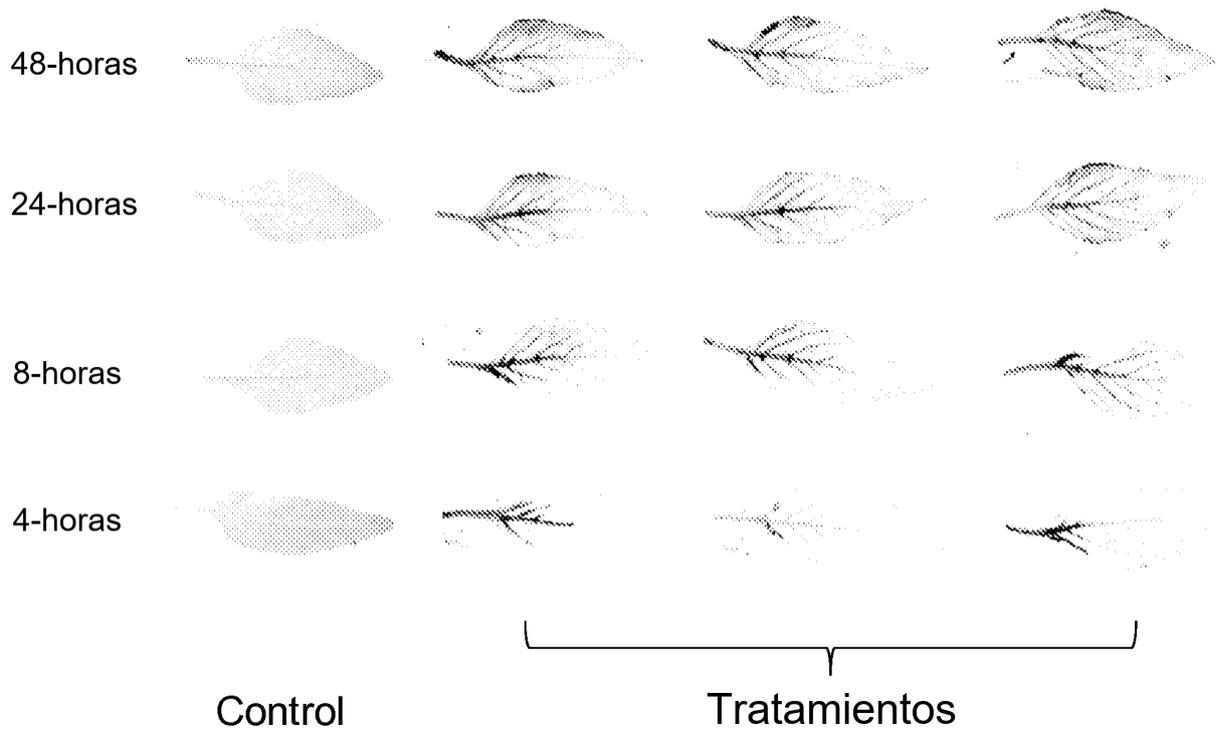


Figura 7

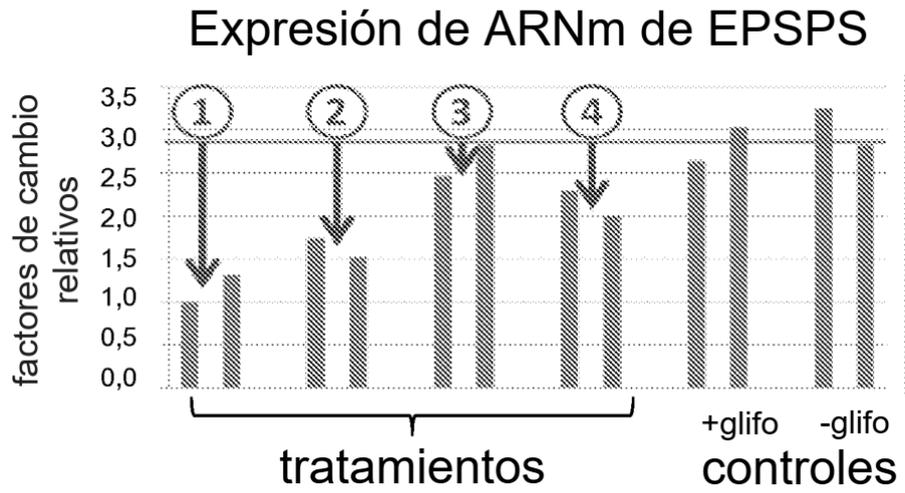


Figura 8

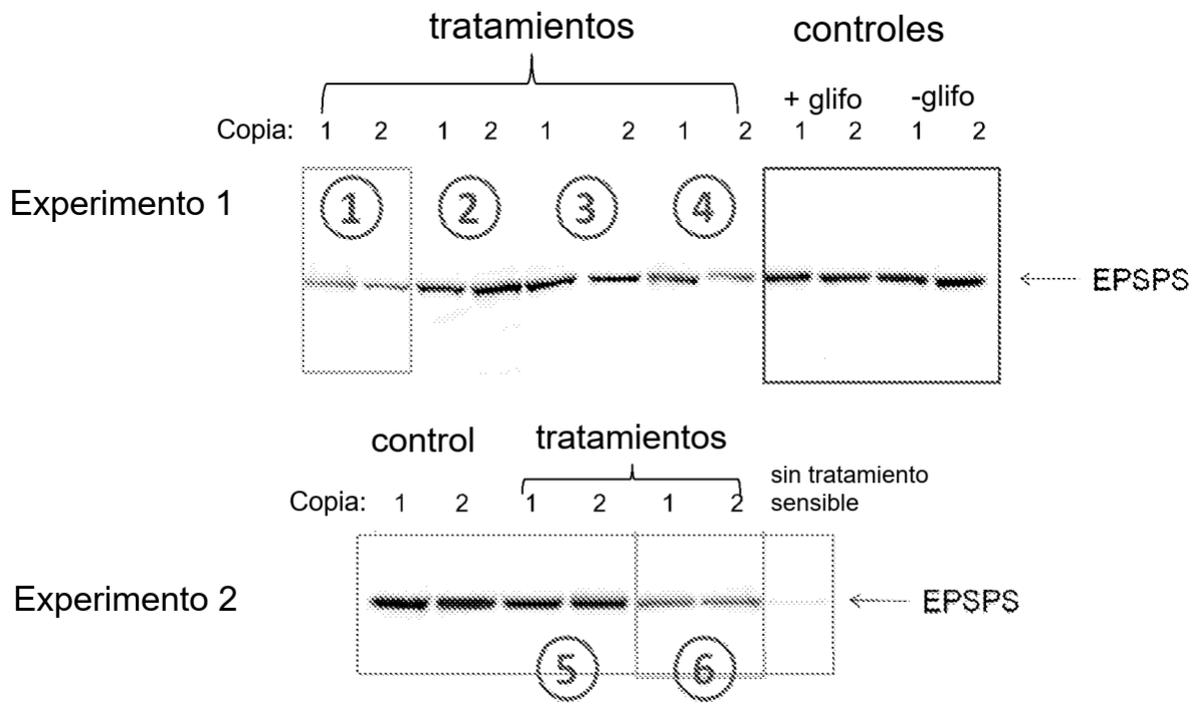


Figura 9

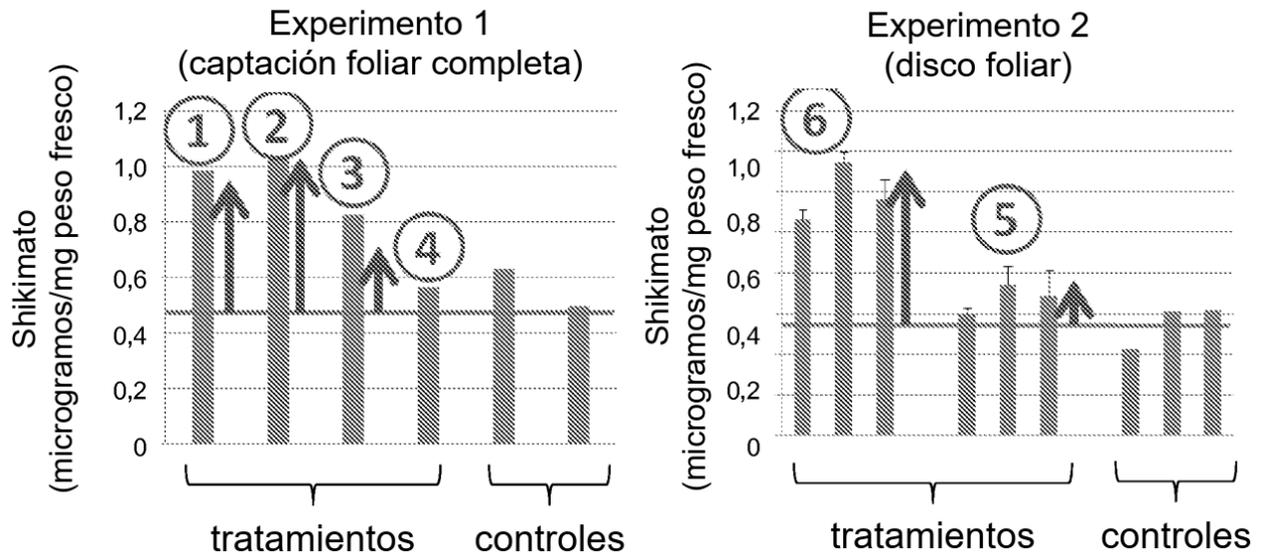


Figura 10

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

ATGCCCCAAATCGGACTTGTATCTGCTGTTAATTTGAGAGTCCAAGGTAATTCAGCTTATCTTTGGA
GCTCGAGGTCTTCGTTGGGAAGTCAAGATGTTTGCTTGCAAAGGAATTTGTTATGTTTTGG
TAGTAGCGACTCCATGGGGCATAAGTTAAGGATTCGTACTCCAAGTGCCACGACCCGAAGATTGACA
AAGGACTTTAATCCTTTAAAGGTAGTCTGCATTGATTATCCAAGACCAGAGCTAGACAATACAGTTA
ACTATTTGGAGGCGGCGTTATTATCATCATCGTTTCGTACTTCCTCACGCCAACTAAACCATTGGA
GATTGTTATTGCTGGTGCAGGTTTGGGTGGTTTGTCTACAGCAAAATATCTGGCAGATGCTGGTCC
AAACCGATATTGCTGGAGGCAAGAGATGTCTAGGTGGGAAGGTAGCTGCATGGAAAGATGATGATG
GAGATTGGTACGAGACTGGGTTGCACATATTCTTTGGGGCTTACCAAATATGCAGAACCTGTTTGG
AGAAGTAGGGATTGATGATCGGTTGCAGTGGAAAGGAACATTCAATGATATTTGCGATGCCTAACAAG
CCAGGGGAGTTTCAGCCGCTTTGATTTTCTGAAGCTCTTCTGCGCCATTAAATGGAATTTTGGCCA
TACTAAAGAACAACGAAATGCTTACGTGGCCGAGAAAGTCAAATTTGCTATTGGACTCTTGCCAGC
AATGCTTGGAGGGCAATCTTATGTTGAAGCTCAAGACGGTTTAAAGTGTAAAGGACTGGATGAGAAAG
CAAGGTGTGCCTGATAGGGTGACAGATGAGGTGTTTCATTGCCATGTCAAAGGCACTTAACTTCATAA
ACCCTGACGAGCTTTCGATGCAGTGCATTTTGATTGCTTTGAACAGATTTCTTCAGGAGAAACATGG
TTCAAAAATGGCCTTTTTTAGATGGTAACCCTCCTGAGAGACTTTGCATGCCGATTGTGGAACATATT
GAGTCAAAGGTGGCCAAGTCAGACTAAACTCACGAATAAAAAAGATCGAGCTGAATGAGGATGGAA
GTGTCAAATGTTTTATACTGAATAATGGCAGTACAATTAAGGAGATGCTTTTGTGTTTGCCACTCC
AGTGGATATCTTGAAGCTTCTTTTGCCTGAAGACTGGAAAGAGATCCCATATTTCCAAAAGTTGGAG
AAGCTAGTGGGAGTTCTGTGATAAATGTCCATATATGGTTTGGACAGAAAAGTGAAGAACACATCTG
ATAATCTGCTCTTCAGCAGAAGCCGTTGCTCAGTGTGTACGCTGACATGTCTGTTACATGTAAGGA
ATATTACAACCCCAATCAGTCTATGTTGGAATTGGTATTTGCACCCGCAGAAGAGTGGATAAATCGT
AGTGAATCAGAAATTATTGATGCTACAATGAAGGAAGTACGGAAGCTTTTCCCTGATGAAATTTCCG
CAGATCAGAGCAAAGCAAAAATATTGAAGTATCATGTTGTCAAACCCCAAGGTCTGTTTATAAAC
TGTGCCAGGTTGTGAACCCGTGCGGCCCTTGCAAAGATCCCCTATAGAGGGTTTTTATTTAGCTGGT
GACTACACGAAACAGAAGTACTTGGCTTCAATGGAAGGTGCTGTCTTATCAGGAAAGCTTTGTGCAC
AAGCTATTGTACAGGATTACGAGTTACTTCTTGGCCGAGCCAGAAGATGTTGGCAGAAGCAAGCGT
AGTTAGCATAGTGAACATA

SEQ ID NO:2

Figura 11

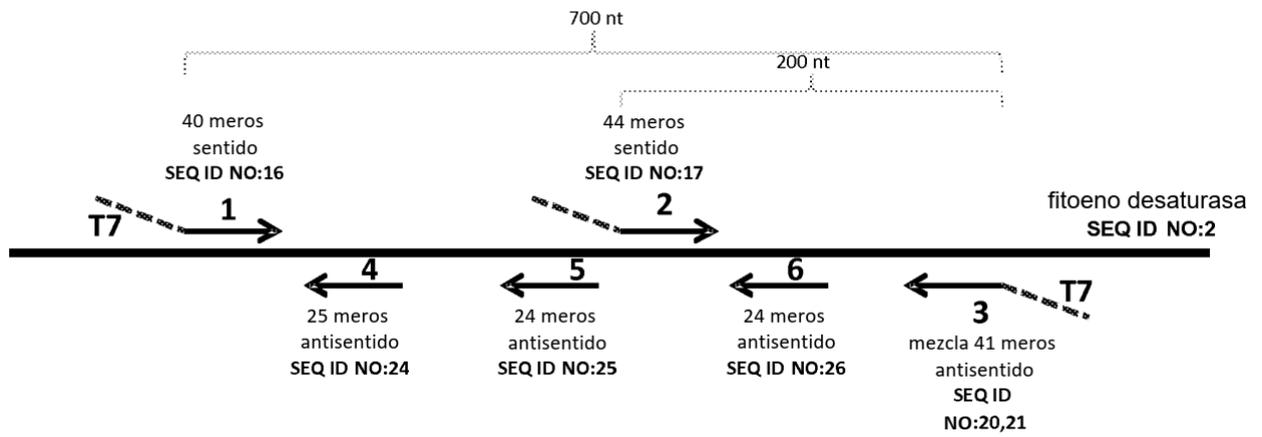


Figura 12

Control

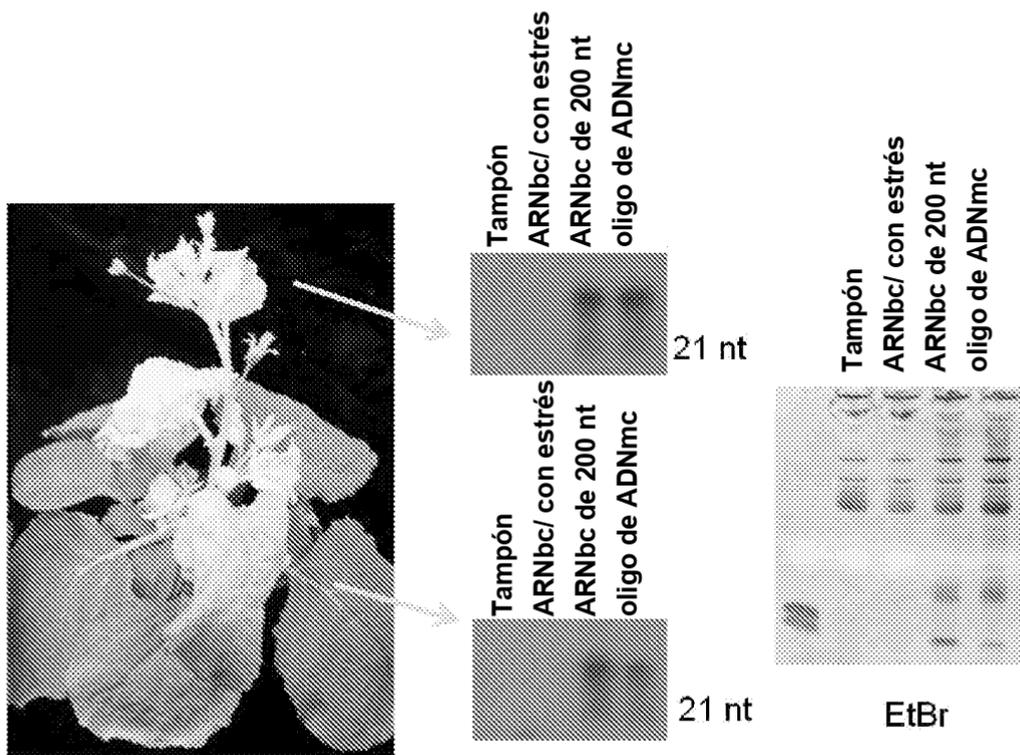
ARNbc de 200 nt

oligos de ADNmc
(1+2+3+4+5+6)

SEQ ID NO: 16, 17, 20,
21, 24, 25, y 26



A



B

Figura 13

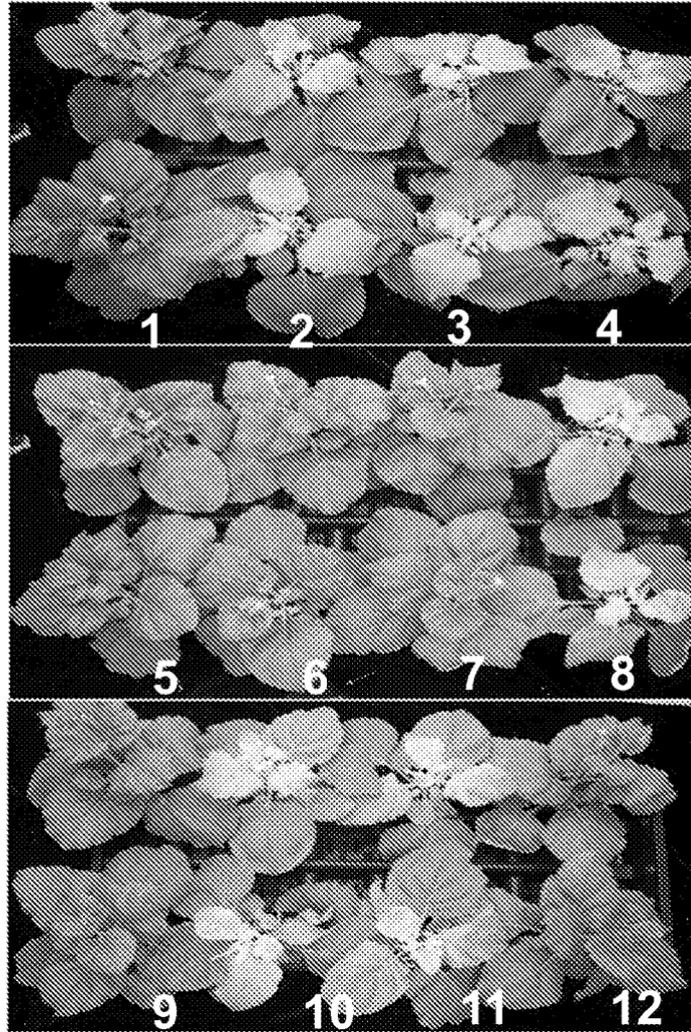


Figura 14

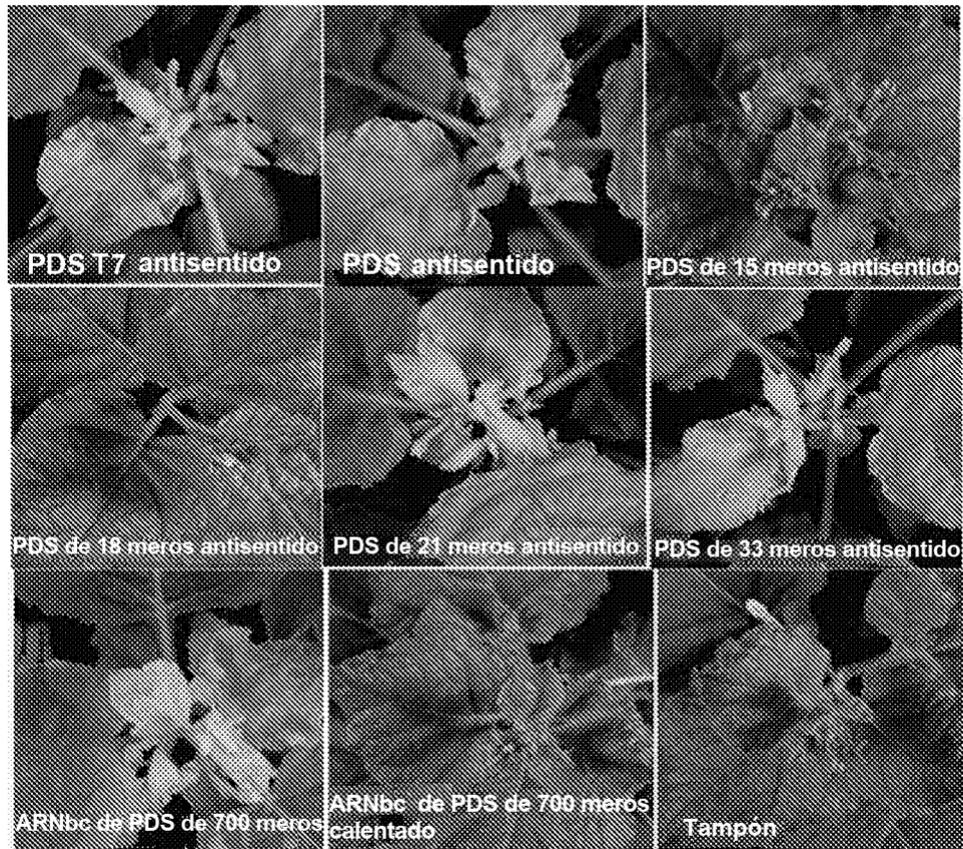


Figura 15

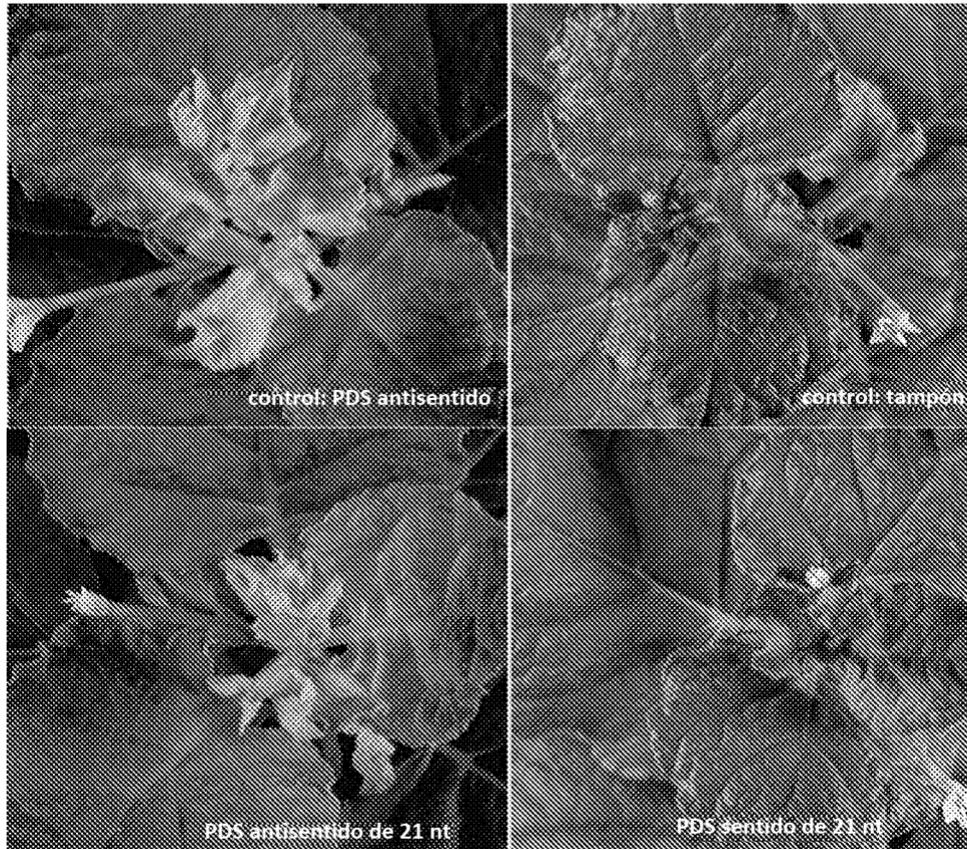


Figura 16

```

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

                30          40          50
Palmera      TT-----TTTGG-----GTCATTCTGTGAGAAATTTTCAGTG--
                ::          :::::          :::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::
Benthamiana TTCAGCTTATCTTTGGAGCTCGAGGTC-TTCGTTGGGAAGTCAA
                60          70          80          90

                60
Palmera      -----TTAGTAAAGTTT-----AT
                ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::
Benthamiana GATGTTTGCTTGCAAAGGAATTTGTTATGTTTTGGTAGTAGCGACTCCAT
                100          110          120          130          140

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

                100          110          120          130
Palmera      -----CTTTAAAGGTTGTTTGTATAGATTATCCTAGGCCA
                ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::
Benthamiana CAAAGGACTTTAATCCTTTAAAGGTAGTCTGCATTGATTATCCAAGACCA
                200          210          220          230          240

                140          150          160          170          180
Palmera      GAGCTTGAAAAGTACATCCAATTTCTTGGAAGCCGCTACTTATCTTCTAC
                ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::
Benthamiana GAGCTAGACAATACAGTTAACTATTTGGAGGCGGCGTTATTATCATCATC
                250          260          270          280          290

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

                240          250          260          270          280
Palmera      GAGCAGGTTTGGCTGGTCTATCCACGGCAAAGTATTTAGCTGATGCAGGT
                :  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::
Benthamiana GTGCAGGTTTGGGTGGTTTGTCTACAGCAAAATATCTGGCAGATGCTGGT
                350          360          370          380          390

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

```

Figura 16 (continuación)

	340	350	360	370	380	
Palmera	AGCGTGGAAAGGATGAGGATGGTACTGGTATGAGACTGGGCTACATATAT					SEQ ID NO: 37
	:: ::::: ::::: ::::: :: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::					
Benthamiana	TGCATGGAAAAGATGATGATGGAGATTGGTACGAGACTGGGTTGCACATAT					SEQ ID NO: 38
	450	460	470	480	490	
	390	400	410	420	430	
Palmera	TCTTTGGGGCATATCCAAATGTCCAAATCTATTTGGAGAACTTGGTATA					
	: :					
Benthamiana	TCTTTGGGGCTTACCCAAATATGCAGAACCTGTTTGGAGAACTAGGGATT					
	500	510	520	530	540	
	440	450	460	470	480	
Palmera	AATGACCGACTGCAATGGAAGGAGCACTCTATGATTTTTGCAATGCCAG					
	: :					
Benthamiana	GATGATCGGTTGCAGTGAAGGAACATTCAATGATATTTGCGATGCCTAA					
	550	560	570	580	590	
	490	500	510	520	530	
Palmera	CAAGCCGGTGAATTCAGTCGCTTTGATTTTTCCCGAAATCCTGCCTGCAC					
	: :					
Benthamiana	CAAGCCAGGGAGTTCAGCCGCTTTGATTTTTCTGAAGCTCTTCCTGCGC					
	600	610	620	630	640	
	540	550	560	570	580	
Palmera	CATTAATGGCATATGGGCAATCCTAAGAAATAATGAAATGCTAACCTGG					
	: :					
Benthamiana	CATTAATGGAATTTGGCCATACTAAAGAACAACGAAATGCTTACGTGG					
	650	660	670	680	690	
	590	600	610	620	630	
Palmera	CCAGAAAAAATCAAGTTTGCCATTGGCTTGTTGCCTGCTATGGCAGGCGG					
	: :					
Benthamiana	CCCGAGAAAGTCAAATTTGCTATTGGACTCTTGCCAGCAATGCTTGGAGG					
	700	710	720	730	740	
	640	650	660	670	680	
Palmera	ACAGTCATATGTTGAAGCACAAAGATGGTTTGAGTGTCCAAGAGTGGATGA					
	: :					
Benthamiana	GCAATCTTATGTTGAAGCTCAAGACGGTTTAAGTGTTAAGGACTGGATGA					
	750	760	770	780	790	
	690	700	710	720	730	
Palmera	GAAAACAAGGAGTACCCGATCGTGTAAGTATGATGTGTTTATTGCCATG					
	: :					
Benthamiana	GAAAACAAGGTGTGCCTGATAGGGTGACAGATGAGGTGTTTATTGCCATG					
	800	810	820	830	840	
	740	750	760	770	780	
Palmera	TCAAAGGCACTGAACTTCATAAATCCCGATGAACTTTCAATGCAGTGCAT					SEQ ID NO: 37
	: :					
Benthamiana	TCAAAGGCACTTAACTTCATAAACCTGACGAGCTTTTCGATGCAGTGCAT					SEQ ID NO: 38
	850	860	870	880	890	

Figura 16 (continuación)

	1240	1250	1260	1270	1280	
Palmera	TCCAAATAGATCCATGCTGGAATTGGTTTTTGCACCCGCGGAGGAATGGA					SEQ ID NO:37
	:: :::	:: :::	:: :::	:: :::	:: :::	
Benthamiana	CCCCAATCAGTCTATGTTGGAATTGGTATTTGCACCCGCGAAGAGTGGA					SEQ ID NO:38
	1350	1360	1370	1380	1390	
	1290	1300	1310	1320	1330	
Palmera	TTTCACGAAGCGACACTGATATTATAGAGGCAACAATGAAAGAGCTTGCC					
	:	:: :::	:: :::	:: :::	:: :::	
Benthamiana	TAAATCGTAGTGACTCAGAAATTATTGATGCTACAATGAAGGAACTAGCG					
	1400	1410	1420	1430	1440	
	1340	1350	1360	1370	1380	
Palmera	AAGCTTTTCCCGGATGAAATCGCTGCCGATGGAAGCAAGGCCAAGATCCT					
	:: :::	:: :::	:: :::	:: :::	:: :::	
Benthamiana	AAGCTTTTCCCTGATGAAATTTCCGGCAGATCAGAGCAAAGCAAATAATT					
	1450	1460	1470	1480	1490	
	1390	1400	1410	1420	1430	
Palmera	CAATATCATGTCGTCAAAACTCCAAGGTCGGTTTATAAGACTGTACCGG					
	:: :::	:: :::	:: :::	:: :::	:: :::	
Benthamiana	GAAGTATCATGTTGTCAAAACCCCAAGGCTGTTTATAAAACTGTGCCAG					
	1500	1510	1520	1530	1540	
	1440	1450	1460	1470	1480	
Palmera	ATTGTGAACCTTGTTCGGCCGCTGCAAAGATCACCAATAGAGGGTTTCTAT					
	:: :::	:: :::	:: :::	:: :::	:: :::	
Benthamiana	GTTGTGAACCTTGTTCGGCCCTTGC AAAGATCCCCTATAGAGGGTTTTTAT					
	1550	1560	1570	1580	1590	
	1490	1500	1510	1520	1530	
Palmera	TTAGCTGGTGATTACACAAAACAAAATATTTGGCTTCTATGGAAGGTGC					
	:: :::	:: :::	:: :::	:: :::	:: :::	
Benthamiana	TTAGCTGGTGACTACACGAAACAGAAGTACTTGGCTTCAATGGAAGGTGC					
	1600	1610	1620	1630	1640	
	1540	1550	1560	1570	1580	
Palmera	TGTCTTATCTGGGAAGCTTTGTGCACAGGCTATCGTACAGGATTATGA--					
	:: :::	:: :::	:: :::	:: :::	:: :::	
Benthamiana	TGTCTTATCAGGAAAGCTTTGTGCACAAGCTATTGTACAGGATTACGAGT					
	1650	1660	1670	1680	1690	
	1590	1600	1610			
Palmera	----TCT--GCTG-----AGTTCTCG--AGCACAAAGAGAA--TTGGC					
	:: :::	:: :::	:: :::	:: :::	:: :::	
Benthamiana	TACTTCTTGGCCGAGCCAGAAGATGTTGGCAGAAGCAAGCGTAGTTAGC					
	1700	1710	1720	1730	1740	
Palmera	G-----					SEQ ID NO:37
Benthamiana	ATAGTGAACTAA					SEQ ID NO:38
	1750	1760				

Figura 17

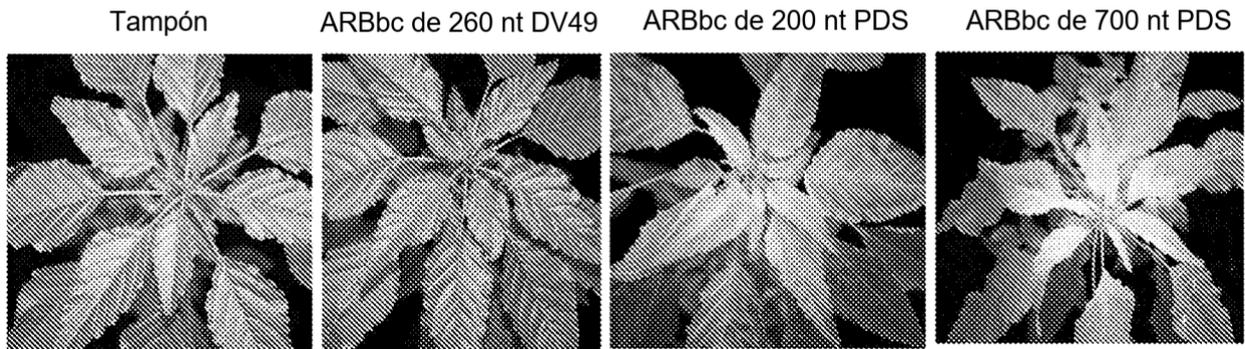
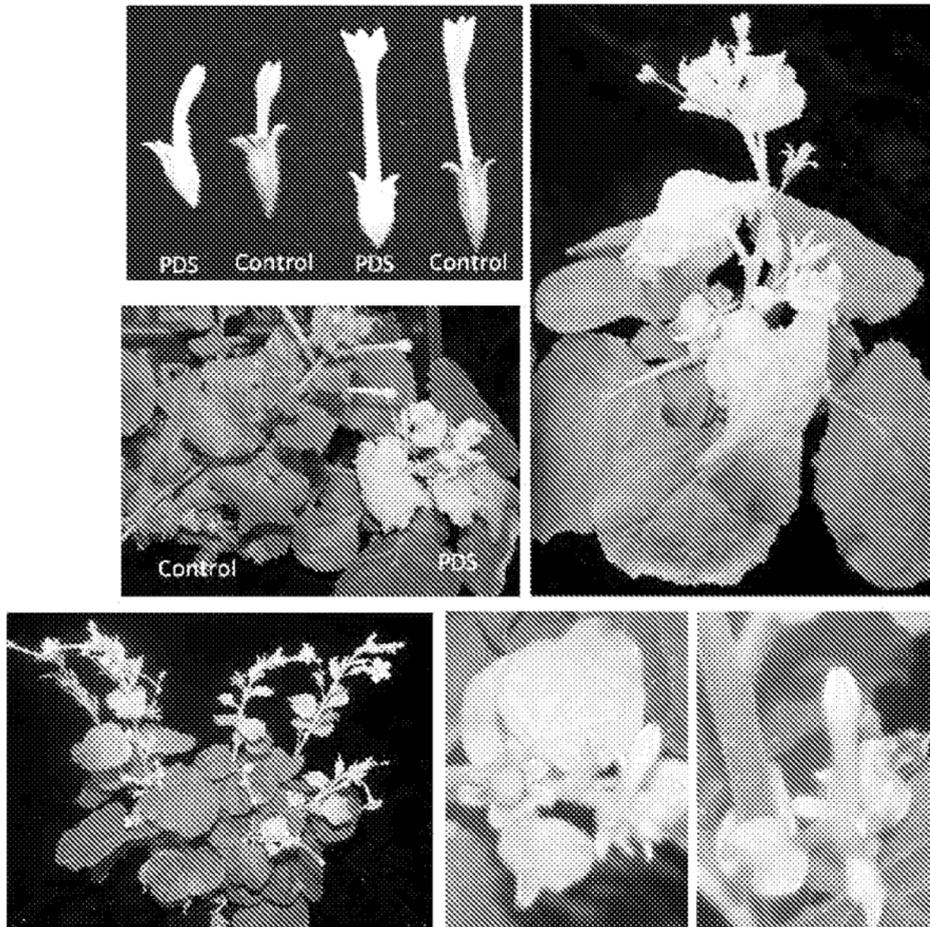
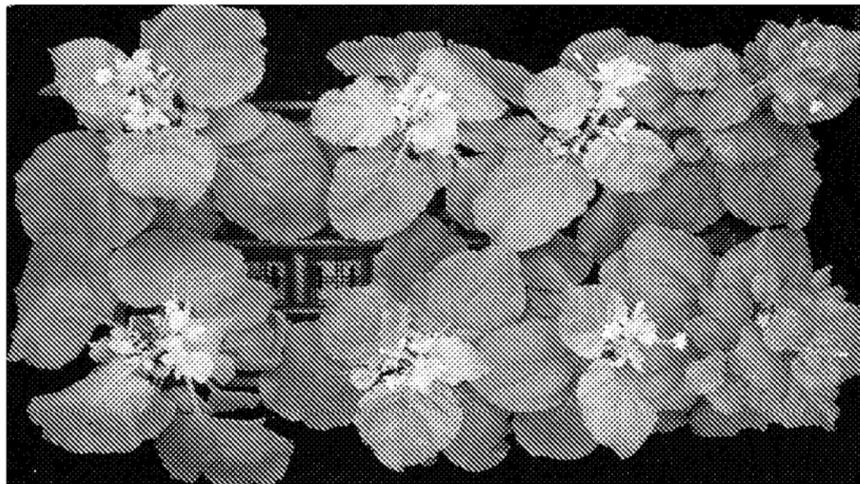


Figura 18



A



Acondicionamiento con Silwet al 0,1% seguido de ADNmc de PDS 1 nanomol + Silwet al 0,01%

Sin acondicionamiento con Silwet; Infiltrado de ADNmc de PDS 1 nanomol + Silwet al 0,01%

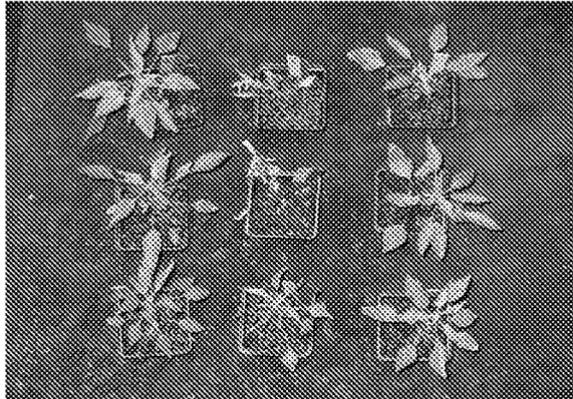
Sin acondicionamiento con Silwet; Infiltrado de ADNmc de PDS 1 nanomol (sin Silwet)

Tampón

B

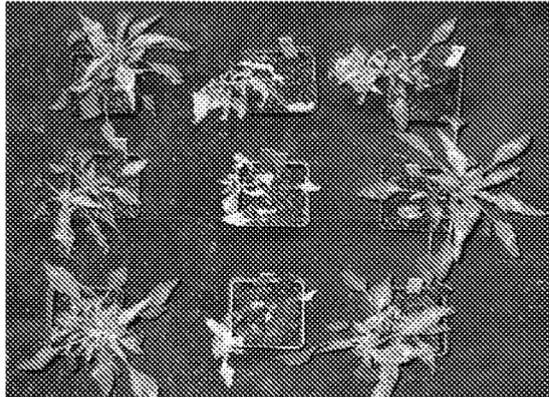
Figura 19

Trasp. n.º 3 Trasp. n.º 2 Trasp. n.º 1



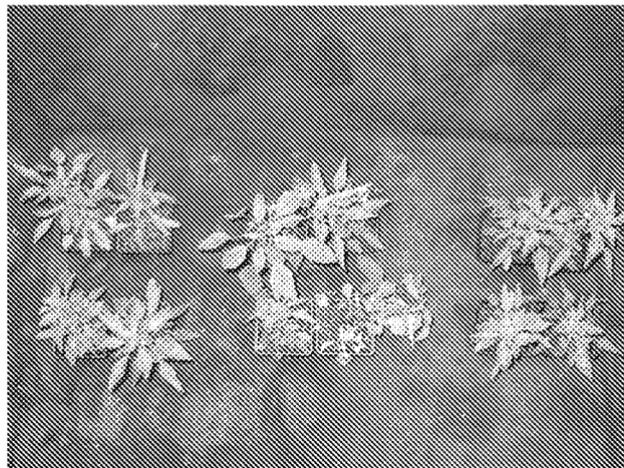
R31 (35 copias de EPSPS)

Trasp. n.º 6 Trasp. n.º 5 Trasp. n.º 4



R34 (57 copias de EPSPS)

Trasp. n.º 9 Trasp. n.º 8 Trasp. n.º 7



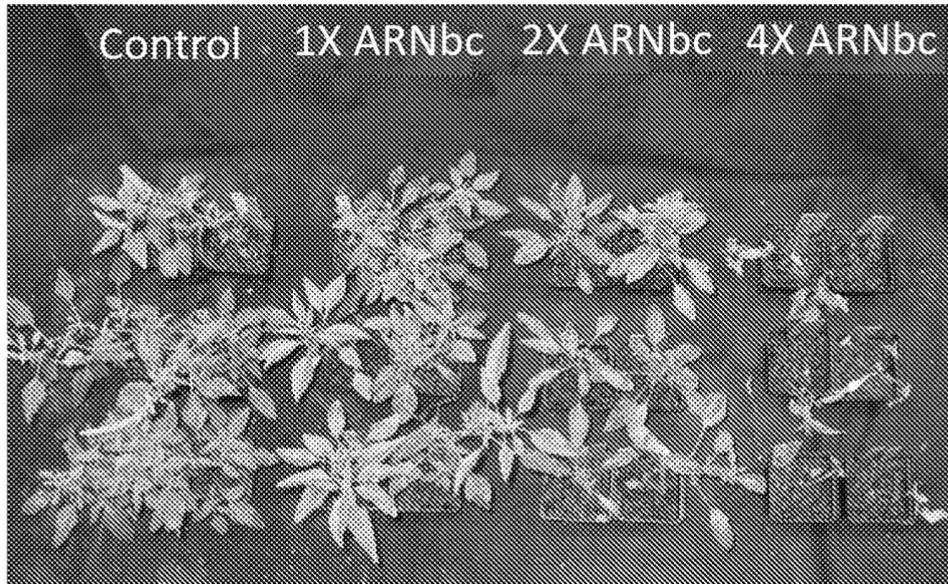
R28 (87 copias de EPSPS)

Figura 20

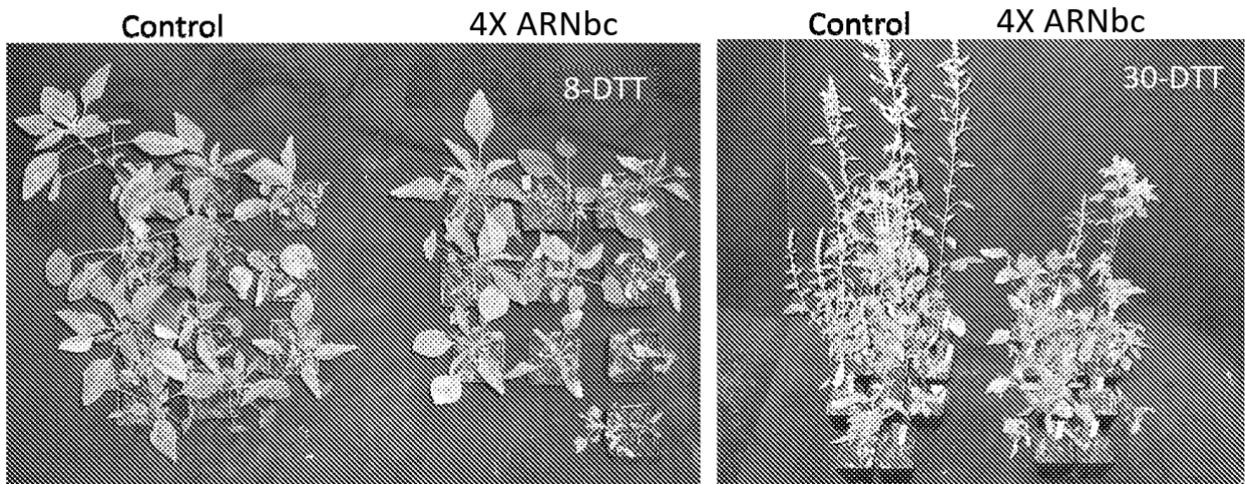
ATGGCTCAAGCTACT**ACCATCAACAATGGTGTCCATACTGGTCAATTGCACCATACTTTACCCAAA**
CCCAGTTACCCAAATCTTCAAAAATCTTAATTTTGGATCAAACCTTGAGAATTTCTCCAAAGTTCAT
GTCTTTAACCAATAAAAGAGTGGTGGGCAATCATCAATTGTTCCCAAGATTCAAGCTTCTGTTGCT
 GCTGCAGCTGAGAAACCTTCATCTGTCCCAGAAATTGTGTTACAACCCATCAAAGAGATCTCTGGTA
 CTGTTCAATTGCCTGGGTCAAAGTCTTTATCCAATCGAATCCTTCTTTTAGCTGCTTTGTCTGAGGG
 CACAACAGTGGTCGACAACTTGCTGTATAGTGATGATATTCTTTATATGTTGGACGCTCTCAGAACT
 CTTGGTTTAAAGTGGAGGATGATAGTACAGCCAAAAGGGCAGTCGTA**GAGGGTTGTGGTGGTCTGT**
TTCTGTTGGTAAAGATGGAAAGGAAGAGATCAACTTTTCCTTGGTAATGCAGGAACAGCGATGCG
CCCATTGACAGCTGCGGTTGCCGTTGCTGGAGGAAATTCAAGTTATGTGCTTGATGGAGTACCAAGA
ATGAGGGAGCGCCCATTTGGGGATCTGGTAGCAGGTCTAAAGCAACTTGGTTCAGATGTAGATTGTT
TTCTTGGCACAAATTGCCCTCCTGTTGGGTCAATGCTAAAGGAGGCCTTCCAGGGGGCAAGGTCAA
 GCTCT**CTGGATCGGTTAGTAGCCAATATTTAACTGCACTTCTCATGGCTACTCCTTTGGGTCTTGGGA**
 GACGTGGAGATTGAGATAGTTGATAAATTGATTTCTGTACCGTATGTTGAAATGACAATAAAGTTGA
 TGGAACGCTTTGGAGTATCCGTAGAACATAGTGATAGTTGGGACAGGTTCTACATTCGAGGTGGTCA
 GAAATACAAATCTCCTGGAAAGGCATATGTTGAGGGTGATGCTTCAAGTGCTAGCTACTTCCTAGCC
 GGAGCCGCCGTCCTGTTGGGACTGTCACTGTCAAGGGTGTGGAACAAGCAGTTTACAGGGTGATG
 TAAAATTTGCCGAAGTTCTTGAGAAGATGGGTTGCA**AGGTCACCTGGACAGAGAATAGTGTAAGTGT**
TACTGGACCACCCAGGGATTCATCTGGAAGAAACATCTGCGTGCTATCGACGTCAACATGAACAAA
ATGCCAGATGTTGCTATGACTCTTGCAAGTTGTTGCCTTGTATGCAGATGGGCCACCGCCATCAGAG
ATGTTGGCTAGCTGGAGAGTGAAGGAAACCGAACGGATGATTGCCATTTGCACAGAACTGAGAAAAGCT
 TGGGGCAACAGTTGAGGAAGGATCTGATTACTGTGTGATCACTCCGCCTGAAAAGCTAAACCCACC
 GCCATTGAAACTTATGACGATCACCGAATGGCCATGGCATTCTCTCTTGTGCTGCCTGTGCAGATGTTT
 CCGTCACTATCCTTGATCCGGGATGCACCCGTAACCTTCCCGACTACTTTGATGTTTTAGAAAA
 GTTCGCCAAGCATTGA

SEQ ID NO:40

Figura 21



A



B

Figura 22

Prueba de cinco reactivos de transfección

(ARNbc el 18 de junio, 4X WM el 21 de junio; Clasificado 7-DTT)

Etapa 1: ARNbc colocado a mano		Etapa 2: pulverización		Etapa 3:	
10X ARNbc formulado en reactivo de transfección		1% Silwet		4X WM (72 horas)	
	JetPRIME (Polypius)	SilenceMag (OZ Biosciences)	Nanopartícula (Sigma-Aldrich)	siPORT NeoFX (Ambion)	TransIT (Miruz Bio)
MON0818/AMS	Poliamina	Nanopartícula magnética	Péptido N-TER	Lípido	Lípido catiónico / polímero

Palmera con 35 copias EPSPS; 10X ARNbc

Figura 23

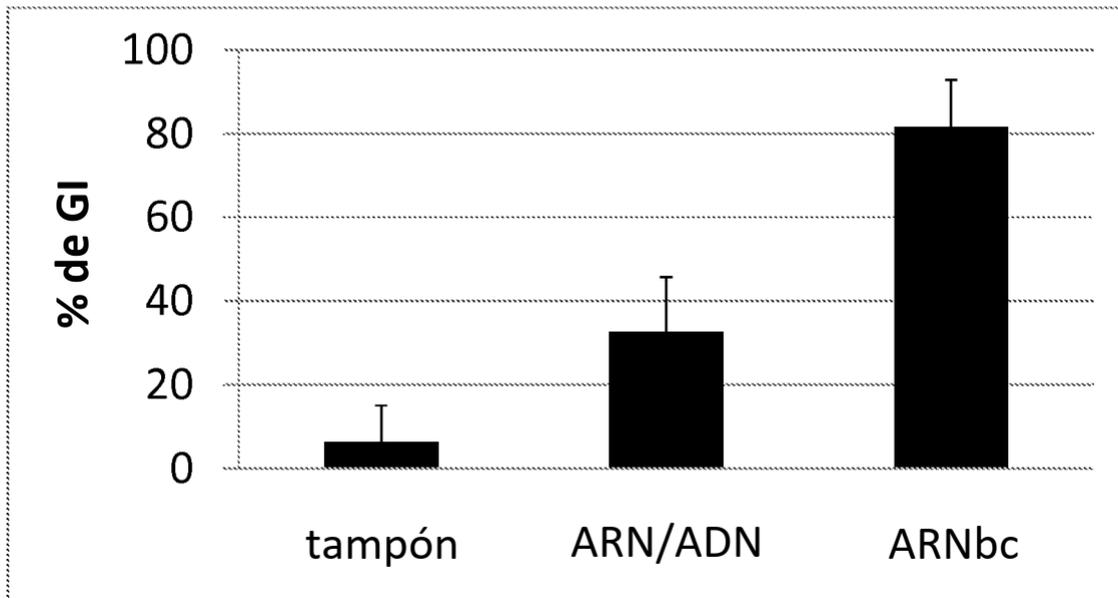
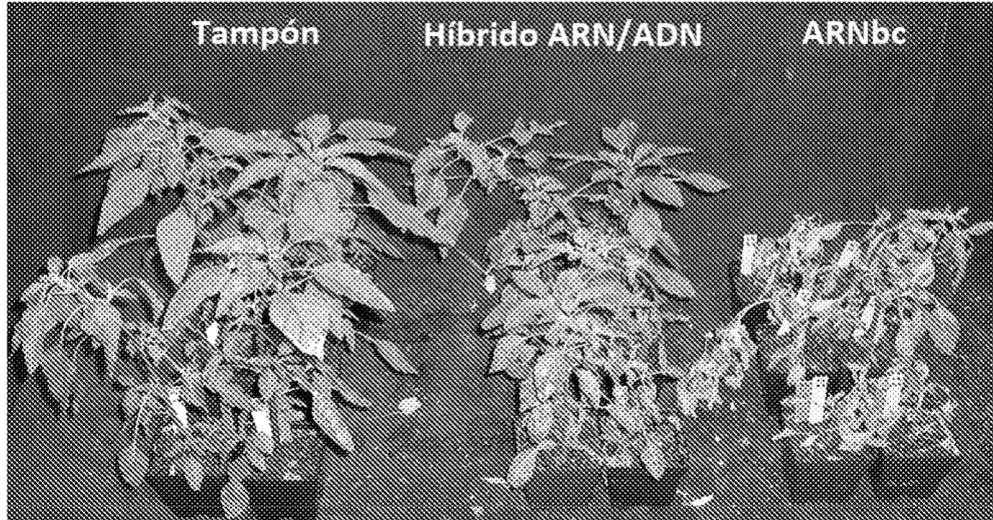
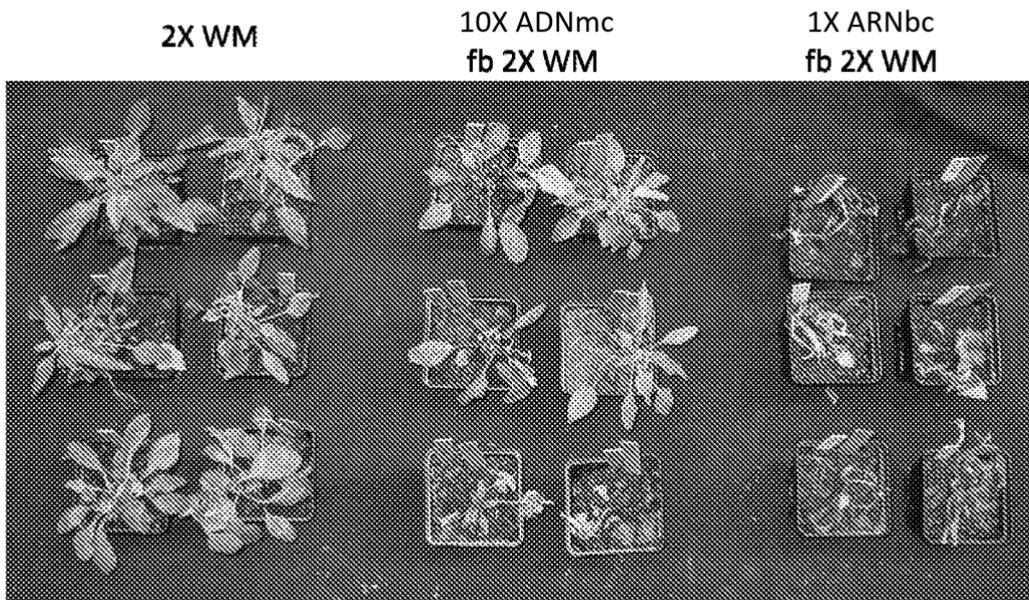


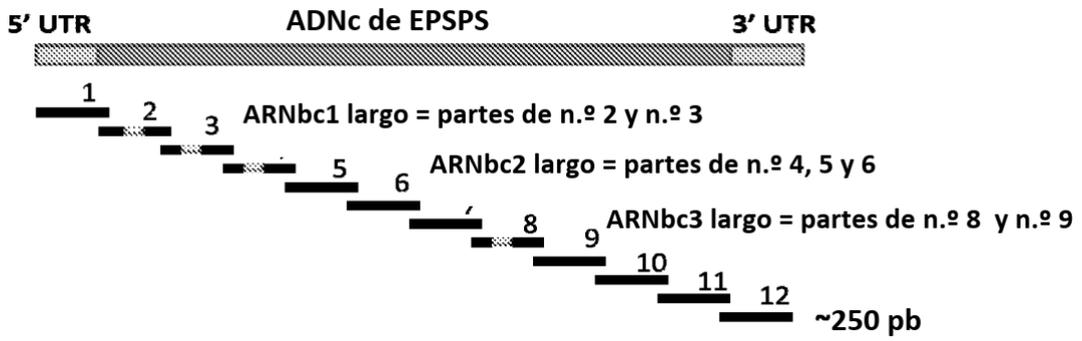
Figura 24

Etapa 1:	Etapa 2: ARNbc formulado en	Etapa 3:
1% Silwet	1X ARNbc o 10X ADNmc con AMS al 2% (colocado a mano)	2X WM (48 horas)



Palmera con 16 copias EPSPS)

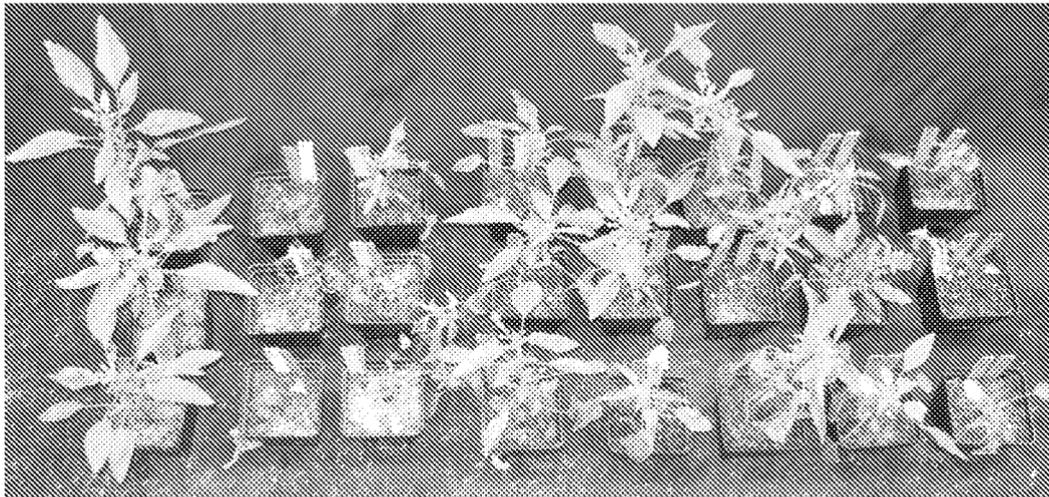
Figura 25



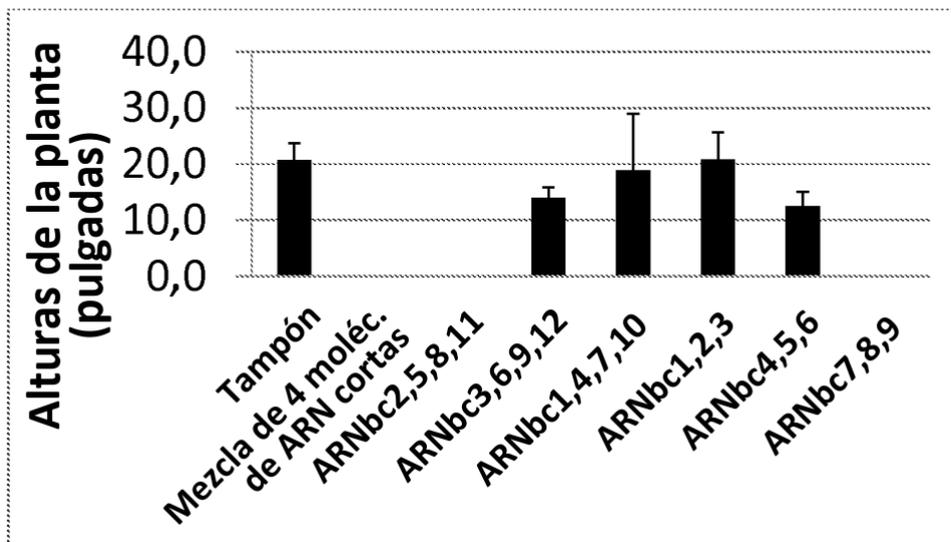
A

4 moléc.
de ARN
cortas

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



B



C

Figura 26

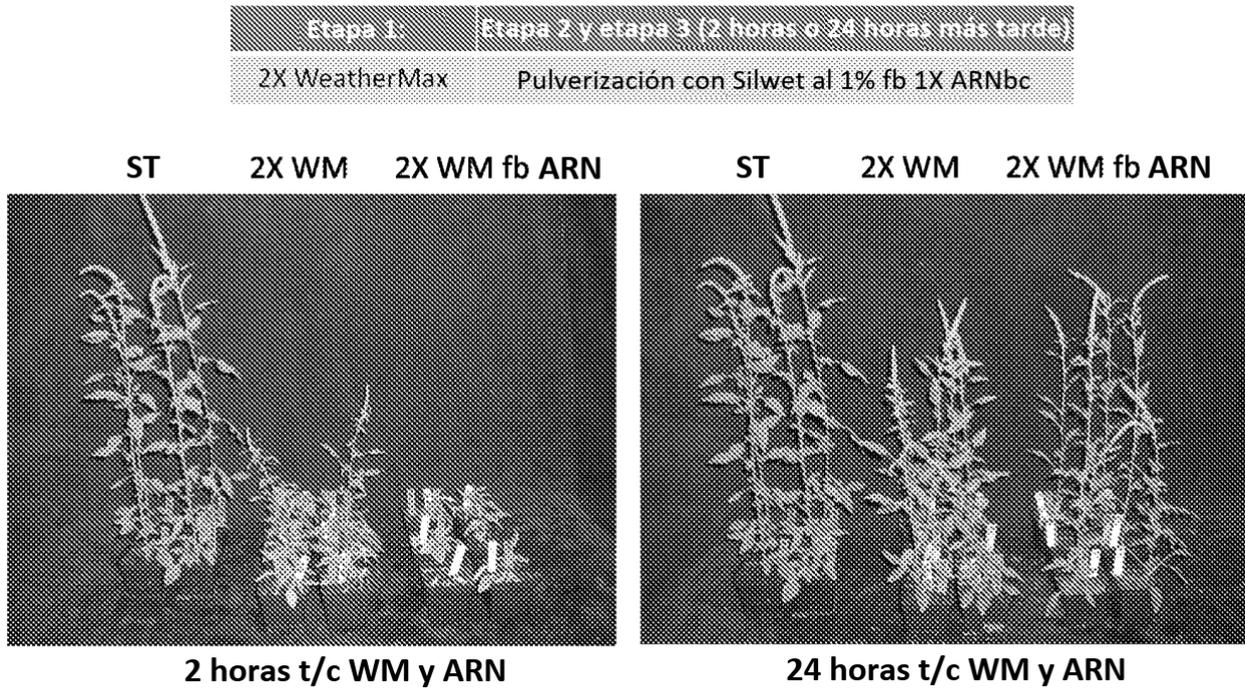


Figura 27

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

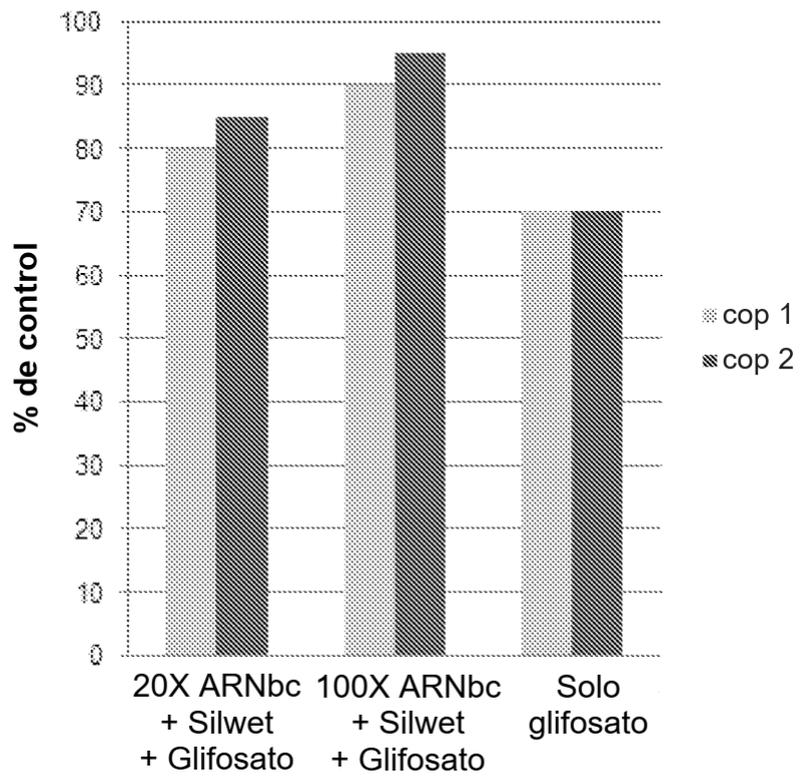


Figura 28

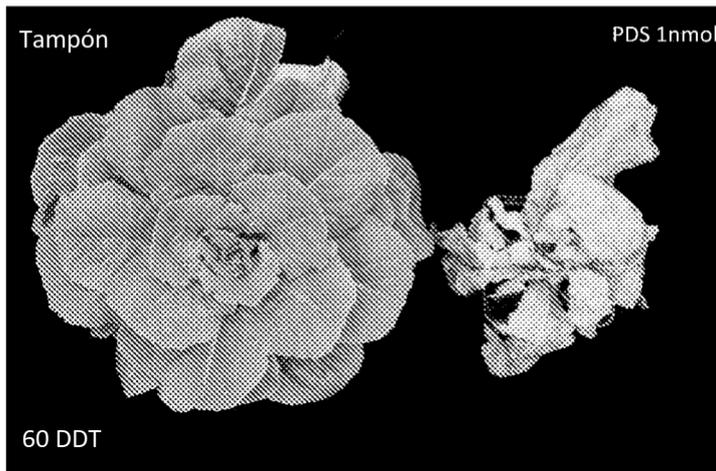
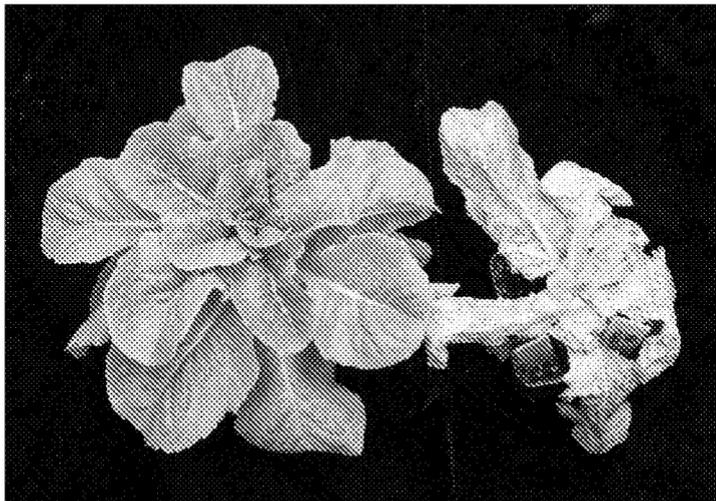
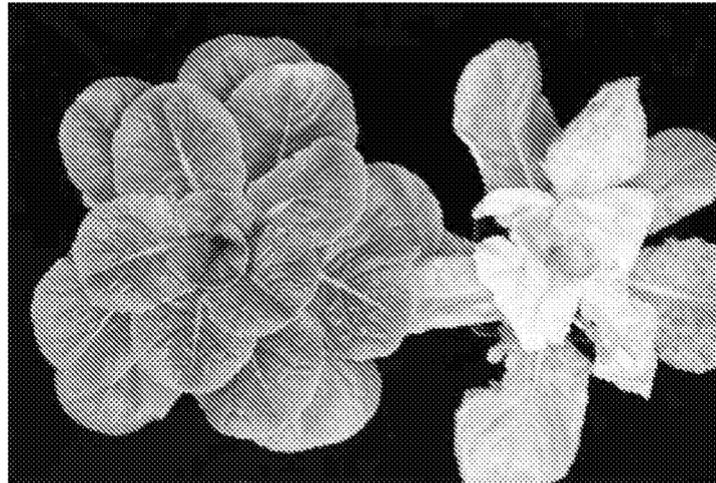
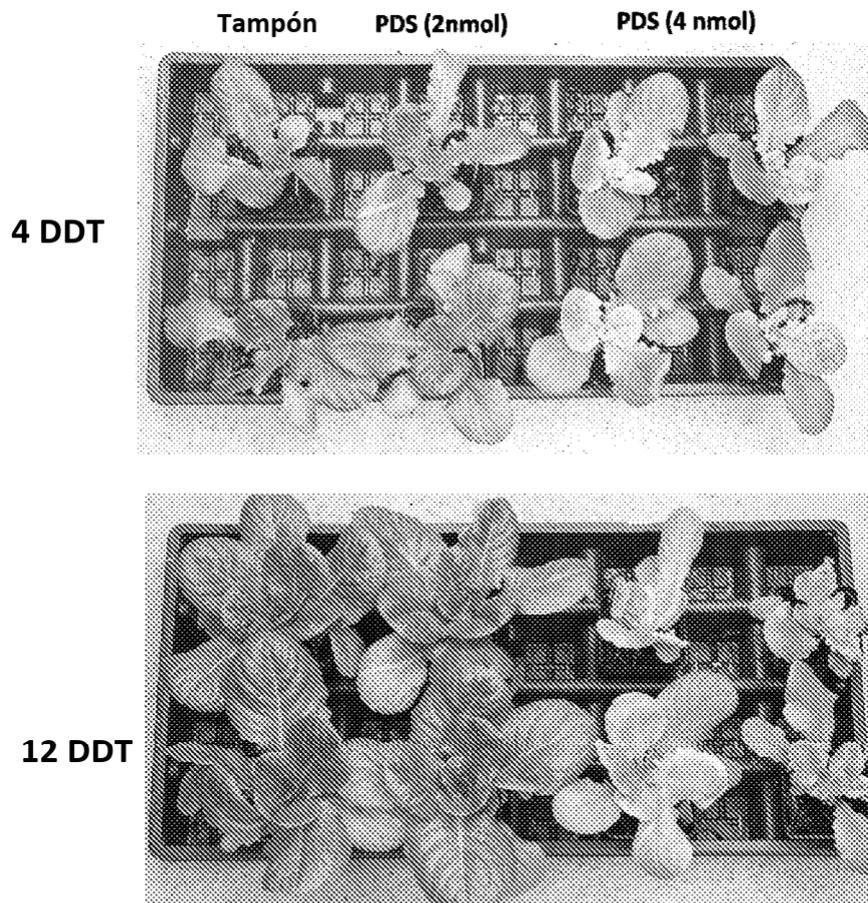


Figura 29



A



B

Figura 30



Figura 31

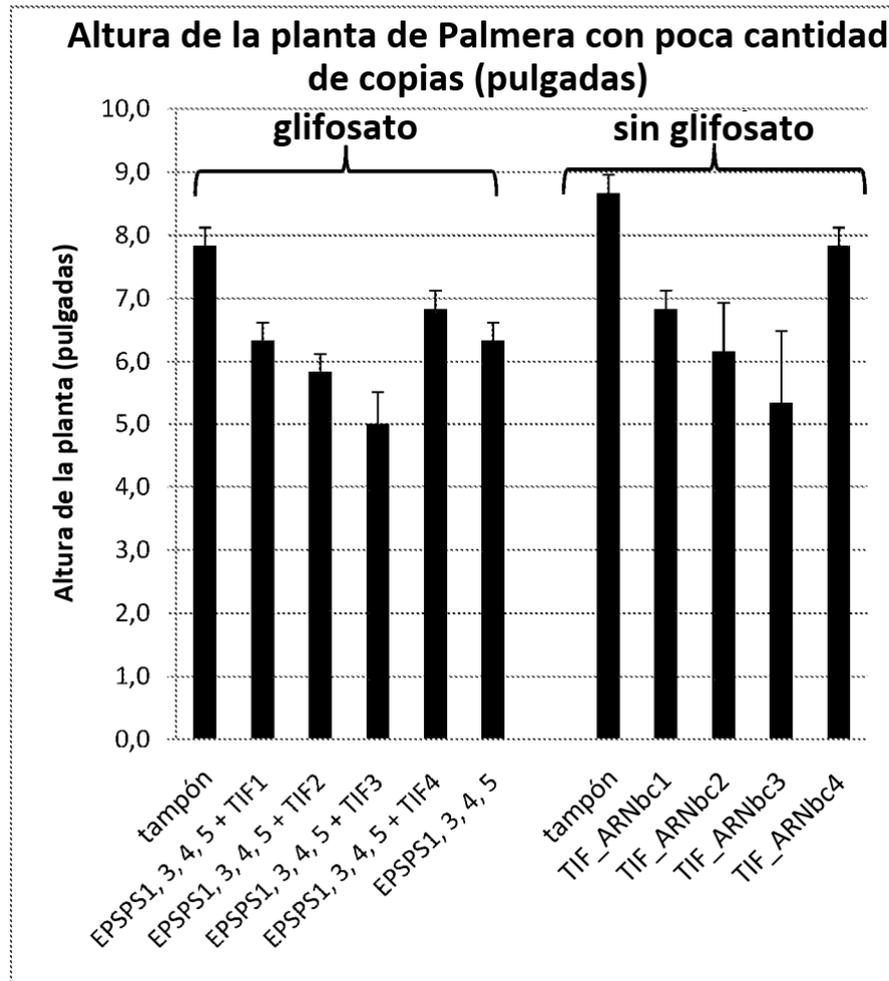


Figura 32

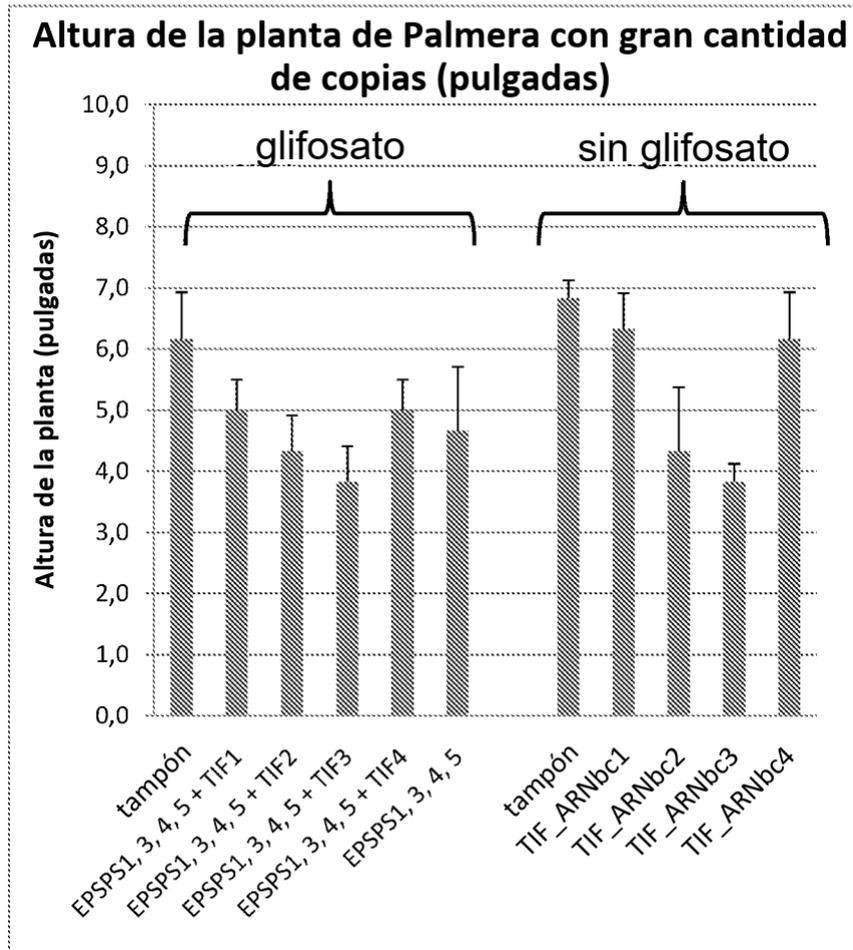


Figura 33

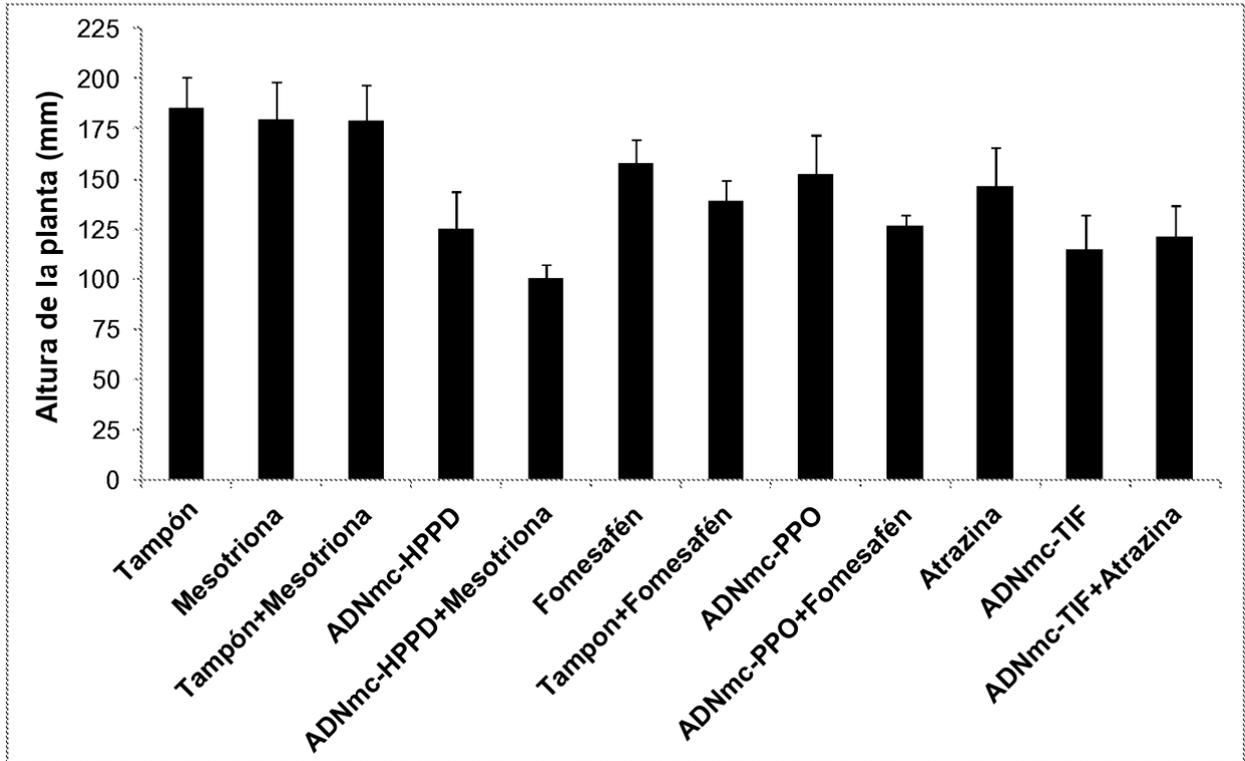


Figura 35

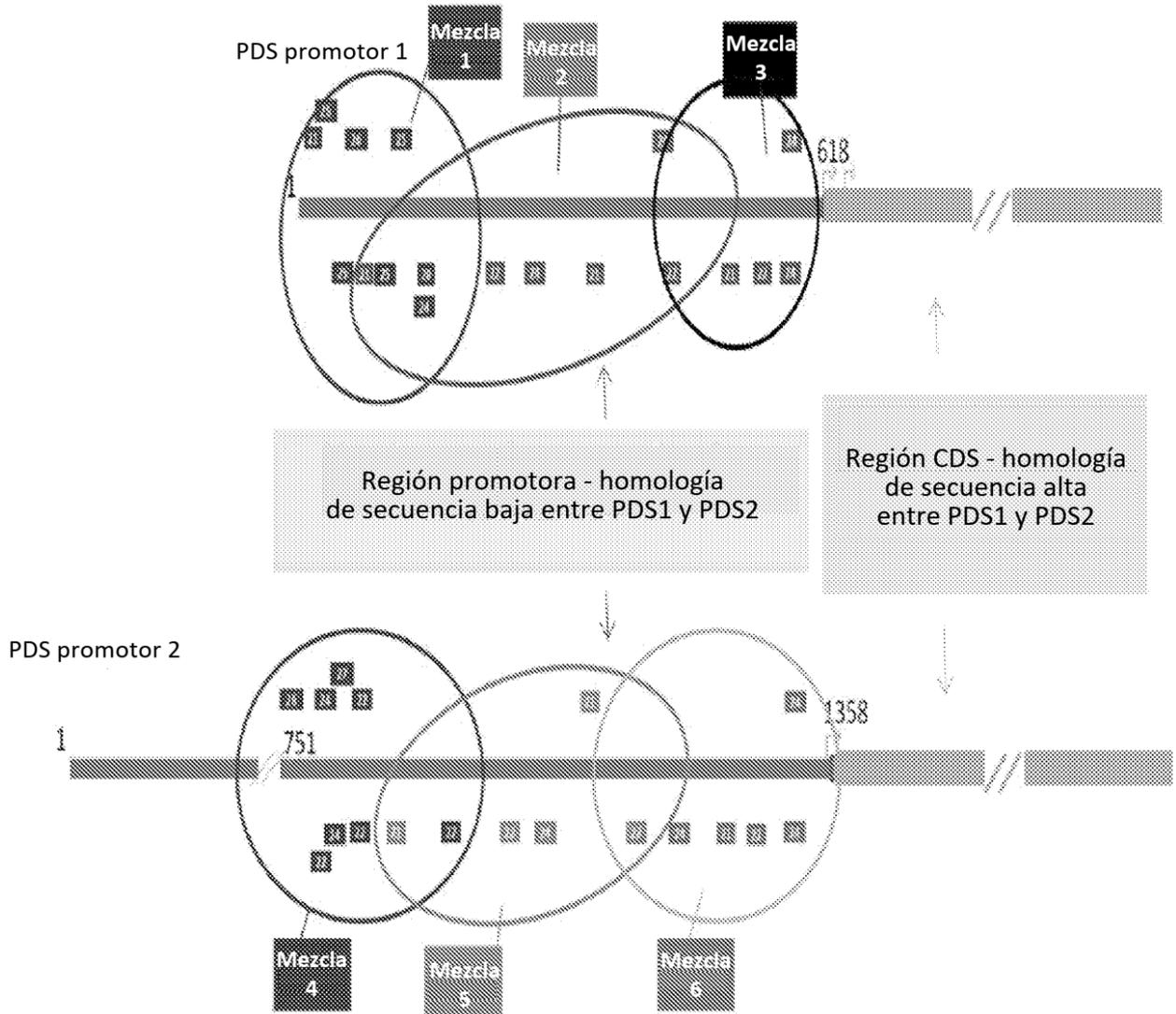


Figura 36

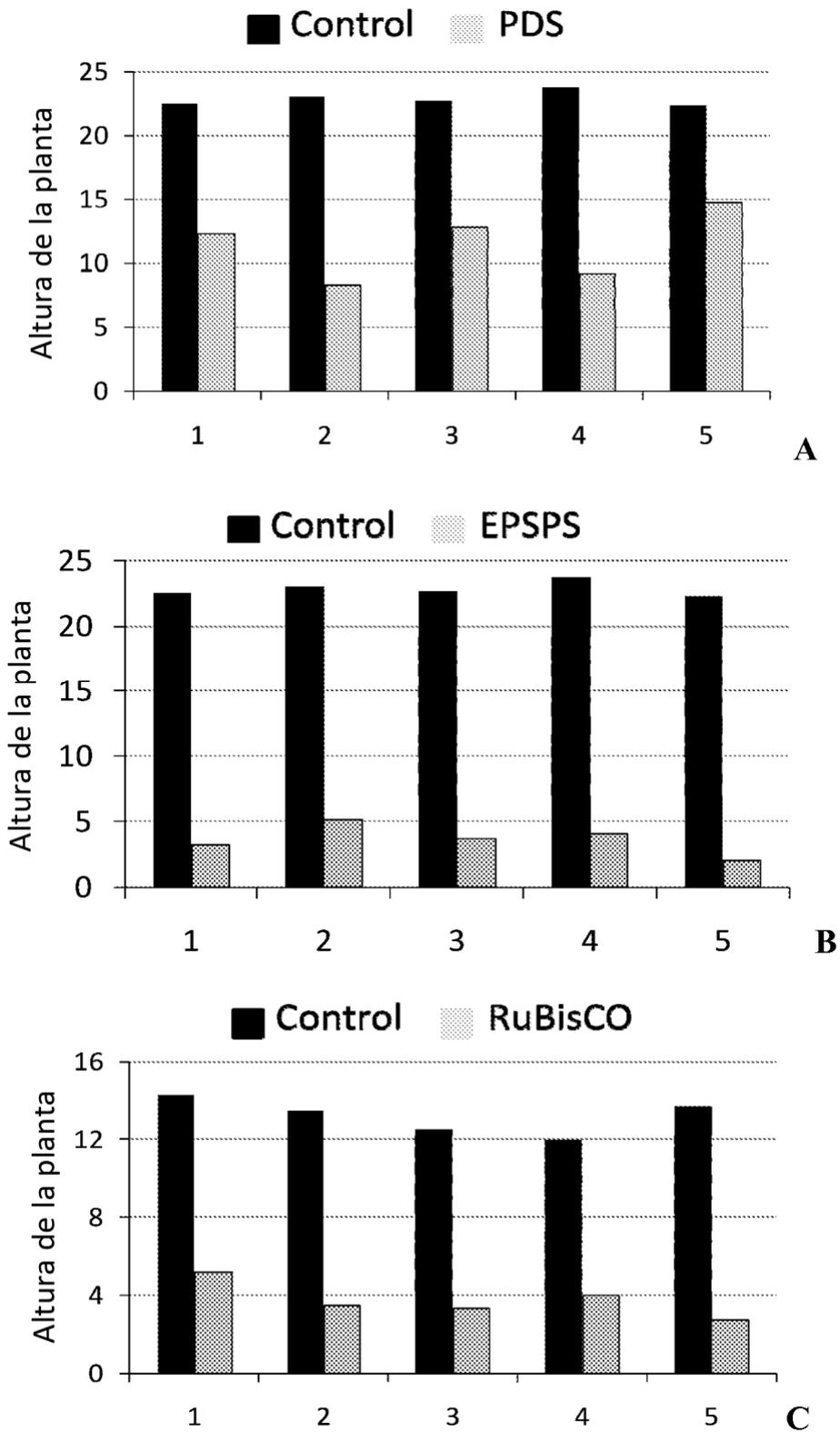


Figura 37

oligo ADN de EPSPS

Tampón (control)

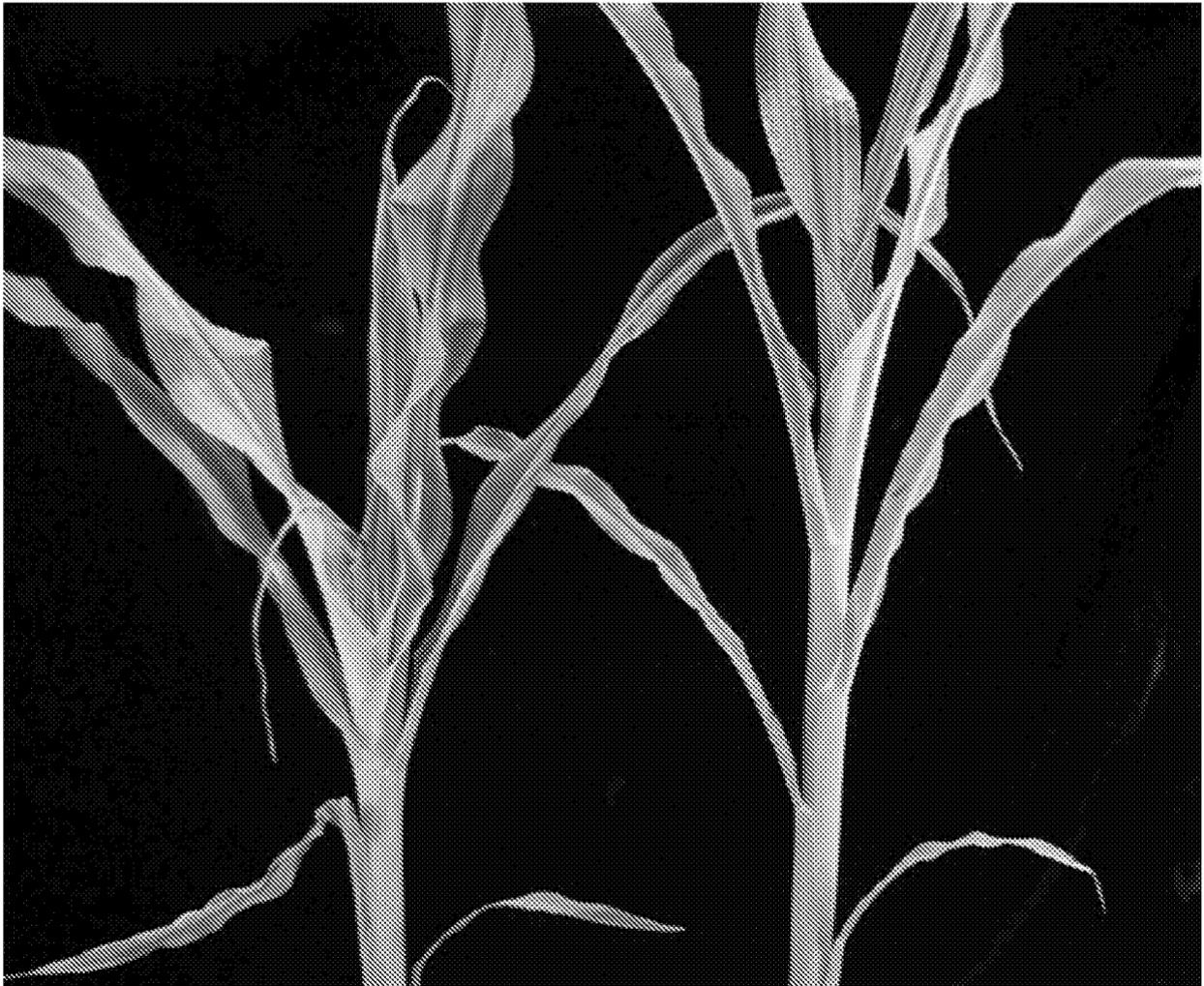


Figura 38

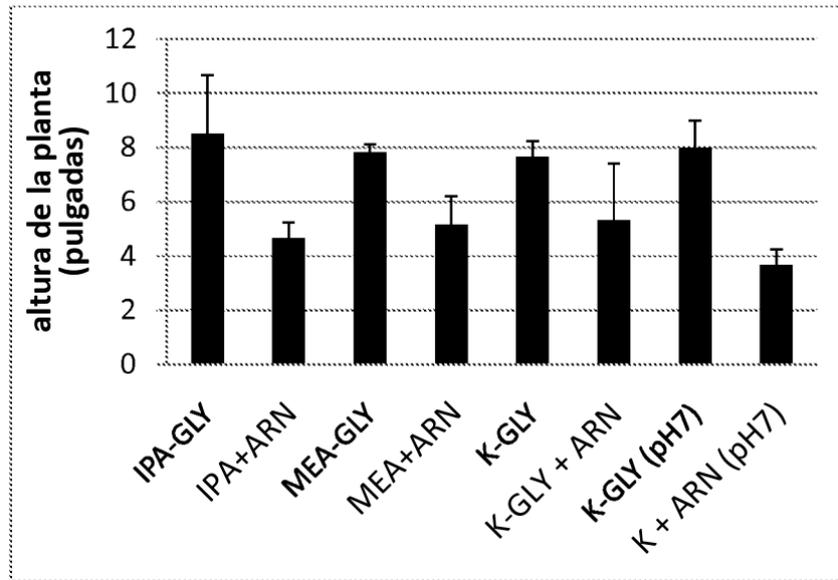


Figura 39



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