



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **121462** (13) **C2**

(51) МПК (2020.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

A01H 5/00

C07H 21/02 (2006.01)

A01P 13/02 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2016 08743	(72) Винахідник(и):	Наварро Сантьяго Кс. (US)
(22) Дата подання заявки:	14.01.2015	(73) Власник(и):	МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖІ ЕЛЕЛСІ, 800 North Lindbergh Boulevard, Mail Zone E1NA, St. Louis, Missouri 63167, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.06.2020	(74) Представник:	Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/927,682	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 2013/0288895 A1, 31.10.2013 US 2013/0067618 A1, 14.03.2013 WO 2013/039990 A1, 21.03.2013 WO 2013/040057 A1, 21.03.2013 WO 2011/112570 A1, 15.09.2011 "Agronomy Facts 37: Adjuvants for enhancing herbicide performance", 26.01.2000, U.S.A., URL: http://pubs.cas.psu.edu/freepubs/pdfs/uc106.pdf , (21.01.2014)
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	15.01.2014		
(33) Код держави- учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.11.2016, Бюл.№ 21		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.06.2020, Бюл.№ 11		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2015/011408, 14.01.2015		

(54) СПОСІБ ТА КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ БОРОТЬБИ ІЗ БУР'ЯНАМИ З ВИКОРИСТАННЯМ ПОЛІНУКЛЕОТИДІВ EPSPS

(57) Реферат:

Винахід стосується полінуклеотидної композиції для посилення гербіцидної активності гліфосату, зокрема, способу та композиції для модулювання 5-енолпірувілшикімат-3-фосфат синтази (EPSPS) у рослин. Композиція та спосіб застосовні у боротьбі зі стійкими до гліфосату бур'янами.

UA 121462 C2

Варіанти реалізації винаходу в загальному випадку відносяться до області боротьби із бур'янами. Зокрема, варіанти реалізації винаходу відносяться до композицій та способів для боротьби із бур'янистими рослинами із застосуванням молекул полінуклеотидів. Додатково запропоновано композиції, які містять молекули полінуклеотидів, і способи застосування таких композицій для зміни фізіології рослин і модуляції дії гербіцидної обробки.

Рівень техніки

Бур'яни є рослинами, які є небажаними в конкретному середовищі. Наприклад, в області агрономії бур'яни є рослинами, які конкурують із культурними рослинами. Бур'яни також можуть слугувати хазяями для рослинних хвороб і шкідливих комах. В області сільськогосподарського виробництва бур'яни можуть призводити до хвороб урожаю, зниження врожаю, підвищення витрат на зрошення, підвищення витрат на збирання врожаю, зниження вартості землі, втрат серед сільськогосподарських тварин і втрат, завданих урожаю комахами та хворобами, що накопичуються у бур'янах. Основними способами дії бур'янів є: 1) конкуренція з культурними рослинами за воду, поживні речовини, сонячне світло та інші важливі для росту та розвитку елементи, 2) вироблення токсичних або дратівливих хімічних речовин, які призводять до проблем із здоров'ям у людей або тварин, 3) вироблення величезної кількості насіння або вегетативних репродуктивних частинок, або і того й іншого, які забруднюють сільськогосподарські продукти та призводять до поширення бур'янистих рослин на сільськогосподарських землях, і 4) вироблення на сільськогосподарських або несільськогосподарських землях великої кількості рослинності, що вимагає утилізації. Бур'яни щорічно призводять до втрати фермерами мільярдів доларів внаслідок втрат урожаю та витрат на боротьбу із бур'янами.

Для контролю росту та поширення бур'янів часто застосовують хімічні гербіциди. Хімічні гербіциди активні в одній або більше ділянках-мішенях у рослині, де вони перешкоджають нормальному функціонуванню рослини. Наприклад, гербіцид N-фосфонометил-гліцин, також відомий як гліфосат, націлений на EPSPS (5-енолпірувілшикімат-3-фосфат синтазу), фермент, який каталізує перетворення шикімат-3-фосфату на 5-енолпірувіл-шикімат-3-фосфат, який є посередником у біохімічному шляху створення трьох незамінних ароматичних амінокислот (тироzinу, фенілаланіну та триптофану).

Одним з обмежень на застосування хімічних гербіцидів для боротьби із бур'янами стала поява стійких до гербіцидів рослин. Стійкість до гербіцидів - це здатність рослини виживати та розмножуватися після обробки дозою гербіциду, яка зазвичай є летальною. У разі бур'янів стійкість до гербіцидів може виникати природним шляхом у результаті випадкових і рідкісних мутацій. Там, де існує селективний тиск внаслідок застосування гербіцидів, стійкі до гербіцидів рослини виживають, щоб дати потомство без конкуренції з боку сприйнятливих до гербіцидів рослин. Цей селективний тиск може призвести до появи зростаючої кількості стійких до гербіцидів бур'янів у популяції бур'янистих рослин. Стійкі до гербіцидів бур'яни спостерігали впродовж практично усього часу застосування гербіцидів. Нині ідентифіковано більше 365 біотипів бур'янів, стійких до одного або більше гербіцидів, згідно даним Комітету з попередження стійкості до дії гербіцидів (HRAC), Північноамериканського комітету з попередження стійкості до дії гербіцидів (NAHRAC) і Американського наукового товариства з боротьби із бур'янами (WSSA). Існує потреба в ефективній боротьбі із такими стійкими до гербіцидів бур'янами та розробці нових композицій та методів для боротьби з бур'янами.

Суть винаходу

Варіанти реалізації цього винаходу відносяться до композицій та способів, вживаних для підвищення чутливості бур'янів до гербіцидів, націлених на 5-енолпірувілшикімат-3-фосфат синтазу (EPSPS), з метою підвищення ефективності боротьби із бур'янами та боротьби із стійкими до гербіцидів бур'янами.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до біоактивного тригерного полінуклеотиду, що містить нуклеотидну послідовність, яка є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до SEQ ID NO: 3, 5 або 9-66 або їх фрагмента. Біоактивний тригерний полінуклеотид може бути одноланцюговою ДНК, одноланцюговою РНК, дволанцюговою РНК, дволанцюговою ДНК або дволанцюговим гібридом ДНК/РНК. У декількох варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид містить нуклеотидну послідовність, яка є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до SEQ ID NO 3 або SEQ ID NO 5. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид містить нуклеотидну послідовність, яка є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до послідовності, вибраної із групи, яка складається з SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 або їх фрагмента. У деяких варіантах реалізації винаходу

біоактивний тригерний полінуклеотид являє собою дволанцюгову РНК, а дволанцюгова РНК містить SEQ ID NO: 3 і 4. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид являє собою дволанцюгову РНК, а дволанцюгова РНК містить SEQ ID NO: 5 і 6. Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до рослинної клітини, яка містить описаний у цьому документі біоактивний тригерний полінуклеотид. Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до рослини, яка містить описаний у цьому документі біоактивний тригерний полінуклеотид.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до композиції, яка містить один або більше біоактивних тригерних полінуклеотидів і агент-переносник, причому один або більше біоактивних тригерних полінуклеотидів містять нуклеотидну послідовність, яка є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до SEQ ID NO: 3, 5 або 9-66 або їх фрагмента. Один або більше біоактивних тригерних полінуклеотидів можуть кожний, незалежно, бути вибраними із групи, яка складається з одноланцюгової ДНК, одноланцюгової РНК, дволанцюгової РНК, дволанцюгової ДНК і дволанцюгових гібридів ДНК/РНК. У деяких варіантах реалізації винаходу композиція містить один або більше біоактивних тригерних полінуклеотидів, що містять нуклеотидну послідовність, яка є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до послідовності, вибраної із групи, яка складається з SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 або їх фрагмента. У деяких варіантах реалізації винаходу композиція містить один або більше біоактивних тригерних полінуклеотидів, які містять нуклеотидну послідовність, яка є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до SEQ ID NO: 3 або SEQ ID NO: 5 або їх фрагмента. У деяких варіантах реалізації винаходу композиція містить один або більше біоактивних тригерних полінуклеотидів дволанцюгової РНК, які містять SEQ ID NO: 3 і 4 або їх фрагменти. У деяких варіантах реалізації винаходу композиція містить один або більше біоактивних тригерних полінуклеотидів дволанцюгової РНК, які містять SEQ ID NO: 5 і 6 або їх фрагменти. У деяких варіантах реалізації винаходу композиція містить перший біоактивний тригерний полінуклеотид й один або більше додаткових біоактивних тригерних полінуклеотидів, які містять нуклеотидну послідовність, що відрізняється від першого біоактивного тригерного полінуклеотиду. У деяких варіантах реалізації винаходу композиція містить біоактивний тригерний полінуклеотид, який містить нуклеотидну послідовність, яка є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до SEQ ID NO: 3, 5 або 9-66, і біоактивну тригерну молекулу, яка не є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до генної послідовності EPSPS або РНК-транскрипту генної послідовності EPSPS. Композиція може містити різні компоненти. Наприклад, композиція може містити один або більше біоактивних тригерних полінуклеотидів, агентів-переносників і неполінуклеотидних гербіцидів. У деяких варіантах реалізації винаходу агент-переносник вибрано із групи, що складається з сурфактанта, такого як кремнійорганічний сурфактант, катіонного ліпосомного реагенту та рослинного гормону, такого як брасиностероїд. Приклади кремнійорганічних сурфактантів включають, але не обмежуються цим, BREAK-THRU® S 321, BREAK-THRU® S 200, BREAK-THRU® OE 441, BREAK-THRU® S 278, BREAK-THRU® S 243, SILWET L-77®, SILWET® HS 429, SILWET® HS 312 і BREAK-THRU® S 233. У деяких варіантах реалізації винаходу композиція містить кремнійорганічний сурфактант і сульфат амонію. У деяких варіантах реалізації винаходу композиція містить DOTAP. У деяких варіантах реалізації винаходу композиція містить катіонний ліпід. У деяких варіантах реалізації винаходу композиція містить частинки нуклеїнова кислота-ліпід. У деяких варіантах реалізації винаходу композиція містить гербіцид, що інгібує EPSPS, такий як гліфосат. У деяких варіантах реалізації винаходу композиція містить гербіцид, що інгібує EPSPS, такий як дикамба або 2,4-Д.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до способу боротьби із рослинами, який включає застосування біоактивного тригерного полінуклеотиду, що містить нуклеотидну послідовність, яка є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до генної послідовності EPSPS або РНК-транскрипту генної послідовності EPSPS, до зовнішньої поверхні рослини, частини рослини або насіння, причому рослину не пермеабілізують механічним шляхом, а біоактивний тригерний полінуклеотид вбудовується у внутрішню частину рослинної клітини. Приклади рослин, з якими можна боротися у такий спосіб, включають, але не обмежуються цим, *Amaranthus palmeri*, *Amaranthus rudis*, *Amaranthus albus*, *Amaranthus chlorostachys*, *Amaranthus graecizans*, *Amaranthus hybridus*, *Amaranthus lividus*, *Amaranthus spinosus*, *Amaranthus thunbergii*, *Amaranthus viridis*, *Lolium multiflorum*, *Lolium rigidum*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Ambrosia trifida*, *Euphorbia heterophylla*, *Kochia scoparia*, *Abutilon theophrasti*, *Sorghum halepense*, *Chenopodium album*, *Commelina diffusa*, *Convolvulus arvensis*, *Conyza*

candensis, *Digitaria sanguinalis* і *Xanthium strumarium*. У деяких варіантах реалізації винаходу генну послідовність EPSPS вибрано із SEQ ID NO: 1 або 2 або їх фрагмента. У деяких варіантах реалізації винаходу генну послідовність EPSPS вибрано із SEQ ID NO: 9-66. У деяких варіантах реалізації винаходу генну послідовність EPSPS вибрано із SEQ ID NO 36, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 43, SEQ ID NO 44, SEQ ID NO 57, SEQ ID NO 58, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 65 і SEQ ID NO 66. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид містить нуклеотидну послідовність, яка є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до SEQ ID NO: 3, 5 або 9-66 або їх фрагмента. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид вибрано із групи, яка складається з одноланцюгової ДНК, одноланцюгової РНК, дволанцюгової РНК, дволанцюгової ДНК і дволанцюгових гібридів ДНК/РНК. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид містить нуклеотидну послідовність, яка є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до SEQ ID NO 3 або SEQ ID NO 5 або їх фрагмента. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид являє собою дволанцюгову РНК, що містить SEQ ID NO: 3 і 4 або їх фрагменти. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид являє собою дволанцюгову РНК, що містить SEQ ID NO: 5 і 6 або їх фрагменти. У деяких варіантах реалізації способу до рослини застосовують перший біоактивний тригерний полінуклеотид й один або більше додаткових біоактивних тригерних полінуклеотидів, які містять відмінну нуклеотидну послідовність у порівнянні з першим біоактивним тригерним полінуклеотидом. У деяких варіантах реалізації винаходу до рослини застосовують біоактивний тригерний полінуклеотид, який містить нуклеотидну послідовність, яка є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до SEQ ID NO: 3, 5 або 9-66, і біоактивну тригерну молекулу, яка не є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до генної послідовності EPSPS або РНК-транскрипту генної послідовності EPSPS. Спосіб може додатково включати застосування одного або більше агентів-переносників, гербіцидів, що інгібують EPSPS, й інших неполінуклеотидних гербіцидів. Приклади агентів-переносників включають, але не обмежуються цим, сурфактанти, такі як кремнійорганічні сурфактанти, катіонні ліпідні реагенти та рослинні гормони, такі як брасиностероїд. У деяких варіантах реалізації винаходу композиція додатково містить неполінуклеотидний гербіцид. У деяких варіантах реалізації винаходу неполінуклеотидним гербіцидом є гліфосат. У деяких варіантах реалізації винаходу неполінуклеотидний гербіцид застосовують окремо від біоактивного тригерного полінуклеотиду. У деяких варіантах реалізації винаходу неполінуклеотидний гербіцид застосовують одночасно з біоактивним тригерним полінуклеотидом.

Деякі варіанти реалізації винаходу відносяться до способу контролювання росту, розвитку або репродуктивної здатності рослини шляхом місцевої обробки рослини композицією, що містить біоактивний тригерний полінуклеотид й агент-переносник, причому біоактивний тригерний полінуклеотид містить нуклеотидну послідовність, яка є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до SEQ ID NO: 3, 5 або 9-66 або їх фрагмента, внаслідок чого відбувається зниження росту, розвитку або репродуктивної здатності рослини. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид вибрано із групи, яка складається з одноланцюгової ДНК, одноланцюгової РНК, дволанцюгової РНК, дволанцюгової ДНК і дволанцюгових гібридів ДНК/РНК. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид містить нуклеотидну послідовність, яка є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до SEQ ID NO 3 або SEQ ID NO 5 або їх фрагмента. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид містить нуклеотидну послідовність, яка є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до послідовності, вибраної із групи, яка складається з SEQ ID NO 36, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 43, SEQ ID NO 44, SEQ ID NO 57, SEQ ID NO 58, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 65, SEQ ID NO 66 або їх фрагмента. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид являє собою дволанцюгову РНК, що містить SEQ ID NO: 3 і 4 або їх фрагменти. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид являє собою дволанцюгову РНК, що містить SEQ ID NO: 5 і 6 або їх фрагменти. У деяких варіантах реалізації способу рослину обробляють першим біоактивним тригерним полінуклеотидом й одним або більше додатковими біоактивними тригерними полінуклеотидами, які містять відмінну нуклеотидну послідовність у порівнянні з першим біоактивним тригерним полінуклеотидом. У деяких варіантах реалізації винаходу рослину обробляють біоактивним тригерним полінуклеотидом, який містить нуклеотидну послідовність, яка є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до SEQ ID NO: 3, 5 або 9-66, і біоактивною тригерною молекулою, яка не є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до генної послідовності

EPSPS або РНК-транскрипту генної послідовності EPSPS. Спосіб може додатково включати обробку рослини одним або більше агентами-переносниками, гербіцидами, що інгібують EPSPS, й іншими неполінуклеотидними гербіцидами. Приклади агентів-переносників включають, але не обмежуються цим, сурфактанти, такі як кремнійорганічні сурфактанти, катіонні ліпідні реагенти та рослинні гормони, такі як брасиностероїд. У деяких варіантах реалізації винаходу рослину обробляють неполінуклеотидним гербіцидом. У деяких варіантах реалізації винаходу неполінуклеотидним гербіцидом є гліфосат. У деяких варіантах реалізації винаходу неполінуклеотидний гербіцид застосовують окремо від біоактивного тригерного полінуклеотиду. У деяких варіантах реалізації винаходу неполінуклеотидний гербіцид застосовують одночасно з біоактивним тригерним полінуклеотидом.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до способу підвищення чутливості бур'янів до гербіциду, що інгібує EPSPS, який включає обробку бур'яну біоактивним тригерним полінуклеотидом, який є значною мірою ідентичним або значною мірою комплементарним до нуклеотидної послідовності, вибраної із групи, яка складається з SEQ ID NO:3, 5 і 9-66 або їх фрагмента, в результаті чого бур'ян стає більш чутливим до гербіциду, що інгібує EPSPS, у порівнянні з бур'янами, які не оброблювали біоактивним тригерним полінуклеотидом. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид є значною мірою ідентичним або значною мірою комплементарним до нуклеотидної послідовності, вибраної із групи, яка складається з SEQ ID NO 36, SEQ ID NO 42, SEQ ID NO 43, SEQ ID NO 44, SEQ ID NO 57, SEQ ID NO 58, SEQ ID NO 59, SEQ ID NO 65, SEQ ID NO 66 або їх фрагмента. У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб додатково включає обробку рослини гербіцидом, що інгібує EPSPS. У деяких варіантах реалізації винаходу бур'ян є стійким до одного або більше із гліфосату, дикамби та сульфонілсечовини. У деяких варіантах реалізації винаходу бур'ян вибрано із групи, яка складається з *Amaranthus palmeri*, *Amaranthus rudis*, *Amaranthus albus*, *Amaranthus chlorostachys*, *Amaranthus graecizans*, *Amaranthus hybridus*, *Amaranthus lividus*, *Amaranthus spinosus*, *Amaranthus thunbergii*, *Amaranthus viridis*, *Lolium multiflorum*, *Lolium rigidum*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Ambrosia trifida*, *Euphorbia heterophylla*, *Kochia scoparia*, *Abutilon theophrasti*, *Sorghum halepense*, *Chenopodium album*, *Commelina diffusa*, *Convolvulus arvensis*, *Conyza candensis*, *Digitaria sanguinalis* і *Xanthium strumarium*. У деяких варіантах реалізації винаходу бур'ян росте на полі зі стійкими до гербіцидів культурними рослинами. Біоактивний тригерний полінуклеотид може бути одноланцюговою ДНК, одноланцюговою РНК, дволанцюговою РНК, дволанцюговою ДНК або дволанцюговим гібридом ДНК/РНК. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид являє собою дволанцюгову РНК, а дволанцюгова РНК містить SEQ ID NO: 3 і 4. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид являє собою дволанцюгову РНК, а дволанцюгова РНК містить SEQ ID NO: 5 і 6. У декількох варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид забезпечено агентом-переносником. У деяких варіантах реалізації винаходу агент-переносник являє собою кремнійорганічний сурфактант. Наприклад, кремнійорганічний сурфактант може являти собою BREAK-THRU® S 321, BREAK-THRU® S 200, BREAK-THRU® OE 441, BREAK-THRU® S 278, BREAK-THRU® S 243, SILWET L-77®, SILWET® HS 429, SILWET® HS 312, BREAK-THRU® S 233 або будь-яку їх комбінацію. У деяких варіантах реалізації винаходу агент-переносник є катіонним ліпосомним реагентом, наприклад, N-[1-(2,3-диолеоїлокси)пропіл]-N, N,N-триметиламоній метилсульфатом (DOTAP). У деяких варіантах реалізації винаходу агент-переносник є рослинним гормоном, наприклад, брасиностероїдом. У деяких варіантах реалізації винаходу спосіб додатково включає обробку бур'яну ауксиноподібним гербіцидом, таким як дикамба або 2,4-Д.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до способу боротьби з однією або більше рослинами наступних видів: *Amaranthus*, *Ambrosia*, *Lolium*, *Digitaria*, *Euphorbia*, *Kochia*, *Sorghum*, *Conyza*, *Chloris*, *Echinochola*, *Eleusine*, *Poa*, *Plantago*, *Avena*, *Chenopodium*, *Setaria*, *Abutilon*, *Ipomoea*, *Sesbania*, *Cassia*, *Sida*, *Brachiaria* і *Solanum* шляхом застосування описаної у цьому документі біоактивної тригерної молекули.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до способу боротьби з одним або більше із *Alopecurus myosuroides*, *Avena sterilis*, *Avena sterilis ludoviciana*, *Brachiaria plantaginea*, *Bromus diandrus*, *Bromus rigidus*, *Cynosurus echinatus*, *Digitaria ciliaris*, *Digitaria ischaemum*, *Digitaria sanguinalis*, *Echinochloa oryzicola*, *Echinochloa phyllopogon*, *Eriochloa punctata*, *Hordeum glaucum*, *Hordeum leporinum*, *Ischaemum rugosum*, *Leptochloa chinensis*, *Lolium persicum*, *Phalaris minor*, *Phalaris paradoxa*, *Rottboellia exalta*, *Setaria faberi*, *Setaria viridis* var. *robusta-alba* schreiber, *Setaria viridis* var. *robusta-purpurea*, *Snowdenia polystachea*, *Sorghum sudanese*, *Alisma plantago-aquatica*, *Amaranthus lividus*, *Amaranthus quitensis*, *Ammania auriculata*, *Ammania coccinea*, *Anthemis cotula*, *Apera spica-venti*, *Bacopa rotundifolia*, *Bidens pilosa*, *Bidens subalternans*, *Brassica*

tournefortii, Bromus tectorum, Camelina microcarpa, Chrysanthemum coronarium, Cuscuta campestris, Cyperus difformis, Damasonium minus, Descurainia sophia, Diplotaxis tenuifolia, Echium plantagineum, Elatine triandra var, pedicellate, Euphorbia heterophylla, Fallopia convolvulus, Fimbristylis miliacea, Galeopsis tetrahit, Galium spurium, Helianthus annuus, Iva xanthifolia, Ixophorus unisetus, Ipomoea indica, Ipomoea purpurea, Ipomoea sepiaria, Ipomoea aquatic, Ipomoea triloba, Lactuca serriola, Limncharis flava, Limnophila erecta, Limnophila sessiliflora, Lindernia dubia, Lindernia dubia var, major, Lindernia micrantha, Lindernia procumbens, Mesembryanthemum crystallinum, Monochoria korsakowii, Monochoria vaginalis, Neslia paniculata, Papaver rhoeas, Parthenium hysterophorus, Pentzia suffruticosa, Phalaris minor, Raphanus raphanistrum, Raphanus sativus, Rapistrum rugosum, Rotala indica var, uliginosa, Sagittaria guyanensis, Sagittaria montevidensis, Sagittaria pygmaea, Salsola iberica, Scirpus juncoides var, ohwianus, Scirpus mucronatus, Setaria lutescens, Sida spinosa, Sinapis arvensis, Sisymbrium orientale, Sisymbrium thellungii, Solanum ptycanthum, Sonchus aspen, Sonchus oleraceus, Sorghum bicolor, Stellaria media, Thlaspi arvense, Xanthium strumarium, Arctotheca calendula, Conyza sumatrensis, Crassocephalum crepidiodes, Cuphea carthagenensis, Epilobium adenocaulon, Erigeron philadelphicus, Landoltia punctata, Lepidium virginicum, Monochoria korsakowii, Solanum americanum, Solanum nigrum, Vulpia bromoides, Youngia japonica, Hydrilla verticillata, Carduus nutans, Carduus pycnocephalus, Centaurea solstitialis, Cirsium arvense, Commelina diffusa, Convolvulus arvensis, Daucus carota, Digitaria ischaemum, Echinochloa crus-pavonis, Fimbristylis miliacea, Galeopsis tetrahit, Galium spurium, Limnophila erecta, Matricaria perforate, Papaver rhoeas, Ranunculus acris, Soliva sessilis, Sphenoclea zeylanica, Stellaria media, Nassella trichotoma, Stipa neesiana, Agrostis stolonifera, Polygonum aviculare, Alopecurus japonicus, Beckmannia syzigachne, Bromus tectorum, Chloris inflata, Echinochloa erecta, Portulaca oleraceai Senecio vulgaris шляхом застосування описаного у цьому документі біоактивного тригерного полінуклеотиду.

КОРОТКИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Нижченаведені графічні матеріали є частиною опису і включені для того, щоб додатково продемонструвати певні аспекти розкритих варіантів реалізації винаходу:

На Фігурі 1 показано стійкі до гліфосату рослини шириці Палмера, оброблені тригерними полінуклеотидами до SEQ ID NO: 7 і 8 та гліфосатом (панель А), оброблені тригерними полінуклеотидами до SEQ ID NO: 3 і 4 та гліфосатом (панель В) або оброблені тригерними полінуклеотидами до SEQ ID NO: 5 і 6 та гліфосатом (панель С).

На Фігурі 2 показано графік % зниження мРНК EPSPS у порівнянні з контролем у протопластах Палмера у відповідь на 6 мкг тригерної SEQ ID NO: 3 і 4 або SEQ ID NO: 5 і 6.

На Фігурі 3 показано стійкі до гліфосату рослини шириці бугорчатої, оброблені тригерними полінуклеотидами SEQ ID NO: 7 і 8 та гліфосатом (панель А), оброблені тригерними полінуклеотидами до SEQ ID NO: 3 і 4 та гліфосатом (панель В) або оброблені тригерними полінуклеотидами до SEQ ID NO: 5 і 6 та гліфосатом (панель С).

На Фігурі 4 показано сиру масу (у грамах) рослин, оброблених тригерними полінуклеотидами до SEQ ID NO: 3, 5, 7 і SEQ ID NO: 36-64 та гліфосатом.

Детальний опис винаходу

Запропоновано способи та композиції, які містять тригерний полінуклеотид, що забезпечує регуляцію, репресію або уповільнення експресії гена 5-енолпірувілшикімат-3-фосфат синтази (EPSPS) і посилену боротьбу із бур'янами. У деяких варіантах реалізації винаходу розкриті у цьому документі способи та композиції забезпечують підвищену чутливість до гербіциду, що інгібує EPSPS. У деяких варіантах реалізації винаходу розкриті у цьому документі способи та композиції забезпечують регуляцію, репресію або уповільнення експресії гена EPSPS у стійких до гліфосату біотипах бур'янів. Аспекти розкритих у цьому документі способів та композицій можна застосовувати для боротьби із різноманітними бур'янами в агрономічних та інших умовах культивування.

Визначення

Нижченаведені терміни використовуються у тексті цього опису, а наступні визначення наведено в якості допоміжного керівництва для спеціалістів у цій області техніки. Якщо не вказано інше, терміни слід сприймати згідно з їх традиційним використанням спеціалістами у відповідній області техніки. Якщо термін наведено у формі однини, передбачається також і форма множини цього терміну, якщо не вказано інше.

Використовувана у цьому документі форма однини може означати один або більше ніж один.

Використовуваний у цьому документі термін "близько" вказує на те, що величина включає неусувну варіацію або похибку приладу або способу, який застосовують для визначення цієї величини, або варіацію, притаманну організму, що вивчається.

Використовувані у цьому документі терміни "ДНК", "молекула ДНК" і "молекула полінуклеотиду ДНК" відносяться до полімеру із дезоксирибонуклеотидних основ геномного або синтетичного походження. ДНК може бути повністю або частково одноланцюговою (олДНК) або повністю або частково дволанцюговою (длДНК). У деяких варіантах реалізації винаходу

5 молекула ДНК може містити одноланцюгові та дволанцюгові ділянки.

Використовувані у цьому документі терміни "РНК", "молекула РНК" і "молекула полінуклеотиду РНК" відносяться до полімеру із рибонуклеотидних основ клітинного або синтетичного походження. РНК може бути повністю або частково одноланцюговою (олРНК) або повністю або частково дволанцюговою (длРНК). У деяких варіантах реалізації винаходу

10 молекула РНК може містити одноланцюгові та дволанцюгові ділянки.

Використовувані у цьому документі терміни "послідовність", "нуклеотидна послідовність" або "полінуклеотидна послідовність" відносяться до нуклеотидної послідовності молекули ДНК, молекули РНК або їх частини. Якщо не вказано інше, нуклеотидні послідовності у тексті цього опису наведено як такі, що читаються зліва направо у напрямку від 5' до 3'. Зрозуміло, що

15 будь-який ідентифікаційний номер послідовності (SEQ ID NO), розкритий у цій заявці, може відноситися як до послідовності ДНК, так і до послідовності РНК у залежності від контексту, в якому згадується SEQ ID NO, навіть якщо цей SEQ ID NO виражено тільки в форматі послідовності ДНК або форматі послідовності РНК. Крім того, розкриття нуклеотидної послідовності розкриває і обернену їй комплементарну послідовність, так як одне неминуче

20 визначає інше, як це відомо спеціалісту у цій області техніки.

Термін "полінуклеотид" відноситься до будь-якого полімеру із мононуклеотидів, які сполучено міжнуклеотидними зв'язками. Полінуклеотиди можуть складатися із рибонуклеотидів природного походження, дезоксирибонуклеотидів природного походження, аналогів нуклеотидів природного походження (наприклад, енантіомерних форм нуклеотидів природного походження) або їх комбінації. Якщо полінуклеотид є одноланцюговим, його довжину можна описати у

25 термінах кількості нуклеотидів. Якщо полінуклеотид є дволанцюговим, його довжину можна описати у термінах кількості пар основ.

Використовуваний у цьому документі термін "полінуклеотид, що не транскрибується" відноситься до полінуклеотиду, який не містить повної транскрипційної одиниці полімерази II.

Використовуваний у цьому документі термін "тригер" або "тригерний полінуклеотид" відноситься до біоактивної молекули полінуклеотиду, яка є значною мірою гомологічною або комплементарною до полінуклеотидної послідовності гена-мішені або РНК, що експресується із гена-мішені, або їх фрагмента або виконує функцію пригнічення експресії гена-мішені або створення фенотипу з виключенням гена. У загальному випадку тригерні полінуклеотиди

35 описано у зв'язку з їх "послідовністю-мішенню". Тригерні полінуклеотиди можуть бути одноланцюговими ДНК (олДНК), одноланцюговими РНК (олРНК), дволанцюговими РНК (длРНК), дволанцюговими ДНК (длДНК) або дволанцюговими гібридами ДНК/РНК. Тригерні полінуклеотиди можуть містити будь-які нуклеотиди природного походження, модифіковані полінуклеотиди, нуклеотидні аналоги або будь-які їх комбінації. У деяких варіантах реалізації винаходу тригерний полінуклеотид може бути вбудовано у більший полінуклеотид, наприклад, у

40 молекулу прай-міРНК. У деяких варіантах реалізації винаходу тригерний полінуклеотид може бути вставлено у малу інтерферуючу РНК (міРНК).

Використовуваний у цьому документі термін "послідовність-мішень" відноситься до нуклеотидної послідовності, яка міститься у гені або генному продукті, проти якого спрямовано тригерний полінуклеотид. У цьому контексті термін "ген" означає визначувану область геномної послідовності, що відповідає одиниці наслідування, яка містить регуляторні області, такі як промотори, енхансери, 5' нетрансльовані області, інтронні області, 3' нетрансльовані області, транскрибовані області та інші функціональні області послідовності, які можуть існувати у вигляді нативних генів або трансгенів у геномі рослини. У залежності від обставин термін

50 послідовність-мішень може відноситися до повнорозмірної нуклеотидної послідовності гена або генного продукту, призначеного для супресії, або нуклеотидної послідовності частини гена або генного продукту, призначеного для супресії. Розкриття послідовності-мішені неминуче розкриває послідовність відповідного тригерного полінуклеотиду, так як одне неминуче визначає інше, як це відомо спеціалісту у цій області техніки.

Термін "генна експресія" відноситься до процесу перетворення генетичної інформації, закодованої в геномній ДНК, у РНК (наприклад, мРНК, рРНК, тРНК або мяРНК), через транскрипцію гена шляхом ферментативної дії РНК-полімерази і в білок через трансляцію мРНК. Генна експресія може регулюватися на багатьох стадіях процесу.

Використовувані у цьому документі вирази "інгібування генної експресії" або "генна

60 супресія", або "сайленсінг гена-мішені" та схожі терміни та вирази відносяться до відсутності

або спостережуваного зниження рівня білка та/або продукту мРНК із гена-мішені. Наслідки інгібування, супресії або сайленсінгу може бути підтверджено шляхом дослідження видимих властивостей клітини або організму або шляхом застосування біохімічних методів.

Використовуваний у цьому документі термін "ідентичність послідовностей", "схожість послідовностей" або "гомологія" застосовують для опису міри схожості між двома або більше нуклеотидними послідовностями. Відсоток "ідентичності послідовностей" між двома послідовностями визначають шляхом порівняння двох оптимально вирівняних послідовностей у вікні порівняння так, що частина послідовності у вікні порівняння може містити добавки або видалення (гепи) у порівнянні із контрольною послідовністю (яка не містить добавок або видалень) для оптимального вирівнювання двох послідовностей. Відсоток розраховують шляхом визначення кількості позицій, у яких в обох послідовностях знаходяться ідентичні нуклеотидні основи або амінокислотні залишки, для визначення кількості співпадаючих позицій, розділення кількості співпадаючих позицій на загальну кількість позицій у вікні порівняння та множення результату на 100 для отримання відсотку ідентичності послідовностей. Кажуть, що послідовність, яка при порівнянні є ідентичною у кожній позиції з контрольною послідовністю, є ідентичною з контрольною послідовністю та навпаки. Вирівнювання двох або більше послідовностей можна проводити за допомогою будь-якої відповідної комп'ютерної програми. Наприклад, широко використовують та прийнятну комп'ютерною програмою для проведення вирівнювання послідовностей є CLUSTALW v1.6 (Thompson, et al. Nucl. Acids Res., 22: 4673-4680, 1994).

Використовуваний у цьому документі термін "розчин" відноситься до гомогенних сумішей і негомогенних сумішей, таких як суспензії, колоїди, міцели та емульсії.

Використовуваний у цьому документі термін "бур'ян" відноситься до будь-якої рослини, яка не є цінною там, де вона росте. Бур'яни зазвичай демонструють стрімкий ріст і тенденцію до заглушення або витіснення більш бажаних рослин. Бур'яни включають рослини-самосіви, які ростуть самі по собі, а не вирощуються фермерами або садівниками. Наприклад, кукурудза, яка росте на полі із соєвими культурами.

Бур'янисті рослини включають, але не обмежуються цим, важливі у рослинництві інвазивні та шкідливі бур'яни та стійкі до гербіцидів біотики, такі як: види *Amaranthus*, наприклад, *A. albus*, *A. blitoides*, *A. hybridus*, *A. palmeri*, *A. powellii*, *A. retroflexus*, *A. spinosus*, *A. tuberculatus* і *A. viridis*; види *Ambrosia*, наприклад, *A. trifida* і *A. artemisiifolia*; види *Lolium*, наприклад, *L. multiflorum*, *L. rigidum* і *L. perenne*; види *Digitaria*, наприклад, *D. insularis*; види *Euphorbia*, наприклад, *E. heterophylla*; види *Kochia*, наприклад, *K. scoparia*; види *Sorghum*, наприклад, *S. halepense*; види *Conyza*, наприклад, *C. bonariensis*, *C. canadensis* і *C. sumatrensis*; види *Chloris*, наприклад, *C. truncate*; види *Echinochloa*, наприклад, *E. colona* і *E. crus-galli*; види *Eleusine*, наприклад, *E. indica*; види *Poa*, наприклад, *P. annua*; види *Plantago*, наприклад, *P. lanceolata*; види *Avena*, наприклад, *A. fatua*; види *Chenopodium*, наприклад, *C. album*; види *Setaria*, наприклад, *S. viridis*; *Abutilon theophrasti*; види *Ipomoea*; види *Sesbania*; види *Cassia*; види *Sida*; види *Brachiaria* і види *Solanum*.

Додаткові види бур'янистих рослин, які можна знайти на культивованих землях, включають *Alopecurus myosuroides*, *Avena sterilis*, *Avena sterilis ludoviciana*, *Brachiaria plantaginea*, *Bromus diandrus*, *Bromus rigidus*, *Cynosurus echinatus*, *Digitaria ciliaris*, *Digitaria ischaemum*, *Digitaria sanguinalis*, *Echinochloa oryzicola*, *Echinochloa phyllopogon*, *Eriochloa punctata*, *Hordeum glaucum*, *Hordeum leporinum*, *Ischaemum rugosum*, *Leptochloa chinensis*, *Lolium persicum*, *Phalaris minor*, *Phalaris paradoxa*, *Rottboellia exalta*, *Setaria faberi*, *Setaria viridis* var. *robusta-alba* schreiber, *Setaria viridis* var. *robusta-purpurea*, *Snowdenia polystachea*, *Sorghum sudanese*, *Alisma plantago-aquatica*, *Amaranthus lividus*, *Amaranthus quitensis*, *Ammania auriculata*, *Ammania coccinea*, *Anthemis cotula*, *Apera spica-venti*, *Bacopa rotundifolia*, *Bidens pilosa*, *Bidens subalternans*, *Brassica tournefortii*, *Bromus tectorum*, *Camelina microcarpa*, *Chrysanthemum coronarium*, *Cuscuta campestris*, *Cyperus difformis*, *Damasonium minus*, *Descurainia sophia*, *Diploaxis tenuifolia*, *Echium plantagineum*, *Elatine triandra* var. *pedicellate*, *Euphorbia heterophylla*, *Fallopia convolvulus*, *Fimbristylis miliacea*, *Galeopsis tetrahit*, *Galium spurium*, *Helianthus annuus*, *Iva xanthifolia*, *Ixophorus unisetus*, *Ipomoea indica*, *Ipomoea purpurea*, *Ipomoea sepiaria*, *Ipomoea aquatic*, *Ipomoea triloba*, *Lactuca serriola*, *Limnophila flava*, *Limnophila erecta*, *Limnophila sessiliflora*, *Lindernia dubia*, *Lindernia dubia* var. *major*, *Lindernia micrantha*, *Lindernia procumbens*, *Mesembryanthemum crystallinum*, *Monochoria korsakowii*, *Monochoria vaginalis*, *Neslia paniculata*, *Papaver rhoeas*, *Parthenium hysterophorus*, *Pentzia suffruticosa*, *Phalaris minor*, *Raphanus raphanistrum*, *Raphanus sativus*, *Rapistrum rugosum*, *Rotala indica* var. *uliginosa*, *Sagittaria guyanensis*, *Sagittaria montevidensis*, *Sagittaria pygmaea*, *Salsola iberica*, *Scirpus juncoides* var. *ohwianus*, *Scirpus mucronatus*, *Setaria lutescens*, *Sida spinosa*, *Sinapis arvensis*, *Sisymbrium orientale*, *Sisymbrium*

thellungii, Solanum ptycanthum, Sonchus aspen, Sonchus oleraceus, Sorghum bicolor, Stellaria media, Thlaspi arvense, Xanthium strumarium, Arctotheca calendula, Conyza sumatrensis, Crassocephalum crepidioides, Cuphea carthagenensis, Epilobium adenocaulon, Erigeron philadelphicus, Landoltia punctata, Lepidium virginicum, Monochoria korsakowii, Solanum americanum, Solanum nigrum, Vulpia bromoides, Youngia japonica, Hydrilla verticillata, Carduus nutans, Carduus pycnocephalus, Centaurea solstitialis, Cirsium arvense, Commelina diffusa, Convolvulus arvensis, Daucus carota, Digitaria ischaemum, Echinochloa crus-galli, Fimbristylis miliacea, Galeopsis tetrahit, Galium spurium, Limnophila erecta, Matricaria perforata, Papaver rhoeas, Ranunculus acris, Soliva sessilis, Sphenoclea zeylanica, Stellaria media, Nassella trichotoma, Stipa neesiana, Agrostis stolonifera, Polygonum aviculare, Alopecurus japonicus, Beckmannia syzigachne, Bromus tectorum, Chloris inflata, Echinochloa erecta, Portulaca oleracea і Senecio vulgaris. Розкриті у цьому документі варіанти реалізації винаходу можна застосовувати для боротьби із будь-яким із цих видів.

Використовуваний у цьому документі термін "гербіцид" відноситься до молекул, які впливають на ріст, розвиток і/або репродуктивну здатність рослин. Гербіциди можуть бути полінуклеотидними або неполінуклеотидними. Гліфосат є прикладом неполінуклеотидного гербіциду, який інгібує EPSPS.

Гербіцид "гліфосат" (N-фосфометилгліцин) інгібує шлях шикімової кислоти, який призводить до біосинтезу ароматичних сполук, включаючи амінокислоти, рослинні гормони та вітаміни. Зокрема, гліфосат стримує перетворення фосфоенолпіровиноградної кислоти (ФЕП) і 3-фосфосіккімової кислоти на 5-енолпірувіл-3-фосфосіккімову кислоту шляхом інгібування ферменту 5-енолпірувілшікімат-3-фосфат синтази (яка у цьому документі називається EPSP-синтазою або EPSPS). Слід мати на увазі, що термін "гліфосат" включає будь-яку гербіцидно ефективну форму N-фосфометилгліцину (включаючи будь-яку його сіль) та інші форми, які призводять до вироблення аніонів гліфосату в рослинах. Гліфосат є комерційно доступним у численних препаратах. Прикладі таких препаратів гліфосату включають, без обмежень, ті, які продаються Monsanto Company (St. Louis, MO) як гербіциди ROUNDUP®, ROUNDUP® ULTRA, ROUNDUP® ULTRAMAX, ROUNDUP® CT, ROUNDUP® EXTRA, ROUNDUP® BIACTIVE, ROUNDUP® BIOFORCE, RODEO®, POLARIS®, SPARK® і ACCORD®, які всі містять гліфосат у вигляді його ізопропіламонієвої солі; ROUNDUP® WEATHERMAX, який містить гліфосат у вигляді його калієвої солі; гербіциди ROUNDUP® DRY і RIVAL®, які містять гліфосат у вигляді його амонієвої солі; ROUNDUP® GEOFORCE, який містить гліфосат у вигляді його натрієвої солі. Інші приклади включають гербіцид TOUCHDOWN® (Syngenta, Greensboro, NC), який містить гліфосат у вигляді його триметилсульфонієвої солі. Доступними є численні інші солі гліфосату, наприклад, диметиламонієва сіль, ізопропіламонієва сіль, сіль тримезіуму, сіль калію, сіль моноамонію та сіль діамонію. Комерційні препарати та норми їх застосування часто визначаються у термінах фунтів кислотного еквіваленту на акр (ф.к.е./акр).

Біоактивні полінуклеотидні тригери

Декілька описаних у цьому документі варіантів реалізації винаходу відносяться до композицій, які містять біоактивний тригерний полінуклеотид, націлений на ген EPSPS. Такі композиції та способи їх застосування можна використовувати для модуляції експресії ендогенних генів EPSPS або трансгенних генів EPSPS (наприклад, CP4 EPSPS, патент США № RE39,247 і 2mEPSPS, патент США № 6040497) в рослинній клітині. У різних варіантах реалізації винаходу ген-мішень EPSPS містить кодуючу (кодуючу білок або трансльовану) послідовність, некодуючу (нетрансльовану) послідовність або як кодуючу, так і некодуючу послідовність. Рослина, оброблена біоактивним тригерним полінуклеотидом EPSPS, є більш чутливою до гербіциду, що інгібує EPSPS, у порівнянні з рослиною, яку не оброблювали біоактивним тригерним полінуклеотидом EPSPS. Передбачається, що у деяких варіантах реалізації винаходу композиція може містити декілька біоактивних тригерних полінуклеотидів. Якщо застосовують декілька біоактивних тригерних полінуклеотидів, біоактивні тригерні полінуклеотиди можуть бути націленими на декілька послідовних сегментів гена-мішені, декілька непослідовних сегментів гена-мішені, декілька алелів гена-мішені або декілька різних генів-мішеней від одного або більше видів. Наприклад, у деяких варіантах реалізації винаходу композиція може містити два або більше біоактивних тригерних полінуклеотидів EPSPS, які здатні зв'язуватись з різними послідовностями-мішенями EPSPS. У деяких варіантах реалізації винаходу різні послідовності-мішені EPSPS можуть належати різним видам рослин. У деяких варіантах реалізації винаходу різні послідовності-мішені EPSPS можуть належати різним областям гена EPSPS. У деяких варіантах реалізації винаходу послідовності-мішені EPSPS може бути вибрано із групи, яка складається з SEQ ID NO: 9-66.

Декілька описаних у цьому документі варіантів реалізації винаходу відносяться до

композицій, які містять один або більше біоактивних тригерних полінуклеотидів, націлених на ген EPSPS, і один або більше біоактивних тригерних полінуклеотидів, які модулюють експресію гена, відмінного від EPSPS. У деяких варіантах реалізації винаходу композиція може містити один або більше біоактивних тригерних полінуклеотидів, націлених на життєво необхідні гени.

Життєво необхідними є гени рослини, які забезпечують ключові ферменти або інші білки, які є необхідними для росту, виживання, розвитку або репродукції рослини (Meinke, et al., Trends Plant Sci. 2008:13(9):483-91). Приклади життєво необхідних генів включають, але не обмежуються цим, гени, які кодуєть біосинтетичні ферменти, метаболізуючі ферменти, рецептори, білки сигнальної трансдукції, структурні білки, фактори транскрипції, транспортні білки та регуляторні РНК, такі як мікроРНК. У деяких варіантах реалізації винаходу супресія життєво необхідного гена посилює дію гербіциду, який впливає на функціонування генного продукту, відмінного від життєво необхідного гена, що супресується.

Біоактивні тригерні полінуклеотиди, застосовні у різноманітних варіантах реалізації винаходу, можуть містити одноланцюгову РНК, дволанцюгову РНК, одноланцюгову ДНК, дволанцюгову ДНК, гібриди ДНК/РНК, хімічно модифіковані полінуклеотиди або будь-яку їх суміш. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид може містити комбінацію рибонуклеотидів і дезоксирибонуклеотидів, наприклад, синтетичні полінуклеотиди, які складаються, головним чином, із рибонуклеотидів, але містять один або більше термінальних дезоксирибонуклеотидів, або синтетичні полінуклеотиди, які складаються, головним чином, із дезоксирибонуклеотидів, але містять один або більше термінальних дідезоксирибонуклеотидів. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид містить неканонічні нуклеотиди, такі як інозин, тіоуридин або псевдоуридин. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид містить хімічно модифіковані нуклеотиди. Наприклад, природний фосфодіестерний остов біоактивного тригерного полінуклеотиду може бути частково або повністю модифіковано внаслідок модифікацій тіофосфатних, дитіофосфатних або метилфосфонатних міжнуклеотидних зв'язків, для синтезу біоактивних тригерних полінуклеотидів можна застосовувати модифіковані нуклеозидні основи або модифіковані цукри, або тригерні полінуклеотиди можна мітити флуоресцентною речовиною (наприклад, флуоресцеїном або родаміном) або іншою міткою (наприклад, біотином). Приклади хімічно модифікованих олігонуклеотидів або полінуклеотидів добре відомі у цій області техніки; дивіться, наприклад, публікацію патенту США 20110171287, публікацію патенту США 20110171176 і публікацію патенту США 20110152353, публікацію патенту США 20110152346, публікацію патенту США 20110160082, які у повному обсязі включено у цей документ за допомогою посилання.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до біоактивних тригерних полінуклеотидів, які модулюють ендогенний ген EPSPS у рослині. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивні тригерні полінуклеотиди EPSPS містять нуклеотидну послідовність, яка є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до щонайменше 10 суміжних нуклеотидів ендогенного гена EPSPS рослини або транскрибованої з нього РНК. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивні тригерні полінуклеотиди EPSPS містять нуклеотидну послідовність, яка є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 або більше суміжних нуклеотидів ендогенного гена EPSPS рослини або транскрибованої з нього РНК. У деяких варіантах реалізації винаходу ендогенний ген EPSPS є геном *Abutilon theophrasti*, *Amaranthus graecizans*, *Amaranthus hybrid*, *Amaranthus lividus*, *Amaranthus palmeri*, *Amaranthus rudis*, *Amaranthus thunbergii*, *Amaranthus viridis*, *Ambrosia trifida*, *Chenopodium album*, *Convolvulus arvensis*, *Conyza Canadensis*, *Digitaria sanguinalis*, *Echinochloa colona*, *Echinochloa crus-galli*, *Euphorbia heterophylla*, *Ipomoea hederacea*, *Lolium multiflorum*, *Senna obtusifolia*, *Sorghum halepense* або *Xanthium strumarium*. У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність ендогенного гена EPSPS вибрано із SEQ ID NO: 1 і 2.

Під "значною мірою ідентичний" або "значною мірою комплементарний" мається на увазі, що біоактивний тригерний полінуклеотид (або щонайменше один ланцюг дволанцюгового полінуклеотиду або його частина, або частина одноланцюгового полінуклеотиду) гібридується у фізіологічних умовах з ендогенним геном, транскрибованою з нього РНК або його фрагментом, здійснюючи регуляцію або супресію ендогенного гена. Наприклад, у деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид має 100 відсотків ідентичності послідовностей або щонайменше близько 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 відсотків ідентичності послідовностей у разі порівняння з послідовністю із 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 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 або більше суміжних полінуклеотидів у гені-мішені або транскрибованій з гена-мішені РНК. У деяких

варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид має 100 відсотків комплементарності послідовностей або щонайменше близько 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 відсотків комплементарності послідовностей у разі порівняння з послідовністю із 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 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 або більше суміжних полінуклеотидів у гені-мішені або транскрибованій з гена-мішені РНК. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид має 100 відсотків ідентичності послідовностей або комплементарності з одним алелем або одним представником сімейства цього гена-мішені (кодуючої або некодуючої послідовності гена). У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид має щонайменше близько 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 або 99 відсотків ідентичності послідовностей або комплементарності з декількома алелями або представниками сімейства цього гена-мішені. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид має 100 відсотків ідентичності послідовностей або комплементарності з декількома алелями або представниками сімейства цього гена-мішені.

Варіанти реалізації винаходу включають біоактивні тригерні полінуклеотиди довжиною 40-60 нуклеотидів (40-мери, 41-мери, 42-мери, 43-мери, 44-мери, 45-мери, 46-мери, 47-мери, 48-мери, 49-мери, 50-мери, 51-мери, 52-мери, 53-мери, 54-мери, 55-мери, 56-мери, 57-мери, 58-мери, 59-мери або 60-мери). Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до біоактивного тригерного полінуклеотиду EPSPS, який містить нуклеотидну послідовність, яка є значною мірою ідентичною або значною мірою комплементарною до однієї або більше із SEQ ID NO: 9-66, і супресує, репресує або іншим чином вповільнює експресію гена-мішені EPSPS в одному або більше видах рослин. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид EPSPS містить нуклеотидну послідовність, яка є ідентичною або комплементарною до однієї або більше із SEQ ID NO: 9-66. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид EPSPS містить послідовність, вибрану із SEQ ID NO: 3-6.

Біоактивні тригерні полінуклеотиди можуть бути одно- або дволанцюговою РНК або одно- або дволанцюговою ДНК, або дволанцюговим гібридом ДНК/РНК, або їх модифікованими аналогами. У деяких варіантах реалізації винаходу тригерні полінуклеотиди вибрано із групи, яка складається з (a) одноланцюгової молекули РНК (олРНК), (b) молекули олРНК, яка гібридується сама з собою з утворенням дволанцюгової молекули РНК, (c) дволанцюгової молекули РНК (длРНК), (d) одноланцюгової молекули ДНК (олДНК), (e) молекули олДНК, яка гібридується сама з собою з утворенням дволанцюгової молекули ДНК, і (f) одноланцюгової молекули ДНК, включаючи модифікований ген Pol III, яка транскрибується в молекулу РНК, (g) дволанцюгової молекули ДНК (длДНК), (h) дволанцюгової молекули ДНК, включаючи модифікований ген Pol III, яка транскрибується в молекулу РНК, (i) дволанцюгової гібридизованої молекули ДНК/РНК або їх комбінацій. У деяких варіантах реалізації винаходу ці полінуклеотиди включають хімічно модифіковані полінуклеотиди або неканонічні нуклеотиди.

У деяких варіантах реалізації винаходу дволанцюгові тригерні полінуклеотиди можуть мати "тупі" кінці або можуть містити 3' або 5' "липкі" кінці із одного, двох, трьох, чотирьох, п'яти або більше нуклеотидів з одного або з обох боків дволанцюгової області. У деяких варіантах реалізації винаходу "липкий" кінець характеризується ідентичністю або комплементарністю з геном-мішенню. У деяких варіантах реалізації винаходу "липкий" кінець не характеризується ідентичністю або комплементарністю з геном-мішенню. У деяких варіантах реалізації винаходу "липкий" кінець може містити один, два, три, чотири або більше нуклеотидів, таких як 2'-дезоксидезокситимідин (dT) нуклеотиди. У деяких варіантах реалізації винаходу "липкий" кінець може містити дезокситимідин (dT) нуклеотиди.

Дволанцюгові біоактивні тригерні полінуклеотиди можуть утворюватися шляхом внутрішньомолекулярної гібридизації або міжмолекулярної гібридизації. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид може містити одноланцюгову ДНК або одноланцюгову РНК, яка гібридується сама з собою з утворенням структури типу шпильки, що має щонайменше частково дволанцюгову структуру, включаючи щонайменше один сегмент, який гібридується з РНК, транскрибованою з гена, призначеного для супресії. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид може знаходитися у більш довгій полінуклеотидній послідовності, наприклад, у прай-міРНК. Інші конфігурації біоактивних тригерних полінуклеотидів відомі у цій області та передбачені у цьому документі.

Способи отримання біоактивних тригерних полінуклеотидів добре відомі у цій області техніки. Наприклад, біоактивні тригерні полінуклеотиди можуть бути експресовані у клітинах-хазяях із вектору, хімічно синтезовані за допомогою відомих способів або вони можуть бути

транскрибовані *in vitro* за допомогою традиційних ферментативних синтетичних способів з використанням, наприклад, РНК-полімераз бактеріофагу Т7, Т3 або SP6. Комерційне приготування олігонуклеотидів часто передбачає наявність двох дезоксирибонуклеотидів у 3' кінці смислового ланцюга. Молекули полінуклеотидів можна синтезувати із комерційно доступних наборів, наприклад, наборів від Applied Biosystems/Ambion (Austin, TX), які містять ДНК, ліговану в 5' кінець мікробної експресійної касети, яка містить промотор бактеріальної Т7 полімерази, який забезпечує ланцюги РНК, які можуть бути зібрані у длРНК, а також набори, що надаються різними виробниками, які включають Т7 RiboMax Express (Promega, Madison, WI), AmpliScribe T7-Flash (Epicentre, Madison, WI) і TranscriptAid T7 High Yield (Fermentas, Glen Burnie, MD). Молекули длРНК можна отримати із мікробних експресійних касет у бактеріальних клітинах (Ongvarrasopone et al. *ScienceAsia* 33:35-39; Yin, *Appl. Microbiol. Biotechnol* 84:323-333, 2009; Liu et al., *BMC Biotechnology* 10:85, 2010), які характеризуються регульованою або недостатньою ферментативною активністю РНКаз III, або застосовуючи різні вірусні вектори для вироблення достатніх кількостей длРНК. Фрагменти гена EPSPS вставлено в мікробні експресійні касети в позиції, в якій відбувається експресія фрагментів з утворенням олРНК або длДНК, застосованих у описаних у цьому документі способах для регуляції експресії гена-мішені EPSPS. Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до експресійних конструкцій, які кодують описані у цьому документі біоактивні тригерні полінуклеотиди.

Після синтезу тригерні полінуклеотиди можна, необов'язково, очищувати. Наприклад, полінуклеотиди можна очищувати із суміші шляхом екстрагування розчинником або смолою, преципітації, електрофорезу, хроматографії або їх комбінації. В альтернативному варіанті тригерні полінуклеотиди можна застосовувати без очищення або з мінімальним очищенням, щоб уникнути втрат внаслідок обробки зразків. Тригерні полінуклеотиди можна висушувати для зберігання або розчиняти у водному розчині. Розчин може містити буфери або солі для стимуляції гібридизації та/або стабілізації ланцюгів подвійної спіралі.

Композиції та способи для боротьби із бур'янами

Біоактивні тригерні полінуклеотиди можна застосовувати до рослини у будь-якій дозі, ефективній для модуляції експресії гена-мішені або вироблення фенотипу з "виключеним" геном. Так як не існує верхньої межі для концентрацій та дозувань біоактивних тригерних полінуклеотидів, застосованих у розкритих у цьому документі композиціях і способах, декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до мінімальної ефективної концентрації або дози біоактивного тригерного полінуклеотиду. Застосовну до рослини концентрацію біоактивного тригерного полінуклеотиду можна коригувати із урахуванням об'єму спрею або засобу, що застосовується до листя рослини або поверхонь інших частин рослини, таких як пелюстки квітів, стебла, бульби, плоди, пиляки, пилки або насіння. В одному варіанті реалізації винаходу обробка трав'яних рослин включає забезпечення біоактивними тригерними полінуклеотидами в розрахунку близько 1 наномоль (нмоль) на рослину. У деяких варіантах реалізації винаходу обробка трав'яних рослин включає забезпечення від близько 0,05 до 1 нмоль біоактивного тригерного полінуклеотиду на рослину. Деякі варіанти реалізації для трав'яних рослин включають діапазони від близько 0,05 до близько 100 нмоль, або від близько 0,1 до близько 20 нмоль, або від близько 1 нмоль до близько 10 нмоль біоактивних тригерних полінуклеотидів на рослину. У деяких варіантах реалізації винаходу обробка трав'яних рослин включає забезпечення 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5 або 20 нмоль біоактивних тригерних полінуклеотидів на рослину.

У разі ілюстрації варіантів реалізації винаходу довільним чином застосовуваний до молекул олігонуклеотидів множник 1X означає обробку 0,8 нмоль молекули біоактивного тригерного полінуклеотиду на рослину; 10X – 8 нмоль молекули біоактивного тригерного полінуклеотиду на рослину; і 100X – 80 нмоль молекули біоактивного тригерного полінуклеотиду на рослину. Запропонована кількість біоактивного тригерного полінуклеотиду може варіюватися в залежності від розміру оброблюваної рослини. Наприклад, для дуже великих рослин, дерев або винограду можна, відповідно, застосовувати більшу кількість біоактивного тригерного полінуклеотиду; у той час як для менших рослин можна, відповідно, застосовувати меншу кількість біоактивного тригерного полінуклеотиду. У деяких варіантах реалізації винаходу, в яких використовують довгі молекули длРНК, які процесуються у декілька олігонуклеотидів, ефективна концентрація або доза біоактивного тригерного полінуклеотиду може бути нижчою.

У декількох варіантах реалізації винаходу біоактивні тригерні полінуклеотиди вбудовуються у рослинну клітину після місцевого застосування біоактивних тригерних полінуклеотидів на поверхні рослини, наприклад, шляхом обприскування рослини біоактивними тригерними полінуклеотидами. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивні тригерні полінуклеотиди

застосовують, не пошкоджуючи тканину та клітини рослини, наприклад, як у разі пошкодження механічного типу або бомбардування частинками. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивні тригерні полінуклеотиди вбудовуються у рослинну клітину без інфікування вірусним вектором.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до композицій, які містять ефективну кількість біоактивного тригерного полінуклеотиду, як самого, так і в комбінації з іншими компонентами, наприклад, однією або більше молекулами неполінуклеотидних гербіцидів і/або одним або більше агентами-переносниками. У деяких варіантах реалізації винаходу один або більше біоактивних тригерних полінуклеотидів знаходяться у одній композиції з агентом-переносником. У інших варіантах реалізації винаходу біоактивні тригерні полінуклеотиди та агент-переносник застосовують окремо. У деяких варіантах реалізації винаходу один або більше біоактивних тригерних полінуклеотидів й одна або більше молекул неполінуклеотидних гербіцидів знаходяться у одній композиції. У інших варіантах реалізації винаходу один або більше біоактивних тригерних полінуклеотидів й одна або більше молекул неполінуклеотидних гербіцидів знаходяться в окремо застосовуваних композиціях. У деяких варіантах реалізації винаходу агент-переносник і неполінуклеотидний гербіцид знаходяться в одній композиції. Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до композиції, яка містить один або більше біоактивних тригерних полінуклеотидів, один або більше агентів-переносників й один або більше неполінуклеотидних гербіцидів. У деяких варіантах реалізації винаходу один або більше біоактивних тригерних полінуклеотидів, неполінуклеотидних гербіцидів й агентів-переносників знаходяться у рідкій композиції.

Неполіпептидні гербіциди можна застосовувати одночасно з біоактивним тригерним полінуклеотидом або біоактивний тригерний полінуклеотид і неполіпептидний гербіцид можна застосовувати у різний час. У деяких варіантах реалізації винаходу композицію, яка містить біоактивний тригерний полінуклеотид, застосовують до рослини перед застосуванням композиції, яка містить неполіпептидний гербіцид. У деяких варіантах реалізації винаходу композицію, яка містить біоактивний тригерний полінуклеотид, застосовують до рослини після застосування неполіпептидного гербіциду. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивні тригерні полінуклеотиди можна застосовувати одночасно з агентом-переносником. У інших варіантах реалізації винаходу біоактивні тригерні полінуклеотиди й агент-переносник застосовують у різний час. У деяких варіантах реалізації винаходу композицію, яка містить біоактивний тригерний полінуклеотид, застосовують до рослини перед застосуванням композиції, яка містить агент-переносник. У деяких варіантах реалізації винаходу композицію, яка містить біоактивний тригерний полінуклеотид, застосовують до рослини після застосування агента-переносника.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до композицій і способів, які забезпечують боротьбу із декількома видами бур'янів. Відомі численні неполінуклеотидні гербіциди, які можна додавати, як самі по собі, так і в комбінації з одним або більше неполінуклеотидними гербіцидами, що мають такий самий або відмінний тип дії (і називаються у цьому документі ко-гербіцидами), до композиції, яка містить біоактивний тригерний полінуклеотид EPSPS, або їх можна застосовувати у поєднанні з біоактивним тригерним полінуклеотидом EPSPS для боротьби з бур'янами. Наприклад, представники сімейств гербіцидів включають, але не обмежуються цим: гербіциди на основі амідів, гербіциди на основі ароматичних кислот, гербіциди на основі миш'яку, гербіциди на основі бензотіазолу, гербіциди на основі бензоїлциклогександіону, гербіциди на основі бензофурил алкілсульфонату, гербіциди на основі карбамату, гербіциди на основі циклогексен оксиму, гербіциди на основі циклопропілізоксазолу, гербіциди на основі дикарбоксиміду, гербіциди на основі динітроаніліну, гербіциди на основі динітрофенолу, гербіциди на основі дифенілового етеру, гербіциди на основі дитіокарбамату, галогенізовані аліфатичні гербіциди, гербіциди на основі імідазолінону, неорганічні гербіциди, гербіциди на основі нітрилу, органофосфорні гербіциди, гербіциди на основі оксадіазолону, гербіциди на основі оксазолу, фенокси-гербіциди, гербіциди на основі фенілендіаміну, гербіциди на основі піразолу, гербіциди на основі піридазину, гербіциди на основі піридазінону, гербіциди на основі піридину, гербіциди на основі піримідиндіаміну, гербіциди на основі піримідинілоксибензиламіну, гербіциди на основі четвертинного амонію, гербіциди на основі тіокарбамату, гербіциди на основі тіокарбонату, гербіциди на основі тіосечовини, гербіциди на основі триазіну, гербіциди на основі триазінону, гербіциди на основі триазолу, гербіциди на основі триазолону, гербіциди на основі триазолпіримідину, гербіциди на основі урацилу і гербіциди на основі сечовини. Типові гербіциди цих сімейств включають, але не обмежуються цим, ацетохлор, ацифлуорфен, ацифлуорфен-натрій, аклоніфен, акролеїн, алахлор, алоксидим, аліловий спирт, аметрин, амікарбазон, амідосульфурон, амінопіралід,

амітрол, сульфамат амонію, анілофос, азулам, атразин, азимсульфурон, ВСПС, бефлбутамід, беназолін, бенфлуралін, бенфуресат, бенсульфурон, бенсульфурон-метил, бенсулід, бентазон, бензфендизон, бензобіциклон, бензофенап, біфенокс, біланафос, біспирибак, біспирибак-натрій, боракс, бромацил, бромобутид, бромоксиніл, бутахлор, бутафенацил, бутаміфос, 5 бутралін, бутроксидим, бутилат, какодилову кислоту, хлорат кальцію, кафенстрол, карбетамід, карфентразон, карфентразон-етил, CDEA, СЕРС, хлорфлуренол, хлорфлуренол-метил, хлоридазон, хлорімурон, хлорімурон-етил, хлороцтову кислоту, хлоротолурон, хлорпрофам, хлорсульфурон, хлортал, хлортал-диметил, цинідон-етил, цинметилін, циносульфурон, цисанілід, клетодим, клодінафоп, клодінафоп-пропаргіл, кломазон, кломеппроп, клорансулам, 10 клорансулам-метил, СМА, 4-CPB, СРМФ, 4-СРР, СРРС, крезол, кумілурун, цианамід, цианазін, циклоат, циклосульфамурон, циклоксидим, цигалофоп, цигалофоп-бутил, 2,4-Д, 3,4-ДА, даімурон, далапон, дазомет, 2,4-ДВ, 3,4-ДВ, 2,4-ДЕВ, десмедифам, дикамбу, дихлобеніл, орто-дихлорбензен, пара-дихлорбензен, дихлорпроп, дихлорпроп-Р, диклофоп, диклофоп-метил, диклосулам, дифензокват, дифензоквата метилсульфат, дифлуфенікан, дифлуфензопир, 15 димефурон, димепіперат, диметахлор, диметаметрин, диметенамід, диметенамід-Р, диметипін, какодилову кислоту, динітрамін, динотерб, дифенамід, дикват, диквату дибромід, дитіопір, діурон, DNOC, 3,4-DP, DSMA, ЕВЕР, ендотал, ЕРТС, еспрокарб, еталфлуралін, еталметсульфурон, еталметсульфурон-метил, етофумезат, етоксифен, етоксисульфурон, етобензанід, феноксапроп-Р, феноксапроп-Р-етил, фентразамід, сульфат заліза, флампроп-М, 20 флазасульфурон, флорасулам, флуазіфоп, флуазіфоп-бутил, флуазіфоп-Р, флуазіфоп-Р-бутил, флукарбазон, флукарбазон-натрій, флуцетосульфурон, флухлоралін, флуфенацет, флуфенпир, флуфенпир-етил, флуметсулам, флуміклорак, флуміклорак-пентил, флуміоксазин, флуометурон, флуороглікофен, флуороглікофен-етил, флупропанат, флупірсульфурон, флупірсульфурон-метил-натрій, флуренол, флуридон, флуорохлоридон, флуороксіпир, 25 флуртамон, флутіацет, флутіацет-метил, фомезафен, форамсульфурон, фозамін, глуфосинат, глуфосинат амонію, гліфосат, галосульфурон, галосульфурон-метил, галоксифоп, галоксифоп-Р, НС-252, гексазінон, імазаметабенз, імазаметабенз-метил, імазамокс, імазапик, йодосульфурон, йодосульфурон-метил-натрій, іоксиніл, ізопротурон, ізоурон, ізоксабен, ізоксахлортал, ізоксафлутал, карбутілат, лактофен, ленацил, лінурун, МАА, МАМА, МСРА, 30 МСРА-тіоетил, МСРВ, мекопроп, мекопроп-Р, мефенацет, мефлулід, мезосульфурон, мезосульфурон-метил, мезотріон, метам, метаміфоп, метамітрон, метазахлор, метабензтіазурон, метиларсинову кислоту, метилдимрон, метилізотіоціанат, метобензурун, метолахлор, S-метолахлор, метосулам, метоксурон, метрибузин, метсульфурон, метсульфурон-метил, МК-66, молінат, монолінурун, MSMA, напроанілід, напропамід, напталам, 35 небурон, нікосульфурон, нонанову кислоту, норфлуразон, олеїнову кислоту (жирні кислоти), орбенкарб, ортосульфамурон, оризалін, оксадіаргіл, оксадіазон, оксасульфурон, оксаксикломефоп, оксифлуорфен, паракват, параквату дихлорид, пебулат, пендіметалін, пенокксулам, пентахлорофенол, пентанохлор, пентоксазон, петоксамід, нафтові олії, фенмедіфам, фенмедіфам-етил, піклорам, піколінафен, піноксаден, піперофос, арсеніт калію, 40 азід калію, претілахлор, примісульфурон, примісульфурон-метил, продіамін, профлуазол, профоксидим, прометон, прометрин, пропахлор, пропаніл, пропаквізафоп, пропазин, профам, пропізохлор, пропоксикарбазон, пропоксикарбазон-натрій, пропізамід, просульфоккарб, просульфурон, піраклоніл, пірафлуфен, пірафлуфен-етил, піразолінат, піразосульфурон, піразосульфурон-етил, піразоксифен, пірибензоксим, пірибутикарб, піридафол, піридат, 45 пірифталід, піримінобак, піримінобак-метил, піримісульфам, піритіобак, піритіобак-натрій, квінклорак, квінмерак, квіннокламін, квізалофоп, квізалофоп-Р, римсульфурон, сетоксидим, сидурон, симазин, симетрин, SMA, арсеніт натрію, азід натрію, хлорат натрію, сулкотріон, сульфентразон, сульфометурон, сульфометурон-метил, сульфосат, сульфосульфурон, сірчану кислоту, дігтарні олії, 2,3,6-ТВА, ТСА, ТСА-натрій, тебутіурон, тепралоксидим, тербацил, 50 тербуметон, тербутилазин, тербутрин, тенілхлор, тіазопір, тифенсульфурон, тифенсульфурон-метил, тіобенкарб, тіокарбазил, топрамезон, тралкоксидим, тріалат, тріасульфурон, триазифлам, трибенурун, трибенурун-метил, трикамбу, триклопир, триетазин, трифлуксисульфурон, трифлуксисульфурон-натрій, трифлуралін, трифлусульфурон, трифлусульфурон-метил, тригідрокситріазін, тритосульфурон, [3-[2-хлоро-4-фтор-5-(-метил-6- 55 трифторметил-2,4-диоксо-,2,3,4-тетрагіднопіримідин-3-іл)фенокси]-2-піридилокси]оцтової кислоти складний етилтер (CAS RN 353292-3-6), 4-[(4,5-дигідро-3-метокси-4-метил-5-оксо)-Н-,2,4-тріазол-ілкарбоніл-сульфамоіл]-5-метилтіофен-3-карбонову кислоту (BAY636), BAY747 (CAS RN 33504-84-2), топрамезон (CAS RN 2063-68-8), 4-гідрокси-3-[[2-[(2-метоксиетокси)метил]-6-(трифторметил)-3-піридиніл]карбоніл]-біцикло[3.2.]окт-3-ен-2-один (CAS 60 RN 35200-68-5) і 4-гідрокси-3-[[2-(3-метоксипропіл)-6-(дифторметил)-3-піридиніл]карбоніл]-

біцикло[3.2.]окт-3-ен-2-один. Крім того, включено гербіцидні сполуки невизначеного типу дії, описані в CN101279950A, CN101279951A, DE10000600A1, DE10116399A1, DE102004054666A1, DE102005014638A1, DE102005014906A1, DE102007012168A1, DE102010042866A1, DE10204951A1, DE10234875A1, DE10234876A1, DE10256353A1, DE10256354A1, DE10256367A1, EP1157991A2, EP1238586A1, EP2147919A1, EP2160098A2, JP03968012B2, JP2001253874A, JP2002080454A, JP2002138075A, JP2002145707A, JP2002220389A, JP2003064059A, JP2003096059A, JP2004051628A, JP2004107228A, JP2005008583A, JP2005239675A, JP2005314407A, JP2006232824A, JP2006282552A, JP2007153847A, JP2007161701A, JP2007182404A, JP2008074840A, JP2008074841A, JP2008133207A, JP2008133218A, JP2008169121A, JP2009067739A, JP2009114128A, JP2009126792A, JP2009137851A, US20060111241A1, US20090036311A1, US20090054240A1, US20090215628A1, US20100099561A1, US20100152443A1, US20110105329A1, US20110201501A1, WO2001055066A2, WO2001056975A1, WO2001056979A1, WO2001090071A2, WO2001090080A1, WO2002002540A1, WO2002028182A1, WO2002040473A1, WO2002044173A2, WO2003000679A2, WO2003006422A1, WO2003013247A1, WO2003016308A1, WO2003020704A1, WO2003022051A1, WO2003022831A1, WO2003022843A1, WO2003029243A2, WO2003037085A1, WO2003037878A1, WO2003045878A2, WO2003050087A2, WO2003051823A1, WO2003051824A1, WO2003051846A2, WO2003076409A1, WO2003087067A1, WO2003090539A1, WO2003091217A1, WO2003093269A2, WO2003104206A2, WO2004002947A1, WO2004002981A2, WO2004011429A1, WO2004029060A1, WO2004035545A2, WO2004035563A1, WO2004035564A1, WO2004037787A1, WO2004067518A1, WO2004067527A1, WO2004077950A1, WO2005000824A1, WO2005007627A1, WO2005040152A1, WO2005047233A1, WO2005047281A1, WO2005061443A2, WO2005061464A1, WO2005068434A1, WO2005070889A1, WO2005089551A1, WO2005095335A1, WO2006006569A1, WO2006024820A1, WO2006029828A1, WO2006029829A1, WO2006037945A1, WO2006050803A1, WO2006090792A1, WO2006123088A2, WO2006125687A1, WO2006125688A1, WO2007003294A1, WO2007026834A1, WO2007071900A1, WO2007077201A1, WO2007077247A1, WO2007096576A1, WO2007119434A1, WO2007134984A1, WO2008009908A1, WO2008029084A1, WO2008059948A1, WO2008071918A1, WO2008074991A1, WO2008084073A1, WO2008100426A2, WO2008102908A1, WO2008152072A2, WO2008152073A2, WO2009000757A1, WO2009005297A2, WO2009035150A2, WO2009063180A1, WO2009068170A2, WO2009068171A2, WO2009086041A1, WO2009090401A2, WO2009090402A2, WO2009115788A1, WO2009116558A1, WO2009152995A1, WO2009158258A1, WO2010012649A1, WO2010012649A1, WO2010026989A1, WO2010034153A1, WO2010049270A1, WO2010049369A1, WO2010049405A1, WO2010049414A1, WO2010063422A1, WO2010069802A1, WO2010078906A2, WO2010078912A1, WO2010104217A1, WO2010108611A1, WO2010112826A3, WO2010116122A3, WO2010119906A1, WO2010130970A1, WO2011003776A2, WO2011035874A1, WO2011065451A1, які всі включено у цей документ за допомогою посилання. У деяких варіантах реалізації винаходу два або більше неполінуклеотидних гербіцидів із схожим типом дії застосовують у поєднанні з біоактивним тригерним полінуклеотидом EPSPS для боротьби з бур'янами. У декількох варіантах реалізації винаходу композиції та способи, у яких використовуються альтернативні типи дії, застосовують до бур'янистих видів, з якими важко боротися. У деяких варіантах реалізації винаходу два або більше неполінуклеотидних гербіцидів із різним типом дії застосовують у поєднанні з біоактивним тригерним полінуклеотидом EPSPS для боротьби з бур'янами. У деяких варіантах реалізації винаходу два або більше неполінуклеотидних гербіцидів із схожим або різним типом дії застосовують у поєднанні з біоактивним тригерним полінуклеотидом EPSPS і біоактивним тригерним полінуклеотидом, націленим на гербіцидний ген-мішень, відмінний від EPSPS, для боротьби з бур'янами. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид EPSPS застосовують у поєднанні з гербіцидом, що інгібує EPSPS, і гербіцидом з відмінним типом дії. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид EPSPS застосовують у поєднанні з гербіцидом, що інгібує EPSPS, гербіцидом з відмінним типом дії і біоактивним тригерним полінуклеотидом, націленим на гербіцидний ген-мішень, відмінний від EPSPS.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до композицій і способів, які посилюють активність неполінуклеотидних гербіцидів. У деяких варіантах реалізації винаходу робочі концентрації неполінуклеотидних гербіцидів можуть бути зменшені у композиціях, які містять біоактивні тригерні полінуклеотиди EPSPS. Наприклад, можна досягти зменшення робочої концентрації на 10-25 відсотків, 26-50 відсотків, 51-75 відсотків або більше. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид EPSPS може зменшувати кількість гербіцида, що інгібує EPSPS, використовуюваного для ефективного знищення бур'янів щонайменше на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75 або 80 відсотків.

У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид EPSPS

застосовують у поєднанні з одним або більше ауксиноподібними гербіцидами для боротьби із бур'янами. Ауксиноподібні гербіциди включають гербіцид на основі бензойної кислоти, гербіцид на основі феноксикарбонової кислоти, гербіцид на основі піридинкарбонової кислоти, гербіцид на основі хінолінкарбонової кислоти, гербіцид на основі піримідинкарбонової кислоти та гербіцид на основі беназолін-етилену. Ауксиноподібні гербіциди також включають сполуки феноксикарбонової кислоти, сполуки піридинкарбонової кислоти, сполуки хінолінкарбонової кислоти та сполуки беназолін-етилену. Приклади сполук феноксикарбонової кислоти включають, але не обмежуються цим, 2,4-дихлорфеноксіоцтову кислоту, (4-хлор-2-метилфеноксі)оцтову кислоту, диклопроп (2,4-ДР), мекопроп (MCPP) і кломепроп. Приклади гербіцидів на основі піридинкарбонової кислоти включають, але не обмежуються цим, клопіралід, піклорам, флуороксипір, аміноциклопірахлор і триклопір. Ці ауксиноподібні гербіциди застосовують у баковій суміші одночасно або до чи після обробки композиціями. Ауксиноподібні гербіциди включають комерційно доступні препарати, наприклад, включаючи, але не обмежуючись цим, 2,4-Д, 2,4-ДВ (Butyrac® 200, Bakker), MCPA (Rhomox®, Rhomene), мекопроп, дихлорпроп, 2,4,5-Т, триклопір (Garlon®, Dow AgroSciences, Indianapolis, IN), хлорамбен, дикамбу (Banvel®, Clarity®, Oracle®, Sterling®), 2,3,6-ТВА, трикамбу, клопіралід (Stinger®, Dow AgroSciences), піклорам (Tordon®, Dow AgroSciences), квінмерак, квінклорак, беназолін, фенак, IAA, NAA, ортоніл і флуороксипір (Vista®, Starane®, Dow AgroSciences), амінопіралід (Milestone®, Dow AgroSciences) і аміноциклопірахлор (Dupont, Wilmington, DE).

У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивний тригерний полінуклеотид EPSPS застосовують у поєднанні з одним або більше гербіцидами на основі бензойної кислоти для боротьби із бур'янами. Гербіциди на основі бензойної кислоти є ефективними гербіцидами як для досходової, так і для післясходової боротьби із бур'янами. Група гербіцидів на основі бензойної кислоти включає дикамбу (3,6-дихлоро-о-анісову кислоту), хлорамбен (3-аміно-2,5-дихлорбензойну кислоту) і ТВА (2,3,6-трихлорбензойну кислоту). Дикамба є одним із багатьох ауксиноподібних гербіцидів, яка є недорогим, екологічно безпечним гербіцидом, який застосовують як до сходовий, так і післясходовий гербіцид для ефективної боротьби з однорічними та багаторічними широколистяними бур'янами та декількома трав'янистими бур'янами у кукурудзяних, соргових, дрібнозернових, лукових, сінних, пасовищних, цукрово-очеретяних, спаржевих, газонних і трав'янистих культурах (Crop Protection Chemicals Reference, pp. 1803-1821, Chemical & Pharmaceutical Press, Inc., New York, NY, 11th ed., 1995). Дикамба включає 3,6-дихлоро-о-анісову кислоту або 3,6-дихлоро-2-метоксибензойну кислоту та її кислоти та солі. Її солі включають ізопропіламін, диглікоамін, диметиламін, калій та натрій. Приклади комерційних препаратів дикамби включають Banvel™ (у вигляді солі DMA, BASF, Research Triangle Park, NC), Clarity® (сіль DGA, BASF), VEL-58-CS-11™ (BASF) і Vanquish™ (сіль DGA, BASF). Дикамбу застосовують як бакову суміш одночасно або до чи після обробки композиціями.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до способу, який включає застосування біоактивного тригерного полінуклеотиду до стійкої до гербіцидів рослини. У деяких варіантах реалізації винаходу стійка до гербіцидів рослина містить трансген, який надає стійкості до гербіцидів. Гербіциди, для яких існують трансгени для стійкості рослин, включають, але не обмежуються цим: ауксиноподібні гербіциди, гліфосат, глюфосінат, сульфонілсечовини, імідазоліони, бромоксиніл, делапон, дикамбу, циклогександіон, інгібітори протопорфіриноген оксидази та інгібітори 4-гідроксифенілпіруватдіоксигенази. Трансгени та їх полінуклеотидні молекули, які кодують білки, що залучені до надання стійкості до гербіцидів, відомі у цій області техніки. Наприклад, трансгени та їх полінуклеотидні молекули, які кодують білки, що залучені до надання стійкості до гербіцидів, включають, але не обмежуються цим: 5-енолпірувілшкімат-3-фосфат синтазу (EPSPS), наприклад, як детальніше описано у патенті США № 7807791, патенті США № 6248876 В1, патенті США № 5627061, патенті США № 5804425, патенті США № 5633435, патенті США № 5145783, патенті США № 4971908, патенті США № 5312910, патенті США № 5188642, патенті США № 4940835, патенті США № 5866775, патенті США № 6225114 В1, патенті США № 6130366, патенті США № 5310667, патенті США № 4535060, патенті США № 4769061, патенті США № 5633448, патенті США № 5510471, патенті США № Re. 36449; патенті США № RE 37287 Е; і патенті США № 5491288; стійкість до сульфонілсечовини та/або імідазоліона, наприклад, як детальніше описано у патенті США № 5605011, патенті США № 5013659, патенті США № 5141870, патенті США № 5767361, патенті США № 5731180, патенті США № 5304732, патенті США № 4761373, патенті США № 5331107, патенті США № 5928937, патенті США № 5378824 і Міжнародній публікації WO96/33270; стійкість до гербіцидів, що інгібують гідроксифенілпіруватдіоксигенази в рослинах, наприклад, як детальніше описано у патенті США № 6245968 В1, патенті США № 6268549, патенті США № 6069115, патенті США №

7312379, патенті США № 7935869, патенті США № 7304209; полінуклеотиди арилоксиалканоатдіоксигенази, які надають стійкість до 2,4-Д та інших феноли-ауксинових гербіцидів, а також до гербіцидів на основі арилоксифеноксипропіонату, які описано, наприклад, у патенті США № 7838733 і Міжнародній публікації WO2005/107437; полінуклеотиди, які надають стійкість до дикамби, описані, наприклад, у Herman et al. (2005) J. Biol. Chem. 280: 24759-24767. Інші ознаки стійкості до гербіцидів включають ті, що надаються полінуклеотидами, які кодують екзогенну фосфінотрицин ацетилтрансферазу, наприклад, як описано у патентах США № 5969213; 5489520; 5550318; 5874265; 5919675; 5561236; 5648477; 5646024; 6177616; і 5879903. Рослини, які містять екзогенну фосфінотрицин ацетилтрансферазу, можуть проявляти покращену стійкість до гербіцидів на основі глүфосінату, які інгібують фермент глутамінсинтазу. Крім того, полінуклеотиди, які надають стійкість до гербіцидів, включають ті, що призводять до зміни активності протопорфіриноген оксидази (протокс), як описано у патентах США № 6288306 B1; 6282837 B1; і 5767373; і Міжнародній публікації WO2001/12825. Рослини, які містять такі полінуклеотиди, можуть проявляти покращену стійкість до будь-якого із множини гербіцидів, які націлені на фермент протокс (що також називаються інгібіторами протоксу). Полінуклеотиди, які кодують гліфосат окидоредуктазу та гліфосат-N-ацетилтрансферазу (GOX, описаний у патенті США № 5463175, і GAT, описаний у публікації патента США 20030083480, дикамба монооксигеназа, патенти США № 7022896 і 7884262, які всі включено у цей документ за допомогою посилання); полінуклеотидна молекула, яка кодує бромоксиніл нітрілазу (Bxp, описаний щодо надання стійкості до бромоксинілу у патенті США № 4810648, який включено у цей документ за допомогою посилання); полінуклеотидна молекула, яка кодує фітоендесатуразу (crtl), описана в Misawa et al, (1993) Plant J. 4:833-840 і Misawa et al, (1994) Plant J. 6:481-489 щодо надання стійкості до норфлуразону; полінуклеотидна молекула, яка кодує ацетогідроксикислу синтазу (AHAS, aka ALS), описана в Sathasiivan et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18:2188-2193 щодо надання стійкості до гербіцидів на основі сульфонілсечовини; і ген bar, описаний в DeBlock, et al. (1987) EMBO J. 6:2513-2519 щодо надання стійкості до глүфосінату та білафосу. Трансгенні кодуючі області та регуляторні елементи генів стійкості до гербіцидів є мішенями, на які націлено біоактивний полінуклеотид, а гербіциди можна включати в композицію та її комбінації, щоб забезпечити покращені способи боротьби із бур'янами.

Трансгенні культурні рослини, які мають стійкість до одного чи більше гербіцидів, можуть потребувати спеціальних способів організації боротьби із бур'янами. Декілька варіантів реалізації винаходу дозволяють націлюватися на трансген, що відповідає за стійкість до гербіцидів, щоб оброблювані рослини ставали чутливішими до гербіциду. Наприклад, ДНК EPSPS, що міститься у трансгенному культурному об'єкті, може бути мішенню для біоактивних тригерних полінуклеотидів з метою зробити трансгенну культурну рослину чутливою до застосування відповідного гліфосатвмісного гербіциду. Такі трансгенні об'єкти відомі у цій області техніки і включають, але не обмежуються цим, DAS-44406-6, MON883302, MON87427, FG72, HCEM485, H7-1, ASR368, J101, J163, DP-098140, GHB614, 356043, MON89788, MON88913, RT200, NK603, GTSB77, GA21, MON1445 і 40-3-2 та публікації патентів США: 20110126310, 20090137395, у повному обсязі включені у цей документ за допомогою посилання.

Декілька варіантів реалізації винаходу відносяться до застосування біоактивного тригерного полінуклеотиду EPSPS у поєднанні з одним або більше агентами-переносниками. У контексті цього документа "агент-переносник" являє собою агент, який у разі комбінації з полінуклеотидом у композиції, яку місцево застосовують до цільової поверхні рослини, надає можливість полінуклеотиду потрапляти у рослинну клітину. У деяких варіантах реалізації винаходу агент-переносник являє собою агент, який кондиціонує поверхню рослинної тканини, наприклад, листя, стебла, корені, квіти або плоди, для проникнення біоактивних тригерних полінуклеотидів у рослинні клітини. У деяких аспектах способи включають одне або більше застосувань композиції біоактивного тригерного полінуклеотиду або одне або більше застосувань агента-переносника для кондиціонування рослини для проникнення біоактивних тригерних полінуклеотидів. Перенесення біоактивних тригерних полінуклеотидів у рослинні клітини можна полегшити шляхом попереднього або одночасного застосування агента-переносника полінуклеотидів у рослинні тканини. У деяких варіантах реалізації винаходу агент-переносник застосовують після застосування полінуклеотидної композиції. Не прив'язуючись до конкретної теорії, можна сказати, що агент-переносник дає можливість біоактивним тригерним полінуклеотидам проходити крізь бар'єр воскової кутикули, устячко та/або стінку клітини або мембранний бар'єр в рослинну клітину. Агенти-переносники, які підходять для полегшення перенесення біоактивного тригерного полінуклеотиду в рослинну клітину, включають агенти, які підвищують проникність зовнішньої поверхні рослини або які підвищують проникність рослинних клітин для олігонуклеотидів або полінуклеотидів. Такі агенти для полегшення перенесення

біоактивного тригерного полінуклеотиду в рослинну клітину включають хімічні агенти, фізичні агенти або їх комбінації. Хімічні агенти для кондиціонування або перенесення включають (a) сурфактанти, (b) органічні розчинники або водний розчин чи водні суміші органічних розчинників, (c) окисники, (d) кислоти, (e) основи, (f) олії, (g) ферменти або їх комбінації.

Варіанти реалізації способу застосування біоактивного тригерного полінуклеотиду до рослинних клітин можуть, необов'язково, включати етап інкубації, етап нейтралізації (наприклад, для нейтралізації кислоти, основи або окисника або для інактивації ферменту), етап промивання або їх комбінації. Варіанти реалізації агентів або видів обробки для кондиціонування рослини для проникнення біоактивних тригерних полінуклеотидів включають емульсії, обернені емульсії, ліпосоми та інші міцело-подібні композиції. Варіанти реалізації агентів або видів обробки для кондиціонування рослини для проникнення біоактивних тригерних полінуклеотидів включають протиіони або інші молекули, які, як відомо, асоціюють з молекулами нуклеїнових кислот, наприклад, неорганічні іони амонію, іони алкіламонію, іони літію, поліаміни, такі як спермін, спермідин або путресцин та інші катіони. Органічні розчинники, які можна застосовувати для кондиціонування рослини для проникнення біоактивних тригерних полінуклеотидів, включають ДМСО, ДМФ, піридин, N-піпролідін, гексаметилфосфорамід, ацетонітрил, діоксан, поліпропіленгліколь, інші розчинники, які можна змішувати з водою або які будуть розчиняти фосфонуклеотиди у неводних системах (таких, які застосовують у синтетичних реакціях). Можна використовувати природні або синтетичні олії з сурфактантами або без сурфактантів або емульсифікатори, наприклад, можна використовувати олії рослинного походження, олії олійних культур (такі як перераховані в 9^{му} переліку гербіцидних ад'ювантів, загальнодоступному у всесвітній мережі (інтернет) на herbicide.adjuvants.com), наприклад, парафінові олії, складні етери жирних кислот і багатоатомних спиртів або олії з коротко ланцюговими молекулами, модифікованими амідами або поліамідами, такими як поліетиленімін чи N-піпролідін.

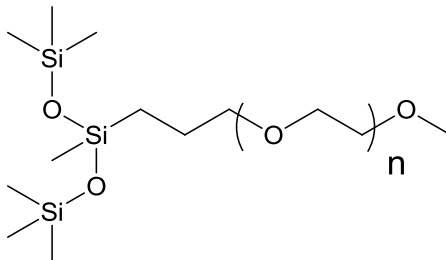
У декількох варіантах реалізації винаходу агент-переносник є кремнійорганічним препаратом. У певних варіантах реалізації винаходу кремнійорганічний препарат, який є комерційно доступним під назвою сурфактант Silwet® L-77 з номером CAS 27306-78-1 і номером EPA: CAL.REG.NO. 5905-50073-AA і у цей час доступний від Momentive Performance Materials, Albany, New York, можна застосовувати для приготування композиції біоактивного тригерного полінуклеотиду. У певних варіантах реалізації винаходу, у яких застосовують кремнійорганічний препарат Silwet L-77 в якості засобу для обробки листя рослин або інших поверхонь рослин, що передують обприскуванню, свіжопротовані концентрації в діапазоні від близько 0,015 до близько 2 відсотків за масою (мас. відсотків) (наприклад, близько 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 мас. відсотків) є ефективними для кондиціонування листя або іншої поверхні рослини для перенесення молекул біоактивного тригерного полінуклеотиду в рослинні клітини після місцевого застосування на поверхні. У певних варіантах реалізації запропонованих у цьому документі способів і композицій застосовано або запропоновано композицію, яка містить молекулу біоактивного тригерного полінуклеотиду та кремнійорганічний препарат, що містить Silwet L-77 в діапазоні від близько 0,015 до близько 2 відсотків за масою (мас. відсотків) (наприклад, близько 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 мас. відсотків).

У певних варіантах реалізації винаходу, застосовано або запропоновано будь-який комерційно доступний кремнійорганічний препарат. Наприклад, один або більше із наступних комерційно доступних кремнійорганічних препаратів можна застосовувати в якості агентів-переносників в композиції біоактивного тригерного полінуклеотиду або використовувати як обробку, що передують обприскуванню, для кондиціонування листя або іншої поверхні рослини для перенесення молекул біоактивного тригерного полінуклеотиду в рослинні клітини: Breakthru S 321, Breakthru S 200 Cat№ 67674-67-3, Breakthru OE 441 Cat№68937-55-3, Breakthru S 278 Cat №27306-78-1, Breakthru S 243, Breakthru S 233 Cat№134180-76-0, доступні від виробника Evonik Goldschmidt (Німеччина), Silwet® HS 429, Silwet® HS 312, Silwet® HS 508, Silwet® HS 604 (Momentive Performance Materials, Албані, Нью-Йорк). У певних варіантах реалізації винаходу, у яких застосовують кремнійорганічний препарат в якості засобу для обробки листя рослин або інших поверхонь, що передують обприскуванню, свіжопротовані концентрації в діапазоні від близько 0,015 до близько 2 відсотків за масою (мас. відсотків) (наприклад, близько 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 мас. відсотків) є ефективними для кондиціонування листя або іншої поверхні рослини для перенесення молекул біоактивного тригерного полінуклеотиду в рослинні клітини після місцевого застосування на поверхні. У певних варіантах реалізації запропонованих у цьому документі способів і композицій застосовано або запропоновано композицію, яка містить

молекулу біоактивного тригерного полінуклеотиду та кремнійорганічний препарат в діапазоні від близько 0,015 до близько 2 відсотків за масою (мас. відсотків) (наприклад, близько 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 мас. відсотків).

Кремнійорганічні препарати, застосовні у запропонованих у цьому документі способах і композиціях, можуть містити одну або більше ефективних кремнійорганічних сполук. Використовуваний у цьому документі вираз "ефективна кремнійорганічна сполука" застосовують, щоб описати будь-яку кремнійорганічну сполуку, яка знаходиться в кремнійорганічному препараті, що стимулює інтерналізацію біоактивного тригерного полінуклеотиду рослинною клітиною. У певних варіантах реалізації винаходу, ефективна кремнійорганічна сполука може уможливлувати проникнення біоактивного тригерного полінуклеотиду в рослинну клітину способом, який робить можливою опосередковану біоактивним тригерним полінуклеотидом супресію експресії гена-мішені у рослинній клітині. У загальному випадку ефективні кремнійорганічні сполуки включають, але не обмежуються цим, сполуки, які містять: i) кінцеву групу трисилоксану, яка ковалентно зв'язана з, ii) алкільний лінкер, включаючи, але не обмежуючись цим, н-пропільний лінкер, який ковалентно зв'язаний з, iii) поліглікольний ланцюг, який ковалентно зв'язаний з iv) термінальною групою. Кінцеві групи трисилоксану таких ефективних кремнійорганічних сполук включають, але не обмежуються цим, гептаметилтрисилоксан. Алкільні лінкери можуть включати, але не обмежуються цим, н-пропільний лінкер. Поліглікольні ланцюги включають, але не обмежуються цим, поліетиленгліколь або поліпропіленгліколь. Поліглікольні ланцюги можуть містити суміш, яка забезпечує середню довжину ланцюга "n", що складає близько "7,5". У певних варіантах реалізації винаходу середня довжина ланцюга "n" може варіюватися від близько 5 до близько 14. Термінальні групи можуть включати, але не обмежуються цим, алкільні групи, такі як метильна група. Вважається, що ефективні кремнійорганічні сполуки включають, але не обмежуються цим, сурфактанти на основі трисилоксану етоксилату або модифікований оксидом поліалкілену гептаметил трисилоксан.



(Сполука I: поліалкіленоксид гептаметилтрисилоксан, середнє $n=7,5$).

У певних варіантах реалізації винаходу кремнійорганічний препарат, який містить кремнійорганічну сполуку, що містить кінцеву групу трисилоксану, використовують у запропонованих у цьому документі способах і композиціях. У певних варіантах реалізації винаходу кремнійорганічний препарат, який містить кремнійорганічну сполуку, що містить кінцеву групу гептаметилтрисилоксану, використовують у запропонованих у цьому документі способах і композиціях. У певних варіантах реалізації винаходу кремнійорганічну композицію, яка містить Сполуку I, використовують у запропонованих у цьому документі способах і композиціях. У певних варіантах реалізації винаходу кремнійорганічну композицію, яка містить Сполуку I, використовують у запропонованих у цьому документі способах і композиціях. У певних варіантах реалізації запропонованих у цьому документі способів і композицій застосовано або запропоновано композицію, яка містить молекулу біоактивного тригерного полінуклеотиду та одну або більше ефективних кремнійорганічних сполук в діапазоні від близько 0,015 до близько 2 відсотків за масою (мас. відсотків) (наприклад, близько 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 мас. відсотків).

У декількох варіантах реалізації винаходу агент-переносник являє собою рослинний гормон. Приклади рослинних гормонів включають абсцизову кислоту, ауксин, цитокінін, гіббереллін, жасмонат, етілен, саліцилову кислоту, окис нітрогену, стріголактон. У деяких варіантах

реалізації винаходу агент-переносник являє собою рослинний гормон брасиностероїд.

У декількох варіантах реалізації винаходу агент-переносник являє собою катіонний ліпід. У контексті цього винаходу "катіонний ліпід" відноситься до сполуки, яка містить щонайменше один ліпідний компонент і позитивно заряджений четвертинний нітроген, зв'язаний з протионом. "Ліпіди" слід сприймати як такі, що складаються із гідрофобного алкільного або алкенільного компонента та карбонової кислоти або етерного компонента. У деяких варіантах реалізації винаходу одна або більше біоактивних тригерних молекул взаємодіють з катіонними ліпідами з утворенням частинок нуклеїнова кислота-ліпід. У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивні тригерні молекули інкапсульовано в ліпосомі так, що біоактивні тригерні молекули є недосяжними для водного середовища. У деяких варіантах реалізації винаходу ліпосома має тверде ядро, що складається з біоактивних тригерних молекул; такі ліпосоми, в яких інкапсульовано біоактивні тригерні молекули і які мають тверде ядро, називаються у цьому документі "ліпідними наночастинками". У деяких варіантах реалізації винаходу біоактивні тригерні молекули не інкапсульовано в ліпосомі. У таких варіантах реалізації винаходу біоактивні тригерні молекули можуть утворювати комплекс на зовнішній поверхні. У таких варіантах реалізації винаходу біоактивні тригерні молекули досяжні для водного середовища. У деяких варіантах реалізації винаходу катіонні ліпіди можна застосовувати в комбінації з іншими ліпідними компонентами, такими як холестерин і ПЕГ-ліпіди, для утворення ліпідних наночастинок в біоактивними тригерними молекулами.

У декількох варіантах реалізації винаходу, експресію гена EPSPS у рослині модулюють шляхом (а) кондиціонування рослини для проникнення біоактивних тригерних полінуклеотидів і (b) обробки рослини біоактивними тригерними полінуклеотидами, причому біоактивні тригерні полінуклеотиди включають щонайменше один сегмент із 18 або більше суміжних нуклеотидів, клонованих або іншим чином ідентифікованих із гена-мішені EPSPS у смисловій або антисмисловій орієнтації, при цьому молекули біоактивного тригерного полінуклеотиду проникають всередину рослини та індукують модуляцію гена-мішені. Кондиціонування та застосування полінуклеотиду можна проводити окремо або на одному етапі. Якщо кондиціонування та застосування біоактивного тригерного полінуклеотиду проводять на окремих етапах, кондиціонування може відбуватися до або після застосування біоактивного тригерного полінуклеотиду протягом хвилин, годин або днів. У деяких варіантах реалізації винаходу для однієї рослини можна проводити більше одного етапу кондиціонування або більше одного застосування молекул біоактивних тригерних полінуклеотидів.

У деяких варіантах реалізації винаходу до біоактивного тригерного полінуклеотиду можуть бути прив'язані ліганди, наприклад, до длРНК, олРНК, длДНК або олДНК тригерного полінуклеотиду. У загальному випадку ліганди можуть включати модифікатори, наприклад, для посилення поглинання; діагностичні сполуки або репортерні групи, наприклад, для відслідковування розподілу; перехрестно-зшиваючі агенти; компоненти, які надають стійкість до нуклеаз; і природні або незвичайні основи. Загальні приклади включають ліпофілі, ліпіди (наприклад, холестерин, жовчну кислоту або жирну кислоту (наприклад, літохоловий олеїл, лауроїл, докосніл, стеароїл, пальмітоїл, мірістоїл олеоїл, лінолеоїл), стероїди (наприклад, уваол, гецигенін, діосгенін), терпени (наприклад, тритерпени, наприклад, сарсасапогенін, фріделін, епіфріделанолове похідне літохолової кислоти), вітаміни (наприклад, фолієву кислоту, вітамін А, біотин, піридоксал), вуглеводи, білки, білок-зв'язуючі агенти, молекули, націлені на інтегрин, полікатіони, пептиди, поліаміни та пептидні міметики. Ліганд також може бути рекомбінантною або синтетичною молекулою, такою як синтетичний полімер, наприклад, поліетиленгліколь (ПЕГ), ПЕГ-40К, ПЕГ-20К і ПЕГ-5К. Інші приклади лігандів включають ліпофільні молекули, наприклад, холестерин, холієву кислоту, адамантан-оцтову кислоту, 1-пірен масляну кислоту, дигідротестостерон, гліцерол (наприклад, його складні етери та етери, наприклад, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉ або C₂₀ алкіл; наприклад, лауроїл, докосніл, стеароїл, олеоїл, лінолеоїл 1,3-біс-О(гексадецил)гліцерол, 1,3-біс-О(октадецил)гліцерол), геранілоксигексильну групу, гексадецилгліцерол, бомеол, ментол, 1,3-пропандіол, гептадецильну групу, пальмітинову кислоту, мірістинову кислоту, О3-(олеоїл)літохолоєву кислоту, О3-(олеоїл)холенову кислоту, додеканоїл, літохоліл, 5β-холаніл, N, N-дистеаріл-літохоламід, 1,2-ді-О-стеароїлгліцерид, диметокситритіл або феноксазін) і ПЕГ (наприклад, ПЕГ-5К, ПЕГ-20К, ПЕГ-40К). У деяких варіантах реалізації винаходу ліпофільні компоненти вибрано із групи, яка складається з ліпиду, холестерину, олеїну, ретинілу та залишків холестерину.

У деяких варіантах реалізації винаходу кон'югація ліганда до біоактивного тригерного полінуклеотиду, наприклад, длРНК, підсилює поглинання його клітиною. У деяких варіантах реалізації винаходу ліпофільний компонент кон'юговано з біоактивним тригерним полінуклеотидом, наприклад, длРНК. Ліпофільні сполуки, які можна кон'югувати з біоактивним

тригерним полінуклеотидом, включають, але не обмежуються цим, 1-пірен масляну кислоту, 1,3-біс-О(гексадецил)гліцерил і ментол. Одним із прикладів лігандів для опосередкованого рецепторами ендоцитозу є фолієва кислота. Фолієва кислота потрапляє у клітину шляхом опосередкованого фолатними рецепторами ендоцитозу. Біоактивні тригерні полінуклеотиди, які несуть фолієву кислоту, будуть ефективно транспортуватися до клітини шляхом опосередкованого фолатними рецепторами ендоцитозу. Інші ліганди, кон'юговані з полінуклеотидами, включають поліетиленгліколи, вуглеводні кластери, перехрестно-зшиваючі агенти, порфіринові кон'югати, пептиди для доставки та ліпіди, такі як холестерин. У деяких випадках кон'югація катіонного ліганда до полінуклеотидів призводить до покращення стійкості до нуклеаз. Типовими прикладами катіонних лігандів є пропіламоній та диметилпропіламоній. Цікаво, що повідомлялося, що антисмислові полінуклеотиди зберігали свою афінність зв'язування до мРНК, коли катіонний ліганд було дисперговано по всьому олігонуклеотиду. Дивіться M. Manoharan Antisense & Nucleic Acid Drug Development 2002, 12, 103 і включені у роботу посилання.

Доставку біоактивних тригерних нуклеотидів всередину рослинної клітини можна здійснювати багатьма способами, включаючи, без обмежень, (1) завантаження ліпосом запропонованим у цьому документі тригерним полінуклеотидом і (2) утворення комплексу тригерного полінуклеотиду з ліпідами або ліпосомами для формування комплексів нуклеїнова кислота-ліпід або нуклеїнова кислота-ліпосома. Ліпосома може складатися з катіонних і нейтральних ліпідів, що зазвичай використовуються для трансфекції клітин *in vitro*. Катіонні ліпіди можуть утворювати комплекс (наприклад, заряд-асоційований) з негативно зарядженими нуклеїновими кислотами з утворенням ліпосом. Приклади катіонних ліпосом включають, без обмежень, ліпофектин, ліпофектамін, ліпофектак і DOTAP. Процедури створення ліпосом добре відомі у цій області техніки. Ліпосомні композиції можуть бути утворені, наприклад, із фосфатидилхоліну, диміристоїл-фосфатидилхоліну, дипальмітоїл-фосфатидилхоліну, диміристоїл-фосфатидилгліцеролу, діолеоїл-фосфатидилетаноламіну або ліпосом, що містять дигідросфінгомелін (DHSM). Багато ліпофільних агентів є комерційно доступними, включаючи ліпофектин® (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, Calif.) і ефектен™ (Qiagen, Valencia, Calif.). Крім того, способи системної доставки можна оптимізувати, використовуючи комерційно доступні катіонні ліпіди, такі як DDAB або DOTAP, кожен з яких можна змішувати з нейтральним ліпідом, таким як DOPE або холестерин. У деяких випадках можна використовували ліпосоми, такі як описані в Templeton et al. (Nature Biotechnology, 15:647-652 (1997)). В інших варіантах реалізації винаходу можна використовувати полікатіони, такі як поліетиленімін для досягнення доставки *in vivo* та *ex vivo* (Boletta et al., J. Am Soc. Nephrol. 7:1728 (1996)). Додаткову інформацію щодо використання ліпосом для доставки нуклеїнових кислот можна знайти в патенті США № 6271359, публікації згідно PCT WO 96/40964 і Morrissey, D. et al. 2005. Nat Biotechnol. 23(8):1002-7.

У деяких варіантах реалізації винаходу композиції біоактивних тригерних полінуклеотидів також можна застосовувати у вигляді сумішей з різними сільськогосподарськими хімічними речовинами та/або інсектицидами, майтіцидами та фунгіцидами, пестицидними та біопестицидними агентами. Приклади включають, але не обмежуються цим, азинфос-метил, ацефат, ізоксантіон, ізофенфос, етіон, етрімфос, оксидеметон-метил, оксидефенфос, квіналфос, хлорпірифос, хлорпірифос-метил, хлорфенвінфос, ціанофос, діоксабензофос, дихлорвос, дисульфотон, диметилвінфос, диметоат, сульфпрофос, діазінон, тіометон, тетрахлорвінфос, темефос, тебупірімфос, тербуфос, налед, вамідотіон, піраклофос, піридафентіон, піриміфос-метил, фенітротіон, фентіон, фентоат, флупіразофос, протіофос, пропафос, профенофос, фоксим, фосалон, фосмет, формотіон, форат, малатіон, мекарбам, месульфенфос, метамідофос, метідатіон, паратіон, метилпаратіон, монокротофос, трихлорфон, EPN, ізазофос, ізамідофос, кадусафос, діамідафос, дихлофентіон, тіоназін, фенаміфос, фосфіазат, фосфітан, фосфокарб, DSP, етопрофос, аланікарб, алдікарб, ізопрокарб, етіофенкарб, карбарил, карбосульфат, ксилікарб, тіодикарб, піримікарб, фенобукарб, фураціокарб, пропоксур, бендіокарб, бенфуракарб, метоміл, метолкарб, ХМС, карбофуран, альдоксикарб, оксамил, акрінатрін, алетрін, есфенвалерат, емпентрін, циклопротрин, цигалотрін, гамма-цигалотрін, лямбда-цигалотрін, цифлутрін, бета-цифлутрін, циперметрін, альфа-циперметрін, дзета-циперметрін, сілафлуофен, татраметрін, тефлутрін, дельтаметрін, тралометрін, біфентрін, фенотрін, фенвалерат, фенпропатрін, фураметрін, пралетрін, флуцинтринат, флувалінат, флуброцинтринат, перметрін, ресметрін, етофенпрокс, картап, тіоциклам, бенсултап, ацетаміпрід, імідаклопрід, клотіанідин, дінотефуран, тіаклопрід, тіаметоксам, нітенпірам, хлорфлуазурон, діфлубензурон, тефлубензурон, трифлумурон, новалурон, новіфлумурон, бістрифлуорон, флуазурон, флуциклоксурон, флуфеноксурон, гексафлумурон, лufenурон,

хромафенозид, тебуфенозид, галофенозид, метоксифенозид, діофенолан, циромазин, пірипроксифен, бупрофезин, метопрен, гідропрен, кінопрен, тріазамат, ендосульфат, хлорфензон, хлоробензілат, дикофол, бромпропілат, ацетопрол, фіпроніл, етіпрол, пірентрин, ротенон, сульфат нікотину, агент ВТ (*Bacillus thuringiensis*), спіносад, абамектин, ацеквіноцил, амідофлумет, амітраз, етоксазол, хінометіонат, клофентезин, оксид фенбутатину, діснохлор, цигексатин, спіродіклофен, спіромезифен, тетрадіфон, тебуфенпірад, бінапакрил, біфеназат, піридабен, піримідифен, феназаквін, фенотіокарб, фенпіроксимат, флуакрипірим, флуазінам, флуфензин, гекситіазокс, пропаргіт, бензомат, комплекс полінактину, мільбемектин, луфенурон, мекарбам, метіокарб, мевінфос, хальфенпрокс, азадірактін, діафентіурон, індоксакарб, бензоат емаектину, олеат калію, олеат натрію, хлорфенапір, тольфенпірад, піметрозин, феноксикарб, гідраметилнон, гідроксипропіловий крохмаль, піридаліл, флуфенерим, флубендіамід, флонікамід, метафлумізол, лепіmekтин, ТРІС, альбендазол, оксбендазол, оксфендазол, трихламід, фенсульфотіон, фенбендазол, гідрохлорид левамизолу, морантел тартрат, дазомет, метам-натрій, тріадімефон, гексаконазол, пропіконазол, іпконазол, прохлораз, трифлумізол, тебуконазол, епоксиконазол, діфеноконазол, флусілазол, тріадіменол, ципроконазол, метконазол, флуквінканазол, бітертанол, тетраконазол, трітіконазол, флутріафол, пенконазол, диніконазол, фенбуконазол, бромбуконазол, імібенконазол, сімеконазол, міклобутаніл, гімексазол, імізаліл, фураметпір, тіфлузамід, етридіазол, окспоконазол, окспоконазол фумарат, пефуразоат, протіоконазол, пірифенокс, фенарімол, нуарімол, бупіримат, мепаніпірим, ципродиніл, піриметаніл, металаксил, мефеноксам, оксаксиксил, беналаксил, тіофанат, тіофанат-метил, беноміл, карбендазим, фуберідазол, тіабендазол, манзеб, пропінеб, зінеб, метірам, манеб, зірам, тіурам, хлороталоніл, етабоксам, оксикарбоксин, карбоксин, флутоланіл, сільтіофам, мепроніл, диметоморф, фенпропідин, фенпропіморф, спіроксамін, тридеморф, додеморф, флуморф, азоксистробін, крезоксим-метил, метоміностробін, орисастробін, флуоксастробін, трифлуксистробін, димоксистробін, піраклостробін, пікоксистробін, іпродіон, процимідон, вінклозолін, клозолінат, флусульфамід, дазомет, метилізотіоціанат, хлоропікрин, метасульфокарб, гідроксиізоксазол, гідроксиізоксазол калію, ехломезол, D-D, карбам, основний хлорид міді, основний сульфат міді, нонілфеносульфат міді, оксин міді, DBEDC, безводний сульфат міді, пентагідрат сульфат міді, гідроокис міді, неорганічну сірку, змочувану сірку, сірчисте вапно, сульфат цинку, фентин, гідрокарбонат натрію, гідрокарбонат калію, гідрохлорит натрію, срібло, едіфенфос, толклофос-метил, фосетил, іпробенфос, дінокап, піразофос, капропамід, фталід, трициклазол, піроквілон, диклоцимет, феноксаніл, касугаміцин, валідаміцин, поліоксини, бластициден S, окситетрациклін, мілдіоміцин, стрептоміцин, рапсову олію, машинну олію, бентіавалікарбізопропіл, іпровалікарб, пропамокарб, дітофенкарб, флуороімід, флудіоксаніл, фенпиклоніл, квіноксифен, оксолинову кислоту, хлороталоніл, каптан, фолпет, пробеназол, ацибензолар-S-метил, тіадиніл, цифлуфенамід, фенгексамід, діфлуметорим, метрафенон, пікобензамід, проквіназид, фамоксадон, циазофамід, фенамідон, зоксамід, боскалід, цимоксаніл, дітіанон, флуазінам, дихлофлуанід, трифорин, ізопротіолан, феримзон, дикломезин, теклофталам, пенцикурон, хінометіонат, іміноктадін ацетат, іміноктадін альбесілат, амбам, полікарбамат, тіадіазин, хлоронеб, диметиддитіокарбамат нікелю, гуазатин, додецилгуанідин-ацетат, квінотозен, толілфлуанід, анілазін, нітроталізопропіл, фенітропан, диметиримол, бентіазол, білок гарпін, флуметовер, мандіпропамід і пентіопірад.

У деяких варіантах реалізації винаходу сільськогосподарське поле, яке потребує боротьби із бур'янами, обробляють шляхом застосування сільськогосподарської хімічної композиції безпосередньо до поверхні рослин, наприклад, шляхом обприскування. Наприклад, композицію, яка містить біоактивний тригерний полінуклеотид і один або більше агентів-переносників і неполінуклеотидний гербіцид, застосовують для боротьби із бур'янами на полі із культурними рослинами шляхом обприскування поля композицією. Композиція може знаходитися у вигляді бакової суміші з одним або більше гербіцидними хімікатами та додатковими пестицидними хімікатами для боротьби із шкідниками та хворобами культурних рослин, які потребують боротьби із шкідниками та хворобами. У деяких варіантах реалізації винаходу передбачається послідовна обробка компонентами (наприклад, композицією, що містить біоактивний тригерний полінуклеотид, а потім гербіцидом) або одночасна обробка або змішування одного або більше компонентів композиції із окремих ємностей. Обробку поля можна проводити так часто, як це потрібно для забезпечення боротьби із бур'янами, а компоненти композиції можна підбирати для націлювання на конкретні види бур'янів або сімейства бур'янів шляхом використання конкретних біоактивних тригерних полінуклеотидів або композицій, що містять біоактивні тригерні полінуклеотиди, здатні до вибіркового націлювання на конкретні види або сімейства рослин, з якими потрібно боротися. Композицію можна застосовувати у ефективних робочих концентраціях згідно з часом застосування на полі, наприклад, перед посівом, під час посіву,

після посіву та після збору врожаю. Гліфосат можна застосовувати на полі в концентрації від 11-44 унцій/акр (0,31-1,25 кг/акр) до 7,2875 фунтів/акр (3,31 кг/акр). Біоактивні тригерні полінуклеотиди із композиції можна застосовувати у концентрації від 1 до 30 грамів на акр у залежності від кількості молекул біоактивного тригерного полінуклеотиду, потрібної для наявного обсягу бур'янів на полі.

Культурні рослини, для яких може існувати потреба у боротьбі із бур'янами, включають, але не обмежуються цим, кукурудзу, соєві боби, бавовну, канолу, цукровий буряк, люцерну, цукрову тростину, рис та пшеницю; овочеві рослини, включаючи, але не обмежуючись цим, помідори, солодкий перець, гострий перець, дині, кавуни, огірки, баклажани, кольорову капусту, броколі, салат-латук, шпинат, цибулю, горох, моркву, солодку кукурудзу, китайську капусту, цибулю порей, фенхель, гарбуз, гарбуз великоплідний або горлянку, редис, брюссельську капусту, фізаліс, турецькі боби, квасолю або окру; кулінарні рослини, включаючи, але не обмежуючись цим, базилік, петрушку, каву або чай; або фруктові рослини, включаючи, але не обмежуючись цим, яблука, груші, вишні, персики, сливи, абрикоси, банани, банан їстівний, столовий виноград, винний виноград, цитрусові, авокадо, манго або ягоди; дерева, вирощувані в декоративних або комерційних цілях, включаючи, але не обмежуючись цим, фруктові або горіхові дерева; декоративні рослини (наприклад, декоративні квіткові рослини або кущі чи газонну траву). Запропоновані у цьому документі способи та композиції також можна застосовувати до рослин, які не вирощують з насіння, включаючи фруктові дерева та рослини, які включають, але не обмежуються цим, авокадо, помідори, баклажани, огірки, дині, кавуни та виноград, а також різні декоративні рослини. Наприклад, запропоновані у цьому документі способи та композиції також можна застосовувати до рослин, вирощуваних шляхом обрізання, клонування або прищеплення.

Всі публікації, патенти та патентні заявки включено у цей документ за допомогою посилання у тій самій мірі, як яби було вказано, що кожна окрема публікація або патентна заявка спеціально й окремо включена за допомогою посилання.

Наступні Приклади наведені в ілюстративних цілях і не мають сприйматися як обмеження.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1. Цільові та тригерні послідовності EPSPS.

Основний механізм стійкості до гліфосату у бур'янів полягає в ампліфікації гена, який кодує 5-енолпірувілшикімат-3-фосфат синтазу (EPSPS). Наприклад, генотипування стійкого до гліфосату Palmer amaranth виявило наявність стійких до гліфосату рослин з від 4 до більш ніж 100 копіями гена EPSPS. Молекули біоактивних тригерних полінуклеотидів, націлені на ген EPSPS з метою зниження його регуляції, застосовні у боротьбі із стійкими до гербіцидів бур'янами.

Як показано у Таблиці 1, було розроблено дві молекули длПНК з використанням послідовності кДНК EPSPS Palmer amaranth (SEQ ID NO: 1) для отримання антисмислового ланцюга, комплементарного до позицій 398-447 (SEQ ID NO: 4) або позицій 1189-1241 (SEQ ID NO: 6) кДНК EPSPS *Amaranthus palmeri*. Послідовності EPSPS Palmer amaranth, на які націлені біоактивні длПНК-тригери, позначено нуклеотидами, виділеними малими літерами. Дві біоактивні тригерні молекули кДНК додатково здатні гібридизуватися з мПНК, транскрибованою із гена EPSPS *Amaranthus rudis* (щириця бугорчата) (SEQ ID NO: 2). Як показано у Таблиці 1, SEQ ID NO: 4 є комплементарною до EPSPS *Amaranthus rudis* у позиціях 398-427, 429-433 і 435-447, які позначено нуклеотидами, виділеними малими літерами, з двома розбіжностями в позиціях 428 і 434 (підкреслено). SEQ ID NO: 6 є комплементарною до EPSPS *Amaranthus rudis* EPSPS в позиціях 1189-1202 і 1204-1241, які позначено нуклеотидами, виділеними малими літерами, з однією розбіжністю в позиції 1203 (підкреслено).

Цільові та тригерні послідовності EPSPS SEQ ID NO: 1-8

SEQ ID NO:	Опис	Послідовність
1	кДНК EPSPS <i>Amaranthus palmeri</i>	ATGGCTCAAGCTACTACCATCAACAATGGTGTCCATACTGGTCAATTGCACCAT ACTTTACCCAAAACCCAGTTACCCAAATCTTCAAAAACCTTTAATTTTGGATCAA ACTTGAGAATTTCTCCAAAGTTTCATGTCTTTAACCAATAAAAGAGTTGGTGGGC AATCATCAATTGTTCCCAAGATTCAAGCTTCTGTTGCTGCTGCAGCTGAGAAAC CTTCATCTGTCCCAGAAATTGTGTTACAACCCATCAAAGAGATCTCTGGTACTG TTCAATTGCCTGGGTCAAAGTCTTTATCCAATCGAATCCTTCTTTTAGCTGCTTT GTCTGAGGGCACAACAGTGGTCGACAACCTTGCTGTATAGTGATGATATTCTTTA TATGTTGGACGCTCTCAgaactcttggttaaaagtggaggatgatagtagcgaagggcagtcG TAGAGGGTTGTGGTGGTCTGTTTCTGTTGGTAAAGATGGAAAGGAAGAGATT CAACTTTTCTTGGTAATGCAGGAACAGCGATGCGCCCATTTGACAGCTGCGGT TGCCGTTGCTGGAGGAAATTCAAGTTATGTGCTTGATGGAGTACCAAGAATGAG GGAGCGCCCCATTGGGGATCTGGTAGCAGGTCTAAAGCAACTTGGTTCAGATG TAGATTGTTTTCTTGGCACAATTGCCCTCCTGTTGCGGTCAATGCTAAAGGAG GCCTTCCAGGGGGCAAGTCAAGCTCTCTGGATCGGTAGTAGCCAATATTTA ACTGCACTTCTCATGGCTACTCCTTTGGGTCTTGGAGACGTGGAGATTGAGATA GTTGATAAATTGATTTCTGTACCGTATGTTGAAATGACAATAAAGTTGATGGAAC GCTTTGGAGTATCCGTAGAACATAGTGATAGTTGGGACAGGTTCTACATTCGAG GTGGTCAGAAATACAAATCTCCTGGAAAGGCATATGTTGAGGGTGATGCTTCAA GTGCTAGCTACTTCTAGCCGGAGCCGCCGTCACTGGTGGGACTGTCACTGTC AAGGGTTGTGGAACAAGCAGTTTACAGGGTGATGTAATAATTTGCCGAAGTTCTT GAGAAGATGGGTTGCAAGGTCACTGGACAGAGAATAGTGTAACCTGTTACTGG ACCACCCAGGGATTCTGGAAGAAACATCTGCGTGCTATCgacgtcaacatgaac aaaatgccagatgttgctatgactcttgagttgtgcCTTGTATGCAGATGGGCCACCGCCATCA GAGATGTGGCTAGCTGGAGAGTGAAGGAAACCGAACGGATGATTGCCATTTGC ACAGAACTGAGAAAGCTTGGGGCAACAGTTGAGGAAGGATCTGATTACTGTGTG ATCACTCCGCCTGAAAAGCTAAACCCACCGCCATTGAAACTTATGACGATCAC CGAATGGCCATGGCATTCTCTCTTGCTGCCTGTGCAGATGTTCCCGTCACTATC CTTGATCCGGGATGCACCCGTAACCTTCCCGGACTACTTTGATGTTTTAGAAA AGTTCCGCAAGCATTGA
2	EPSPS <i>Amaranthus rudis</i>	ATGGCTCAAGCTACTACCATCAACAATGGTGTCCAAACTGGTCAATTGCACCATA CTTTACCCAAAACCCACTTACCCAAATCTTCAAAAACCTGTTAATTTTGGATCAAAC TTTAGAATTTCTCCAAAGTTTCATGTCTTTAACCAATAAAAGAGTTGGTGGGCAATC ATCAATTATTCCCAAGATTCAAGCTTTCAGTTGCTGCTGCAGCTGAGAAACCTTCAT CTGTCCCAGAAATTGTGTTACAACCCATCAAAGAGATCTCTGGTACCATTCAATT GCCTGGGTCAAAGTCTCTATCTAATCGAATCCTTCTTTTAGCTGCTTTGTCTCAGG GCACAACTGTGGTCGACAACCTTGCTGTATAGTGATGATATTCTTTATATGTTGGAC GCTCTCAgaactcttggttaaaagtggaggatgataAtacagAcaaaagggcagtcGTGGAGGGTTG TGGTGGTCTGTTTCTGTTGGTAAAGATGGAAGGAAGAGATTCAACTTTTCTTG GAAATGCAGGAACAGCGATGCGCCCATTTGACAGCTGCGGTTGCCGTTGCTGGAG GAAATTCAAGCTATGTTCTTGACGGAGTACCAAGAATGAGGGAGCGCCCCATTGG GGATCTGGTAGCAGGTCTAAAGCAACTTGGTTCAGATGTTGACTGTTTTCTTGGC ACAAATTGCCCTCCTGTTGCGGTCAATGCTAAAGGAGGCCTTCCAGGGGGCAAG GTCAAGCTCTCTGGATCGGTTAGTAGCCAATATTTAACTGCACTTCTGATGGCTA CTCCTTTGGGTCTTGGAGATGTGGAGATTGAGATAGTTGATAAATTGATTTCCGT ACCGTATGTTGAAATGACAATAAGGTTGATGGAACGCTTTGGAGTATCTGTTGAA CATAGTGATAGTTGGGACAGGTTCTTCATCCGAGGTGGTCAGAAATACAAATCTC CTGGAAAGGCATATGTTGAGGGTGACGCTTCAAGTGCTAGCTACTTCTAGCTG GAGCCGCCGTCACTGGGGGACTGTGACTGTCAAGGTTGTGGAACAAGCAGT TTACAGGGTGATGTAAATTTGCCGAAGTTCTTGAGAAGATGGGTTGCAAGGTCA CCTGGACAGACAATAGCGTAACTGTTACTGGACCACCCAGGGAATCATCTGGAA GGAAACATTTGCGCGCTATCgacgtcaacatgaATaaaatgccagatgttgctatgactcttgagttgt gcCTTGTATGCAGATGGGCCACCGCCATTAGAGATGTGGCTAGCTGGAGAGTGA AGGAAACCGAACGGATGATTGCCATTTGCACAGAACTGAGAAAGCTTGGGGCAA CAGTTGAGGAAGGATCTGATTACTGTGTGATCACTCCGCCTGAAAAGCTGATACC CACCGCCATCGAAACTTATGACGATCACCGAATGGCCATGGCATTCTCTCTTGCT

Таблиця 1

Цільові та тригерні послідовності EPSPS SEQ ID NO: 1-8

SEQ ID NO:	Опис	Послідовність
		GCCTGTGCTGATGTTCCCGTCACTATCCTTGATCCGGGATGTACACGTAAACCT TCCCGGACTACTTTGATGTCTTAGAAAAGTTCGCCAAGCATTGA
3	50-мерний EPSPS-тригер	GAACUCUUGGUUUAAAAGUGGAGGAUGAUAGUACAGCCAAAAGGGCAGUC
4	Обернена комплементарна послідовність	GACUGCCCUUUUGGCUGUACUAUCAUCCUCCACUUUUAAACCAAGAGUUC
5	53-мерний EPSPS-тригер	GACGUCAACAUGAACAAAAUGCCAGAUUGCUAUGACUCUUGCAGUUGUUGC
6	Обернена комплементарна послідовність	GCAACAACUGCAAGAGUCAUAGCAACAUCUGGCAUUUUGUUCAUGUUGACGUC
7	24-мерний EPSPS-тригер	AUGCCAGAUUGCUAUGACUCUU
8	Обернена комплементарна послідовність	AAGAGUCAUAGCAACAUCUGGCAU

- Ген EPSPS міститься у великій кількості видів рослин. Наприклад, ген, який кодує молекулу полінуклеотиду EPSPS, зустрічається в природі в геномі *Amaranthus palmeri*, *Amaranthus rudis*, *Amaranthus albus*, *Amaranthus chlorostachys*, *Amaranthus graecizans*, *Amaranthus hybridus*, *Amaranthus lividus*, *Amaranthus spinosus*, *Amaranthus thunbergii*, *Amaranthus viridis*, *Lolium multiflorum*, *Lolium rigidum*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Ambrosia trifida*, *Euphorbia heterophylla*, *Kochia scoparia*, *Abutilon theophrasti*, *Sorghum halepense*, *Chenopodium album*, *Commelina diffusa*, *Convolvulus arvensis*, *Conyza candensis*, *Digitaria sanguinalis* і *Xanthium strumarium*. Нуклеотидні послідовності SEQ ID NO 3 і SEQ ID NO 5 порівнювали з послідовностями гена EPSPS різних видів рослин і визначали послідовності-мішені, які мають щонайменше 85 % ідентичності або комплементарності з SEQ ID NO 3-6. Визначені послідовності-мішені EPSPS, які мають щонайменше 85 % ідентичності або комплементарності з SEQ ID NO, 3-6 показано у Таблиці 2 (розбіжності підкреслено). Вважається, що біоактивні тригерні полінуклеотиди, які містять нуклеотидну послідовність, що має щонайменше 85 % ідентичності або комплементарності з SEQ ID NO: 9-35, знижують експресію EPSPS і контролюють стійкі до гербіцидів бур'яни.

Таблиця 2

Нуклеотидні послідовності-мішені EPSPS SEQ ID NO: 9-35

SEQ ID NO:	Вид	Відповідає:	Послідовність	Довжина
9	<i>Amaranthus graecizans</i>	SEQ ID NO: 3	GAGCTCTTGGTTTAAAAGTGGAGGATGATAATACAGCCAAAAG GGCAGT	49
10	<i>Amaranthus hybridus</i>	SEQ ID NO: 3	GAACCTCTTGGTTTAAAAGTGGAGGATGATAATACAGCCAAAAG GGCAGTC	50

Нуклеотидні послідовності-мішені EPSPS SEQ ID NO: 9-35

SEQ ID NO:	Вид	Відповідь:	Послідовність	Довжина
11	<i>Amaranthus palmeri</i>	SEQ ID NO: 3	GAAGTCTTGGTTTAAAAAGTGGAGGATGATAGTACAGCCAAAAGG GCAGTC	50
12	<i>Amaranthus rudis</i>	SEQ ID NO: 3	GAAGTCTTGGTTTAAAAAGTGGAGGATGATAATACAGACAAAAGG GCAGTC	50
13	<i>Amaranthus viridis</i>	SEQ ID NO: 3	GAAGTCTTGGTTTAAAAAGTGGAGGATGATAATACAGCCAAAAGG GCAGTC	50
14	<i>Abutilon theophrasti</i>	SEQ ID NO: 5	GATGTCAACATGAACAAAATGCCAGATGTTGCCATGACTCTCGC TGTGTTGC	53
15	<i>Amaranthus graecizans</i>	SEQ ID NO: 5	GACGTCAACATGAACAAAATGCCAGATGTTGCTATGACTCTTGCA GTTGTTGC	53
16	<i>Amaranthus hybridus</i>	SEQ ID NO: 5	GACGTCAACATGAACAAAATGCCAGATGTTGCTATGACTCTTGCA GTAGTTGC	53
17	<i>Amaranthus lividus</i>	SEQ ID NO: 5	GACGTCAACATGAACAAAATGCCAGATGTTGCTATGACTCTTGCA GTAGTTGC	53
18	<i>Amaranthus palmeri</i>	SEQ ID NO: 5	GACGTCAACATGAACAAAATGCCAGATGTTGCTATGACTCTTGCA GTTGTTGC	53
19	<i>Amaranthus rudis</i>	SEQ ID NO: 5	GACGTCAACATGAATAAAAATGCCAGATGTTGCTATGACTCTTGCA GTTGTTGC	53
20	<i>Amaranthus thunbergii</i>	SEQ ID NO: 5	GACGTCAACATGAACAAAATGCCAGATGTTGCTATGACTCTTGCA GTAGTTGC	53
21	<i>Amaranthus viridis</i>	SEQ ID NO: 5	GACGTCAACATGAACAAAATGCCAGATGTTGCTATGACTCTTGCA GTAGTTGC	53
22	<i>Ambrosia trifida</i>	SEQ ID NO: 5	GATGTGAACATGAACAAAATGCCAGATGTTGCCATGACGCTTGCA GTCGTTGC	53
23	<i>Chenopodium album</i>	SEQ ID NO: 5	GATGTCAACATGAACAAAATGCCAGATGTCGCTATGACTCTTGCT GTTGTTGC	53
24	<i>Convolvulus arvensis</i>	SEQ ID NO: 5	GATGTCAACATGAATAAAAATGCCAGATGTCGCCATGACTCTTGCT GTAGTTGC	53
25	<i>Conyza canadensis</i>	SEQ ID NO: 5	GATGTGAACATGAACAAGATGCCTGATGTTGCCATGACTCTTGCT GTGGTCGC	53
26	<i>Digitaria sanguinalis</i>	SEQ ID NO: 5	GATGTGAACATGAACAAAATGCCCGATGTTGCCATGACTCTTGCC GTGGTTGC	53
27	<i>Digitaria sanguinalis</i>	SEQ ID NO: 5	GACGTCAACATGAACAAAATGCCTGATGTCGCAATGACTCTTGCT GTGGTTGC	53
28	<i>Echinochloa colona</i>	SEQ ID NO: 5	GATGTCAACATGAACAAAATGCCTGATGTTGCCATGACTCTTGCT GTGGTCGC	53
29	<i>Echinochloa crus-galli</i>	SEQ ID NO: 5	GATGTCAACATGAACAAAATGCCTGATGTTGCCATGACTCTTGCT GTGGTCGC	53
30	<i>Euphorbia heterophylla</i>	SEQ ID NO: 5	GATGTGAACATGAACAAAATGCCAGATGTCGCTATGACATTGGCT GTGGTTGC	53
31	<i>Ipomoea hederacea</i>	SEQ ID NO: 5	GATGTCAACATGAACAAAATGCCAGATGTTGCCATGACTCTTGCT GTAGTTGC	53
32	<i>Lolium multiflorum</i>	SEQ ID NO: 5	GATGTCAACATGAACAAAATGCCTGATGTTGCCATGACTCTTGCT CGTTGTTGC	53
33	<i>Senna obtusifolia</i>	SEQ ID NO: 5	GATGTCAACATGAACAAGATGCCAGATGTTGCCATGACTCTTGCT TGTAGTTGC	53
34	<i>Sorghum halepense</i>	SEQ ID NO: 5	GATGTGAACATGAACAAAATGCCTGATGTTGCCATGACTCTTGCT TGTGTTGC	53
35	<i>Xanthium strumarium</i>	SEQ ID NO: 5	GATGTGAACATGAACAAAATGCCAGATGTTGCCATGACGCTTGCT AGTCGTTGC	53

Приклад 2. Біоактивні тригерні молекули EPSPS підвищують сприйнятливості до гліфосату стійких до гліфосату Palmer amaranth.

Оцінювали ефективність біоактивних полінуклеотидних тригерних молекул середнього розміру, що містили SEQ ID NO: 3 і 4 або SEQ ID NO: 5 і 6, у стійких до гліфосату Palmer amaranth у порівнянні з 24-мерним тригером, що містить SEQ ID NO: 7 і 8, для якого відомо, що він підвищує чутливість до гліфосату стійких до гліфосату Palmer amaranth. Отримували тригери з дволанцюгових РНК (длРНК), які містили полінуклеотидні послідовності SEQ ID NO: 3 і 4, SEQ ID NO: 5 і 6 і SEQ ID NO: 7 і 8, і змішували тригери з 0,5 % Silwet L-77, 2 % AMS і 20 мМ фосфатним буфером до бажаної концентрації. Після цього тригерні препарати застосовували місцево до листя стійких до гліфосату рослин *Amaranthus palmeri* ("R-22"). Контрольні рослини або не оброблювали, або оброблювали 0,5 % Silwet L-77, 2 % AMS і 20 мМ розчином фосфатного буфера. Через один день після обробки до рослин застосовували гербіцид гліфосат марки WeatherMax® (RU Wmax, Monsanto, St Louis, MO) у концентрації 1,5 фунтів/акр (0,68 кг/акр). Через 11 днів після обробки (ДПО) тригерними полінуклеотидами EPSPS оцінювали відсоткове зменшення росту оброблених длРНК рослин у порівнянні з необробленими контрольними рослинами шляхом візуальної оцінки. Через 14 днів ДПО визначали сирю масу оброблених длРНК і контрольних рослин. Обробку проводили у чотирьох повторях. Як показано у Таблиці 3, полінуклеотидні тригерні молекули середнього розміру, що відповідають SEQ ID NO: 3 і 4 або SEQ ID NO: 5 і 6, демонстрували таку ж активність, що і тригерна послідовність, що відповідає SEQ ID NO: 7 і 8, у підвищенні чутливості до гліфосату стійких до гліфосату рослин *Amaranthus palmeri*. Також дивіться Фігуру 1.

Таблиця 3

Активність тригерних полінуклеотидів EPSPS у стійких до гліфосату *Amaranthus palmeri*

Обробка	Концентрація	Візуальна оцінка через 11 ДПО		Сира маса через 14 ДПО	
SEQ ID NO	(нмоль)	Середнє	Ст. відх.	Середнє	Ст. відх.
контроль препарату	-	30,0	11,5	27,7	13,1
SEQ ID NO 7/8	2 нмоль	47,5	5,0	19,0	7,7
SEQ ID NO 7/8	4 нмоль	88,8	12,5	95,3	8,6
SEQ ID NO 7/8	8 нмоль	90,0	7,1	91,8	5,4
SEQ ID NO 7/8	16 нмоль	85,8	11,8	93,7	6,6
SEQ ID NO 5/6	2 нмоль	48,8	17,5	18,2	10,9
SEQ ID NO 5/6	4 нмоль	41,3	4,8	94,0	5,6
SEQ ID NO 5/6	8 нмоль	93,8	2,5	96,2	2,8
SEQ ID NO 5/6	16 нмоль	81,3	13,1	90,7	9,5
SEQ ID NO 3/4	2 нмоль	46,3	18,0	24,0	3,7
SEQ ID NO 3/4	4 нмоль	28,8	10,3	94,7	5,4
SEQ ID NO 3/4	8 нмоль	88,3	10,4	88,4	9,5
SEQ ID NO 3/4	16 нмоль	90,0	13,5	97,0	2,7

Приклад 3. Біоактивні тригерні молекули EPSPS підвищують сприйнятливості до гліфосату стійкої до гліфосату щиріці бугорчатої.

Оцінювали ефективність полінуклеотидних тригерних молекул середнього розміру, що містили SEQ ID NO: 3 і 4 або SEQ ID NO: 5 і 6, у стійкій до гліфосату щиріці бугорчатої (*Amaranthus rudis*) у порівнянні з 24-мерним тригером, що містить SEQ ID NO: 7 і 8. Отримували длРНК-тригери, які містили полінуклеотидні послідовності SEQ ID NO: 3 і 4, SEQ ID NO: 5 і 6 і SEQ ID NO: 7 і 8, і змішували кожен тригер із 0,5 % Silwet L-77, 2 % AMS і 20 мМ фосфатним буфером до концентрації 8 нмоль. Після цього тригерні препарати застосовували місцево до листя стійкої до гліфосату щиріці бугорчатої. Контрольні рослини або не оброблювали, або оброблювали розчином 0,5 % Silwet L-77, 2 % AMS і 20 мМ фосфатного буфера. Через один день після обробки тригерним препаратом до рослин застосовували гербіцид гліфосат марки WeatherMax® у концентрації 1,5 фунтів/акр (0,68 кг/акр). Обробку проводили у чотирьох повторях. Обробку проводили у чотирьох повторях. Через 14 днів ДПО визначали сирю масу оброблених тригерними полінуклеотидами EPSPS рослин і розраховували % сирі маси у порівнянні з контрольними рослинами (обробленими тільки гербіцидом гліфосатом марки WeatherMax®). Дивіться Таблицю 4. Як показано у Таблиці 4, тригерні полінуклеотида, що містили SEQ ID NO 3/4 або SEQ ID NO 5/6, демонстрували таку ж активність, що і тригерні полінуклеотида, що містили SEQ ID NO 7/8, у підвищенні чутливості до гліфосату стійких до гліфосату рослин щиріці бугорчатої.

Таблиця 4

Активність тригерних полінуклеотидів EPSPS у стійкій до гліфосату щириці бугорчатій

Обробка і SEQ ID NO	Концентрація	% контрольної сирової маси, середнє
Буфер	-	35
SEQ ID NO 7/8	8 нмоль	85
SEQ ID NO 3/4	8 нмоль	78
SEQ ID NO 5/6	8 нмоль	83

Приклад 4. Тригерні молекули длПНК, що містять SEQ ID NO 3/4 і SEQ ID NO 5/6, зменшують мПНК EPSPS в протопластах Палмера.

Оцінювали ефективність біоактивних полінуклеотидних тригерних молекул середнього розміру, що відповідають SEQ ID NO: 3 і 4 або SEQ ID NO: 5 і 6, в протопластах *Amaranthus palmeri*. Дозу у 6 мкг кожного длПНК-тригера (SEQ ID NO 3/4 або SEQ ID NO 5/6) додавали до протопластів *Amaranthus palmeri*. Як показано на Фігурі 2, длПНК-тригери, що містили SEQ ID NO: 3 і 4 або SEQ ID NO: 5 і 6, зменшували рівні мПНК EPSPS на 69 % і 84 %, відповідно.

Приклад 5. Біоактивні тригерні молекули EPSPS підвищують сприйнятливості до гліфосату стійкої до гліфосату щириці бугорчатої.

Оцінювали ефективність біоактивних полінуклеотидних тригерних молекул середнього розміру,

що містили SEQ ID NO 3 і 4 або SEQ ID NO 5 і 6, у стійкій до гліфосату щириці бугорчатій (WH13) у порівнянні з 24-мерним тригером, що містив SEQ ID NO 7 і 8, для якого відомо, що він підвищує чутливість до гліфосату стійкої до гліфосату щириці бугорчатої. Отримували тригери з дволанцюгових ПНК (длПНК), які містили полінуклеотидні послідовності SEQ ID NO: 3 і 4, SEQ ID NO: 5 і 6 і SEQ ID NO: 7 і 8, і змішували біоактивні тригерні полінуклеотиди з 0,5 % Silwet L-77, 2 % AMS і 20 мМ фосфатним буфером до концентрації 2 нмоль, 4 нмоль, 8 нмоль або 16 нмоль. Після цього тригерні препарати застосовували місцево до листя стійких до гліфосату рослин щириці бугорчатої ("WH13"). Контрольні рослини або не оброблювали, або оброблювали 0,5 % Silwet L-77, 2 % AMS і 20 мМ розчином фосфатного буфера. Через один день після обробки до рослин застосовували гербіцид гліфосат марки WeatherMax® (RU Wmax, Monsanto, St Louis, MO) у концентрації 1,5 фунтів/акр (0,68 кг/акр). Обробку проводили у чотирьох повторях. На Фігурі 3 показано рослини через 14 днів після обробки. Як показано на Фігурі 3, молекули біоактивних тригерних полінуклеотидів середнього розміру, що містили SEQ ID NO: 3 і 4 або SEQ ID NO: 5 і 6, підвищували чутливість до гліфосату стійких до гліфосату рослин щириці бугорчатої.

Приклад 6. Спосіб боротьби з бур'янами на полі.

Композицію, яка містить щонайменше один біоактивний тригерний полінуклеотид, що містить нуклеотидну послідовність, яка є значною мірою ідентичною/комплементарною до SEQ ID NO: 3-35 або їх фрагмента, і агент-переносник, який переносить біоактивний тригерний полінуклеотид у рослинну клітину, застосовують на полі, на якому ростуть рослини, у ефективній концентрації. Наприклад, ефективна концентрація біоактивного тригерного полінуклеотиду може відповідати робочій концентрації від близько 1 до 30 грамів або більше на акр у залежності від розміру біоактивного тригерного полінуклеотиду та кількості біоактивних тригерних полінуклеотидів у композиції. Біоактивний тригерний полінуклеотид в композиції може являти собою длПНК, олДНК або длДНК або їх комбінацію. Ефективна концентрація біоактивних тригерних полінуклеотидів модулює експресію гена EPSPS в одному або більше цільових видах бур'янистих рослин так, щоб стимулювати чутливість цільових видів бур'янистих рослин до гліфосату. Гербіцид, який містить гліфосат, застосовують для боротьби із бур'янами на полі.

Композиція необов'язково містить біоактивний тригерний полінуклеотид, який модулює експресію життєво необхідного гена та, необов'язково, гербіцид, який має відмінний тип дії в порівнянні з гліфосатом. Композиція може містити один або більше додаткових гербіцидів, якщо існує потреба у забезпеченні ефективної боротьби із декількома видами бур'янів. Композиція, яка містить 1 або 2, або 3, або 4 чи більше біоактивних тригерних полінуклеотидів, які є значною мірою ідентичними або значною мірою комплементарними до SEQ ID NO: 3-35 або їх фрагмента, уможливають широку активність композиції проти декількох видів бур'янів, які присутні на полі.

Приклад 7. Розміщення кДНК EPSPS для дослідження длПНК-тригера в GR Palmer

- кДНК EPSPS із SEQ ID NO: 1 розміщували протягом усієї довжини кДНК, щоб визначити послідовності-мішені для покриття біоактивних тригерних полінуклеотидів, як показано у Таблиці 5. Вибирали нуклеотидні послідовності-мішені довжиною приблизно 47-62 п.о. Біоактивні тригерні полінуклеотиди, які містили нуклеотидну послідовність, що мала щонайменше 85 % ідентичності або комплементарності з SEQ ID NO: 36-66, досліджували щодо їх здатності підвищувати чутливість до гліфосату стійкої до гліфосату шириці бугорчатої.

Таблиця 5

Нуклеотидні послідовності-мішені EPSPS SEQ ID NO 36-66

SEQ ID NO	Розмір	Смисловий ланцюг
36	49	GCTCAAGCTACTACCATCAACAATGGTGTCCATACTGGTCAATTGCACC
37	60	GCACCATACTTTACCCAAAACCCAGTTACCCAAATCTTCAAAAACCTCTTA ATTTTGGATC
38	60	GATCAAACCTTGAGAATTTCTCCAAAGTTCATGTCTTTAACCAATAAAAGA GTTGGTGGGC
39	48	GCAATCATCAATTGTTCCCAAGATTCAAGCTTCTGTTGCTGCTGCAGC
40	54	GCTGAGAAACCTTCATCTGTCCCAGAAATTGTGTTACAACCCATCAAAGAGATC
41	52	GATCTCTGGTACTGTTCAATTGCCTGGGTCAAAGTCTTTATCCAATCGAATC
42	54	GAATCCTTCTTTTAGCTGCTTTGTCTGAGGGCACAACAGTGGTCGACAACCTTGC
43	47	GCTGTATAGTGATGATATTCTTTATATGTTGGACGCTCTCAGAACTC
44	61	GCAGTCGTAGAGGGTTGTGGTGGTCTGTTTCCTGTTGGTAAAGATGGA AAGGAAGAGATTC
45	48	GATTCAAACCTTTTCTTGGTAATGCAGGAACAGCGATGCGCCCATTTGAC
46	56	GACAGCTGCGGTTGCCGTTGCTGGAGGAAATTCAAGTTATGTGCTTGA TGGAGTAC
47	52	GTACCAAGAATGAGGGAGCGCCCCATTGGGGATCTGGTAGCAGGTCTAAAGC
48	53	GCAACTTGGTTCAGATGTAGATTGTTTCTTGGCACAATTGCCCTCCTGTTC
49	56	GTTTCGGGTCAATGCTAAAGGAGGCCTTCCAGGGGGCAAGGTCAAGCTC TCTGGATC
50	54	GATCGGTTAGTAGCCAATATTTAACTGCACTTCTCATGGCTACTCCTTTGGGTC
51	48	GTCTTGGAGACGTGGAGATTGAGATAGTTGATAAATTGATTTCTGTAC
52	58	GTACCGTATGTTGAAATGACAATAAAGTTGATGGAACGCTTTGGAGTATC CGTAGAAC
53	51	GAACATAGTGATAGTTGGGACAGGTTCTACATTCGAGGTGGTCAGAAATAC
54	55	GTCAGAAATACAAATCTCCTGGAAAGGCATATGTTGAGGGTGATGCTTCA AGTGC
55	51	GCTAGCTACTTCCTAGCCGGAGCCGCGCTCACTGGTGGGACTGTCACTGTC
56	55	GTCAAGGGTTGTGGAACAAGCAGTTTACAGGGTGATGTAAAATTTGCCGA AGTTC
57	56	GTTCTTGAGAAGATGGGTTGCAAGGTCACCTGGACAGAGAATAGTGTAAC TGTTAC
58	54	GTTACTGGACCACCCAGGGATTCATCTGGAAAGAAACATCTGCGTGCTAT CGAC
59	62	GCCTTGTATGCAGATGGGCCCACCGCCATCAGAGATGTGGCTAGCTGGAG AGTGAAGGAAAC
60	50	GAAACCGAACGGATGATTGCCATTTGCACAGAACTGAGAAAGCTTGGGGC
61	52	GCAACAGTTGAGGAAGGATCTGATTACTGTGTGATCACTCCGCCTGAAAAGC
62	51	GCTAAACCCACCGCCATTGAACTTATGACGATCACCGAATGGCCATGGC
63	57	GCATTCTCTCTTGCTGCCTGTGCAGATGTTCCCGTCACTATCCTTGATCCG GGATGC
64	54	GCACCCGTAAAACCTTCCCGGACTACTTTGATGTTTTAGAAAAGTTCGCCAAGC
65	50	GAACCTTGGTTTAAAAGTGAGGATGATAGTACAGCCAAAAGGGCAGTC
66	53	GACGTCAACATGAACAAAATGCCAGATGTTGCTATGACTCTTGCAAGTTGTTGC

- Отримували тригери з дволанцюгових РНК (длРНК), які містили полінуклеотидні послідовності, що відповідали SEQ ID NOs: 36-62, і змішували біоактивні тригерні

полінуклеотиди з 0,5 % Silwet L-77, 2 % AMS і 20 мМ фосфатним буфером до кінцевої концентрації 8 нмоль. Після цього тригерні препарати застосовували місцево до листя стійких до гліфосату рослин щириці бугорчатої ("WH13"). Контрольні рослини або не оброблювали, або оброблювали препаратом 0,5 % Silwet L-77, 2 % AMS і 20 мМ розчином фосфатного "буфера".

5

Додатково в якості контролю застосовували длПНК, яка містила SEQ ID NO: 7 і 8 (24-мерний EPSPS-тригер). Через один день після обробки до рослин застосовували гербіцид гліфосат марки WeatherMax® (RU Wmax, Monsanto, St Louis, MO) у концентрації 1,5 фунтів/акр (0,68 кг/акр).

10

Обробку проводили у трьох повторях. На Фігурі 4 показано сиру масу (г) рослин через 14 днів після обробки. Як показано на Фігурі 4, декілька молекул біоактивних тригерних полінуклеотидів середнього розміру підвищували чутливість до гліфосату стійких до гліфосату рослин щириці бугорчатої, зокрема, крім біоактивних тригерних полінуклеотидів, що містили SEQ ID NO: 3 і 4 або SEQ ID NO: 5 і 6, гарну ефективність спостерігали для біоактивних тригерних полінуклеотидів, що відповідали SEQ ID NO: 36, 42, 43, 44, 57, 58 і 59.

15

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Monsanto Technology LLC
Santiago X. Navarro

<120> СПОСОБИ ТА КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ БОРОТЬБИ ІЗ БУР'ЯНАМИ З
ВИКОРИСТАННЯМ ПОЛІНУКЛЕОТИДІВ EPSPS

<130> P34158WO00

<150> 61/927,682

<151> 2014-01-15

<160> 66

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 1557

<212> ДНК

<213> Amaranthus palmeri

<400> 1

atggctcaag ctactaccat caacaatggt gtccatactg gtcaattgca ccatacttta	60
cccaaaaccc agttacccaa atcttcaaaa actcttaatt ttggatcaaa ctgagaatt	120
tctccaaagt tcatgtcttt aaccaataaa agagttggtg ggcaatcatc aattgtccc	180
aagattcaag cttctgttgc tgctgcagct gagaacactt catctgtccc agaaattgtg	240
ttacaacca tcaagagat ctctggtact gttcaattgc ctgggtcaaa gtctttatcc	300
aatcgaatcc ttcttttagc tgctttgtct gagggcacia cagtggctga caacttgctg	360
tatagtgatg atattcttta tatgttgac gctctcagaa ctcttggtt aaaagtggag	420
gatgatagta cagccaaaag ggcagtcgta gagggttgtg gtggtctgtt tcctgttggt	480
aaagatggaa aggaagagat tcaacttttc cttggtaatg caggaacagc gatgcgcca	540
ttgacagctg cgggtgccgt tgctggagga aattcaagtt atgtgctga tggagtacca	600
agaatgaggg agcgcccat tggggatctg gtagcaggtc taaagcaact tggttcagat	660
gtagattgtt ttcttggcac aaattgccct cctgttcggg tcaatgctaa aggaggcctt	720
ccagggggca aggtcaagct ctctggatcg gttagtagcc aatatttaac tgcaattctc	780
atggctactc ctttgggtct tggagacgtg gagattgaga tagttgataa attgatttct	840
gtaccgtatg tgaaatgac aataaagttg atggaacgct ttggagtatc cgtagaacat	900
agtgatagtt gggacaggtt ctacattcga ggtggtcaga aatacaaatc tcctggaaag	960

gcatatgttg aggggtgatgc ttcaagtgt agctacttcc tagccggagc cgccgtcact 1020
 ggtgggactg tcaactgtcaa ggggtgtgga acaagcagtt tacagggtga tgtaaaattt 1080
 gccgaagttc ttgagaagat ggggtgcaag gtcacctgga cagagaatag tgtaactgtt 1140
 actggaccac ccagggatc atctggaaag aaacatctgc gtgctatga cgtcaacatg 1200
 aacaaaatgc cagatgttgc tatgactctt gcagttgttg ccttgatgc agatgggccc 1260
 accgcatca gagatgtggc tagctggaga gtgaaggaaa ccgaacggat gattgccatt 1320
 tgcacagaac tgagaaagct tggggcaaca gttgaggaag gatctgatta ctgtgtgatc 1380
 actccgctg aaaagctaaa cccaccgcc attgaaactt atgacgatca ccgaatggcc 1440
 atggcattct ctctgtgc ctgtgcagat gttcccgta ctatcctga tccgggatgc 1500
 acccgtaaaa ccttcccgga ctactttgat gtttagaaa agttcgcaa gcattga 1557

<210> 2

<211> 1557

<212> ДНК

<213> Amaranthus rudis

<400> 2

atggctcaag ctactaccat caacaatgt gtccaaactg gtcaattgca ccatactta 60
 cccaaaacc acttaccacaa atctcaaaa actgttaatt ttgatcaaa cttagaatt 120
 tctccaaagt tcatgtctt aaccaataaa agagttggtg ggcaatcacc aattattccc 180
 aagattcaag ctacagttgc tctgtcagct gagaacctt catctgtccc agaaattgtg 240
 ttacaacca tcaaagagat ctctgtgacc attcaattgc ctgggtcaaa gtctctatct 300
 aatcgaatcc ttcttttagc tctttgtct cagggcacaa ctgtggtcga caacttgctg 360
 tatagtgatg atattcttta tatgttgac gctctcagaa ctcttggtt aaaagtggag 420
 gatgataata cagacaaaag ggcagtcgtg gaggggtgtg gtggtctgtt tctgttgg 480
 aaagatggaa aggaagagat tcaactttc ctggaaatg caggacacgc gatgcgcca 540
 ttgacagctg cggttgccgt tctgtgagga aattcaagct atgtcttga cggagtacca 600
 agaatgaggg agcgcccat tggggatctg gtagcagtc taaagcaact tggtcagat 660
 gttgactgtt ttctggcac aaattgccct cctgtcggg tcaatgctaa aggagcctt 720
 ccagggggca aggtcaagct ctctggatcg gttagtagcc aatatttaac tgcactctg 780

atggctactc ctttgggtct tggagatgtg gagattgaga tagttgataa attgatttcc 840
 gtaccgtatg ttgaaatgac aataagggtg atggaacgct ttggagtatc tgttgaacat 900
 agtgatagtt gggacaggtt ctcatccga ggtggtcaga aatacaaatc tcctggaaag 960
 gcatatgttg aggggtgacgc ttcaagtgtc agctacttcc tagctggagc cgccgtcact 1020
 ggggggactg tgactgtcaa ggggtgtgga acaagcagtt tacagggtga tgtaaaattt 1080
 gccgaagttc ttgagaagat ggggtgcaag gtcacctgga cagacaatag cgtaactgtt 1140
 actggaccac ccagggaatc atctggaagg aaacatttgc gcgctatcga cgtcaacatg 1200
 aataaaatgc cagatgttgc tatgactctt gcagttgtg ccttgatgc agatgggccc 1260
 accgccatta gagatgtggc tagctggaga gtgaaggaaa ccgaacggat gattgccatt 1320
 tgcacagaac tgagaaagct tggggcaaca gttgaggaag gatctgatta ctgtgtgac 1380
 actccgctg aaaagctgat acccaccgcc atcgaaactt atgacgatca ccgaatggcc 1440
 atggcattct ctcttgctgc ctgtgtgat gttcccgta ctatcctga tccgggatgt 1500
 acacgtaaaa ccttcccgga ctacttgat gtcttagaaa agttcgccaa gcattga 1557

<210> 3
 <211> 50
 <212> РНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична послідовність

<400> 3
 gaacucucgg uuuuuuagug gaggaugaua guacagccaa aagggcaguc 50

<210> 4
 <211> 50
 <212> РНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична послідовність

<400> 4
 gacugcccuu uuggcuguaс uаuсаuссuс саsuuuuuаа ссааgаguuс 50

<210> 5
 <211> 53
 <212> РНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 5

gacgusaasa ugaasaanaa gccagaauuu gcuauagacuc uugcaguugu ugc

53

<210> 6

<211> 53

<212> РНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 6

gcaasaacug caagagucuu agcaasaucu ggcauuuuuu ucauuuugac guc

53

<210> 7

<211> 24

<212> РНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 7

augccagaug uugcuauagac ucuu

24

<210> 8

<211> 24

<212> РНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 8

aagagucuuu gcaasaucug gcau

24

<210> 9

<211> 49

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 9

gagctcttgg tttaaaagtg gaggatgata atacagccaa aagggcagt 49

<210> 10

<211> 50

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 10

gaactcttgg tttaaaagtg gaggatgata atacagccaa aagggcagtc 50

<210> 11

<211> 50

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 11

gaactcttgg tttaaaagtg gaggatgata gtacagccaa aagggcagtc 50

<210> 12

<211> 50

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 12

gaactcttgg tttaaaagtg gaggatgata atacagacaa aagggcagtc 50

<210> 13

<211> 50

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 13

gaactcttgg tttaaaagtg gaggatgata atacagccaa aagggcagtc 50

<210> 14

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 14

gatgtcaaca tgaacaaaat gccagatgtt gccatgactc tcgctgttgt tgc 53

<210> 15

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 15

gacgtcaaca tgaacaaaat gccagatgtt gctatgactc ttgcagttgt tgc 53

<210> 16

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 16

gacgtcaaca tgaacaaaat gccagatgtt gctatgactc ttgcagtagt tgc 53

<210> 17

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 17

gacgtcaaca tgaacaaaat gccagatgtt gctatgactc ttgcagtagt tgc 53

<210> 18

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 18

gacgtcaaca tgaacaaaat gccagatggt gctatgactc ttgcagttgt tgc 53

<210> 19

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 19

gacgtcaaca tgaataaaat gccagatggt gctatgactc ttgcagttgt tgc 53

<210> 20

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 20

gacgtcaaca tgaacaaaat gccagatggt gctatgactc ttgcagtagt tgc 53

<210> 21

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 21

gacgtcaaca tgaacaaaat gccagatggt gctatgactc ttgcagtagt tgc 53

<210> 22

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 22

gatgttaaca tgaacaaaat gccagatggt gccatgacgc ttgcagtcgt tgc 53

<210> 23

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 23

gatgtcaaca tgaacaaaat gccagatgtc gctatgactc ttgctgttgc tgc 53

<210> 24

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 24

gatgtcaaca tgaataaaaat gccagatgtc gccatgactc ttgctgtagt tgc 53

<210> 25

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 25

gatgtgaaca tgaacaagat gcctgatgtt gccatgactc ttgctgtggt cgc 53

<210> 26

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 26

gatgttaaca tgaacaaaat gcccgatgtt gccatgactc ttgccgtggt tgc 53

<210> 27

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 27

gacgtcaaca tgaacaaaat gcctgatgtc gcaatgactc ttgctgtggt tgc 53

<210> 28

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 28

gatgtcaaca tgaacaaaat gcctgatgtt gccatgactc ttgctgtggt cgc 53

<210> 29

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 29

gatgtcaaca tgaacaaaat gcctgatgtt gccatgactc ttgctgtggt cgc 53

<210> 30

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 30

gatgtgaaca tgaacaaaat gccagatgtc gctatgacat tggctgtggt tgc 53

<210> 31

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 31

gatgtcaaca tgaacaaaat gccagatgtt gccatgactc ttgctgtagt tgc 53

<210> 32

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 32

gatgtcaaca tgaacaaaat gcctgatggt gccatgactc ttgccgttgt tgc 53

<210> 33

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 33

gatgtcaaca tgaacaagat gccagatggt gccatgactc ttgctgtagt tgc 53

<210> 34

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 34

gatgttaaca tgaacaaaat gcctgatggt gccatgactc ttgctgttgt tgc 53

<210> 35

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 35

gatgttaaca tgaacaaaat gccagatggt gccatgacgc ttgcagtcgt tgc 53

<210> 36

<211> 49

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 36

gctcaagcta ctaccatcaa caatggtgtc catactggtc aattgcacc 49

<210> 37
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична послідовність

<400> 37
 gcaccatact ttacccaaaa cccagttacc saaattctca aaaactctta atttggatc 60

<210> 38
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична послідовність

<400> 38
 gatcaaaact gagaatttct ccaaagttca tgtctttaac caataaaaga gttggtgggc 60

<210> 39
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична послідовність

<400> 39
 gcaatcatca attgttccca agattcaagc ttctgttgct gctgcagc 48

<210> 40
 <211> 54
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична послідовність

<400> 40
 gctgagaaac cttcatctgt cccagaaatt gtgttacaac ccatcaaaga gatc 54

<210> 41
 <211> 52
 <212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 41

gatctctggt actgttcaat tgcctgggtc aaagtcttta tccaatcgaa tc 52

<210> 42

<211> 54

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 42

gaatccttct ttagctgct ttgtctgagg gcacaacagt ggctcgacaac ttgc 54

<210> 43

<211> 47

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 43

gctgtatagt gatgatattc ttatatgtt ggacgctctc agaactc 47

<210> 44

<211> 61

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 44

gcagtcgtag agggttgtgg tggctgttt cctgttgga aagatggaaa ggaagagatt 60

c

61

<210> 45

<211> 48

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 45
gattcaactt ttcccttggt atgcaggaac agcgatgcgc ccattgac 48

<210> 46
<211> 56
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична послідовність

<400> 46
gacagctgcg gttgccgttg ctggaggaaa ttcaagttat gtgcttgatg gagtac 56

<210> 47
<211> 52
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична послідовність

<400> 47
gtaccaagaa tgaggagcg cccattggg gatctgtag caggtctaaa gc 52

<210> 48
<211> 53
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична послідовність

<400> 48
gcaacttgt tcagatgtag attgtttct tggcacaat tgcctcctg ttc 53

<210> 49
<211> 56
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична послідовність

<400> 49
gttcgggtca atgctaaagg aggcctcca gggggcaagg tcaagctctc tggatc 56

<210> 50

<400> 45
gattcaactt ttcccttggt atgcaggaac agcgatgcgc ccattgac 48

<210> 46
<211> 56
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична послідовність

<400> 46
gacagctgcg gttgccgttg ctggaggaaa ttcaagttat gtgcttgatg gagtac 56

<210> 47
<211> 52
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична послідовність

<400> 47
gtaccaagaa tgaggagcg cccattggg gatctgtag caggtctaaa gc 52

<210> 48
<211> 53
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична послідовність

<400> 48
gcaacttggg tcagatgtag attgtttct tggcacaat tgcctcctg ttc 53

<210> 49
<211> 56
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична послідовність

<400> 49
gttcgggtca atgctaaagg aggcctcca gggggcaagg tcaagctctc tggatc 56

<210> 50

<211> 54
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

 <220>
 <223> синтетична послідовність

 <400> 50
 gatcggtag tagccaatat ttaactgcac ttctcatggc tactccttg ggtc 54

<210> 51
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

 <220>
 <223> синтетична послідовність

 <400> 51
 gtcttgaga cgtggagatt gagatagtg ataaattgat ttctgtac 48

<210> 52
 <211> 58
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

 <220>
 <223> синтетична послідовність

 <400> 52
 gtaccgtatg ttgaaatgac aataaagtg atggaacgct ttggagtatc cgtagaac 58

<210> 53
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

 <220>
 <223> синтетична послідовність

 <400> 53
 gaacatagtg atagttggga caggttctac attcgagggtg gtcagaaata c 51

<210> 54
 <211> 55
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

 <220>
 <223> синтетична послідовність

<400> 54
gtcagaaata caaatctcct ggaaaggcat atgttgaggg tgatgcttca agtgc 55

<210> 55
<211> 51
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична послідовність

<400> 55
gctagtact tctagccgg agccgccgtc actggtggga ctgtcactgt c 51

<210> 56
<211> 56
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична послідовність

<400> 56
gttcttgaga agatgggttg caaggtcacc tggacagaga atagtgtaac tgttac 56

<210> 57
<211> 56
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична послідовність

<400> 57
gttcttgaga agatgggttg caaggtcacc tggacagaga atagtgtaac tgttac 56

<210> 58
<211> 54
<212> ДНК
<213> штучна послідовність

<220>
<223> синтетична послідовність

<400> 58
gttactggac caccaggga ttcatctgga aagaacatc tgcgtgctat cgac 54

<210> 59

<211> 62
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична послідовність

<400> 59
 gccttgatg cagatgggcc caccgccatc agagatgtgg ctactggag agtgaaggaa 60
 ac 62

<210> 60
 <211> 50
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична послідовність

<400> 60
 gaaaccgaac ggatgattgc cattgcaca gaactgaga agcttggggc 50

<210> 61
 <211> 52
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична послідовність

<400> 61
 gcaacagtgt aggaaggatc tgattactgt gtgatcactc cgcctgaaa gc 52

<210> 62
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична послідовність

<400> 62
 gctaaacccc accgccattg aaacttatga cgtaccga atggccatgg c 51

<210> 63
 <211> 57
 <212> ДНК
 <213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 63

gcattctctc ttgtgcctg tgcagatgtt cccgtcacta tccttgatcc gggatgc 57

<210> 64

<211> 54

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 64

gcacccgtaa aacctcccc gactacttg atgtttaga aaagtcgcc aagc 54

<210> 65

<211> 50

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 65

gaactcttgg tttaaaagtg gaggatgata gtacagccaa aagggcagtc 50

<210> 66

<211> 53

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> синтетична послідовність

<400> 66

gacgtcaaca tgaacaaaat gccagatgtt gctatgactc ttgcagttgt tgc 53

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб контролювання росту, розвитку або репродуктивної здатності рослини, який включає: місцеву обробку рослини композицією, що містить дволанцюгову РНК (длРНК) полінуклеотид і агент-переносник, причому длРНК полінуклеотид містить (а) ланцюг, що складається з SEQ ID NO: 3 або 5; і (б) ланцюг, що містить зворотний комплемент (а), внаслідок чого відбувається
- 10 піддавалася обробці композицією.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що агент-переносник вибраний з групи, яка складається з кремнійорганічного сурфактанту, катіонного ліпідного реагенту і рослинного гормону.
- 15 3. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що кремнійорганічний сурфактант наведений в номерах CAS, вибраних з групи, що складається з CAS № 67674-67-3, CAS № 68937-55-3, CAS № 27306-78-1, CAS № 27306-78-1 та CAS № 134180-76-0, де катіонний ліпідний реагент являє

собою N41-(2,3-діолеоїлокси)пропіл]-N,N,N-триметиламонію метилсульфат (DOTAP) або де рослинний гормон являє собою брасиностероїд.

4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що рослину вибрано із групи, що складається з *Amaranthus palmeri*, *Amaranthus rudis*, *Amaranthus albus*, *Amaranthus chlorostachys*, *Amaranthus graecizans*, *Amaranthus hybridus*, *Amaranthus lividus*, *Amaranthus spinosus*, *Amaranthus thunbergii*, *Amaranthus viridis*, *Lolium multiflorum*, *Lolium rigidum*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Ambrosia trifida*, *Euphorbia heterophylla*, *Kochia scoparia*, *Abutilon theophrasti*, *Sorghum halepense*, *Chenopodium album*, *Commelina diffusa*, *Convolvulus arvensis*, *Conyza canadensis*, *Digitaria sanguinalis* і *Xanthium strumarium*.

5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що композиція додатково містить один або більше гербіцидів, які інгібують EPSPS, або два різні длРНК полінуклеотиди, один з яких складається з ланцюга SEQ ID NO: 3 та його зворотного комплементу, а інший складається з ланцюга SEQ ID NO: 5 та його зворотного комплементу.

6. Спосіб за п. 5, який **відрізняється** тим, що композиція додатково містить компонент, вибраний з групи, яка складається з одного або більше гербіцидів, які відрізняються від одного або більше гербіцидів, які інгібують EPSPS, ауксиноподібних гербіцидів, 3,6-дихлоро-о-анісової кислоти та 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти.

7. Композиція, яка містить: длРНК полінуклеотид й агент-переносник, яка **відрізняється** тим, що длРНК полінуклеотид містить (а) ланцюг, що складається з SEQ ID NO: 3 або 5; і (b) ланцюг, що містить зворотний комплемент (а).

8. Композиція за п. 7, яка **відрізняється** тим, що агент-переносник вибраний із групи, що складається з кремнійорганічного сурфактанту, катіонного ліпідного реагенту і брасиностероїду.

9. Композиція за п. 8, яка **відрізняється** тим, що композиція додатково містить сульфат амонію.

10. Композиція за п. 8, яка **відрізняється** тим, що кремнійорганічний сурфактант, наведений в номерах CAS, вибраних з групи, що складається з CAS № 67674-67-3, CAS № 68937-55-3, CAS № 27306-78-1, CAS № 27306-78-1 та CAS № 134180-76-0, де катіонний ліпідний реагент являє собою N41-(2,3-діолеоїлокси)пропіл]-N,N,N-триметиламонію метилсульфат (DOTAP).

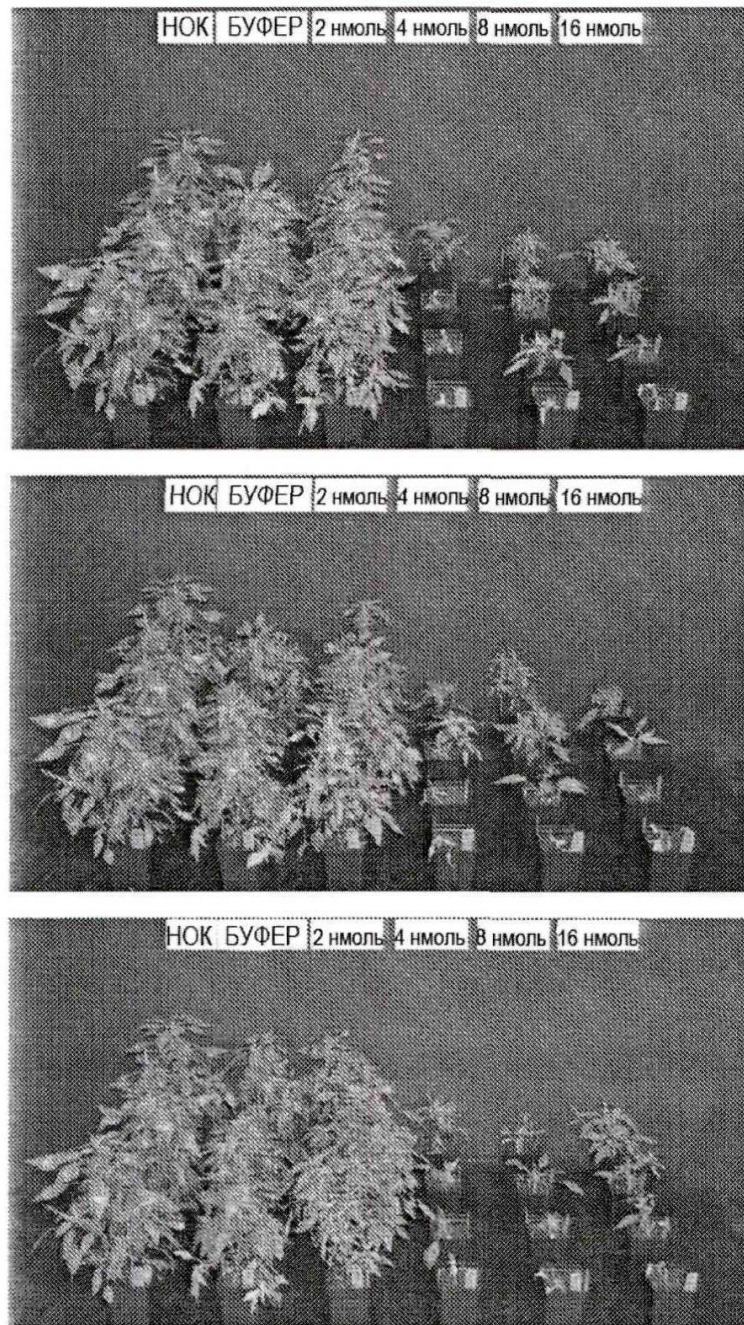
11. Композиція за п. 7, яка додатково містить гербіцид, який інгібуює EPSPS.

12. Композиція за п. 11, яка **відрізняється** тим, що (i) гербіцид, який інгібуює EPSPS, являє собою гліфосат або (ii) додатково містить гербіцид, який не інгібуює EPSPS.

13. Спосіб надання рослині чутливості до гербіциду, який інгібуює EPSPS, який включає: обробку рослини длРНК полінуклеотидом, який **відрізняється** тим, що длРНК полінуклеотид містить (а) ланцюг, що складається з SEQ ID NO: 3 або 5, і (b) ланцюг, що містить зворотний комплемент (а), внаслідок чого рослина стає чутливішою до гербіциду, який інгібуює EPSPS, відносно рослини, яка не оброблена длРНК полінуклеотидом.

14. Спосіб за п. 13, який **відрізняється** тим, що гербіцид, який інгібуює EPSPS, являє собою гліфосат або рослину, є стійким до гліфосату, 3,6-дихлоро-о-анісової кислоти, сульфонілсечовини або їхніх комбінацій.

15. Спосіб за п. 13, який **відрізняється** тим, що бур'ян вибраний із групи, що складається з *Amaranthus palmeri*, *Amaranthus rudis*, *Amaranthus albus*, *Amaranthus chlorostachys*, *Amaranthus graecizans*, *Amaranthus hybridus*, *Amaranthus lividus*, *Amaranthus spinosus*, *Amaranthus thunbergii*, *Amaranthus viridis*, *Lolium multiflorum*, *Lolium rigidum*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Ambrosia trifida*, *Euphorbia heterophylla*, *Kochia scoparia*, *Abutilon theophrasti*, *Sorghum halepense*, *Chenopodium album*, *Commelina diffusa*, *Convolvulus arvensis*, *Conyza canadensis*, *Digitaria sanguinalis* і *Xanthium strumarium*.



Фиг.1

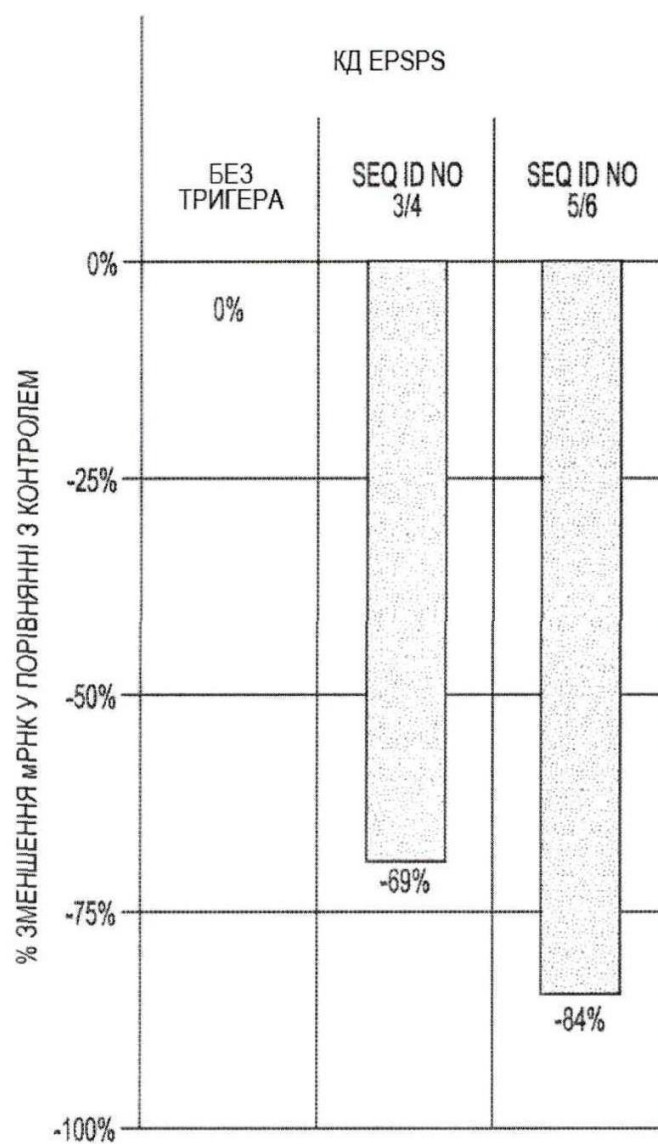


Fig.2

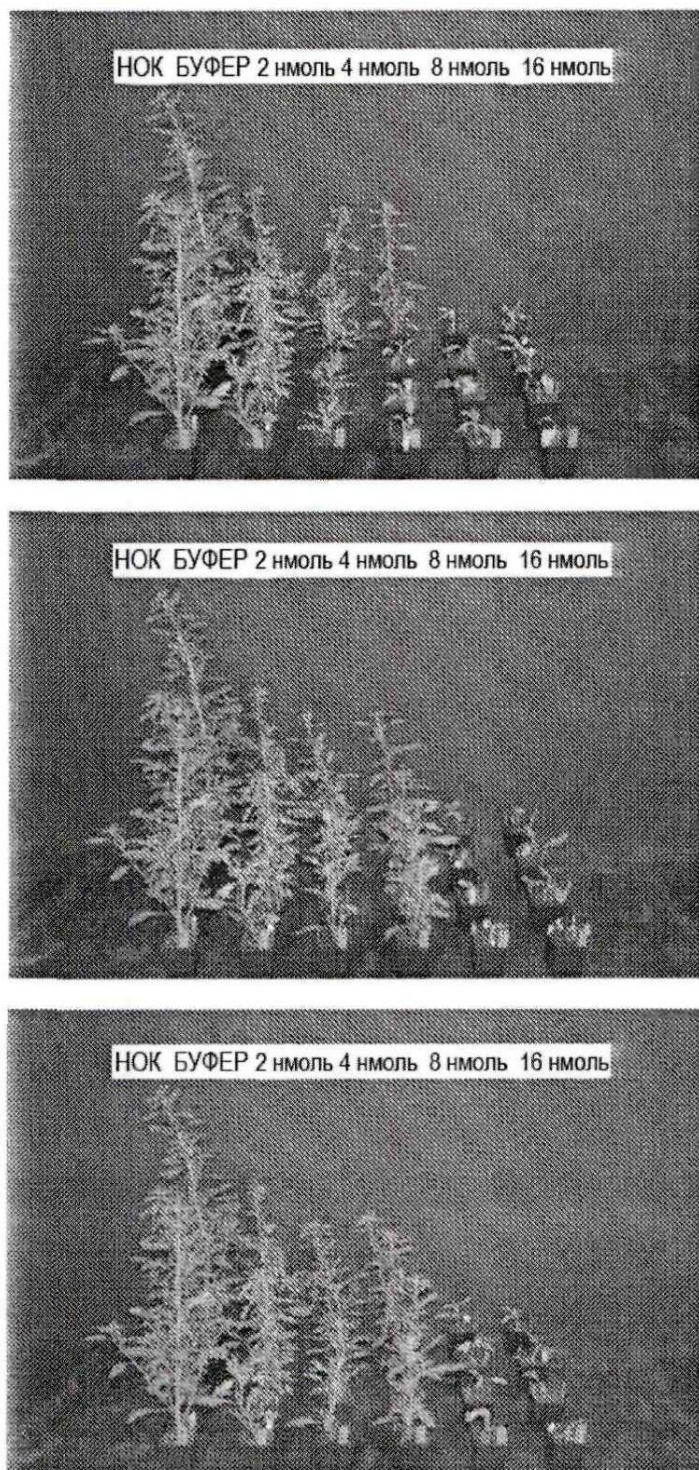


Fig.3

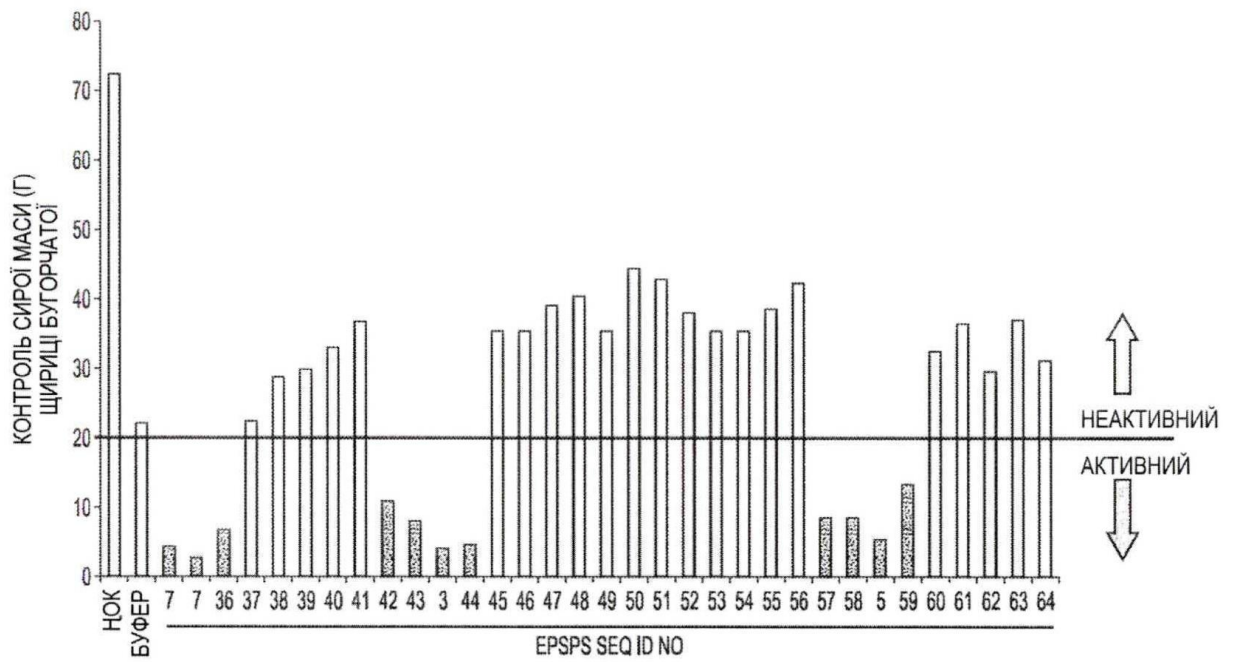


Fig.4

Комп'ютерна верстка М. Шамоніна

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601