

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 915 576**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2018** **PCT/IB2018/057160**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2019** **WO19058255**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2018** **E 18786034 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2022** **EP 3684930**

54 Título: **Modificación de la especificidad de moléculas de ARN no codificantes de plantas para silenciar la expresión génica**

30 Prioridad:

19.09.2017 GB 201715113

19.09.2017 GB 201715116

23.11.2017 GB 201719516

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

23.06.2022

73 Titular/es:

TROPIC BIOSCIENCES UK LIMITED (100.0%)
Norwich Research Park, Innovation Centre,
Colney Lane
Colney, Norwich NR4 7GJ, GB

72 Inventor/es:

MAORI, EYAL;
GALANTY, YARON;
PIGNOCCHI, CRISTINA;
CHAPARRO GARCIA, ANGELA y
MEIR, OFIR

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 915 576 T3

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

DESCRIPCIÓN

Modificación de la especificidad de moléculas de ARN no codificantes de plantas para silenciar la expresión génica

5 **Campo y antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a la modificación de genes que codifican o se procesan en moléculas silenciadoras de ARN y, más particularmente, pero no exclusivamente, al uso de los mismos para silenciar la expresión génica diana endógena o exógena de interés en las plantas.

10 El silenciamiento de ARN o interferencia de ARN (ARNi), el mecanismo regulador genético endógeno co- o postranscripcional en el que las moléculas de ARN inhiben la expresión o traducción génica, generalmente está mediado por moléculas de ARN no codificantes, incluidos los microARN (miARN), ARN interferentes pequeños (ARNip), ARNpi de acción trans (ta-ARNip), ARN de interacción con piwi (ARNpi), ARN antisentido, etc.
15 Recientemente, se ha implicado que los ARN no codificantes adicionales albergan una actividad silenciadora de ARN, incluidos ARN de transferencia (ARNt), ARN nuclear pequeño (ARNncp), ARN nucleolar pequeño (ARNnop) y ARN derivado de repeticiones. Estas moléculas silenciadoras de ARN canónicas y no canónicas difieren en sus sustratos, biogénesis, proteínas efectoras y modos de regulación negativa de la diana.

20 Por otra parte, proteínas argonauta, en complejo con ARN pequeños, forman el núcleo del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), el complejo efector ARN-interferencia (ARNi). La superfamilia argonauta se segrega en dos clados, denominados Ago y Piwi. Las proteínas Ago (por ejemplo, Ago1 y Ago2) suelen formar complejos con miARN y ARNpi, mientras que las proteínas Piwi (por ejemplo, Piwi, Ago3 y Aubergine (Aub)) suelen formar complejos con ARNip.

25 Los ARN pequeños de interferencia (ARNpi) son moléculas de ARN de doble cadena de 20-25 nucleótidos (nt) de longitud, que interfieren con la expresión de genes específicos con secuencias nucleotídicas complementarias al degradar su transcripción durante o después de la transcripción, lo que da como resultado que no haya traducción.

30 Los microARN (miARN) son pequeños ARN no codificantes endógenos (ARNnc) de 20 a 24 nt de longitud, que proceden precursores largos autocomplementarios. Los miARN maduros regulan la expresión génica de dos maneras; (i) inhibiendo la traducción o (ii) degradando los ARNm codificantes por un complemento perfecto o casi perfecto con la transcripción diana. La mayoría de los ARNm diana de plantas contienen un solo sitio complementario de miARN, lo que da como resultado que los ARNm diana sean escindidos y degradados por la molécula silenciadora de ARN y
35 la maquinaria de descomposición del ARN.

Los ARN que interaccionan con piwi (ARNip) son pequeños ARN no codificantes que son el producto de moléculas precursoras monocatenarias largas y que se generan sin una etapa de corte. Los ARNip suelen tener una longitud de 26 a 31 nt y son en su mayoría antisentido. Los ARNip forman complejos de ARN-proteína a través de interacciones
40 con proteínas Piwi. Los ARNip antisentido normalmente se cargan en Piwi o Aub.

Los ARNip de transacción (ARNtasi) son una clase de ARN pequeños de interferencia (ARNpi) que reprimen la expresión génica a través del silenciamiento génico postranscripcional. Su biogénesis está impulsada por la asociación de miARN a precursores de ARNtasi, que recluta ARN polimerasas dependientes de ARN (RpRd) que sintetizan
45 ARNbc a partir del molde precursor de ARNtasi. A continuación, dicho ARNbc es procesado por DICER-LIKE 4 (DCL4) en ARNtasi maduros a intervalos "en fase" de aproximadamente 21 nucleótidos.

Los avances recientes en las técnicas de edición del genoma han hecho posible alterar las secuencias de ADN en las células vivas. Al editar solo unos pocos de los miles de millones de nucleótidos en las células de las plantas, estas
50 nuevas técnicas podrían ser la forma más efectiva de hacer que los cultivos crezcan mejor en climas severos (rendimiento de los cultivos y estrés abiótico) y mejorar la resistencia al estrés biótico (insectos, virus, bacteria, escarabajos, nematodos, etc.). Existen enfoques limitados para lograr la resistencia a las plagas utilizando tecnologías de edición del genoma, tales como CRISPR/Cas9: inactivación de genes susceptibles de plantas (tales como los conocidos genes MLO), mediante la introducción de codones de terminación, desplazamiento del marco, inserciones,
55 delecciones, etc.; o regulación positiva de genes de resistencia, como los genes R, mediante modificación de elementos reguladores como promotores, sitios de unión de microARN, etc. No obstante, los enfoques que están dirigidos específicamente al patógeno se limitan a las aplicaciones transgénicas de CRISPR.

Trabajos previos sobre la edición del genoma de moléculas de ARN en varios organismos (por ejemplo, murino, de ser humano, de gambas, de plantas), centrados en eliminar la actividad de miARN o cambiar su sitio de unión en los
60 ARN diana, por ejemplo:

Zhao *et al.*, [Zhao *et al.*, Scientific Reports (2014) 4:3943] han proporcionado una estrategia de inhibición de miARN empleando el sistema CRISPR en células murinas. Zhao usó un ARNg diseñado específicamente para cortar un gen de miARN en un solo sitio mediante Cas9, lo que da como resultado la inactivación del miARN en células murinas.

65 Jiang *et al.* [Jiang *et al.*, RNA Biology (2014) 11 (10): 1243-9] usaron CRISPR/Cas9 para deplecionar el miR-93 humano

de un clúster apuntando a su región 5' en las células HeLa. Se indujeron varios indeles pequeños en la región objetivo que contenía el sitio de procesamiento de Drosha (es decir, la posición en la que Drosha, una enzima ARNasa III específica de ARN de doble cadena, se une a, escinde y, por lo tanto, procesa los miARN primarios (pri-miARN) en pre-miARN en el núcleo de una célula huésped) y las secuencias semilla (es decir, las secuencias heptamétricas conservadas que son esenciales para la unión del miARN al ARNm, típicamente situadas en las posiciones 2-7 desde el extremo 5' del miARN). Según Jiang *et al.*, incluso la delección de un solo nucleótido condujo a la inactivación completa del miARN diana con alta especificidad.

Con respecto a la edición del genoma de las plantas, Bortesi y Fischer [Bortesi y Fischer, *Biotechnology Advances* (2015) 33: 41-52] trató el uso de la tecnología CRISPR-Cas9 en plantas en comparación con ZFN y TALEN, y Basak y Nithin [Basak y Nithin, *Front Plant Sci.* (2015) 6: 1001] demostraron el uso de la tecnología CRISPR-Cas9 para la inactivación de genes que codifican proteínas en plantas modelo tales como *Arabidopsis* y tabaco y cultivos como trigo, maíz y arroz.

Además de la interrupción de la actividad de miARN o de los sitios de unión a la diana, se usó silenciamiento génico utilizando silenciamiento génico mediado por microARN artificiales (miARNa) y genes diana endógenos y exógenos [Tiware *et al.* *Plant Mol Biol* (2014) 86: 1]. Similar a los microARN, los miARNa son monocatenarios, de aproximadamente 21 nt de longitud y se diseñaron reemplazando las secuencias de miARN maduras de dúplex dentro de pre-miARN [Tiware *et al.* (2014) citado anteriormente]. Estos miARNa se introducen como un transgén dentro de un casete de expresión artificial (que incluye un promotor, un terminador, etc.) [Carbonell *et al.*, *Plant Physiology* (2014) pág. 113.234989], se procesan a través de la biogénesis de ARN pequeño y la maquinaria de silenciamiento y regulan por disminución la expresión de la diana. Según Schwab *et al.* [Schwab *et al.* *The Plant Cell* (2006) Vol. 18, 1121-1133], los miARNa son activos cuando se expresan bajo promotores inducibles o específicos de tejido y se pueden usar para silenciar genes específicos en plantas, especialmente cuando varios genes diana relacionados, pero no idénticos, necesitan ser regulados por disminución.

Senis *et al.* [Senis *et al.*, *Nucleic Acids Research* (2017) Vol. 45(1): e3] desvelan la modificación por ingeniería de un miARN antiviral sin promotor en un locus de miARN endógeno. De manera específica, Senis *et al.* insertan un transgén precursor de miARNa (pri-miARNa en horquilla) adyacente a un gen de miARN de origen natural (por ejemplo, miR122) mediante recombinación de ADN dirigida por homología que es inducida por nucleasa específica de secuencia, tal como Cas9 o TALEN. Este enfoque usa miARNa sin promotor y sin terminador usando ADN activo transcripcionalmente que expresa miARN natural (miR122), es decir, el promotor y el terminador endógenos impulsaron y regularon la transcripción del transgén de miARNa insertado.

Anteriormente se han descrito varios métodos libres de ADN para introducir ARN y/o proteínas en las células. Por ejemplo, la transfección de ARN mediante electroporación y lipofección se ha descrito en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20160289675. Cho describió la administración directa de los complejos de ribonucleoproteína Cas9/ARNg (RNP) a las células mediante microinyección de los complejos de proteína Cas9 y ARNg [Cho *et al.*, "Heritable gene knockout in *Caenorhabditis elegans* by direct injection of Cas9-ARNgc ribonucleoproteins", *Genetics* (2013) 195:1177-1180]. Kim describió la administración de complejos de proteína Cas9/ARNg mediante electroporación en [Kim *et al.*, "Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins" *Genome Res.* (2014) 24:1012-1019]. Zuris publicó la administración de complejos de ARNg asociado con proteína Cas9 mediante liposomas [Zuris *et al.*, "Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*" *Nat Biotechnol.* (2014) doi: 10.1038/nbt.3081].

Zhou *et al.* (*Frontiers in Plant Science* 8 (2017): 1598) se refiere a la edición del genoma basada en CRISPR-Cas9 y el estudio de la función y regulación del microARN en arroz. Ramirez ("Function of microRNAs in plant innate immunity", 2017) se refiere con la función de los microARN en la inmunidad innata de las plantas. Jacobs *et al.* (*BMC Biotechnology* 15.1 (2015): 1-10) se refiere a modificaciones del genoma dirigidas en soja con CRISPR/Cas9. El documento WO 2016/100333 A1 se refiere a portadores de microARN pesticidas y a su uso.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones independientes. En las reivindicaciones dependientes, se definen aspectos y realizaciones preferidas adicionales. Cualquier aspecto, realización y ejemplo de la presente divulgación que no caiga dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención y se proporciona meramente con fines ilustrativos.

La invención proporciona un método para modificar un gen que codifica o se procesa en una molécula silenciadora de ARN para un ARN diana en una célula vegetal, comprendiendo el método introducir en la célula vegetal un agente de edición de ADN que redirige una especificidad silenciadora de dicha molécula silenciadora de ARN hacia un segundo ARN diana, siendo dicho ARN diana y dicho segundo ARN diana distintos e introducir en la célula vegetal un oligonucleótido donante para generar un cambio preciso en el genoma, modificando así el gen que codifica la molécula silenciadora de ARN de manera que se suprime la especificidad original de la molécula silenciadora de ARN y se gana una nueva especificidad hacia el segundo ARN diana.

- De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para producir una planta con expresión reducida de un gen diana, comprendiendo el método modificar un gen que codifica o se procesa en una molécula silenciadora de ARN a un ARN diana en una célula vegetal de acuerdo con un método de la invención, generar una planta a partir de dicha célula vegetal, produciendo así la planta con expresión reducida de un gen diana.
- De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para generar una planta con mayor tolerancia al estrés, rendimiento aumentado, tasa de crecimiento aumentada o calidad del rendimiento aumentada, comprendiendo el método modificar un gen que codifica o se procesa en una molécula silenciadora de ARN en una célula vegetal según algunas realizaciones de la invención, en el que el ARN diana de interés es de un gen de la planta que confiere sensibilidad al estrés, rendimiento disminuido, tasa de crecimiento disminuido o calidad de rendimiento disminuido, generando así la planta.
- De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para generar una planta tolerante o resistente a patógenos, comprendiendo el método modificar un gen que codifica o se procesa en una molécula silenciadora de ARN en una célula vegetal según algunas realizaciones de la invención, en el que el ARN diana de interés es de un gen de la planta que confiere sensibilidad al patógeno, generando así la planta tolerante o resistente al patógeno.
- De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para generar una planta tolerante o resistente a patógenos, comprendiendo el método modificar un gen que codifica o se procesa en una molécula silenciadora de ARN en una célula vegetal según algunas realizaciones de la invención, en el que el ARN diana de interés es de un gen del patógeno, generando así la planta tolerante o resistente al patógeno.
- De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para generar una planta tolerante o resistente a plagas, comprendiendo el método modificar un gen que codifica o se procesa en una molécula silenciadora de ARN en una célula vegetal según algunas realizaciones de la invención, en el que el ARN diana de interés es de un gen de la plaga, generando así la planta tolerante o resistente a plagas.
- De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para generar una planta tolerante o resistente a plagas, comprendiendo el método modificar un gen que codifica o se procesa en una molécula silenciadora de ARN en una célula vegetal según algunas realizaciones de la invención, en el que el ARN diana de interés es de un gen de la planta que confiere sensibilidad a la plaga, generando así la planta tolerante o resistente a plagas.
- De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para generar una planta resistente a herbicidas, comprendiendo el método modificar un gen que codifica o se procesa en una molécula silenciadora de ARN en una célula vegetal según algunas realizaciones de la invención, en el que el ARN diana de interés es de un gen de la planta que confiere sensibilidad al herbicida, generando así la planta resistente a herbicidas.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el gen que codifica o se procesa en la molécula silenciadora de ARN es endógeno a la célula vegetal.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, modificar el gen que codifica la molécula silenciadora de ARN comprende impartir a la molécula silenciadora de ARN una complementariedad de al menos un 45 % con respecto al segundo ARN diana.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la especificidad de silenciamiento de la molécula silenciadora de ARN se determina midiendo el nivel de ARN del segundo ARN diana.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la especificidad de silenciamiento de la molécula silenciadora de ARN se determina fenotípicamente.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la determinación fenotípica se efectúa mediante la determinación de al menos un fenotipo vegetal seleccionado del grupo que consiste en una coloración de las hojas, una coloración de las flores, una tasa de crecimiento, un tamaño de la planta, rendimientos de un cultivo, un rasgo de fruta, una resistencia al estrés biótico y una resistencia al estrés abiótico.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el fenotipo de la planta se determina antes que el genotipo de la planta.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el genotipo de la planta se determina antes que el fenotipo de la planta.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la molécula silenciadora de ARN se procesa a partir de un

precursor.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la molécula silenciadora de ARN es una molécula de interferencia de ARN (ARNi).

5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la molécula de ARNi se selecciona entre el grupo que consiste en ARN pequeño de interferencia (ARNpi), un ARN en horquilla corta (ARNhc), un microARN (miARN), un ARN que interacciona con Piwi (ARNip) y un ARNpi que actúa en trans (ARNtasi).

10 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la molécula de ARN o molécula de ARNi se diseña de manera que una secuencia de la molécula de ARNi se modifica para preservar la originalidad de la estructura y para ser reconocida por factores de ARNi celular.

15 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la modificación del gen se efectúa mediante una modificación seleccionada del grupo que consiste en una delección, una inserción, una mutación puntual y una combinación de las mismas.

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la modificación está en una región de tallo de la molécula silenciadora de ARN.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la modificación está en una región de bucle de la molécula silenciadora de ARN.

25 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la modificación está en una región no estructurada de la molécula silenciadora de ARN.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la modificación está en una región de tallo y una región de bucle de la molécula silenciadora de ARN.

30 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la modificación está en una región de tallo y una región de bucle y en la región no estructurada de la molécula silenciadora de ARN.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la modificación es una inserción.

35 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la modificación es una delección.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la modificación es una mutación puntual.

40 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la modificación comprende una modificación de, como máximo, 200 nucleótidos.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN comprende al menos un ARNg unido operativamente a un promotor expresable en plantas.

45 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN no comprende una endonucleasa.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN comprende una endonucleasa.

50 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN es un sistema de edición de ADN seleccionado entre el grupo que consiste en una meganucleasa, una nucleasa de dedos de cinc (ZFN), una nucleasa efectora similar al activador de la transcripción (TALEN) y CRISPR.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la endonucleasa comprende Cas9.

55 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN se aplica a la célula como ADN, ARN o RNP.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN está unido a un indicador para controlar la expresión en una célula vegetal.

60 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el indicador es una proteína fluorescente.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el segundo ARN diana es endógeno a la célula vegetal.

65 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el segundo ARN diana es exógeno a la célula vegetal.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la célula vegetal es un protoplasto.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la siembra comprende cruces o autofecundaciones.

- 5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la planta no está modificada genéticamente (no-OMG).

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la planta se selecciona entre el grupo que consiste en un cultivo, una flor y un árbol.

- 10 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y/o científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la invención. Aunque en la práctica o el ensayo de realizaciones de la invención pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen métodos y/o materiales ilustrativos. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones, prevalecerá. Adicionalmente, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean necesariamente limitantes.

Breve descripción de las varias vistas de los dibujos

- 20 Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento, solo a modo de ejemplo, haciendo referencia a los dibujos adjuntos. Las características mostradas son a modo de ejemplo y con fines ilustrativos de la discusión de realizaciones de la invención. En este sentido, la descripción tomada junto con los dibujos hace evidente para los expertos en la materia cómo pueden ponerse en práctica realizaciones de la invención.

- 25 En los dibujos:

La FIG. 1 es un diagrama de flujo de la realización del reemplazo del silenciamiento génico inducido por edición del genoma (GEiGS) del miARN endógeno con ARNpi dirigido al gen PDS, induciendo así el silenciamiento génico del gen PDS endógeno. Para introducir la modificación, se está utilizando un sistema de 2 componentes. El primero, un sistema CRISPR/CAS9, en un vector que contiene GFP, genera una escisión en los loci elegidos, a través de ARN guía específicos diseñados para promover la reparación del ADN homólogo (HDR) en el sitio. El segundo, una secuencia DONANTE, con la modificación deseada de la secuencia de miARN, para apuntar a los genes recién asignados, se introduce como molde para el HDR. Este sistema se está utilizando en la transformación de protoplastos, se enriquece por FACS debido a la señal GFP en el vector CRISPR/CAS9, se recupera y se regenera en las plantas.

- 30 Las FIG. 2A-C son fotografías que ilustran que el silenciamiento del gen PDS provoca fotoblanqueo. El silenciamiento del gen PDS en plantas de *Nicotiana* (Figuras 2A-B) y *Arabidopsis* (Figura 2C) provoca fotoblanqueo en *N. benthamiana* (Figura 2B) y *Arabidopsis* (Figura 2C, lado derecho). Las fotografías se tomaron 3 © semanas después del silenciamiento del PDS.

- 40 Las FIG. 3A-D son fotografías de reducción de los niveles de expresión de GFP en *Arabidopsis* usando GEiGS. Los protoplastos de *Arabidopsis* que expresan GFP se ilustran como control (Figuras 3A-B) en comparación con los protoplastos editados usando GEiGS para expresar ARNip de GFP (Figuras 3C-D). Cabe señalar que, los protoplastos o plantas GEiGS se silencian para la expresión de la proteína GFP.

- 45 La FIG. 4 es un diagrama de flujo de realización del reemplazo de GEiGS de miARN endógeno con ARNpi dirigido a GFP, que genera plantas de *Arabidopsis* con ARNi activo contra GFP. Para introducir la modificación, un sistema CRISPR/CAS9, en un vector que contiene RFP, genera una escisión en los loci elegidos, a través de ARN guía específicos diseñados para promover la reparación del ADN homólogo (HDR) en el sitio. El segundo, una secuencia DONANTE, con la modificación deseada de la secuencia de miARN, para apuntar al gen GFP, se introduce como molde para el HDR. Este sistema se está utilizando en protoplastos que expresan GFP. Se está realizando y recuperando el enriquecimiento de células supuestamente modificadas por FACS debido a la señal de RFP en el vector CRISPR/CAS9. Las plantas regeneradas están siendo analizadas para determinar la intensidad de la señal GFP.

- 50 La FIG. 5 es un diagrama de flujo de realización del reemplazo de GEiGS de miARN endógeno con ARNpi dirigido a GFP, que genera plantas de *Arabidopsis* con ARNi dirigido por GEiGS contra GFP. Cabe señalar que, las plantas GEiGS se silencian para la expresión de GFP después de la transformación de la planta. Se está usando RFP para el enriquecimiento de células con presencia transitoria del vector CRISPR/CAS9.

- 55 La FIG. 6 es un diagrama de flujo de realización del reemplazo de GEiGS de miARN endógeno con ARNpi dirigido a GFP, que genera plantas resistentes a la infección vírica, por ejemplo, infección por TMV (es decir, gen exógeno). Se está usando RFP para el enriquecimiento de células con presencia transitoria del vector CRISPR/CAS9.

- 60 La FIG. 7 es una fotografía de plantas de plátano que sufren encamado causado por el nematodo barrenador, *Radopholus similis*.

La FIG. 8 es una tabla que ilustra la presencia de *Radopholus similis* y *Pratylenchus coffeae* en diferentes cultivos en el área de Tay Nguyen.

- 65 La FIG. 9 es un diagrama de flujo de la realización de canalización computacional para generar moldes de GEiGS. La canalización computacional de GEiGS aplica metadatos biológicos y permite una generación automática de moldes de donantes de ADN de GEiGS que se utilizan para editar mínimamente genes de ARN no codificantes

endógenos (por ejemplo, genes de miARN), lo que conduce a una nueva ganancia de función, es decir, la redirección de su capacidad de silenciamiento para dirigirse a la expresión del gen de interés.

La FIG. 10 es un diagrama de flujo de la realización que ilustra el diseño de una planta resistente a plagas que se dirige a cualquier gen de plaga exógeno deseado. Reemplazo de GEiGS de miARN endógeno con ARNpi dirigido al gen esencial de patógenos/plagas, que genera plantas resistentes a la infección por patógenos/plagas.

La FIG. 11 es un dibujo de realización que ilustra las etapas principales requeridas para diseñar una molécula silenciadora de ARN y con bases génicas de miARN mínimamente editadas.

Las FIG. 12A-G ilustran transcritos primarios de miR-390 y estructura de miR390 modificada y secuencias dirigidas. Representación de la estructura secundaria de los transcritos primarios de miR390 y sus versiones modificadas (Figura 12A) de tipo salvaje; (Figuras 12B-C) versión modificada para apuntar a GFP; (Figuras 12D-E) versión modificada para apuntar a AtPDS3; (Figuras 12F-G) versión modificada para apuntar a AtADH1. Los miARN/ARNpi maduros se destacan en rojo, exhibiendo la conservación de la estructura a través del diseño. Las regiones seleccionadas para su manipulación mediante el sistema CRISPR/CAS9 están delineadas en púrpura y la secuencia NGG está resaltada en amarillo (Figura 12A).

Las FIG. 13A-G ilustran transcritos primarios de miR-173 y estructura de miR173 modificada y secuencias dirigidas. Representación de la estructura secundaria de los transcritos primarios de miR173 y sus versiones modificadas (Figura 13A) de tipo salvaje; (Figuras 13B-C) versión modificada para apuntar a GFP; (Figura 13D-E) versión modificada para apuntar a AtPDS3; (Figura 13F-G) versión modificada para apuntar a AtADH1. Los miARN/ARNpi maduros se destacan en rojo, exhibiendo la conservación de la estructura a través del diseño. Las regiones seleccionadas para su manipulación mediante el sistema CRISPR/CAS9 están delineadas en púrpura y la secuencia NGG está resaltada en amarillo (Figura 13A).

La FIG. 13H ilustra ejemplos de realización de diseños de oligo GEiGS en los que la estructura precursora no desempeña un papel en la biogénesis, por lo tanto, no es necesario mantenerla. Diseño basado en ARNtasi bnTAS3B de *Brassica rapa*. De arriba a abajo: ARNtasi de tipo salvaje, diseño GEiGS con cambios de secuencia mínimos y diseño GEiGS con cambios de secuencia máximos. Las selecciones de precursores de ARN no codificantes que dan lugar a moléculas de ARN pequeñas maduras se resaltan en verde. Las diferencias de secuencia entre los oligos GEiGS y la secuencia de tipo salvaje se resaltan en rojo. Cabe señalar que, la biogénesis de ARNtasi, a diferencia de los miARN y los ARNt, no depende de la estructura secundaria precursora.

Las FIG. 14A-D ilustran el direccionamiento de genes por miR-173 y sus versiones modificadas. (Figura 14A) El miR-173 de tipo salvaje se dirige al transcrito TAS1c por complementariedad de secuencia del miARN maduro con una secuencia en el gen (en rojo). Los miARN recién modificados (INTERCAMBIOS 1, 2, 3, 4, 9 y 10) fueron diseñados para apuntar (Figura 14B) a GFP, (Figura 14C) AtPDS3 y (Figura 14D) AtADH1 mediante complementariedad de secuencia con su secuencia (en rojo). Los nucleótidos modificados de la secuencia sv, se escriben en minúsculas.

Las FIG. 15A-D ilustran el direccionamiento de genes por miR-390 y sus versiones modificadas. (Figura 15A) El miR-390 de tipo salvaje se dirige al transcrito TAS3 por complementariedad de secuencia del miARN maduro con una secuencia en el gen (en rojo). Los miARN recién modificados (INTERCAMBIOS 5, 6, 7, 8, 11 y 12) fueron diseñados para apuntar (Figura 15B) a GFP, (Figura 15C) AtPDS3 y (Figura 15D) AtADH1 mediante complementariedad de secuencia con su secuencia (en rojo). Los nucleótidos modificados de la secuencia sv, se escriben en minúsculas.

La FIG. 16 ilustra el fenotipo/genotipo de PDS3: las plantas con fenotipo blanqueado se seleccionaron y genotiparon mediante PCR de amplicón interno seguido de análisis de digestión de restricción con Btsal (NEB) para verificar la presencia del donante frente a la secuencia de tipo salvaje. Carril 1: Plantas tratadas SIN DONANTE, restringidas, Carriles 2-4: Plantas tratadas con PDS3 que contienen DONANTE restringido, Carril 5: Control de DONANTE de plásmido positivo sin restricciones, Carril 6: Agua sin control de molde, Carril 7: Donante de plásmido positivo restringido, Carril 8: Plantas bombardeadas con DONANTE negativo restringido, Carril 9: Plantas de control no tratadas restringidas. La posterior amplificación por PCR externa del amplicón se procesó y secuenció para validar la inserción.

La FIG. 17 ilustra el fenotipo/genotipo de ADH1: Las plantas se seleccionaron a través de la resistencia al alcohol alílico y se genotipificaron mediante PCR de amplicón interno seguido de digestión de restricción BclI (NEB) para verificar la presencia de donantes. Carril 1: Planta de control sensible al alcohol alílico restringida, Carril 2-4: Plantas resistentes al alcohol alílico que contienen DONANTE restringido, Carril 5: Control de DONANTE de plásmido positivo sin restricciones, Carril 6: control sin molde, Carril 7: Donante de plásmido positivo restringido, Carril 8: Planta bombardeada con DONANTE no específico restringido, Carril 9: Control no tratado con alcohol alílico restringido.

La FIG. 18 es un gráfico que ilustra el análisis de expresión génica en plantas modificadas con miR-173 dirigidas al transcrito de AtPDS3. El análisis de la expresión de AtPDS3 se realizó mediante qRT-PCR, en la regeneración de plantas bombardeadas con GEiGSn.⁹⁴ e INTERCAMBIO3 en comparación con plantas bombardeadas con GEiGS#5 e INTERCAMBIO1 y 2 (GFP). Cabe señalar que, se observó una reducción del 82 % en el nivel de expresión génica, en promedio, cuando miR-173 se modificó para apuntar a AtPDS3, en comparación con las plantas de control (las barras de error presentan SD; valor de $p < 0,01$ calculado sobre los valores de Ct).

La FIG. 19 es un gráfico que ilustra el análisis de expresión génica en plantas modificadas con miR-390 dirigidas al transcrito de AtPDS3. El análisis de la expresión de AtADH1 se realizó mediante qRT-PCR, en la regeneración de plantas bombardeadas con GEiGSn.⁹⁵ e INTERCAMBIO11, en comparación con plantas bombardeadas con GEiGSn.⁹⁵ e INTERCAMBIO1 y 2 (GFP). Cabe señalar que, se observó una reducción del 82 % en el nivel de expresión génica, en promedio, cuando miR-390 se modificó para apuntar a AtADH1, en comparación con las

plantas de control (las barras de error representan SD; valor de $p < 0,01$ calculado sobre los valores de Ct).

Descripción detallada

La presente invención se refiere a la modificación de genes que codifican o se procesan en moléculas silenciadoras de ARN y, más particularmente, pero no exclusivamente, al uso de los mismos para silenciar ARN diana endógeno o exógeno de interés en plantas.

Los principios y la operación de la presente invención pueden entenderse mejor en referencia a los dibujos y las descripciones adjuntas.

Debe entenderse que la invención no se limita necesariamente en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados por los ejemplos. La invención tiene capacidad para otras realizaciones o puede practicarse o llevarse a cabo de diversas maneras. Asimismo, debe entenderse que la fraseología y la terminología empleadas en el presente documento son con fines descriptivos y no deberían interpretarse como limitantes.

Trabajos previos sobre la edición del genoma de moléculas de ARN en varios organismos (por ejemplo, murino, de ser humano, de plantas), se centró en la interrupción de la actividad de miARN o los sitios de unión objetivo mediante transgénesis. La edición del genoma en plantas se ha concentrado aún más en el uso de la tecnología CRISPR-Cas9, ZFN y TALEN, para la eliminación de genes o inserciones en plantas modelo. Por otra parte, se describió el silenciamiento de genes en plantas usando transgenes de microARN artificiales para silenciar genes diana endógenos y exógenos [Molnar A *et al.* Plant J. (2009) 58(1):165-74. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03767.x. Epub 2009 Jan 19; Borges y Martienssen, Nature Reviews Molecular Cell Biology | AOP, publicado *online* el 4 de noviembre de 2015; doi: 10.1038/nrm4085]. Los transgenes de miARN artificiales se introducen en las células vegetales dentro de un casete de expresión artificial (que incluye un promotor, un terminador, un marcador de selección, etc.) y regulan por disminución la expresión diana.

Los presentes inventores han ideado una tecnología de edición de genes dirigida a moléculas de ARN no codificantes (por ejemplo, endógenas) diseñadas para dirigirse e interferir con un gen diana no natural de interés (endógeno o exógeno a la célula vegetal). La tecnología de edición de genes descrita en el presente documento no implementa las herramientas genéticas y transgénicas moleculares clásicas que comprenden casetes de expresión que tienen un promotor, un terminador, marcador de selección.

Como se muestra a continuación en el presente documento y en la sección de ejemplos que sigue, los presentes inventores han diseñado una plataforma de silenciamiento génico inducido por edición del genoma (GEiGS) capaz de utilizar moléculas de ARN no codificantes endógenas de una célula vegetal que incluyen, por ejemplo, moléculas silenciadoras de ARN (por ejemplo, ARNpi, miARN, ARNip, tasiARN, ARNt, ARNr, ARN antisentido, ARNsn, ARNsno, etc.) y modificándolos para apuntar y regular por disminuir cualquier diana de ARN de interés (véase el diagrama de flujo de ejemplo en la Figura 1). Usando GEiGS, el presente método permite detectar posibles moléculas de ARN no codificantes, editar nucleótidos en estas moléculas de ARN endógeno y, por lo tanto, redirigir su especificidad para apuntar y regular por disminuir de manera efectiva y específica cualquier ARN de interés, incluidos, ARN endógeno y/o exógeno codificado por patógenos y plagas (véase el diagrama de flujo de ejemplo en la figura 9). Considerados en conjunto, GEiGS se puede utilizar como una nueva tecnología no modificada genéticamente para aumentar el rendimiento de los cultivos, la tasa de crecimiento de los cultivos, la calidad del cultivo, así como para la protección del cultivo contra el estrés, patógenos, plagas y herbicidas.

El término "planta" como se usa en el presente documento abarca plantas completas, una planta injertada, ancestros y descendencia de las plantas y partes de plantas, incluyendo semillas, brotes, tallos, raíces (incluyendo tubérculos), portainjertos, vástago y células vegetales, tejidos y órganos. La planta puede estar en cualquier forma, incluyendo cultivos en suspensión, embriones, regiones meristemáticas, tejido de callo, hojas, gametofitos, esporofitos, polen y micrósporas. Las plantas que pueden ser particularmente útiles en los métodos de la invención incluyen todas las plantas que pertenecen a la superfamilia Viridiplantae, en particular, plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, incluyendo una legumbre forrajera o de pienso, planta ornamental, cultivo alimentario, árbol o arbusto seleccionados de la lista que comprende *Acacia* spp., *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Aesculus* spp., *Agathis australis*, *Albizia amara*, *Alsophila tricolor*, *Andropogon* spp., *Arachis* spp., *Areca catechu*, *Astelia fragrans*, *Astragalus cicer*, *Baikiaea plurijuga*, *Betula* spp., *Brassica* spp., *Bruguiera gymnorrhiza*, *Burkea africana*, *Butea frondosa*, *Cadaba farinosa*, *Calliandra* spp., *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Capsicum* spp., *Cassia* spp., *Centroema pubescens*, *Chacoomeles* spp., *Cinnamomum cassia*, *Coffea arabica*, *Colophospermum mopane*, *Coronilla varia*, *Cotoneaster serotina*, *Crataegus* spp., *Cucumis* spp., *Cupressus* spp., *Cyathea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Cryptomeria japonica*, *Cymbopogon* spp., *Cynthea dealbata*, *Cydonia oblonga*, *Dalbergia monetaria*, *Davallia divaricata*, *Desmodium* spp., *Dicksonia squarosa*, *Dibeteropogon amplexans*, *Dioclea* spp., *Dolichos* spp., *Dorycnium rectum*, *Echinochloa pyramidalis*, *Ehrafia* spp., *Eleusine coracana*, *Eragrostis* spp., *Erythrina* spp., *Eucalyptus* spp., *Euclea schimperii*, *Eulalia villosa*, *Pagopyrum* spp., *Feijoa sellowiana*, *Fragaria* spp., *Flemingia* spp., *Freycinetia banksii*, *Geranium thunbergii*, *Ginkgo biloba*, *Glycine javanica*, *Gliricidia* spp., *Gossypium hirsutum*, *Grevillea* spp., *Guibourtia coleosperma*, *Hedysarum* spp., *Hemaphysa altissima*, *Heteropogon contortus*, *Hordeum vulgare*, *Hyparrhenia rufa*, *Hypericum erectum*, *Hypeffhelia disolute*, *Indigo incamata*, *Iris* spp., *Leptarrhena pyrolifolia*, *Lespedeza* spp., *Lettuca* spp., *Leucaena leucocephala*, *Loudetia simplex*,

- Lotonus bainesli*, *Lotus* spp., *Macrotyloma axillare*, *Malus* spp., *Manihot esculenta*, *Medicago saliva*, *Metasequoia glyptostroboides*, *Musa sapientum*, plátano, *Nicotianum* spp., *Onobrychis* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp., *Peltophorum africanum*, *Pennisetum* spp., *Persea gratissima*, *Petunia* spp., *Phaseolus* spp., *Phoenix canariensis*, *Phormium cookianum*, *Photinia* spp., *Picea glauca*, *Pinus* spp., *Pisum sativum*, *Podocarpus totara*, *Pogonarthria fleckii*,
5 *Pogonaffhria squarrosa*, *Populus* spp., *Prosopis cineraria*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pterolobium stellatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Rhaphiolepis umbellata*, *Rhopalostylis sapida*, *Rhus natalensis*, *Ribes grossularia*, *Ribes* spp., *Robinia pseudoacacia*, *Rosa* spp., *Rubus* spp., *Salix* spp., *Schyzachyrium sanguineum*, *Sciadopitys vefficillata*, *Sequoia sempervirens*, *Sequoiadendron giganteum*, *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Sporobolus fimbriatus*, *Stiburus alopecuroides*, *Stylosanthos humilis*, *Tadehagi* spp., *Taxodium distichum*, *Themeda triandra*, *Trifolium* spp., *Triticum* spp.,
10 *Tsuga heterophylla*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vitis vinifera*, *Watsonia pyramidata*, *Zantedeschia aethiopica*, *Zea mays*, amaranto, alcachofa, espárrago, brócoli, coles de Bruselas, repollo, colza, zanahoria, coliflor, apio, berza, lino, kale, lenteja, colza de semilla oleaginosa, quingombó, cebolla, patata, arroz, soja, paja, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, tomate, té de calabaza, árboles. Como alternativa, se pueden usar algas y otras no Viridiplantae para los métodos de algunas realizaciones de la presente invención.
- 15 De acuerdo con una realización específica, la planta es un cultivo, una flor o un árbol.
- De acuerdo con una realización específica, la planta es una especie de planta leñosa, por ejemplo, *Actinidia chinensis* (Actinidiaceae), *Manihotesculenta* (Euphorbiaceae), *Firiodendron tulipifera* (Magnoliaceae), *Populus* (Salicaceae),
20 *Santalum album* (Santalaceae), *Ulmus* (Ulmaceae) y diferentes especies de Rosaceae (*Malus*, *Prunus*, *Pyrus*) y las Rutaceae (*Citrus*, *Microcitrus*), Gimnospermas, por ejemplo, *Picea glauca* y *Pinus taeda*, árboles del bosque (por ejemplo, Betuláceas, Fagáceas, Gimnospermas y especies de árboles tropicales), árboles frutales, arbustos o hierbas, por ejemplo, (plátano, cacao, coco, café, dátil, uva y té) y aceite de palma.
- 25 De acuerdo con una realización específica, la planta es de un cultivo tropical, por ejemplo, café, macadamia, plátano, piña, taro, papaya, mango, cebada, judías, mandioca, garbanzo, cacao (chocolate), caupí, maíz, mijo, arroz, sorgo, caña de azúcar, batata, tabaco, taro, té, ñame.
- "Grano", "semilla", o "vaina", se refiere a la unidad de reproducción de una planta con flores, capaz de convertirse en
30 otra planta similar. Como se utiliza en el presente documento, los términos se usan como sinónimos e intercambiablemente.
- De acuerdo con una realización específica, la planta es una célula vegetal, por ejemplo, célula vegetal en una suspensión de células embrionarias.
- 35 De acuerdo con una realización específica, la célula vegetal es un protoplasto.
- Los protoplastos derivan de cualquier tejido vegetal, por ejemplo, frutos, flores, raíces, hojas, embriones, suspensión de células embrionarias, callos o tejido de plántulas.
- 40 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "molécula de ARN no codificante" se refiere a una secuencia de ARN que no se traduce en una secuencia de aminoácidos y no codifica una proteína.
- De acuerdo con una realización, la molécula de ARN no codificante está típicamente sujeta al mecanismo o actividad de procesamiento de silenciamiento de ARN. Sin embargo, también se contemplan en el presente documento algunos cambios en los nucleótidos (por ejemplo, para miARN de hasta 24 nucleótidos) que pueden provocar un mecanismo de procesamiento que da como resultado la interferencia del ARN o la inhibición de la traducción.
- 45 De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante es endógena (de origen natural, por ejemplo, nativa) a la célula. Se apreciará que la molécula de ARN no codificante también puede ser exógena a la célula (es decir, añadida externamente y que no se produce de forma natural en la célula).
- 50 De acuerdo con algunas realizaciones, la molécula de ARN no codificante comprende una actividad de inhibición de la traducción intrínseca.
- 55 De acuerdo con algunas realizaciones, la molécula de ARN no codificante comprende una actividad intrínseca de ARNi.
- De acuerdo con una realización de la invención, la molécula de ARN no codificante es específica de un ARN diana (por ejemplo, un ARN diana natural) y no inhibe de forma cruzada ni silencia un segundo ARN diana o un ARN diana de interés a menos que esté diseñado para hacerlo (como se explica a continuación) y presenta un 100 % o menos homología global con el gen diana, por ejemplo, menos del 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 % de homología global con el gen diana; según lo determinado a nivel de ARN o proteína por RT-PCR, transferencia Western, inmunohistoquímica y/o citometría de
60 flujo, secuenciación o cualquier otro método de detección.
- 65

La expresión "silenciamiento de ARN" o ARNi se refiere a un mecanismo de regulación celular en el que median moléculas de ARN no codificantes (la "molécula silenciadora de ARN" o "molécula de ARNi"), de una manera específica de la secuencia, inhibición co- o post-transcripcional de la expresión o traducción génica.

- 5 De acuerdo con una realización, la molécula silenciadora de ARN es capaz de mediar en la represión de ARN durante la transcripción (silenciamiento génico cotranscripcional).

De acuerdo con una realización específica, el silenciamiento génico cotranscripcional incluye el silenciamiento epigenético (por ejemplo, el estado cromático que impide la expresión génica funcional).

- 10 De acuerdo con una realización, la molécula silenciadora de ARN es capaz de mediar en la represión de ARN después de la transcripción (silenciamiento génico postranscripcional).

- 15 El silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) generalmente se refiere al proceso (que generalmente ocurre en el citocitoplasma celular) de degradación o escisión de moléculas de ARN mensajero (ARNm) que disminuyen su actividad al impedir la traducción.

- 20 Por ejemplo, y como se analiza con detalle a continuación, una hebra guía de una molécula silenciadora de ARN se empareja con una secuencia complementaria en una molécula de ARNm e induce la escisión, por ejemplo, Argonauta 2 (Ago2).

- 25 El silenciamiento génico cotranscripcional normalmente se refiere a la inactivación de la actividad génica (es decir, la represión de la transcripción) y normalmente se produce en el núcleo celular. Tal represión de la actividad génica está mediada por factores relacionados con la epigenética, tales como, por ejemplo, metil-transferasas, que metilan el ADN diana y las histonas. Por lo tanto, en el silenciamiento génico cotranscripcional, la asociación de un ARN pequeño con un ARN diana (interacción ARN pequeño-transcrito) desestabiliza el transcrito naciente diana y recluta enzimas modificadoras de ADN e histonas (es decir, factores epigenéticos) que inducen la remodelación de la cromatina en una estructura que reprime la actividad génica y la transcripción. Asimismo, en el silenciamiento génico cotranscripcional, los armazones de ARN no codificantes largos asociados a la cromatina pueden reclutar complejos modificadores de la cromatina independientemente de los ARN pequeños. Estos mecanismos de silenciamiento cotranscripcional forman sistemas de vigilancia de ARN que detectan y silencian eventos de transcripción inapropiados y proporcionan una memoria de estos eventos a través de bucles epigenéticos que se refuerzan a sí mismos [como se describe en D. Hoch y D. Moazed, RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression, Nat Rev Genet. (2015) 16(2): 71-84].

- 35 De acuerdo con una realización de la invención, la maquinaria de biogénesis/procesamiento de ARNi genera la molécula silenciadora de ARN.

- 40 De acuerdo con una realización de la invención, la maquinaria de biogénesis/procesamiento de ARNi genera la molécula silenciadora de ARN, pero no se ha identificado una diana específica.

A continuación sigue una descripción detallada de moléculas de ARN no codificantes que comprenden una actividad intrínseca de ARNi (por ejemplo, son moléculas silenciadoras de ARN) que pueden usarse de acuerdo con realizaciones específicas de la presente invención.

- 45 De acuerdo con una realización, la molécula silenciadora de ARN se procesa a partir de un precursor.

De acuerdo con una realización, la molécula silenciadora de ARN se procesa a partir de un precursor de ARN monocatenario (ARNmc) estructurado.

- 50 De acuerdo con una realización, la molécula silenciadora de ARN se procesa a partir de un precursor de ARN monocatenario no estructurado en dúplex.

- 55 De acuerdo con una realización, la molécula silenciadora de ARN se procesa a partir de un precursor de ARNbc (por ejemplo, que comprende apareamiento de bases perfecto e imperfecto).

De acuerdo con una realización, la molécula silenciadora de ARN se procesa a partir de un precursor de ARN no estructurado.

- 60 De acuerdo con una realización, la molécula silenciadora de ARN se procesa a partir de un precursor de ARN codificante de proteína.

De acuerdo con una realización, la molécula silenciadora de ARN se procesa a partir de un precursor de ARN no codificante.

- 65 De acuerdo con una realización, el ARNbc puede derivar de dos ARN complementarios diferentes o de un ARN sencillo

que se pliega sobre sí mismo para formar ARNbc.

ARN de bases apareadas de forma perfecta o imperfecta (es decir, ARN bicatenario; ARNbc), ARNpi y ARNhc - La presencia de ARNbc largos en las células estimula la actividad de una enzima ribonucleasa III denominada dicer. Dicer (también conocida como endoribonucleasa Dicer o helicasa con motivo de ARNasa) es una enzima que en las plantas se suele denominar proteína similar a Dicer (DCL). Diferentes plantas tienen diferentes números de genes DCL, de este modo, por ejemplo, el genoma de *Arabidopsis* típicamente tiene cuatro genes DCL, el arroz tiene ocho genes DCL y el genoma del maíz tiene cinco genes DCL. Dicer participa en el procesamiento del ARNbc en fragmentos cortos de ARNbc conocidos como ARN de interferencia cortos (ARNpi). Los ARNpi derivados de la actividad dicer tienen típicamente de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud y comprenden aproximadamente dúplex de 19 pares de bases con dos salientes de nucleótidos en 3'.

En consecuencia, algunas realizaciones de la invención contemplan la modificación de un gen que codifica un ARNbc para redirigir una especificidad de silenciamiento (incluida la actividad de silenciamiento) hacia un segundo ARN diana (es decir, el ARN de interés).

De acuerdo con una realización, se usan precursores de ARNbc de más de 21 pb. Varios estudios demuestran que los ARNbc largos se pueden usar para silenciar la expresión génica sin inducir la respuesta al estrés o causar efectos fuera de la diana significativos; véase, por ejemplo, [Strat *et al.*, Nucleic Acids Research, 2006, Vol. 34, N.º 13 3803-3810; Bhargava A *et al.* Brain Res. Protoc. 2004;13:115-125; Diallo M., *et al.*, Oligonucleotides. 2003;13:381-392; Paddison P.J., *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002;99:1443-1448; Tran N., *et al.*, FEBS Lett. 2004;573:127-134].

El término "ARNpi" se refiere a pequeños dúplex de ARN inhibidores (generalmente 18-30 pares de bases) que inducen la vía de interferencia de ARN (ARNi). Típicamente, los ARNpi se sintetizan químicamente como 21 unidades con una región dúplex central de 19 pb y salientes en 3' simétricos de 2 bases en los extremos, aunque se ha descrito recientemente que los dúplex de ARN sintetizados químicamente de 25-30 bases de longitud pueden tener un aumento de potencia de hasta 100 veces en comparación con 21 unidades en la misma ubicación. Se sugiere que el aumento de potencia observado obtenido usando ARN más largos en la activación de ARNi es el resultado de proporcionar a Dicer un sustrato (27 unidades) en lugar de un producto (21 unidades) y que esto mejora la velocidad o la eficiencia de entrada del dúplex de ARNpi en RISC.

Se ha descubierto que la posición, pero no la composición, del saliente en 3' influye en la potencia de un ARNpi y los dúplex asimétricos que tienen un saliente en 3' en la cadena antisentido son generalmente más potentes que aquellos con el saliente en 3' en la cadena sentido (Rose *et al.*, 2005).

Las cadenas de un ARN de interferencia bicatenario (por ejemplo, un ARNpi) se pueden conectar para formar una estructura de horquilla o bucle (por ejemplo, un ARNsh). Por lo tanto, como se ha mencionado, la molécula silenciadora de ARN utilizada de acuerdo con algunas realizaciones de la invención también puede ser un ARN de horquilla corto (ARNhc).

El término ARN de horquilla corto, "ARNhc", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ARN que tiene una estructura de tallo-bucle, que comprende una primera y una segunda región de secuencia complementaria, el grado de complementariedad y orientación de las regiones es suficiente para que se produzca un apareamiento de bases entre las regiones, estando unidas la primera y la segunda regiones por una región de bucle, el bucle resultante de la falta de apareamiento de bases entre nucleótidos (o análogos de nucleótidos) dentro de la región del bucle. El número de nucleótidos en el bucle es un número entre 3 y 23 ambos incluido, o entre 5 y 15, o entre 7 y 13, o entre 4 y 9, o entre 9 y 11. Algunos de los nucleótidos del bucle pueden participar en interacciones de pares de bases con otros nucleótidos del bucle. Los ejemplos de secuencias oligonucleotídicas que se pueden usar para formar el bucle incluyen 5'-CAAGAGA-3' y 5'-UUACAA-3' (solicitudes de patente internacional números WO2013126963 y WO2014107763). Un experto en la técnica reconocerá que el oligonucleótido monocatenario resultante forma una estructura de horquilla o tallo-bucle que comprende una región de doble cadena capaz de interactuar con la maquinaria de ARNi.

La molécula silenciadora de ARN usada de acuerdo con algunas realizaciones de la invención no necesita limitarse a aquellas moléculas que contienen solo ARN, pero incluye además nucleótidos y no nucleótidos modificados químicamente.

La presente invención contempla varios tipos de ARNpi, incluidos los ARNpi que actúan en trans (Ta-ARNpi), ARNpi asociados a repeticiones (Ra-ARNpi) y ARNpi derivados de transcritos antisentido naturales (Nat-ARNpi).

De acuerdo con una realización, el ARN silenciador incluye "ARNip, que es una clase de ARN que interactúa con Piwi de aproximadamente 26 y 31 nucleótidos de longitud. Los ARNip suelen formar complejos de proteína-ARN a través de interacciones con proteínas Piwi, es decir, los ARNip antisentido normalmente se cargan en proteínas Piwi (por ejemplo, Piwi, Ago3 y Aubergine (Aub)).

miARN: según otra realización, la molécula silenciadora de ARN puede ser un miARN.

El término "microARN", "miARN" y "miR" son sinónimos y se refieren a un conjunto de moléculas de ARN monocatenario no codificante de aproximadamente 19-24 nucleótidos de longitud, que regulan la expresión génica. Los miARN se encuentran en una amplia gama de organismos (por ejemplo, insectos, mamíferos, plantas, nematodos) y se ha demostrado que desempeñan un papel en el desarrollo, la homeostasis y la etiología de la enfermedad.

Inicialmente, el pre-miARN está presente como un ARN de bucle tallo bicatenario largo no perfecto que Dicer procesa aún más en un dúplex similar a ARNpi, que comprende la cadena guía madura (miARN) y un fragmento de tamaño similar conocido como cadena pasajera (miARN*). El miARN y el miARN* pueden derivar de brazos opuestos del pre-miARN y el pre-miARN. Las secuencias de miARN* se pueden encontrar en bibliotecas de miARN clonados, pero normalmente con una frecuencia más baja que los miARN.

Aunque inicialmente presente como una especie de doble cadena con miARN*, el miARN finalmente se incorpora como un ARN monocatenario en un complejo de ribonucleoproteína conocido como complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Varias proteínas pueden formar el RISC, lo que puede dar lugar a una variabilidad en la especificidad de los dúplex de miARN/miARN*, sitio de unión del gen diana, actividad del miARN (reprimir o activar) y qué cadena del dúplex miARN/miARN* se carga en el RISC.

Cuando la cadena de miARN del dúplex miARN:miARN* se carga en el RISC, el miARN* se retira y se degrada. La cadena del dúplex miARN:miARN* que se carga en el RISC es la cadena cuyo extremo 5' está apareado con menos fuerza. En los casos en que ambos extremos del miARN:miARN* tienen un apareamiento 5' aproximadamente equivalente, tanto miARN como miARN* pueden tener actividad de silenciamiento génico.

El RISC identifica los ácidos nucleicos diana basándose en altos niveles de complementariedad entre el miARN y el ARNm, especialmente por los nucleótidos 2-8 del miARN (denominado "secuencia semilla").

Varios estudios han analizado el requisito de apareamiento de bases entre el miARN y su ARNm diana para lograr una inhibición eficiente de la traducción (revisado por Bartel 2004, Cell 116-281). Estudios computacionales, que analizan la unión de miARN en genomas completos ha sugerido un papel específico para las bases 2-8 en el 5' del miARN (también denominado "secuencia semilla") en la unión a la diana, pero el papel del primer nucleótido, que normalmente se ha visto que es "A" también se ha reconocido (Lewis *et al.* 2005 Cell 120-15). De forma análoga, Krek *et al.* utilizaron los nucleótidos 1-7 o 2-8 para identificar y validar dianas (2005, Nat Genet 37-495). Los sitios diana del ARNm pueden estar en la 5' UTR, la 3' UTR o en la región de codificación. De manera interesante, Múltiples miARN pueden regular la misma diana de ARNm reconociendo el mismo o varios sitios. La presencia de múltiples sitios de unión de miARN en la mayoría de las dianas identificadas genéticamente puede indicar que la acción cooperativa de múltiples RISC proporciona la inhibición de la traducción más eficiente.

Los miARN pueden indicar al RISC que regule por disminución la expresión génica mediante cualquiera de dos mecanismos: escisión del ARNm o represión de la traducción. El miARN puede especificar la escisión del ARNm si el ARNm tiene un cierto grado de complementariedad con el miARN. Cuando un miARN guía la escisión, el corte suele estar entre los nucleótidos que se aparean con los restos 10 y 11 del miARN. Como alternativa, el miARN puede reprimir la traducción si el miARN no tiene el grado necesario de complementariedad con el miARN. La represión traduccional puede ser más frecuente en animales, ya que los animales pueden tener un menor grado de complementariedad entre el miARN y el sitio de unión.

Cabe señalar que puede haber variabilidad en los extremos 5' y 3' de cualquier par de miARN y miARN*. Esta variabilidad puede deberse a la variabilidad en el procesamiento enzimático de Drosha y Dicer con respecto al sitio de escisión. La variabilidad en los extremos 5' y 3' de miARN y miARN* también puede deberse a desajustes en las estructuras del tallo de pre-miARN y pre-miARN. Los desajustes de las cadenas del tallo pueden dar lugar a una población de diferentes estructuras en horquilla. La variabilidad en las estructuras del tallo también puede conducir a la variabilidad en los productos de escisión de Drosha y Dicer.

Se apreciará que la secuencia de pre-miARN puede comprender de 45-90, 60-80 o 60-70 nucleótidos mientras que la secuencia de pri-miARN puede comprender de 45-30.000, 50-25.000, 100-20.000, 1.000-1.500 u 80-100 nucleótidos.

De acuerdo con una realización, el miARN comprende miR-390a (como se expone en la SEQ ID NO: 28).

De acuerdo con una realización, el miARN comprende miR-173 (como se expone en la SEQ ID NO: 29).

Antisentido: el antisentido es un ARN monocatenario diseñado para prevenir o inhibir la expresión de un gen mediante la hibridación específica con su ARNm. La regulación por disminución de un ARN diana puede efectuarse usando un polinucleótido antisentido capaz de hibridarse específicamente con un transcrito de ARNm que codifica el ARN diana.

Como se ha mencionado anteriormente, los métodos de algunas realizaciones de la invención se utilizan para redirigir una actividad silenciadora y/o una especificidad de la molécula de ARN no codificante hacia un segundo ARN diana o hacia un ARN diana de interés.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "redirige una especificidad silenciadora" se refiere a la reprogramación de la especificidad original del ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) hacia una diana no natural del ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN). En consecuencia, se elimina la especificidad original del ARN no codificante (es decir, pérdida de función) y la nueva especificidad es hacia una diana de ARN distinta de la diana natural (es decir, el ARN de interés), es decir, ganancia de función. Se apreciará que solo se produce ganancia de función en los casos en que el ARN no codificante no tiene actividad silenciadora.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "ARN diana" se refiere a una secuencia de ARN unida naturalmente por una molécula de ARN no codificante. Por lo tanto, el ARN diana es considerado por el experto en la materia como un sustrato para el ARN no codificante.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "segundo ARN diana" se refiere a una secuencia de ARN (codificante o no codificante) que no se une naturalmente a una molécula de ARN no codificante. Por lo tanto, el segundo ARN diana no es un sustrato natural del ARN no codificante.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "ARN diana de interés" se refiere a una secuencia de ARN (codificante o no codificante) para ser silenciada por la molécula de ARN no codificante diseñada.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "silenciar un gen diana" se refiere a la ausencia o reducción observable en el nivel de ARNm y/o productos proteicos del gen diana (por ejemplo, debido al silenciamiento génico co- y/o postranscripcional). Por lo tanto, el silenciamiento de un gen diana puede ser del 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % en comparación con un gen diana no dirigido por la molécula de ARN no codificante diseñada utilizada de acuerdo con la invención.

Las consecuencias del silenciamiento pueden confirmarse mediante el examen de las propiedades externas de una célula vegetal o planta completa u otro organismo que absorba el ARN no codificante diseñado de la planta o mediante técnicas bioquímicas (como se analiza a continuación).

Se apreciará que la molécula de ARN no codificante diseñada utilizada de acuerdo con algunas realizaciones de la invención puede tener algunos efectos de especificidad fuera de la diana siempre que no afecte a un rasgo valioso desde el punto de vista agrícola (por ejemplo, biomasa, rendimiento, etc).

De acuerdo con una realización, el segundo ARN diana es endógeno a la célula vegetal. El segundo ARN diana endógeno de ejemplo incluye, pero sin limitación, un producto de un gen que confiere sensibilidad al estrés, a la infección, a los herbicidas, o un producto de un gen relacionado con la tasa de crecimiento de las plantas, rendimientos de los cultivos, como se trata más adelante en el presente documento.

De acuerdo con una realización, el segundo ARN diana es exógeno a la célula vegetal (también denominado en el presente documento heterólogo). En tal caso, el segundo ARN diana es un producto de un gen que no forma parte naturalmente del genoma de la planta. El segundo ARN diana exógeno de ejemplo incluye, pero sin limitación, un producto de un gen de un patógeno vegetal tal como, pero sin limitación, un insecto, un virus, una bacteria, un hongo, un nematodo, como se trata más adelante en el presente documento. Un ARN diana exógeno (codificante o no codificante) puede comprender una secuencia de ácido nucleico que comparte identidad de secuencia con una secuencia de ARN endógeno (por ejemplo, puede ser parcialmente homóloga a una secuencia de ácido nucleico endógeno) de la planta.

La unión específica de una molécula de ARN endógeno no codificante con un ARN diana puede determinarse mediante algoritmos computacionales (tal como BLAST) y verificarse mediante métodos que incluyen, por ejemplo, transferencia Northern, hibridación *in situ*, ensayo QuantiGene Plex, etc.

Mediante el uso del término "complementariedad" o "complementario" se entiende que la molécula de ARN no codificante (o al menos una parte de ella que está presente en forma de ARN pequeño procesado, o al menos una cadena de un polinucleótido de doble hebra o una porción del mismo, o una porción de un polinucleótido monocatenario) se hibrida en condiciones fisiológicas con el ARN diana, o un fragmento del mismo, para efectuar la regulación o función o supresión del gen diana. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una molécula de ARN no codificante tiene una identidad de secuencia del 100 por cien o al menos aproximadamente de 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 por cien de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de 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, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500 o nucleótidos más contiguos en el ARN diana (o miembros de la familia de un gen diana dado).

Como se utiliza en el presente documento, se dice que las moléculas de ARN no codificantes, o sus pequeñas formas de ARN procesadas, exhiben "complementariedad completa" cuando cada nucleótido de una de las secuencias que se lee de 5' a 3' es complementario a cada nucleótido de la otra secuencia cuando se lee de 3' a 5'. Una secuencia de

nucleótidos que es completamente complementaria a una secuencia de nucleótidos de referencia exhibirá una secuencia idéntica a la secuencia del complemento inverso de la secuencia de nucleótidos de referencia.

Los métodos para determinar la complementariedad de secuencia son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, herramientas bioinformáticas que son bien conocidas en la técnica (por ejemplo, BLAST, alineación de secuencias múltiples).

De acuerdo con una realización, si la molécula de ARN no codificante se procesa o se transforma en un ARNpi, la complementariedad está en el intervalo de 90-100 % (por ejemplo, 100 %) con su secuencia diana.

De acuerdo con una realización, si la molécula de ARN no codificante es o se procesa en un miARN o ARNip, la complementariedad está en el intervalo de 33-100 % con su secuencia diana.

De acuerdo con una realización, si la molécula de ARN no codificante es un miARN, la complementariedad de la secuencia semilla (es decir, los nucleótidos 2-8 del 5') está en el intervalo de 85-100 % (por ejemplo, 100 %) con respecto a su secuencia diana.

De acuerdo con una realización, el ARN no codificante puede procesarse aún más en una forma de ARN pequeño (por ejemplo, el premiARN se procesa en un miARN maduro). En tal caso, la homología se mide en función de la forma de ARN pequeño procesada (por ejemplo, la secuencia de miARN madura).

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "forma de ARN pequeño" se refiere al ARN pequeño maduro que es capaz de hibridarse con un ARN diana (o fragmento del mismo). De acuerdo con una realización, la forma de ARN pequeño tiene una actividad silenciadora.

De acuerdo con una realización, la complementariedad con la secuencia diana es al menos aproximadamente el 33 % de la forma de ARN pequeño procesada (por ejemplo, el 33 % de los 21-28 nt). Por lo tanto, por ejemplo, si la molécula de ARN no codificante es un miARN, el 33 % de la secuencia de miARN maduro (por ejemplo, 21 nt) comprende la complementación de la semilla (por ejemplo, 7 nt de los 21 nt).

De acuerdo con una realización, la complementariedad con la secuencia diana es al menos aproximadamente el 45 % de la forma de ARN pequeño procesada (por ejemplo, el 45 % de los 21-28 nt). Por lo tanto, por ejemplo, si la molécula de ARN no codificante es un miARN, el 45 % de la secuencia de miARN maduro (por ejemplo, 21 nt) comprende la complementación de la semilla (por ejemplo, 9-10 nt de los 21 nt).

De acuerdo con una realización, la molécula de ARN no codificante (es decir, antes de la modificación) normalmente se selecciona como una que tiene aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 33 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o hasta un 99 % de complementariedad hacia la secuencia del segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (es decir, antes de la modificación) normalmente se selecciona como una que no tenga más del 99 % de complementariedad con respecto a la secuencia del segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (es decir, antes de la modificación) normalmente se selecciona como una que no tenga más del 98 % de complementariedad con respecto a la secuencia del segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (es decir, antes de la modificación) normalmente se selecciona como una que no tenga más del 97 % de complementariedad con respecto a la secuencia del segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (es decir, antes de la modificación) normalmente se selecciona como una que no tenga más del 96 % de complementariedad con respecto a la secuencia del segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (es decir, antes de la modificación) normalmente se selecciona como una que no tenga más del 95 % de complementariedad con respecto a la secuencia del segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (es decir, antes de la modificación) normalmente se selecciona como una que no tenga más del 94 % de complementariedad con respecto a la secuencia del segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (es decir, antes de la modificación) normalmente se selecciona como una que no tenga más del 93 % de complementariedad con respecto a la secuencia

del segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (es decir, antes de la modificación) normalmente se selecciona como una que no tenga más del 92 % de complementariedad con respecto a la secuencia del segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (es decir, antes de la modificación) normalmente se selecciona como una que no tenga más del 91 % de complementariedad con la secuencia de la segunda diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (es decir, antes de la modificación) normalmente se selecciona como una que no tenga más del 90 % de complementariedad con respecto a la secuencia del segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (es decir, antes de la modificación) normalmente se selecciona como una que no tenga más del 85 % de complementariedad con respecto a la secuencia del segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (es decir, antes de la modificación) normalmente se selecciona como una que no tenga más del 50 % de complementariedad con respecto a la secuencia del segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (es decir, antes de la modificación) normalmente se selecciona como una que no tenga más del 33 % de complementariedad con respecto a la secuencia del segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para comprender al menos aproximadamente un 33 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso un 100 % de complementariedad hacia la secuencia del segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para comprender un mínimo del 33 % de complementariedad con respecto al segundo ARN diana (por ejemplo, 85-100 % de coincidencia inicial).

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para que tenga una complementariedad mínima del 40 % con respecto al segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para que tenga una complementariedad mínima del 45 % con respecto al segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para que tenga una complementariedad mínima del 50 % con respecto al segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para que tenga una complementariedad mínima del 45 % con respecto al segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para que tenga una complementariedad mínima del 60 % con respecto al segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para que tenga una complementariedad mínima del 70 % con respecto al segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para que tenga una complementariedad mínima del 80 % con respecto al segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para que tenga una complementariedad mínima del 85 % con respecto al segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para que tenga una complementariedad mínima del 90 % con respecto al segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para que tenga una complementariedad mínima del 91 % con respecto al segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de

ARN) está diseñada para que tenga una complementariedad mínima del 92 % con respecto al segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para que tenga una complementariedad mínima del 93 % con respecto al segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para que tenga una complementariedad mínima del 94 % con respecto al segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para que tenga una complementariedad mínima del 95 % con respecto al segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para que tenga una complementariedad mínima del 96 % con respecto al segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para que tenga una complementariedad mínima del 97 % con respecto al segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para que tenga una complementariedad mínima del 98 % con respecto al segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para que tenga una complementariedad mínima del 99 % con respecto al segundo ARN diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) está diseñada para que tenga un 100 % de complementariedad con el segundo ARN diana.

Para redirigir una actividad silenciadora y/o especificidad de una molécula de ARN no codificante (por ejemplo, una molécula silenciadora de ARN) hacia un segundo ARN diana o ARN diana de interés, el gen que codifica una molécula de ARN no codificante (por ejemplo, una molécula silenciadora de ARN) se modifica usando un agente de edición de ADN.

A continuación sigue es una descripción de varios ejemplos no limitantes de métodos y agentes de edición de ADN utilizados para introducir alteraciones de ácido nucleico en un gen que codifica una molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) y agentes para implementar los mismos que se pueden utilizar según realizaciones de la presente divulgación.

Edición del genoma usando endonucleasas genomodificadas - este enfoque se refiere a un método de genética inversa que utiliza nucleasas genomanipuladas artificialmente para cortar y crear típicamente roturas específicas de doble cadena (DSB) en una ubicación o ubicaciones deseadas en el genoma, que luego se reparan mediante procesos endógenos celulares tales como, recombinación homóloga (RH) o unión de extremos no homólogos (NHEJ). NHEJ une directamente los extremos del ADN en una rotura de doble cadena (DSB) con o sin un recorte mínimo de extremos, mientras que HR utiliza una secuencia donante homóloga como molde (es decir, la cromátida hermana formada durante la fase S) para regenerar/copiar la secuencia de ADN que falta en el sitio de rotura. Para introducir modificaciones específicas de nucleótidos en el ADN genómico, un molde de reparación de ADN del donante que contenga la secuencia deseada debe estar presente durante la HR (ADN monocatenario o bicatenario proporcionado exógenamente).

La edición del genoma no se puede realizar utilizando endonucleasas de restricción tradicionales, ya que la mayoría de las enzimas de restricción reconocen algunos pares de bases en el ADN como su diana y estas secuencias a menudo se encontrarán en muchas ubicaciones a lo largo del genoma, lo que da como resultado cortes múltiples que no están limitados a una ubicación deseada. Para superar este problema y crear roturas de una cadena o de doble cadena específicas del sitio (DSB), hasta la fecha se han descubierto y genomodificado varias clases distintas de nucleasas. Estas incluyen las meganucleasas, las nucleasas de dedo de cinc (ZFN), las nucleasas efectoras similares al activador de la transcripción (TALEN) y el sistema CRISPR/ Cas9.

Meganucleasas - Las meganucleasas se agrupan comúnmente en cuatro familias: la familia LAGLIDADG, la familia GIY-YIG, la familia de cajas His-Cys y la familia HNH. Estas familias se caracterizan por motivos estructurales, que afectan a la actividad catalítica y a la secuencia de reconocimiento. Por ejemplo, los miembros de la familia LAGLIDADG se caracterizan por tener una o dos copias del motivo LAGLIDADG conservado. Las cuatro familias de meganucleasas están ampliamente separadas entre sí con respecto a los elementos estructurales conservados y, por consiguiente, la especificidad de la secuencia de reconocimiento de ADN y la actividad catalítica. Las meganucleasas se encuentran comúnmente en especies microbianas y tienen la propiedad única de tener secuencias de reconocimiento muy largas (> 14 pb), lo que las hace naturalmente muy específicas para cortar en una ubicación deseada.

Esto se puede aprovechar para realizar roturas de doble cadena específicas del sitio (DSB= en la edición del genoma.

Un experto en la materia puede usar estas meganucleasas de origen natural, sin embargo, el número de dichas meganucleasas de origen natural es limitado. Para superar este problema, se han utilizado métodos de detección de alto rendimiento y mutagénesis para crear variantes de meganucleasa que reconocen secuencias únicas. Por ejemplo, se han fusionado varias meganucleasas para crear enzimas híbridas que reconocen una nueva secuencia.

Como alternativa, los aminoácidos de la meganucleasa que interaccionan con el ADN se pueden alterar para diseñar meganucleasas específicas de secuencia (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 8.021.867). Las meganucleasas se pueden diseñar usando los métodos descritos en, por ejemplo, Certo, MT *et al.* Nature Methods (2012) 9:073-975; las patentes de Estados Unidos N.º 8.304.222; 8.021.867; 8.119.381; 8.124.369; 8.129.134; 8.133.697; 8.143.015; 8.143.016; 8.148.098; u 8.163.514. Como alternativa, las meganucleasas con características de corte específicas del sitio se pueden obtener utilizando tecnologías disponibles comercialmente, por ejemplo, Tecnología de edición del genoma Directed Nuclease Editor™ de Precision BioSciences.

ZFN y TALEN: dos clases distintas de nucleasas modificadas por ingeniería, nucleasas de dedo de cinc (ZFN) y nucleasas efectoras similares a activadores de transcripción (TALEN), se ha demostrado que ambas son eficaces en la producción de roturas de doble cadena (DSB) específicas (Christian *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2011; Mahfouz *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2010).

Básicamente, la tecnología de endonucleasas de restricción ZFN y TALEN utiliza una enzima de corte de ADN no específica que está unida a un dominio de unión de ADN específico (ya sea una serie de dominios de dedos de cinc o repeticiones TALE, respectivamente). Normalmente, se selecciona una enzima de restricción cuyo sitio de reconocimiento de ADN y sitio de escisión están separados entre sí. La porción escindida se separa y luego se une a un dominio de unión al ADN, produciendo así una endonucleasa con una especificidad muy alta para una secuencia deseada. Una enzima de restricción ilustrativa con dichas propiedades es FokI. Además, FokI tiene la ventaja de requerir dimerización para tener actividad nucleasa y esto significa que la especificidad aumenta considerablemente a medida que cada pareja de nucleasa reconoce una secuencia de ADN única. Para potenciar este efecto, se han genomodificado nucleasas FokI que solo pueden funcionar como heterodímeros y tienen una mayor actividad catalítica. Las nucleasas que funcionan como heterodímeros evitan la posibilidad de actividad homodímera no deseada y, por tanto, aumentan la especificidad de la rotura de doble cadena (DSB).

Por lo tanto, por ejemplo, para apuntar a un sitio específico, ZFN y TALEN se construyen como pares de nucleasas, con cada miembro del par diseñado para unirse a secuencias adyacentes en el sitio diana. Tras la expresión transitoria en las células, las nucleasas se unen a sus sitios diana y los dominios FokI se heterodimerizan para crear una rotura de la doble cadena (DSB). La reparación de estas roturas de doble cadena (DSB) a través de la ruta de unión de extremos no homólogos (NHEJ) a menudo da como resultado pequeñas deleciones o pequeñas inserciones de secuencia (Indels). Dado que cada reparación hecha por NHEJ es única, el uso de un solo par de nucleasas puede producir una serie alélica con una variedad de inserciones o deleciones diferentes en el sitio diana.

En general, la NHEJ es relativamente precisa (aproximadamente el 85 % de las DSB en células humanas son reparados por NHEJ dentro de los 30 minutos posteriores a la detección) en la edición de genes. NHEJ erróneo depende de cuando la reparación es precisa, la nucleasa seguirá cortando hasta que el producto de reparación sea mutagénico y el motivo de reconocimiento/sitio de corte/PAM se ha ido/mutado o que la nucleasa introducida transitoriamente ya no está presente.

Las deleciones suelen oscilar entre unos pocos pares de bases y unos cientos de pares de bases de longitud, pero se han generado con éxito deleciones más grandes en cultivos celulares usando dos pares de nucleasas simultáneamente (Carlson *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2010). Adicionalmente, cuando se introduce un fragmento de ADN con homología con la región diana junto con el par de nucleasas, la rotura de doble cadena (DSB) se puede reparar mediante recombinación homóloga (HR) para generar modificaciones específicas (Li *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2010; Urnov *et al.*, 2005).

Aunque las porciones de nucleasa tanto de ZFN como de TALEN tienen propiedades similares, la diferencia entre estas nucleasas genomodificadas está en su péptido de reconocimiento de ADN. Las ZFN se basan en dedos de cinc Cys2-His2 y las TALEN en los TALE. Ambos dominios peptídicos que reconocen ADN tienen la característica de que se encuentran naturalmente en combinaciones en sus proteínas. Los dedos de Cinc Cys2-His2 se encuentran normalmente en repeticiones que están separadas por 3 pb y se encuentran en diversas combinaciones en diversas proteínas que interaccionan con ácidos nucleicos. Los TALE, por otro lado, se encuentran en repeticiones con una relación de reconocimiento uno a uno entre los aminoácidos y los pares de nucleótidos reconocidos. Debido a que tanto los dedos de cinc como los TALE ocurren en patrones repetidos, se pueden probar diferentes combinaciones para crear una amplia variedad de especificidades de secuencia. Los enfoques para fabricar endonucleasas de dedos de cinc específicas para el sitio incluyen, por ejemplo, ensamblaje modular (donde los dedos de cinc correlacionados con una secuencia de triplete se unen en una fila para cubrir la secuencia requerida), OPEN (selección de dominios peptídicos de baja rigurosidad frente a triplete de nucleótidos seguida de selecciones de alta rigurosidad de una combinación de péptidos frente a la diana final en sistemas bacterianos) y selección bacteriana de un híbrido de bibliotecas de dedos de cinc, entre otras. Los ZFN también se pueden diseñar y obtener comercialmente de, por ejemplo, Sangamo Biosciences™ (Richmond, CA).

En, por ejemplo, Reyon *et al.* Nature Biotechnology 2012 May; 30(5):460-5 se describen métodos para diseñar y obtener TALEN; Miller *et al.* Nat Biotechnol. (2011) 29: 143-148; Cermak *et al.* Nucleic Acids Research (2011) 39 (12): e82 y Zhang *et al.* Nature Biotechnology (2011) 29 (2): 149-53. Mayo Clinic presentó un programa basado en la web recientemente desarrollado llamado Mojo Hand para diseñar construcciones TAL y TALEN para aplicaciones de edición del genoma (se puede acceder a través de [www\(dot\)talendesign\(dot\)org](http://www.talendesign.org)). TALEN también se puede diseñar y obtener comercialmente de, por ejemplo, Sangamo Biosciences™ (Richmond, CA).

Sistema T-GEE (motor de edición del genoma de TargetGene): un complejo molecular de nucleoproteína programable que contiene una fracción polipeptídica y un ácido nucleico que confiere especificidad (SCNA) que se ensambla *in vivo*, en una célula diana y es capaz de interactuar con la secuencia de ácido nucleico diana predeterminada. El complejo molecular de nucleoproteína programable es capaz de modificar y/o editar específicamente un sitio diana dentro de la secuencia de ácido nucleico diana y/o modificar la función de la secuencia de ácido nucleico diana. La composición de nucleoproteína comprende (a) una molécula de polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico y que comprende (i) un dominio funcional capaz de modificar el sitio diana y (ii) un dominio de unión que es capaz de interactuar con un ácido nucleico que confiere especificidad y (b) ácido nucleico que confiere especificidad (SCNA) que comprende (i) una secuencia de nucleótidos complementaria a una región del ácido nucleico diana que flanquea el sitio diana y (ii) una región de reconocimiento capaz de unirse específicamente al dominio de unión del polipéptido. La composición permite modificar una secuencia de ácido nucleico predeterminada de manera precisa, de forma fiable y rentable con alta especificidad y capacidades de unión del complejo molecular al ácido nucleico diana a través del apareamiento de bases del ácido nucleico que confiere especificidad y un ácido nucleico diana. La composición es menos genotóxica, modular en su ensamblaje, utiliza una sola plataforma sin personalización, práctica para su uso independiente fuera de instalaciones centrales especializadas, y tiene un marco de tiempo de desarrollo más corto y costos reducidos.

Sistema CRISPR-Cas y todas sus variantes (también denominado en el presente documento "CRISPR"): muchas bacterias y arqueas contienen sistemas inmunitarios adaptativos basados en ARN endógeno que pueden degradar los ácidos nucleicos de los fagos y plásmidos invasores. Estos sistemas consisten en secuencias de nucleótidos de repeticiones palindrómicas cortas (CRISPR) agrupadas y regularmente interespaciadas que producen componentes de ARN y genes asociados a CRISPR (Cas) que codifican componentes de proteínas. Los ARN CRISPR (ARNcr) contienen tramos cortos de homología con el ADN de virus y plásmidos específicos y actúan como guías para dirigir las nucleasas Cas para degradar los ácidos nucleicos complementarios del patógeno correspondiente. Los estudios del sistema CRISPR/Cas tipo II de *Streptococcus pyogenes* han demostrado que tres componentes forman un complejo de ARN/proteína y juntos son suficientes para la actividad de nucleasa específica de secuencia: la nucleasa Cas9, un ARNcr que contiene 20 pares de bases de homología con la secuencia diana, y un ARNcr transactivador (traARNcr) (Jinek *et al.* Science (2012) 337: 816-821).

Se demostró además que un ARN guía quimérico sintético (ARNg) compuesto por una fusión entre ARNcr y traARNcr podría dirigir a Cas9 para escindir dianas de ADN que son complementarios al ARNcr *in vitro*. También se demostró que la expresión transitoria de Cas9 junto con ARNg sintéticos se puede usar para producir roturas de doble cadena (DSB) específicas en diversas especies diferentes (Cho *et al.*, 2013; Cong *et al.*, 2013; DiCarlo *et al.*, 2013; Hwang *et al.*, 2013a,b; Jinek *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013).

El sistema CRISPR/Cas para la edición del genoma contiene dos componentes distintos: un ARNg y una endonucleasa, por ejemplo, Cas9.

El ARNg (también denominado en el presente documento ARN guía corto (ARNgc)) suele ser una secuencia de 20 nucleótidos que codifica una combinación de la secuencia homóloga diana (ARNcr) y el ARN bacteriano endógeno que une el ARNcr con la nucleasa Cas9 (ARNtracr) en una sola transcripción quimérica. El complejo ARNg/Cas9 se recluta en la secuencia diana mediante el apareamiento de bases entre la secuencia de ARNg y el ADN genómico complementario. Para la unión exitosa de Cas9, la secuencia diana genómica también debe contener la secuencia del motivo adyacente protoespaciador (PAM) correcto inmediatamente después de la secuencia diana. La unión del complejo ARNg/Cas9 localiza Cas9 en la secuencia genómica diana para que Cas9 pueda cortar ambas cadenas del ADN provocando una rotura de doble cadena (DSB). Al igual que con ZFN y TALEN, las roturas de doble cadena (DSB) producidas por CRISPR/Cas pueden sufrir una recombinación homóloga o NHEJ y son susceptibles a una modificación de secuencia específica durante la reparación del ADN.

La nucleasa Cas9 tiene dos dominios funcionales: RuvC y HNH, cada uno cortando una cadena de ADN diferente. Cuando ambos dominios están activos, el Cas9 provoca roturas de doble cadena (DSB) en el ADN genómico.

Una ventaja significativa de CRISPR/Cas es que la alta eficiencia de este sistema se combina con la capacidad de crear fácilmente ARNg sintéticos. Esto crea un sistema que puede modificarse fácilmente para apuntar a modificaciones en diferentes sitios genómicos y/o para apuntar a diferentes modificaciones en el mismo sitio. Además, se han establecido protocolos que permiten el direccionamiento simultáneo de múltiples genes. La mayoría de las células portadoras de la mutación presentan mutaciones bialélicas en los genes diana.

Sin embargo, la aparente flexibilidad en las interacciones de apareamiento de bases entre la secuencia de ARNg y la secuencia diana de ADN genómico permite que Cas9 corte coincidencias imperfectas con la secuencia diana.

Versiones modificadas de la enzima Cas9 que contienen un solo dominio catalítico inactivo, ya sea RuvC- o HNH-, se llaman 'nickasas'. Con un solo dominio de nucleasa activo, la nickasa Cas9 corta solo una cadena del ADN diana, creando una rotura o "muesca" de una sola cadena. Una rotura o muesca de una sola cadena, se repara principalmente mediante un mecanismo de reparación de rotura de una sola cadena que implica proteínas tales como, entre otras, PARP (sensor) y complejo XRCC1/LIG III (ligadura). Si se genera una rotura de cadena única (SSB) por venenos de topoisomerasa I o por medicamentos que atrapan PARP1 en SSB naturales, entonces estos podrían persistir y cuando la célula entre en la fase S y la horquilla de replicación encuentre tales SSB, se convertirán en DSB de un solo extremo. que solo puede ser reparado por recursos humanos. Sin embargo, dos muescas de cadena opuestas proximales introducidas por una nickasa Cas9 se tratan como una rotura de doble cadena, en lo que a menudo se denomina un sistema CRISPR de "doble muesca". Una doble muesca, que es básicamente DSB no paralela, puede ser reparada como otras DSB mediante HR o NHEJ dependiendo del efecto deseado en el gen diana y la presencia de una secuencia donante y la etapa del ciclo celular (HR es de abundancia mucho menor y solo puede ocurrir en las etapas S y G2 del ciclo celular). Por lo tanto, si la especificidad y la reducción de los efectos fuera de la diana son cruciales, el uso de la nickasa Cas9 para crear una muesca doble mediante el diseño de dos ARNg con secuencias diana muy próximas y en cadenas opuestas del ADN genómico disminuiría el efecto fuera de la diana, ya que el ARNg por sí solo producirá muescas que probablemente no cambien el ADN genómico, aunque estos eventos no son imposibles.

Las versiones modificadas de la enzima Cas9 que contienen dos dominios catalíticos inactivos (Cas9 muerto o dCas9) no tienen actividad de nucleasa y aún pueden unirse al ADN en función de la especificidad del ARNg. El dCas9 se puede utilizar como una plataforma para que los reguladores transcripcionales de ADN activen o repriman la expresión génica al fusionar la enzima inactiva con dominios reguladores conocidos. Por ejemplo, la unión de dCas9 solo a una secuencia diana en el ADN genómico puede interferir con la transcripción génica.

Hay una serie de herramientas disponibles públicamente para ayudar a elegir y/o diseñar secuencias diana, así como listas de ARNg únicos determinados bioinformáticamente para diferentes genes en diferentes especies, tales como, pero sin limitación, el Feng Zhang lab's Target Finder, el Michael Boutros lab's Target Finder (E-CRISP), las herramientas RGEN: Cas-OFFinder, el CasFinder: El algoritmo flexible para identificar dianas Cas9 específicas en genomas y el CRISPR Optimal Target Finder.

Para utilizar el sistema CRISPR, tanto el ARNg como una endonucleasa Cas (por ejemplo, Cas9) deben expresarse o estar presentes (por ejemplo, como un complejo de ribonucleoproteína) en una célula diana. El vector de inserción puede contener ambos casetes en un solo plásmido o los casetes se expresan a partir de dos plásmidos separados. Los plásmidos CRISPR están disponibles comercialmente, tal como el plásmido px330 de Addgene (75 Sidney St, Suite 550A • Cambridge, MA 02139). El uso de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interesparadas (CRISPR) asociadas a la tecnología de ARN guía (Cas) y una endonucleasa Cas para modificar genomas de plantas también son al menos desvelados por Svitashv *et al.*, 2015, Plant Physiology, 169 (2): 931-945; Kumar y Jain, 2015, J Exp Bot 66: 47-57; y la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 20150082478. Las endonucleasas cas que se pueden usar para efectuar la edición de ADN con ARNg incluyen, pero sin limitación, Cas9, Cpf1 (Zetsche *et al.*, 2015, Cell. 163(3):759-71), C2c1, C2c2 y C2c3 (Shmakov *et al.*, Mol Cell. 2015 Nov 5;60(3):385-97).

De acuerdo con una realización específica, el CRISPR comprende un ARN de guía corto (ARNgc) que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-4 o SEQ ID NO: 235-366.

"Hit and run" o "in-out": implica un procedimiento de recombinación de dos etapas. En la primera etapa, se usa un vector de tipo inserción que contiene un casete de marcador seleccionable doble positivo/negativo para introducir la alteración de secuencia deseada. El vector de inserción contiene una sola región continua de homología con el locus diana y se modifica para llevar la mutación de interés. Esta construcción dirigida se linealiza con una enzima de restricción en un sitio dentro de la región de homología, se introduce en las células y se realiza una selección positiva para aislar eventos mediados por recombinación homóloga. El ADN que lleva la secuencia homóloga se puede proporcionar como un plásmido, oligos monocatenarios o bicatenarios. Estos recombinantes homólogos contienen una duplicación local que está separada por la secuencia del vector que interviene, incluido el casete de selección. En la segunda etapa, los clones seleccionados se someten a selección negativa para identificar las células que han perdido el casete de selección a través de la recombinación intracromosómica entre las secuencias duplicadas. El evento de recombinación local elimina la duplicación y, dependiendo del sitio de recombinación, el alelo retiene la mutación introducida o vuelve al tipo salvaje. El resultado final es la introducción de la modificación deseada sin la retención de ninguna secuencia exógena.

La estrategia de "reemplazo doble" o "etiquetar e intercambiar" implica un procedimiento de selección de dos etapas similar al enfoque de *hit and run*, pero requiere el uso de dos construcciones de orientación diferentes. En la primera etapa, se utiliza un vector de orientación estándar con brazos de homología de 3' y 5' para insertar un doble casete seleccionable positivo/negativo cerca del lugar donde se va a introducir la mutación. Después de que los componentes

del sistema se hayan introducido en la célula y se haya aplicado la selección positiva, podrían identificarse eventos mediados por HR. A continuación, se introduce un segundo vector de dirección que contiene una región de homología con la mutación deseada en los clones seleccionados y se aplica selección negativa para eliminar el casete de selección e introducir la mutación. El alelo final contiene la mutación deseada mientras elimina las secuencias exógenas no deseadas.

De acuerdo con una realización específica, el agente de edición de ADN comprende un módulo de selección de ADN (por ejemplo, ARNg).

De acuerdo con una realización específica, el agente de edición de ADN no comprende una endonucleasa.

De acuerdo con una realización específica, el agente de edición de ADN comprende una nucleasa (por ejemplo, una endonucleasa) y un módulo de selección de ADN (por ejemplo, ARNg).

De acuerdo con una realización específica, el agente de edición de ADN es CRISPR/Cas, por ejemplo, ARNg y Cas9.

De acuerdo con una realización específica, el agente de edición de ADN es TALEN.

De acuerdo con una realización específica, el agente de edición de ADN es ZFN.

De acuerdo con una realización específica, el agente de edición de ADN es meganucleasa.

De acuerdo con una realización, el agente de edición de ADN está unido a un indicador para controlar la expresión en una célula vegetal.

De acuerdo con una realización, el indicador es una proteína indicadora fluorescente.

La expresión "una proteína fluorescente" se refiere a un polipéptido que emite fluorescencia y normalmente es detectable por citometría de flujo, microscopia o cualquier sistema de imágenes fluorescentes, por lo tanto, puede usarse como base para la selección de células que expresan dicha proteína.

Los ejemplos de proteínas fluorescentes que se pueden utilizar como indicadores son, pero sin limitación, la proteína fluorescente verde (GFP), la proteína fluorescente azul (BFP) y las proteínas fluorescentes rojas (por ejemplo, dsRed, mCherry, RFP). Una lista no limitativa de indicadores fluorescentes u otros incluye proteínas detectables por luminiscencia (por ejemplo, luciferasa) o ensayo colorimétrico (por ejemplo, GUS). De acuerdo con una realización específica, el indicador fluorescente es una proteína fluorescente roja (por ejemplo, dsRed, mCherry, RFP) o GFP.

Se puede encontrar una revisión de las nuevas clases de proteínas fluorescentes y sus aplicaciones en Trends in Biochemical Sciences [Rodríguez, Erik A.; Campbell, Robert E.; Lin, John Y.; Lin, Michael Z.; Miyawaki, Atsushi; Palmer, Amy E.; Shu, Xiao-kun; Zhang, Jin; Tsien, Roger Y. "The Growing and Glowing Toolbox of Fluorescent and Photoactive Proteins". Trends in Biochemical Sciences. doi:10.1016/j.tibs.2016.09.010].

De acuerdo con otra realización, el indicador es un gen endógeno de una planta. Un indicador de ejemplo es el gen de la fitoeno desaturasa (PDS3) que codifica una de las enzimas importantes en la ruta de biosíntesis de carotenoides. Su silenciamiento produce un fenotipo albino/blanqueado. En consecuencia, las plantas con expresión reducida de PDS3 exhiben niveles reducidos de clorofila, hasta albino completo y enanismo. Los genes adicionales que se pueden usar de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen, pero sin limitación, genes que intervienen en la protección de cultivos. Los genes de ejemplo se describen en la Tabla 1B, a continuación.

De acuerdo con otra realización, el indicador es un marcador de selección de antibióticos. Los ejemplos de marcadores de selección de antibióticos que pueden usarse como indicadores son, pero sin limitación, neomicina fosfotransferasa II (nptII) e higromicina fosfotransferasa (hpt). Los genes marcadores adicionales que se pueden usar de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen, pero sin limitación, genes de resistencia a gentamicina acetiltransferasa (accC3) y resistencia a bleomicina y fleomicina.

Se apreciará que la enzima NPTII inactiva por fosforilación una serie de antibióticos aminoglucósidos, tales como kanamicina, neomicina, geneticina (o G418) y paromomicina. De estos, kanamicina, neomicina y paromomicina se utilizan en una amplia gama de especies de plantas.

De acuerdo con otra realización, el indicador es un marcador de selección tóxico. Un marcador de selección tóxico de ejemplo que se puede utilizar como indicador es, pero sin limitación, selección de alcohol alílico utilizando el gen de la alcohol deshidrogenasa (ADH1). ADH1, que comprende un grupo de enzimas deshidrogenasas que catalizan la interconversión entre alcoholes y aldehídos o cetonas con la reducción concomitante de NAD⁺ o NADP⁺, descompone las sustancias tóxicas alcohólicas dentro de los tejidos. Las plantas que albergan una expresión reducida de ADH1 exhiben una mayor tolerancia al alcohol alílico. En consecuencia, las plantas con *ADH1* reducida son resistentes al efecto tóxico del alcohol alílico.

Independientemente del agente de edición de ADN utilizado, el método de la invención se emplea de manera que el gen que codifica la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, la molécula silenciadora de ARN) se modifica mediante al menos una delección, una inserción o una mutación puntual.

5 De acuerdo con una realización, la modificación está en una región estructurada de la molécula silenciadora de ARN.

De acuerdo con una realización, la modificación está en una región de tallo de la molécula silenciadora de ARN.

10 De acuerdo con una realización, la modificación está en una región de bucle de la molécula silenciadora de ARN.

De acuerdo con una realización, la modificación está en una región de tallo y una región de bucle de la molécula silenciadora de ARN.

15 De acuerdo con una realización, la modificación está en una región no estructurada de la molécula silenciadora de ARN.

De acuerdo con una realización, la modificación está en una región de tallo y una región de bucle y en la región no estructurada de la molécula silenciadora de ARN.

20 De acuerdo con una realización específica, la modificación comprende una modificación de aproximadamente 10-250 nucleótidos, aproximadamente 10-200 nucleótidos, aproximadamente 10-150 nucleótidos, aproximadamente 10-100 nucleótidos, aproximadamente 10-50 nucleótidos, aproximadamente 1-50 nucleótidos, aproximadamente 1-10 nucleótidos, aproximadamente 50-150 nucleótidos, aproximadamente 50-100 nucleótidos o aproximadamente 100-250 nucleótidos (en comparación con la molécula de ARN no codificante nativa, por ejemplo, molécula silenciadora de ARN).

30 De acuerdo con una realización, la modificación comprende una modificación de como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 o como máximo 250 nucleótidos (en comparación con la molécula de ARN no codificante nativa, por ejemplo, molécula silenciadora de ARN).

35 De acuerdo con una realización, la modificación puede estar en una secuencia de ácido nucleico consecutiva (por ejemplo, al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200 bases).

De acuerdo con una realización, la modificación puede ser de manera no consecutiva, por ejemplo, a lo largo de una secuencia de 20, 50, 100, 150, 200, 500, 1000 ácidos nucleicos.

40 De acuerdo con una realización específica, la modificación comprende una modificación de, como máximo, 200 nucleótidos.

De acuerdo con una realización específica, la modificación comprende una modificación de, como máximo, 150 nucleótidos.

45 De acuerdo con una realización específica, la modificación comprende una modificación de, como máximo, 100 nucleótidos.

De acuerdo con una realización específica, la modificación comprende una modificación de, como máximo, 50 nucleótidos.

50 De acuerdo con una realización específica, la modificación comprende una modificación de, como máximo, 25 nucleótidos.

55 De acuerdo con una realización específica, la modificación comprende una modificación de, como máximo, 20 nucleótidos.

De acuerdo con una realización específica, la modificación comprende una modificación de, como máximo, 15 nucleótidos.

60 De acuerdo con una realización específica, la modificación comprende una modificación de, como máximo, 10 nucleótidos.

De acuerdo con una realización específica, la modificación comprende una modificación de, como máximo, 5 nucleótidos.

65 De acuerdo con una realización, la modificación depende de la estructura de la molécula silenciadora de ARN.

- En consecuencia, cuando la molécula silenciadora de ARN contiene una estructura no esencial (es decir, una estructura secundaria de la molécula silenciadora de ARN que no desempeña un papel en su biogénesis y/o función adecuadas) o es puramente ARNbc (es decir, la molécula silenciadora de ARN que tiene una estructura perfecta o ARNbc casi perfecto), algunas modificaciones (por ejemplo, 20-30 nucleótidos, por ejemplo, 1-10 nucleótidos, por ejemplo, 5 nucleótidos) se introducen para redirigir la especificidad de silencio de la molécula silenciadora de ARN.
- De acuerdo con otra realización, cuando la molécula silenciadora de ARN tiene una estructura esencial (es decir, la biogénesis adecuada y/o la actividad de la molécula silenciadora de ARN depende de su estructura secundaria), modificaciones más grandes (por ejemplo, 10-200 nucleótidos, por ejemplo, 50-150 nucleótidos, por ejemplo, más de 30 nucleótidos y no más de 200 nucleótidos, 30-200 nucleótidos, 35-200 nucleótidos, 35-150 nucleótidos, 35-100 nucleótidos) se introducen para redirigir la especificidad de silencio de la molécula silenciadora de ARN.
- De acuerdo con una realización, la modificación es tal que el motivo de reconocimiento/sitio de corte/PAM de la molécula silenciadora de ARN se modifica para abolir el sitio de reconocimiento de PAM original.
- De acuerdo con una realización específica, la modificación está en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más ácidos nucleicos en un motivo PAM.
- De acuerdo con una realización, la modificación comprende una inserción.
- De acuerdo con una realización específica, la inserción comprende una inserción de aproximadamente 10-250 nucleótidos, aproximadamente 10-200 nucleótidos, aproximadamente 10-150 nucleótidos, aproximadamente 10-100 nucleótidos, aproximadamente 10-50 nucleótidos, aproximadamente 1-50 nucleótidos, aproximadamente 1-10 nucleótidos, aproximadamente 50-150 nucleótidos, aproximadamente 50-100 nucleótidos o aproximadamente 100-200 nucleótidos (en comparación con la molécula de ARN no codificante nativa, por ejemplo, molécula silenciadora de ARN).
- De acuerdo con una realización, la inserción comprende una inserción de como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 o como máximo 250 nucleótidos (en comparación con la molécula de ARN no codificante nativa, por ejemplo, molécula silenciadora de ARN).
- De acuerdo con una realización específica, la inserción comprende una inserción de como máximo 200 nucleótidos.
- De acuerdo con una realización específica, la inserción comprende una inserción de como máximo 150 nucleótidos.
- De acuerdo con una realización específica, la inserción comprende una inserción de como máximo 100 nucleótidos.
- De acuerdo con una realización específica, la inserción comprende una inserción de como máximo 50 nucleótidos.
- De acuerdo con una realización específica, la inserción comprende una inserción de como máximo 25 nucleótidos.
- De acuerdo con una realización específica, la inserción comprende una inserción de como máximo 20 nucleótidos.
- De acuerdo con una realización específica, la inserción comprende una inserción de como máximo 15 nucleótidos.
- De acuerdo con una realización específica, la inserción comprende una inserción de como máximo 10 nucleótidos.
- De acuerdo con una realización específica, la inserción comprende una inserción de como máximo 5 nucleótidos.
- De acuerdo con una realización, la modificación comprende una delección.
- De acuerdo con una realización específica, la delección comprende una delección de aproximadamente 10-250 nucleótidos, aproximadamente 10-200 nucleótidos, aproximadamente 10-150 nucleótidos, aproximadamente 10-100 nucleótidos, aproximadamente 10-50 nucleótidos, aproximadamente 1-50 nucleótidos, aproximadamente 1-10 nucleótidos, aproximadamente 50-150 nucleótidos, aproximadamente 50-100 nucleótidos o aproximadamente 100-200 nucleótidos (en comparación con la molécula de ARN no codificante nativa, por ejemplo, molécula silenciadora de ARN).
- De acuerdo con una realización, la delección comprende una delección de como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 o como máximo 250 nucleótidos (en comparación con la molécula de ARN no codificante nativa, por ejemplo, molécula silenciadora de ARN).
- De acuerdo con una realización específica, la delección comprende una delección de como máximo 200 nucleótidos.

- De acuerdo con una realización específica, la delección comprende una delección de como máximo 150 nucleótidos.
- De acuerdo con una realización específica, la delección comprende una delección de como máximo 100 nucleótidos.
- 5 De acuerdo con una realización específica, la delección comprende una delección de como máximo 50 nucleótidos.
- De acuerdo con una realización específica, la delección comprende una delección de como máximo 25 nucleótidos.
- 10 De acuerdo con una realización específica, la delección comprende una delección de como máximo 20 nucleótidos.
- De acuerdo con una realización específica, la delección comprende una delección de como máximo 15 nucleótidos.
- De acuerdo con una realización específica, la delección comprende una delección de como máximo 10 nucleótidos.
- 15 De acuerdo con una realización específica, la delección comprende una delección de como máximo 5 nucleótidos.
- De acuerdo con una realización, la modificación comprende una mutación puntual.
- 20 De acuerdo con una realización específica, la mutación puntual comprende una mutación puntual de aproximadamente 10-250 nucleótidos, aproximadamente 10-200 nucleótidos, aproximadamente 10-150 nucleótidos, aproximadamente 10-100 nucleótidos, aproximadamente 10-50 nucleótidos, aproximadamente 1-50 nucleótidos, aproximadamente 1-10 nucleótidos, aproximadamente 50-150 nucleótidos, aproximadamente 50-100 nucleótidos o aproximadamente 100-200 nucleótidos (en comparación con la molécula de ARN no codificante nativa, por ejemplo, molécula silenciadora de ARN).
- 25 De acuerdo con una realización, la mutación puntual comprende una mutación puntual en como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 o como máximo 250 nucleótidos (en comparación con la molécula de ARN no codificante nativa, por ejemplo, molécula silenciadora de ARN).
- 30 De acuerdo con una realización específica, la mutación puntual comprende una mutación puntual en un máximo de 200 nucleótidos.
- 35 De acuerdo con una realización específica, la mutación puntual comprende una mutación puntual en un máximo de 150 nucleótidos.
- De acuerdo con una realización específica, la mutación puntual comprende una mutación puntual en un máximo de 100 nucleótidos.
- 40 De acuerdo con una realización específica, la mutación puntual comprende una mutación puntual en un máximo de 50 nucleótidos.
- De acuerdo con una realización específica, la mutación puntual comprende una mutación puntual en un máximo de 25 nucleótidos.
- 45 De acuerdo con una realización específica, la mutación puntual comprende una mutación puntual en un máximo de 20 nucleótidos.
- De acuerdo con una realización específica, la mutación puntual comprende una mutación puntual en un máximo de 15 nucleótidos.
- 50 De acuerdo con una realización específica, la mutación puntual comprende una mutación puntual en un máximo de 10 nucleótidos.
- De acuerdo con una realización específica, la mutación puntual comprende una mutación puntual en un máximo de 5 nucleótidos.
- 55 De acuerdo con una realización, la modificación comprende una combinación de cualquiera de una delección, una inserción y/o una mutación puntual.
- 60 De acuerdo con una realización, la modificación comprende el reemplazo de nucleótidos (por ejemplo, intercambio de nucleótidos).
- 65 De acuerdo con una realización específica, el intercambio comprende el intercambio de aproximadamente 10-250 nucleótidos, aproximadamente 10-200 nucleótidos, aproximadamente 10-150 nucleótidos, aproximadamente 10-100

nucleótidos, aproximadamente 10-50 nucleótidos, aproximadamente 1-50 nucleótidos, aproximadamente 1-10 nucleótidos, aproximadamente 50-150 nucleótidos, aproximadamente 50-100 nucleótidos o aproximadamente 100-200 nucleótidos (en comparación con la molécula de ARN no codificante nativa, por ejemplo, molécula silenciadora de ARN).

5 De acuerdo con una realización, el intercambio de nucleótidos comprende un reemplazo de nucleótidos en como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 o como máximo 250 nucleótidos (en comparación con la molécula de ARN no codificante nativa, por ejemplo, molécula silenciadora de ARN).

10 De acuerdo con una realización específica, el intercambio de nucleótidos comprende un reemplazo de nucleótidos en un máximo de 200 nucleótidos.

15 De acuerdo con una realización específica, el intercambio de nucleótidos comprende un reemplazo de nucleótidos en un máximo de 150 nucleótidos.

De acuerdo con una realización específica, el intercambio de nucleótidos comprende un reemplazo de nucleótidos en un máximo de 100 nucleótidos.

20 De acuerdo con una realización específica, el intercambio de nucleótidos comprende un reemplazo de nucleótidos en un máximo de 50 nucleótidos.

De acuerdo con una realización específica, el intercambio de nucleótidos comprende un reemplazo de nucleótidos en un máximo de 25 nucleótidos.

25 De acuerdo con una realización específica, el intercambio de nucleótidos comprende un reemplazo de nucleótidos en un máximo de 20 nucleótidos.

30 De acuerdo con una realización específica, el intercambio de nucleótidos comprende un reemplazo de nucleótidos en un máximo de 15 nucleótidos.

De acuerdo con una realización específica, el intercambio de nucleótidos comprende un reemplazo de nucleótidos en un máximo de 10 nucleótidos.

35 De acuerdo con una realización específica, el intercambio de nucleótidos comprende un reemplazo de nucleótidos en un máximo de 5 nucleótidos.

40 De acuerdo con una realización, el gen que codifica la molécula silenciadora de ARN se modifica intercambiando una secuencia de una molécula silenciadora de ARN endógena (por ejemplo, miARN) con una secuencia silenciadora de ARN de elección (por ejemplo, ARNpi).

45 De acuerdo con una realización específica, la secuencia de un ARNpi utilizado para el intercambio de genes de una molécula silenciadora de ARN endógeno (por ejemplo, miARN) que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5-12 o SEQ ID NO: 103-234.

De acuerdo con una realización, la cadena guía de la molécula silenciadora de ARN, tal como los precursores de miARN (pri/pre-miARN) o los precursores de ARNpi (ARNbc), se modifica para preservar la originalidad de la estructura y mantener el mismo perfil de apareamiento de bases.

50 De acuerdo con una realización, la cadena pasajera de la molécula silenciadora de ARN, tal como los precursores de miARN (pri/pre-miARN) o los precursores de ARNpi (ARNbc), se modifica para preservar la originalidad de la estructura y mantener el mismo perfil de apareamiento de bases.

55 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "originalidad de la estructura" se refiere a la estructura del ARN secundario (es decir, perfil de apareamiento de bases). Mantener la originalidad de la estructura es importante para una biogénesis/procesamiento correcto y eficiente del ARN no codificante

(por ejemplo, molécula silenciadora de ARN como ARNpi o miARN) que depende de la estructura y no puramente de la secuencia.

60 De acuerdo con una realización, la molécula silenciadora de ARN se modifica en la cadena guía (cadena silenciadora) para que comprenda aproximadamente un 50 - 100 % de complementariedad con el ARN diana (como se ha tratado anteriormente), mientras que la cadena pasajera se modifica para preservar la estructura de ARN no codificante original (sin modificar).

65 De acuerdo con una realización, la molécula silenciadora de ARN se modifica de manera que la secuencia inicial (por

ejemplo, para los nucleótidos de miARN 2-8 desde el extremo 5') sea complementaria a la secuencia diana.

De acuerdo con una realización específica, la molécula silenciadora de ARN (es decir, la molécula de ARNi) está diseñada de manera que una secuencia de la molécula de ARNi se modifica para preservar la originalidad de la estructura y para ser reconocida por los factores de procesamiento y ejecución de ARNi celular.

El agente de edición de ADN usado de acuerdo con la invención puede introducirse en células vegetales usando métodos de liberación de ADN (por ejemplo, mediante vectores de expresión) o usando métodos libres de ADN.

De acuerdo con una realización, el ARNg (o cualquier otro módulo de reconocimiento de ADN utilizado, dependiendo del sistema de edición de ADN que se utilice) se puede proporcionar como ARN a la célula.

Por lo tanto, se apreciará que las presentes técnicas se refieren a la introducción del agente de edición de ADN utilizando métodos libres de ADN o ADN transitorio, tal como la transfección de ARN (por ejemplo, transfección de ARNm + ARNg) o la transfección de ribonucleoproteína (RNP) (por ejemplo, transfección del complejo proteína-ARN, por ejemplo, transfección del complejo de ribonucleoproteína (RNP) Cas9/ARNg).

Por ejemplo, Cas9 se puede introducir como un plásmido de expresión de ADN, transcrito *in vitro* (es decir, ARN), o como una proteína recombinante unida a la porción de ARN en una partícula de ribonucleoproteína (RNP). El ARNg, por ejemplo, puede administrarse como un plásmido de ADN o como un transcrito *in vitro* (es decir, ARN).

Cualquier método conocido en la técnica para la transfección de ARN o RNP se puede utilizar de acuerdo con las presentes enseñanzas, tales como, pero, sin limitaciones, microinyección [según lo descrito por Cho *et al.*, "Heritable gene knockout in *Caenorhabditis elegans* by direct injection of Cas9-sgRNA ribonucleoproteins", *Genetics* (2013) 195:1177-1180], electroporación [según lo descrito por Kim *et al.*, "Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins" *Genome Res.* (2014) 24:1012-1019], o transfección mediada por lípidos, por ejemplo, usando liposomas [como se describe en Zuris *et al.*, "Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*" *Nat Biotechnol.* (2014) doi: 10.1038/nbt.3081]. Otros métodos de transfección de ARN se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20160289675.

Una ventaja de los métodos de transfección de ARN descritos en el presente documento es que la transfección de ARN es esencialmente transitoria y libre de vectores. Un transgén de ARN puede administrarse a una célula y expresarse en ella, como un casete de expresión mínima sin necesidad de ninguna secuencia adicional (por ejemplo, secuencias de virus).

De acuerdo con una realización, el agente de edición de ADN usado de acuerdo con la invención se introduce en la célula vegetal usando vectores de expresión.

El "vector de expresión" (también denominado en el presente documento como "una construcción de ácido nucleico", "vector" o "construcción") utilizado de acuerdo con algunas realizaciones de la invención incluye secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación en procariotas, eucariotas, o preferentemente ambos (por ejemplo, vectores lanzadera).

Las construcciones útiles en los métodos de acuerdo con algunas realizaciones de la invención pueden construirse usando tecnología de ADN recombinante bien conocida por los expertos en la técnica. Las secuencias de ácido nucleico pueden insertarse en vectores, que pueden estar disponibles en el mercado, adecuados para la transformación en plantas y adecuado para la expresión transitoria del gen de interés en las células transformadas. La construcción genética puede ser un vector de expresión en el que la secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a una o más secuencias reguladoras que permiten la expresión en las células vegetales.

De acuerdo con una realización, para expresar un agente de edición de ADN funcional, en los casos en que el módulo de escisión (nucleasa) no sea una parte integral de la unidad de reconocimiento de ADN, el vector de expresión puede codificar el módulo de escisión así como la unidad de reconocimiento de ADN (por ejemplo, ARNg en el caso de CRISPR/Cas).

Como alternativa, el módulo de escisión (nucleasa) y la unidad de reconocimiento de ADN (por ejemplo, ARNg) pueden clonarse en vectores de expresión separados. En tal caso, al menos dos vectores de expresión diferentes deben transformarse en la misma célula vegetal.

Como alternativa, cuando no se utiliza una nucleasa (es decir, no se administra desde una fuente exógena a la célula), la unidad de reconocimiento de ADN (por ejemplo, ARNg) puede clonarse y expresarse utilizando un solo vector de expresión.

Los vectores de expresión típicos también pueden contener una secuencia de iniciación de la transcripción y la traducción, terminador de transcripción y traducción y, opcionalmente, una señal de poliadenilación.

De acuerdo con una realización, el agente de edición de ADN comprende un agente de ácido nucleico que codifica al menos una unidad de reconocimiento de ADN (por ejemplo, ARNg) unida operativamente a un elemento regulador que actúa en cis activo en células vegetales (por ejemplo, promotor).

De acuerdo con una realización, la nucleasa (por ejemplo, endonucleasa) y la unidad de reconocimiento de ADN (por ejemplo, ARNg) se codifican a partir del mismo vector de expresión. Tal vector puede comprender un solo elemento regulador que actúa en cis activo en células vegetales (por ejemplo, promotor) para la expresión tanto de la nucleasa como de la unidad de reconocimiento de ADN. Como alternativa, la nucleasa y la unidad de reconocimiento de ADN pueden estar unidas operativamente cada una a un elemento regulador que actúa en cis activo en células vegetales (por ejemplo, promotor).

De acuerdo con una realización, la nucleasa (por ejemplo, endonucleasa) y la unidad de reconocimiento de ADN (por ejemplo, ARNg) se codifican a partir de diferentes vectores de expresión, por lo que cada uno se une operativamente a un elemento regulador que actúa en cis activo en células vegetales (por ejemplo, promotor).

Como se usa en el presente documento, la expresión "expresable en plantas" o "activo en células vegetales" se refiere a una secuencia promotora, incluyendo cualquier elemento regulador adicional añadido a la misma o contenido en la misma, que es al menos capaz de inducir, conferir, activar o potenciar la expresión en una célula vegetal, tejido u órgano, preferentemente, una célula vegetal monocotiledónea o dicotiledónea, tejido u órgano.

El promotor vegetal empleado puede ser un promotor constitutivo, un promotor específico del tejido, un promotor inducible, un promotor quimérico o un promotor regulado por el desarrollo.

Se presentan ejemplos de promotores preferidos útiles para los métodos de algunas realizaciones de la invención se presentan en la tabla I, II, III y IV.

Tabla I: Promotores constitutivos ilustrativos para su uso en la ejecución de algunas realizaciones de la invención

Fuente del gen	Patrón de expresión	Referencia
Actina	constitutivo	McElroy <i>et al</i> , Plant Cell, 2: 163-171, 1990
CAMV 35S	constitutivo	Odell <i>et al</i> , Nature, 313: 810-812, 1985
CaMV 19S	constitutivo	Nilsson <i>et al.</i> , Physiol. Plant 100:456-462, 1997
GOS2	constitutivo	de Pater <i>et al</i> , Plant J Nov; 2(6):837-44, 1992
ubiquitina	constitutivo	Christensen <i>et al</i> , Plant Mol. Biol. 18: 675-689, 1992
Ciclofilina de arroz	constitutivo	Bucholz <i>et al</i> , Planta Mol Biol. 25(5):837-43, 1994
Histona H3 de maíz	constitutivo	Lepetit <i>et al</i> , Mol. Gen. Genet. 231: 276-285, 1992
Actina 2	constitutivo	An <i>et al</i> , Plant J. 10(1):107121, 1996
CVMV (Cassava Vein Mosai Virus)	constitutivo	Lawrenson <i>et al</i> , Gen Biol 16:258, 2015
U6 (AtU626; TaU6)	constitutivo	Lawrenson <i>et al</i> , Gen Biol 16:258, 2015

Tabla II

Promotores preferidos en semillas ilustrativos para su uso en la ejecución de algunas realizaciones de la invención		
Fuente del gen	Patrón de expresión	Referencia
Genes específicos de semillas	semilla	Simon, <i>et al.</i> , Plant Mol. Biol. 5. 191, 1985; Scofield, <i>et al.</i> , J. Biol. Chem. 262: 12202, 1987; Baszczynski, <i>et al.</i> , Plant Mol. Biol. 14: 633, 1990.
Albúmina de nuez de Brasil	semilla	Pearson' <i>et al.</i> , Plant Mol. Biol. 18: 235-245, 1992.
legumbre	semilla	Ellis, <i>et al</i> . Plant Mol. Biol. 10: 203-214, 1988
Glutelina (arroz)	semilla	Takaiwa, <i>et al.</i> , Mol. Gen. Genet. 208: 15-22, 1986; Takaiwa, <i>et al.</i> , FEBS Letts. 22 43-47, 1987
Zeína	semilla	Matzke <i>et al</i> Plant Mol Biol, 143).323-32 1990
napA	semilla	Stalberg, <i>et al</i> , Planta 199: 515-519, 1996
glutenina-1 de trigo de BPM y APM	endospermo	Mol Gen Genet 216:81-90, 1989; NAR 17: 461-2,
SPA de trigo	semilla	Albani <i>et al</i> , Plant Cell, 9: 171- 184, 1997
gliadinas a, b y g de trigo	endospermo	EMB03:1409-15, 1984

(continuación)

Promotores preferidos en semillas ilustrativos para su uso en la ejecución de algunas realizaciones de la invención		
Fuente del gen	Patrón de expresión	Referencia
Promotor ltrI de cebada	endospermo	
BI de cebada, hordeína C, D	endospermo	Theor Appl Gen 98:1253-62, 1999; Plant 4:343-55, 1993; Mol Gen Genet 250:750-60, 1996
DOF de cebada	endospermo	Mena <i>et al</i> , The Plant Journal, 116(1): 53-62, 1998
Biz2	endospermo	EP99106056.7
Promotor sintético	endospermo	Vicente-Carbajosa <i>et al.</i> , Plant J. 13: 629-640, 1998
prolamina de arroz NRP33	endospermo	Wu <i>et al</i> , Plant Cell Physiology 39(8) 885-889, 1998
globulina de arroz G1b-1	endospermo	Wu <i>et al</i> , Plant Cell Physiology 39(8) 885-889, 1998
OSH1 de arroz	embrión	Sato <i>et al</i> , Proc. Nati. Acad. Sci. EE.UU., 93: 8117-8122
alfa-globulina de arroz REB/OHP-1	endospermo	Nakase <i>et al</i> . Plant Mol. Biol. 33: 513-S22, 1997
ADP-glucosa de arroz PP	endospermo	Trans Res 6:157-68, 1997
familia de genes ESR de maíz	endospermo	Plant J 12:235-46, 1997
gamma-kafirina de sorgo	endospermo	PMB 32:1029-35, 1996
KNOX	embrión	Postma-Haarsma <i>et al</i> , Plant Mol. Biol. 39: 257-71, 1999
oleosina de arroz	Embrión y aleutón	Wu <i>et al</i> , J. Biochem., 123:386, 1998
oleosina de girasol	Semilla (embrión y semilla seca)	Cummins, <i>et al.</i> , Plant Mol. Biol. 19: 873-876, 1992

Tabla III

Promotores específicos de flor ilustrativos para su uso en la ejecución de la invención		
Fuente del gen	Patrón de expresión	Referencia
AtPRP4	flores	www(dot)salus(dot)medium(dot)edu/m mg/tiemey/html
chalcone sintasa (chsA)	flores	Van der Meer, <i>et al.</i> , Plant Mol. Biol. 15, 95-109, 1990.
LAT52	antera	Twel <i>et al</i> Mol. Gen Genet. 217:240-245 (1989)
apetala-3	flores	

Tabla IV

Promotores alternativos de arroz para su uso en la ejecución de la invención		
N.º PRO	Gen	Expresión
PR00001	Metalotioneína Mte	capa de transferencia de embrión + callos
PR00005	posible beta-amilasa	capa de transferencia de embrión
PR00009	Posible celulosa sintasa	Débil en las raíces
PR00012	lipasa (posible)	
PR00014	Transferasa (posible)	
PR00016	peptidil prolil cis-trans isomerasa (posible)	
PR00019	desconocido	
PR00020	proteína prp (posible)	
PR00029	nodulina (posible)	
PR00058	Inhibidor de proteinasa Rgpi9	semilla
PR00061	beta expansina EXPB9	Débil en flores jóvenes
PR00063	Proteína estructural	tejidos jóvenes + callos + embrión
PR00069	xilosidasa (posible)	
PR00075	Prolamina 10 Kda	fuerte en el endospermo
PR00076	alérgeno RA2	fuerte en el endospermo
PR00077	prolamina RP7	fuerte en el endospermo
PR00078	CBP80	
PR00079	enzima de ramificación de almidón I	
PR00080	ML2 de tipo metalotioneína	capa de transferencia de embrión + callos
PR00081	posible cafeoil-CoA 3-0 metiltransferasa	brote
PR00087	prolamina RM9	fuerte en el endospermo

(continuación)

Promotores alternativos de arroz para su uso en la ejecución de la invención		
N.º PRO	Gen	Expresión
PR00090	prolamina RP6	fuerte en el endospermo
PR00091	prolamina RP5	fuerte en el endospermo
PR00092	alérgeno RA5	
PR00095	posible metionina aminopeptidasa	embrión
PR00098	proteína de unión a GTP relacionada con ras	
PR00104	beta expansina EXPB 1	
PR00105	Proteína rica en glicina	
PR00108	Proteína de tipo metalotioneína (posible)	
PR00110	Raíz fuerte RCc3	
PR00111	proteína de tipo uclacianina 3	centro de discriminación débil meristemo de brote
PR00116	subunidad no ATPasa 11 de partículas reguladoras de proteasoma 26S	específico de meristemo muy débil
PR00117	posible proteína ribosómica 40S	débil en el endospermo
PR00122	precursor de la proteína de unión a clorofila a/lo (Cab27)	muy débil en brote
PR00123	posible protoclorofilida reductasa	Hojas fuertes
PR00126	metalotioneína RiCMT	centro de discriminación fuerte meristemo de brote
PR00129	GOS2	Constitutivo fuerte
PR00131	GOS9	
PR00133	quitinasa Cht-3	específico de meristemo muy débil
PR00135	alfaglobulina	Fuerte en el endospermo
PR00136	alanina aminotransferasa	Débil en el endospermo
PR00138	Ciclina A2	
PR00139	Ciclina D2	
PR00140	Ciclina D3	
PR00141	Ciclofilina 2	Brote y semilla
PR00146	sacarosa sintasa SS1 (cebada)	constitutivo medio
PR00147	inhibidor de tripsina ITR1 (cebada)	débil en el endospermo
PR00149	ubiquitina 2 con intrón	constitutivo fuerte
PR00151	WSI18	Embrión y tensión
PR00156	homólogo de HVA22 (posible)	
PR00157	EL2	
PR00169	acuaporina	constitutivo medio en plantas jóvenes
PR00170	Proteína de grupo de alta movilidad	Constitutivo fuerte
PR00171	proteína RGP 1 glicosilada reversiblemente	constitutivo débil
PR00173	MDH citosólico	brote
PR00175	RAB21	Embrión y tensión
PR00176	CDPK7	
PR00177	Cdc2-1	muy débil en meristemo
PR00197	sacarosa sintasa 3	
PR00198	OsVP1	
PR00200	OSH1	muy débil en meristemo de plantas jóvenes
PR00208	posible clorofilasa	
PR00210	OsNRT1	
PRO0211	EXP3	
PRO0216	transportador de fosfato OjPT1	
PRO0218	oleosina 18 kd	aleurona + embrión
PRO0219	ubiquitina 2 sin intrón	
PRO0220	RFL	
PRO0221	intrón delta de UBI de maíz	no detectado
PRO0223	glutelina-1	
PRO0224	fragmento de promotor de prolamina RP6	
PRO0225	4xABRE	
PRO0226	glutelina OSLUA3	
PRO0227	BLZ-2_corto (cebada)	
PRO0228	BLZ-2_largo (cebada)	

El promotor inducible es un promotor inducido en un tejido vegetal específico, por una etapa de desarrollo o por un estímulo específico, como condiciones de estrés que comprenden, por ejemplo, luz, temperatura, productos químicos, sequía, alta salinidad, choque osmótico, condiciones oxidantes o en caso de patogenicidad e incluyen, pero sin limitación, el promotor inducible por la luz derivado del gen *rbcS* del guisante, el promotor 5 del gen *rbcS* de la alfalfa, los promotores DRE, MYC y MYB activos en sequía; los promotores INT, INPS, *prxEa*, *Ha hsp17.7G4* y *RD21* activos en alta salinidad y estrés osmótico, y los promotores *hsr203J* y *str246C* activos en estrés patógeno.

De acuerdo con una realización, el promotor es un promotor inducible por patógenos. Estos promotores dirigen la expresión de genes en plantas después de la infección con un patógeno, tal como 10 bacterias, hongos, virus, nematodos e insectos. Dichos promotores incluyen los de proteínas relacionadas con la patogenia (proteínas PR), que se inducen después de la infección por un patógeno; por ejemplo, proteínas PR, proteínas SAR, beta-1,3-glucanasa, quitinasa, etc. Véase, por ejemplo, Redolfi *et al.* (1983) *Neth. J. Plant Pathol* 89:245-254; Uknes *et al.* (1992) *Plant Cell* 4:645-656; y Van Loon (1985) *Plant Mol. Virol.* 4: 111-116.

De acuerdo con una realización, cuando se usa más de un promotor en el vector de expresión, los promotores son idénticos (por ejemplo, todos idénticos, al menos dos idénticos).

De acuerdo con una realización, cuando se usa más de un promotor en el vector de expresión, los promotores son diferentes (por ejemplo, al menos dos son diferentes, todos son diferentes).

De acuerdo con una realización, el promotor en el vector de expresión incluye, pero sin limitación, *CaMV 35S*, 2x *CaMV 35S*, *CaMV 19S*, ubiquitina, *AtU626* o *TaU6*.

De acuerdo con una realización específica, el promotor en el vector de expresión comprende un promotor 35S.

De acuerdo con una realización específica, el promotor en el vector de expresión comprende un promotor U6.

Los vectores de expresión también pueden comprender secuencias de iniciación de la transcripción y la traducción, secuencias de terminación de transcripción y traducción y, opcionalmente, una señal de poliadenilación.

De acuerdo con una realización específica, el vector de expresión comprende una secuencia de terminación, tales como, pero sin limitación, una secuencia de terminación G7, una secuencia de terminación de *AtuNos* o una secuencia de terminación de *CaMV-35S*.

Las células vegetales pueden transformarse de manera estable o transitoria con las construcciones de ácido nucleico utilizadas de acuerdo con algunas realizaciones de la invención. En la transformación estable, la molécula de ácido nucleico utilizada de acuerdo con algunas realizaciones de la invención se integra en el genoma de la planta y como tal representa un rasgo heredado y estable. En la transformación transitoria, la molécula de ácido nucleico se expresa por la célula transformada pero no está integrada en el genoma y como tal representa un rasgo transitorio.

Existen diversos métodos para introducir genes extraños en plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Potrykus, I., *Annu. Rev. Plant. Physiol., Plant. Mol. Biol.* (1991) 42: 205-225; Shimamoto *et al.*, *Nature* (1989) 338:274-276).

Los principales métodos para provocar integración estable de ADN exógeno en ADN genómico de planta incluyen dos enfoques principales:

(i) Transferencia génica mediada por *Agrobacterium*: Klee *et al.* (1987) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38:467-486; Klee y Rogers en *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 6, *Molecular Biology of Plant Nuclear Genes*, eds. Schell, J. y Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) pág. 2-25; Gatenby, en *Plant Biotechnology*, eds. Kung, S. y Arntzen, C. J., Butterworth Publishers, Boston, Mass. (1989) pág. 93-112.

(ii) Captación directa de ADN: Paszkowski *et al.*, en *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 6, *Molecular Biology of Plant Nuclear Genes* eds. Schell, J. y Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) pág. 52-68; incluyendo métodos para captación directa de ADN en protoplastos, Toriyama, K. *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6: 1072-1074. Captación de ADN inducida por descarga eléctrica breve de células vegetales: Zhang *et al.* *Plant Cell Rep.* (1988) 7:379-384. Fromm *et al.* *Nature* (1986) 319: 791-793. Inyección de ADN en células o tejidos vegetales mediante bombardeo de partículas, Klein *et al.* *Bio/Technology* (1988) 6: 559-563; McCabe *et al.* *Bio/Technology* (1988) 6: 923-926; Sanford, *Physiol. Plant.* (1990) 79: 206-209; mediante el uso de sistemas de micropipetas: Neuhaus *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* (1987) 75: 30-36; Neuhaus y Spangenberg, *Physiol. Plant.* (1990) 79: 213-217; transformación con fibras de vidrio o filamentos de carburo de silicio de cultivos celulares, embriones o tejido calloso, patente de Estados Unidos n.º 5.464.765 o mediante la incubación directa de ADN con polen germinante, DeWet *et al.* en *Experimental Manipulation of Ovule Tissue*, eds. Chapman, G. P. y Mantell, S. H. y Daniels, W. Longman, Londres, (1985) pág. 197-209; y Ohta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83:715-719.

El sistema de *Agrobacterium* incluye el uso de vectores plasmídicos que contienen segmentos de ADN definidos que se integran en el ADN genómico de la planta. Los métodos de inoculación del tejido vegetal varían según la especie

de la planta y el sistema de administración de *Agrobacterium*. Un enfoque ampliamente usado es el procedimiento del disco de hoja que puede realizarse con cualquier explante tisular que proporcione una buena fuente para el inicio de la diferenciación de la planta completa. Horsch *et al.* en Plant Molecular Biology Manual A5, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988) pág. 1-9. Otro enfoque complementario emplea el sistema de suministro de *Agrobacterium* en combinación con infiltración al vacío. El sistema de *Agrobacterium* es especialmente viable en la creación de plantas dicotiledóneas transgénicas.

De acuerdo con una realización, se utiliza un método de expresión libre de agrobacterias para introducir genes extraños en las células vegetales. De acuerdo con una realización, el método de expresión libre de agrobacterias es transitorio. De acuerdo con una realización específica, se utiliza un método de bombardeo para introducir genes extraños en las células vegetales. De acuerdo con otra realización específica, el bombardeo de la raíz de una planta se utiliza para introducir genes extraños en las células vegetales. Un método de bombardeo de ejemplo que puede usarse de acuerdo con algunas realizaciones de la invención se analiza en la sección de ejemplos que sigue.

Por otra parte, se pueden usar varios kits de clonación o síntesis de genes de acuerdo con las enseñanzas de algunas realizaciones de la invención.

De acuerdo con una realización, la construcción de ácido nucleico es un vector binario. Los ejemplos de vectores binarios son pBIN19, pBI101, pBinAR, pGPTV, pCambia, pBIB-HYG, pBecks, pGreen o pPZP (Hajukiewicz, P. *et al.*, Plant Mol. Biol. 25, 989 (1994) y Hellens *et al.*, Trends in Plant Science 5, 446 (2000)).

Los ejemplos de otros vectores que se utilizarán en otros métodos de liberación de ADN (por ejemplo, transfección, electroporación, bombardeo, inoculación vírica como se analiza a continuación) son: pGE-ARNgc (Zhang *et al.* Nat. Comms. 2016 7:12697), pJIT163-Ubi-Cas9 (Wang *et al.* Nat. Biotechnol 2004 32, 947-951), pICH47742::2x35S-5'UTR-hCas9(STOP)-NOST (Belhan *et al.* Plant Methods 2013 11:9(1):39), pAHC25 (Christensen, A.H. y P.H. Quail, 1996. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. Transgenic Research 5: 213-218), pHBT-sGFP(S65T)-NOS (Sheen *et al.* Protein phosphatase activity is required for light-inducible gene expression in maize, EMBO J. 12 (9), 3497-3505 (1993).

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "oligonucleótidos donantes" u "oligos donantes" se refiere a nucleótidos exógenos, es decir, introducidos externamente en la célula vegetal para generar un cambio preciso en el genoma. De acuerdo con una realización, los oligonucleótidos donantes son sintéticos.

De acuerdo con una realización, los oligos donantes son oligos de ARN.

De acuerdo con una realización, los oligos donantes son oligos de ADN.

De acuerdo con una realización, los oligos donantes son oligos sintéticos.

De acuerdo con una realización, los oligonucleótidos donantes comprenden oligonucleótidos donantes monocatenarios (ODNmc).

De acuerdo con una realización, los oligonucleótidos donantes comprenden oligonucleótidos donantes bicatenarios (ODNbc).

De acuerdo con una realización, los oligonucleótidos donantes comprenden ADN bicatenario (ADNbc).

De acuerdo con una realización, los oligonucleótidos donantes comprenden dúplex de ADN-ARN bicatenario (dúplex de ADN-ARN).

De acuerdo con una realización, los oligonucleótidos donantes comprenden un híbrido de ADN-ARN bicatenario

De acuerdo con una realización, los oligonucleótidos donantes comprenden un híbrido de ADN-ARN monocatenario.

De acuerdo con una realización, los oligonucleótidos donantes comprenden ADN monocatenario (ADNmc).

De acuerdo con una realización, los oligonucleótidos donantes comprenden ARN bicatenario (ARNbc).

De acuerdo con una realización, los oligonucleótidos donantes comprenden ARN monocatenario (ARNmc).

De acuerdo con una realización, los oligonucleótidos donantes comprenden la secuencia de ADN o ARN para el intercambio (como se ha tratado anteriormente).

De acuerdo con una realización, los oligonucleótidos donantes se proporcionan en un formato de vector u oligo no expresado.

De acuerdo con una realización, los oligonucleótidos donantes comprenden un plásmido donante de ADN (por ejemplo, plásmido circular o linealizado).

De acuerdo con una realización, los oligonucleótidos donantes comprenden aproximadamente 50-5000, aproximadamente 100-5000, aproximadamente 250-5000, aproximadamente 500-5000, aproximadamente 750-5000, aproximadamente 1000-5000, aproximadamente 1500-5000, aproximadamente 2000-5000, aproximadamente 2500-5000, aproximadamente 3000-5000, aproximadamente 4000-5000, aproximadamente 50-4000, aproximadamente 100-4000, aproximadamente 250-4000, aproximadamente 500-4000, aproximadamente 750-4000, aproximadamente 1000-4000, aproximadamente 1500-4000, aproximadamente 2000-4000, aproximadamente 2500-4000, aproximadamente 3000-4000, aproximadamente 50-3000, aproximadamente 100-3000, aproximadamente 250-3000, aproximadamente 500-3000, aproximadamente 750-3000, aproximadamente 1000-3000, aproximadamente 1500-3000, aproximadamente 2000-3000, aproximadamente 50-2000, aproximadamente 100-2000, aproximadamente 250-2000, aproximadamente 500-2000, aproximadamente 750-2000, aproximadamente 1000-2000, aproximadamente 1500-2000, aproximadamente 50-1000, aproximadamente 100-1000, aproximadamente 250-1000, aproximadamente 500-1000, aproximadamente 750-1000, aproximadamente 1000-1000, aproximadamente 150-750, aproximadamente 250-750, aproximadamente 500-750, aproximadamente 1000-750, aproximadamente 150-500, aproximadamente 200-500, aproximadamente 250-500, aproximadamente 350-500, aproximadamente 50-250, aproximadamente 150-250 o aproximadamente 200-250 nucleótidos.

De acuerdo con una realización específica, los oligonucleótidos donantes que comprenden ODNmc (por ejemplo, ADNmc o ARNmc) comprenden aproximadamente 200-500 nucleótidos.

De acuerdo con una realización específica, los oligonucleótidos donantes que comprenden ODNbc (por ejemplo, ADNbc o ARNbc) comprenden aproximadamente 250-5000 nucleótidos.

De acuerdo con una realización, para el intercambio de genes de una molécula silenciadora de ARN endógeno (por ejemplo, miARN) con una secuencia de silenciamiento de ARN de elección (por ejemplo, ARNpi), el vector de expresión, ODNmc (por ejemplo, ADNmc o ARNmc) u ODNbc (por ejemplo, ADNbc o ARNbc) no tienen que expresarse en una célula vegetal y podrían servir como un molde sin expresión. De acuerdo con una realización específica, en tal caso, solo es necesario expresar el agente de edición de ADN (por ejemplo, módulos Cas9/ARNgc) si se proporciona en forma de ADN.

De acuerdo con algunas realizaciones, para la edición de genes de una molécula de ARN no codificante endógena (por ejemplo, una molécula silenciadora de ARN) sin el uso de una nucleasa, el agente de edición de ADN (por ejemplo, ARNg) puede introducirse en la célula eucariota con o sin (por ejemplo, ADN o ARN donante de oligonucleótidos, tal como se analiza en el presente documento).

De acuerdo con una realización, la introducción de oligonucleótidos en el donante de células vegetales se efectúa utilizando cualquiera de los métodos descritos anteriormente (por ejemplo, utilizando los vectores de expresión o la transfección RNP).

De acuerdo con una realización, los oligonucleótidos del donante de ARNg y ADN se introducen simultáneamente en la célula vegetal (por ejemplo, mediante bombardeo). Se apreciará que cualquier factor adicional (por ejemplo, nucleasa) puede cointroducirse con el mismo.

De acuerdo con una realización, el ARNg se introduce en la célula vegetal antes que los oligonucleótidos del donante de ADN (por ejemplo, en unos pocos minutos o unas pocas horas). Se apreciará que cualquier factor adicional (por ejemplo, nucleasa) puede introducirse antes de, concomitantemente con, o después del ARNg o de los oligonucleótidos donantes de ADN.

De acuerdo con una realización, el ARNg se introduce en la célula vegetal después de los oligonucleótidos del donante de ADN (por ejemplo, en unos pocos minutos o unas pocas horas). Se apreciará que cualquier factor adicional (por ejemplo, nucleasa) puede introducirse antes de, concomitantemente con, o después del ARNg o de los oligonucleótidos donantes de ADN.

De acuerdo con una realización, se proporciona una composición que comprende al menos un oligonucleótido donante de ARNg y ADN para la edición del genoma.

De acuerdo con una realización, se proporciona una composición que comprende al menos un ARNg, una nucleasa (por ejemplo, endonucleasa) y oligonucleótidos donantes de ADN para la edición del genoma.

Existen varios métodos de transferencia directa de ADN a células vegetales y el experto en la materia sabrá cuál seleccionar. En electroporación, los protoplastos se exponen brevemente a un campo eléctrico fuerte. En microinyección, el ADN se inyecta de manera mecánica directamente en las células usando micropipetas muy pequeñas. En bombardeo de micropartículas, el ADN se adsorbe en microproyectiles, tales como cristales de sulfato de magnesio o partículas de oro o tungsteno, y los microproyectiles se aceleran físicamente en protoplastos, células

o tejidos vegetales.

Por lo tanto, la liberación de ácidos nucleicos puede introducirse en una célula vegetal en realizaciones de la invención mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo y sin limitación: mediante transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.508.184); mediante absorción de ADN mediada por desecación/inhibición (véase, por ejemplo, Potrykus *et al.* (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199:183-8); mediante electroporación (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.384.253); mediante agitación con fibras de carburo de silicio (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.302.523 y 5.464.765); mediante transformación mediada por *Agrobacterium* (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 5.563.055, 5.591.616, 5.693.512, 5.824.877, 5.981.840 y 6.384.301); mediante aceleración de partículas recubiertas de ADN (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5,015,580, 5,550,318, 5,538,880, 6,160,208, 6,399,861 y 6,403,865) y mediante nanopartículas, nanoportadores y péptidos de penetración celular (documentos WO201126644A2; WO2009046384A1; WO2008148223A1) en los métodos para administrar ADN, ARN, péptidos y/o proteínas o combinaciones de ácidos nucleicos y péptidos en células vegetales.

Otros métodos de transfección incluyen el uso de reactivos de transfección (por ejemplo, Lipofectin, ThermoFisher), dendrímeros (Kukowska-Latallo, J.F. *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4897-902), péptidos penetradores celulares (Mae *et al.*, 2005, *Internalisation of cell-penetrating peptides into tobacco protoplasts*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1669(2): 101-7) o poliaminas (Zhang y Vinogradov, 2010, *Short biodegradable polyamines for gene delivery and transfection of brain capillary endothelial cells*, *J Control Release*, 143(3):359-366).

De acuerdo con una realización específica, para introducir ADN en células vegetales (por ejemplo, protoplastos), el método comprende la captación de ADN mediada por polietilenglicol (PEG). Para detalles adicionales, véase Karesch *et al.* (1991) *Plant Cell Rep.* 9:575-578; Mathur *et al.* (1995) *Plant Cell Rep.* 14:221-226; Negrutiu *et al.* (1987) *Plant Cell Mol. Biol.* 8: 363-373. Luego, las células vegetales (por ejemplo, protoplastos) se cultivan en condiciones que les permitieron desarrollar paredes celulares, comenzar a dividirse para formar un callo, desarrollar brotes y raíces, y regenerar plantas enteras.

Después de la transformación estable, se realiza propagación de la planta. El método más común de propagación de plantas es mediante semillas. La regeneración mediante propagación por semillas, sin embargo, tiene la deficiencia de que, debido a la heterocigosidad, existe una falta de uniformidad en el cultivo, ya que las semillas son producidas por plantas según las variaciones genéticas regidas por las normas mendelianas. Básicamente, cada semilla es genéticamente diferente y cada una crecerá con sus propios rasgos específicos. Por lo tanto, se prefiere que la planta transformada se produzca de manera que la planta regenerada tenga los rasgos y características idénticos de la planta transgénica original. Por lo tanto, se prefiere que la planta transformada se regenere por micropropagación que proporciona una reproducción rápida y consistente de las plantas transformadas genéticamente idénticas.

La micropropagación es un proceso de cultivo de plantas de nueva generación a partir de un solo trozo de tejido que se ha escindido de una planta o cultivar original seleccionado. Este proceso permite la reproducción masiva de plantas con la característica deseada. Las plantas de nueva generación son genéticamente idénticas a, y tienen todas las características de, la planta original. La micropropagación (o clonación) permite la producción en masa de material vegetal de calidad en un periodo de tiempo corto y ofrece una multiplicación rápida de cultivares seleccionados en la conservación de las características de la planta original transgénica o transformada. Las ventajas de la clonación de plantas son la velocidad de multiplicación de plantas y la calidad y uniformidad de plantas producidas.

La micropropagación es un procedimiento de múltiples etapas que requiere alteración del medio de cultivo o de las condiciones de crecimiento entre las etapas. Por lo tanto, el proceso de micropropagación implica cuatro etapas básicas: Etapa uno, cultivo de tejido inicial; etapa dos, multiplicación de cultivo tisular; etapa tres, diferenciación y formación de plantas; y etapa cuatro, cultivo y endurecimiento en invernadero. Durante la etapa uno, cultivo tisular inicial, el cultivo tisular se establece y se certifica que está exento de contaminantes. Durante la etapa dos, el cultivo tisular inicial se multiplica hasta que se produce un número suficiente de muestras tisulares para cumplir los objetivos de producción. Durante la etapa tres, las muestras tisulares cultivadas en la etapa dos se dividen y cultivan en plántulas individuales. En la etapa cuatro, las plántulas transformadas se transfieren a un invernadero para su endurecimiento, donde la tolerancia de las plantas a la luz aumenta gradualmente de modo que pueda cultivarse en el entorno natural.

Aunque actualmente se prefiere la transformación estable, algunas realizaciones de la invención también contemplan la transformación transitoria de las células de la hoja, células meristemáticas o la planta completa.

Puede efectuarse transformación transitoria mediante cualquiera de los métodos de transferencia directa de ADN descritos anteriormente o mediante infección vírica usando virus vegetales modificados.

Los virus que se han mostrado que son útiles para la transformación de hospedadores vegetales incluyen CaMV, TMV, TRV y BV. Se describe transformación de plantas usando virus vegetales en la patente de Estados Unidos n.º 4.855.237 (BGV), documento EP-A 67.553 (TMV), solicitud publicada japonesa n.º 63-14693 (TMV), documento EPA 194.809 (BV), documento EPA 278.667 (BV); y Gluzman, Y. *et al.*, *Communications in Molecular Biology: Viral Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pág. 172-189 (1988). Las partículas de pseudovirus para su uso en la

expresión de ADN extraño en muchos huéspedes, incluyendo plantas, se describe en el documento WO 87/06261.

La construcción de virus de ARN de plantas para la introducción y expresión de secuencias de ácido nucleico exógenas no víricas en plantas se demuestra por las referencias anteriores, así como por Dawson, W. O. *et al.*, *Virology* (1989) 172:285-292; Takamatsu *et al.* *EMBO J.* (1987) 6:307-311; French *et al.* *Science* (1986) 231:1294-1297; y Takamatsu *et al.* *FEBS Letters* (1990) 269:73-76.

Cuando el virus es un virus de ADN, se pueden hacer modificaciones adecuadas al virus en sí mismo. Como alternativa, el virus se puede clonar primero en un plásmido bacteriano para facilitar la construcción del vector vírico deseado con el ADN extraño. Después, el virus puede escindirse del plásmido. Si el virus es un virus de ADN, puede unirse un origen bacteriano de replicación al ADN vírico, que después es replicado por las bacterias. La transcripción y traducción de este ADN producirá la proteína de cubierta que encapsulará el ADN vírico. Si el virus es un virus de ARN, el virus generalmente se clona como un ADNc y se inserta en un plásmido. El plásmido se usa después para realizar todas las construcciones. El virus de ARN se produce después al transcribir la secuencia vírica del plásmido y la traducción de los genes víricos para producir la o las proteínas de cubierta que encapsidan el ARN vírico.

La construcción de virus de ARN de plantas para la introducción y expresión en plantas de secuencias de ácido nucleico exógenas no virales tales como las incluidas en la construcción utilizada de acuerdo con algunas realizaciones de la invención se demuestra mediante las referencias anteriores, así como en la patente de Estados Unidos n.º 5.316.931.

En una realización, se proporciona un ácido nucleico vírico de planta en el que la secuencia codificante de la proteína de cubierta nativa se ha delecionado de un ácido nucleico vírico, una secuencia de codificación de proteína de cubierta vírica vegetal no nativa y un promotor no nativo, preferentemente se ha insertado el promotor subgenómico de la secuencia codificante de la proteína de cubierta no nativa, capaz de expresión en la planta huésped, empaquetado del ácido nucleico vírico vegetal recombinante y asegurando una infección sistémica del huésped por el ácido nucleico vírico vegetal recombinante. Como alternativa, el gen de la proteína de cubierta puede inactivarse mediante inserción de una secuencia de ácido nucleico no nativa dentro de él, de modo que se produce una proteína. El ácido nucleico vírico de la planta recombinante puede contener uno o más promotores subgenómicos no nativos adicionales. Cada promotor subgenómico no nativo es capaz de transcribir o expresar genes adyacentes o secuencias de ácido nucleico en el hospedador vegetal e incapaz de recombinarse entre sí y con promotores subgenómicos nativos. Pueden insertarse secuencias de ácido nucleico no nativas (extrañas) adyacentes al promotor subgenómico vírico o los promotores subgenómicos víricos de planta nativa y una no nativa si se incluye más de una secuencia de ácido nucleico. Las secuencias de ácido nucleico no nativas se transcriben o expresan en la planta hospedadora bajo control del promotor subgenómico para producir los productos deseados.

En una segunda realización, se proporciona un ácido nucleico vírico de planta recombinante como en la primera realización, excepto que la secuencia codificante de proteína de cubierta nativa se coloca adyacente a uno de los promotores subgenómicos de proteína de cubierta no nativa en lugar de una secuencia codificante de proteína de cubierta no nativa.

En una tercera realización, se proporciona un ácido nucleico vírico de planta recombinante en el que el gen de la proteína de cubierta nativa está adyacente a su promotor subgenómico y se han insertado uno o más promotores subgenómicos no nativos en el ácido nucleico vírico. Los promotores subgenómicos no nativos insertados son capaces de transcribir o expresar genes adyacentes en una planta hospedadora y son incapaces de recombinarse entre sí y con promotores subgenómicos nativos. Pueden insertarse secuencias de ácido nucleico no nativas adyacentes a los promotores víricos de plantas subgenómicos no nativos de modo que las secuencias se transcriban o expresen en la planta hospedadora bajo el control de los promotores subgenómicos para producir el producto deseado.

En una cuarta realización, se proporciona un ácido nucleico vírico de planta recombinante como en la tercera realización, excepto que la secuencia codificante de proteína de cubierta nativa se reemplaza por una secuencia codificante de proteína de cubierta no nativa.

Los vectores víricos están encapsidados por las proteínas de cubierta codificadas por el ácido nucleico vírico de la planta recombinante para producir un virus vegetal recombinante. El ácido nucleico vírico de planta recombinante o virus de planta recombinante se usa para infectar plantas hospedadoras adecuadas. El ácido nucleico vírico de la planta recombinante tiene capacidad de replicación en el hospedador, diseminación sistémica en el hospedador y transcripción o expresión de gen o genes extraños (ácido nucleico aislado) en el hospedador para producir la proteína deseada.

Además de lo anterior, la molécula de ácido nucleico utilizada de acuerdo con algunas realizaciones de la invención también se puede introducir en un genoma de cloroplasto permitiendo así la expresión de cloroplasto.

Se conoce una técnica para introducir secuencias de ácido nucleico exógenas en el genoma de los cloroplastos. Esta técnica implica los siguientes procedimientos. El primero, las células vegetales se tratan químicamente para reducir el número de cloroplastos por célula a aproximadamente uno. Después, el ácido nucleico exógeno se introduce mediante

bombardeo de partículas en las células con el objetivo de introducir al menos una molécula de ácido nucleico exógena en los cloroplastos. El ácido nucleico exógeno se selecciona de modo que se puedan integrar en el genoma del cloroplasto mediante recombinación homóloga que se efectúa fácilmente mediante enzimas inherentes al cloroplasto. Con este fin, el ácido nucleico exógeno incluye, además de un gen de interés, al menos un tramo de ácido nucleico que procede del genoma del cloroplasto. Adicionalmente, el ácido nucleico exógeno incluye un marcador seleccionable, que actúa mediante procedimientos de selección secuencial para determinar que todas o sustancialmente todas las copias de los genomas de cloroplasto después de dicha selección incluirán el ácido nucleico exógeno. Se encuentran detalles adicionales relacionados con esta técnica en las patentes de Estados Unidos n.º 4.945.050; y 5.693.507. Por tanto, el sistema de expresión de proteínas del cloroplasto puede producir un polipéptido y este puede integrarse en la membrana interna del cloroplasto.

Independientemente del método de transformación/infección empleado, las presentes enseñanzas seleccionan además células transformadas que comprenden un evento de edición del genoma.

De acuerdo con una realización específica, la selección se lleva a cabo de tal manera que solo se seleccionan las células que comprenden una modificación precisa exitosa (por ejemplo, intercambio, inserción, delección, mutación puntual) en el locus específico. En consecuencia, las células que comprenden cualquier evento que incluye una modificación (por ejemplo, una inserción, delección, mutación puntual) en un locus no deseado no se seleccionan.

De acuerdo con una realización, la selección de células modificadas se puede realizar a nivel fenotípico, mediante detección de un evento molecular, mediante detección de un indicador fluorescente o mediante crecimiento en presencia de selección (por ejemplo, antibiótico).

De acuerdo con una realización, la selección de células modificadas se realiza analizando la biogénesis y la aparición de la molécula de ARN no codificante recién editada (por ejemplo, la presencia de una nueva versión de miARN, la presencia de nuevos ARNpi editados, ARNip, ARNtasi, etc.).

De acuerdo con una realización, la selección de células modificadas se realiza analizando la actividad silenciadora y/o la especificidad de la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) hacia un segundo ARN diana mediante la validación de al menos un fenotipo en la planta o el organismo que codifica el ARN diana, por ejemplo, coloración de hojas de plantas, por ejemplo, pérdida parcial o completa de clorofila en hojas y otros órganos (blaqueamiento), presencia/ausencia de patrones nacroticos, coloración de flores, rasgos de la fruta (tal como la vida útil, la firmeza y el sabor), tasa de crecimiento, tamaño de la planta (por ejemplo, enanismo), rendimientos de los cultivos, resistencia al estrés biótico (por ejemplo, resistencia a enfermedades, mortalidad de nematodos, tasa de puesta de huevos del escarabajo u otros fenotipos resistentes asociados con cualquiera de bacterias, virus, hongos, parásitos, insectos, malas hierbas y plantas cultivadas o autóctonas), resistencia al estrés abiótico (por ejemplo, resistencia al frío/calor, resistencia a la sequía, resistencia a la sal, resistencia al alcohol alílico o resistencia a la falta de nutrientes, por ejemplo, fósforo (P)).

De acuerdo con una realización, la especificidad de silenciamiento de la molécula de ARN no codificante se determina genotípicamente, por ejemplo, mediante expresión de un gen o falta de expresión.

De acuerdo con una realización, la especificidad de silenciamiento de la molécula de ARN no codificante se determina fenotípicamente.

De acuerdo con una realización, un fenotipo de la planta se determina antes que un genotipo.

De acuerdo con una realización, un genotipo de la planta se determina antes que un fenotipo.

De acuerdo con una realización, la selección de células modificadas se realiza analizando la actividad silenciadora y/o la especificidad de la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) hacia un segundo ARN diana o ARN diana de interés midiendo el nivel de ARN del segundo ARN diana o diana ARN de interés. Esto puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante transferencia Northern, ensayos de protección de nucleasa, hibridación *in situ* o RT-PCR cuantitativa.

De acuerdo con una realización, la selección de células modificadas se realiza mediante el análisis de células vegetales o clones que comprenden el evento de edición de ADN, también denominado en el presente documento "mutación" o "edición", dependiendo del tipo de edición buscada, por ejemplo, inserción, delección, inserción-delección (Indel), inversión, sustitución y combinaciones de los mismos.

Los métodos para detectar la alteración de secuencia son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, Secuenciación de ADN y ARN (por ejemplo, secuenciación de próxima generación), electroforesis, un ensayo de detección de desajuste basado en enzimas y un ensayo de hibridación como PCR, RT-PCR, protección de ARNasa, hibridación *in situ*, extensión del cebador, transferencia Southern, transferencia Northern y transferencia puntual. También se pueden utilizar varios métodos utilizados para la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), tal como la endonucleasa T7 basada en PCR, secuenciación Hetroduplex y Sanger, o PCR seguida de digestión de

restricción para detectar la aparición o desaparición de sitios de restricción únicos.

Otro método para validar la presencia de un evento de edición de ADN, por ejemplo, Indels, comprende un ensayo de escisión de desajustes que utiliza una enzima selectiva de estructura (por ejemplo, endonucleasa) que reconoce y escinde el ADN no coincidente.

De acuerdo con una realización, la selección de células transformadas se efectúa mediante citometría de flujo (FACS) seleccionando células transformadas que exhiben fluorescencia emitida por el indicador fluorescente. Después de la clasificación FACS, se recolectan los grupos seleccionados positivamente de células vegetales transformadas, que muestran el marcador fluorescente y se puede usar una alícuota para probar el evento de edición de ADN como se ha tratado anteriormente.

En los casos en que se utilizó marcador de selección de antibióticos, después de la transformación, los clones de células vegetales se cultivan en presencia de selección (por ejemplo, antibiótico) hasta que se convierten en colonias, es decir, clones y micro-callos. Luego, una parte de las células de los callos se analiza (valida) para el evento de edición de ADN, tal como se ha analizado anteriormente.

Por lo tanto, de acuerdo con una realización de la invención, el método comprende además validar en las células transformadas la complementariedad de la molécula de ARN no codificante endógena (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) hacia el segundo ARN diana.

Como se ha mencionado anteriormente, después de la modificación del gen que codifica la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN), la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN) comprende al menos aproximadamente un 30 %, 33 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso 100 % de complementariedad hacia la secuencia del segundo ARN diana o ARN diana de interés.

La unión específica de la molécula de ARN no codificante diseñada con un ARN diana de interés puede determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como por algoritmos computacionales (por ejemplo, BLAST) y verificado por métodos que incluyen, por ejemplo, transferencia Northern, hibridación *in situ*, ensayo QuantiGene Plex, etc.

Se apreciará que los clones positivos pueden ser homocigotos o heterocigotos para el evento de edición de ADN. En el caso de una célula heterocigota, la célula (por ejemplo, cuando es diploide) puede comprender una copia de un gen modificado y una copia de un gen no modificado de la molécula de ARN no codificante (por ejemplo, molécula silenciadora de ARN). El experto en la materia seleccionará el clon para cultivo/regeneración adicional de acuerdo con el uso previsto.

De acuerdo con una realización, cuando se desea un método transitorio, los clones que exhiben la presencia de un evento de edición de ADN como se desea se analizan y seleccionan adicionalmente por la ausencia del agente de edición de ADN, a saber, pérdida de secuencias de ADN que codifican el agente de edición de ADN. Esto se puede hacer, por ejemplo, mediante el análisis de la pérdida de expresión del agente de edición de ADN (por ejemplo, en el ARNm, proteína) por ejemplo, por detección fluorescente de GFP o q-PCR, HPLC.

De acuerdo con una realización, cuando se desea un método transitorio, las células pueden analizarse en busca de la ausencia del constructo de ácido nucleico como se describe en el presente documento o porciones del mismo, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica el agente de edición de ADN. Esto puede afirmarse mediante microscopia fluorescente, q-PCR, FACS, y/o cualquier otro método como transferencia Southern, PCR, secuenciación, HPLC).

La planta se puede cruzar para obtener una planta desprovista del agente de edición de ADN (por ejemplo, de la endonucleasa), como se indica a continuación.

Los clones positivos pueden almacenarse (por ejemplo, criopreservarse).

Como alternativa, las células vegetales (por ejemplo, protoplastos) pueden regenerarse en plantas completas primero creciendo en un grupo de células vegetales que se desarrolla en un callo y luego mediante la regeneración de brotes (callogénesis) del callo usando métodos de cultivo de tejido vegetal. El crecimiento de protoplastos en callos y la regeneración de brotes requiere el equilibrio adecuado de los reguladores del crecimiento de las plantas en el medio de cultivo de tejidos que debe personalizarse para cada especie de planta.

Los protoplastos también se pueden utilizar para el cultivo de plantas, usando una técnica llamada fusión de protoplastos. Se induce la fusión de protoplastos de diferentes especies mediante el uso de un campo eléctrico o una solución de polietilenglicol. Esta técnica puede usarse para generar híbridos somáticos en cultivo de tejidos.

Se conocen bien en la técnica los métodos de regeneración de protoplastos. Varios factores afectan al aislamiento,

cultivo y regeneración de protoplastos, a saber, el genotipo, el tejido del donante y su pretratamiento, el tratamiento enzimático para el aislamiento de protoplastos, el método de cultivo de protoplastos, el cultivo, el medio de cultivo y el ambiente físico. Para una revisión exhaustiva, véase Maheshwari *et al.* 1986 *Differentiation of Protoplasts and of Transformed Plant Cells*: 3-36. Springer-Verlag, Berlín.

5 Las plantas regeneradas pueden someterse a cultivo y selección adicionales según lo estime conveniente el experto en la materia. De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para producir una planta con expresión reducida de un gen diana, comprendiendo el método: modificar un gen que codifica o se procesa en una molécula silenciadora de ARN para un ARN diana en una célula vegetal de acuerdo con un método de la invención,
10 generar una planta a partir de dicha célula vegetal, produciendo así la planta con expresión reducida de un gen diana.

La reproducción puede comprender el cruzamiento o la autofecundación.

15 El término "cruzamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a la fertilización de plantas femeninas (o gametos) por plantas masculinas (o gametos). El término "gameto" se refiere a la célula reproductora haploide (óvulo o esperma) producida en las plantas por mitosis de un gametofito e implicada en la reproducción sexual, durante la cual dos gametos del sexo opuesto se fusionan para formar un cigoto diploide. El término generalmente incluye referencia a un polen (incluido el espermatozoide) y un óvulo (incluido el óvulo). por lo tanto, "cruzamiento" generalmente se refiere a la fertilización de óvulos de un individuo con polen de otro individuo, mientras que
20 "autopolinización" se refiere a la fertilización de óvulos de un individuo con polen del mismo individuo. El cruzamiento se usa ampliamente en el mejoramiento de plantas y da como resultado una mezcla de información genómica entre las dos plantas cruzadas, un cromosoma de la madre y un cromosoma del padre. Esto dará como resultado una nueva combinación de rasgos heredados genéticamente.

25 Como se ha mencionado anteriormente, la planta puede cruzarse para obtener una planta libre de factores no deseados, por ejemplo, agente de edición de ADN (por ejemplo, endonucleasa).

De acuerdo con una realización, se proporciona un método para generar una planta con mayor tolerancia al estrés, rendimiento aumentado, tasa de crecimiento aumentada o calidad del rendimiento aumentada, el método que
30 comprende la modificación de un gen que codifica o se procesa en un silenciamiento de ARN en una célula vegetal de acuerdo con el método de algunas realizaciones de la invención, en el que el ARN diana de interés es de un gen de la planta que confiere sensibilidad al estrés, rendimiento disminuido, tasa de crecimiento disminuido o calidad de rendimiento disminuido, generando así la planta.

35 La expresión "tolerancia al estrés", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de una planta para soportar un estrés biótico o abiótico sin sufrir una alteración sustancial en el metabolismo, crecimiento, productividad y/o viabilidad.

La expresión "estrés abiótico", como se usa en el presente documento se refiere a la exposición de una planta, célula vegetal o similar, a un agente físico o químico no vivo ("abiótico") que tiene un efecto adverso sobre el metabolismo, crecimiento, desarrollo, propagación o supervivencia de la planta (colectivamente, "crecimiento"). Se puede imponer un estrés abiótico a una planta debido, por ejemplo, a un factor ambiental tal como agua (por ejemplo, inundación, sequía o deshidratación), condiciones anaeróbicas (por ejemplo, un nivel más bajo de oxígeno o un nivel alto de CO₂), condiciones osmóticas anormales (por ejemplo, estrés osmótico), salinidad o temperatura (por ejemplo, calor/calor, frío, congelación o escarcha), una exposición a contaminantes (por ejemplo, toxicidad por metales pesados), anaerobiosis, deficiencia de nutrientes (por ejemplo, deficiencia de nitrógeno o nitrógeno limitado), contaminación atmosférica o radiación ultravioleta.

La expresión "estrés biótico", como se usa en el presente documento se refiere a la exposición de una planta, célula vegetal o similar, a un organismo vivo ("biótico") que tiene un efecto adverso sobre el metabolismo, crecimiento, desarrollo, propagación o supervivencia de la planta (colectivamente, "crecimiento"). El estrés biótico puede ser causado por, por ejemplo, bacteria, virus, hongos, parásitos, insectos beneficiosos y dañinos, malezas y plantas cultivadas o nativas.

55 La frase "rendimiento" o "rendimiento de la planta", como se usa en el presente documento, se refiere al aumento del crecimiento de la planta (tasa de crecimiento), aumento del crecimiento de los cultivos, aumento de la biomasa y/o aumento de la producción de productos vegetales (incluidos cereales, frutos, semillas, etc.).

De acuerdo con una realización, para generar una planta con mayor tolerancia al estrés, rendimiento aumentado, tasa de crecimiento aumentada o calidad del rendimiento aumentada, la molécula de ARN no codificante está diseñada para dirigirse a un ARN de interés de un gen de la planta que confiere sensibilidad al estrés, rendimiento disminuido, tasa de crecimiento disminuida o calidad del rendimiento disminuida.

65 De acuerdo con una realización, los genes de plantas de susceptibilidad de ejemplo a los que se apunta (por ejemplo, inactivación) incluyen, pero sin limitación, los genes S de susceptibilidad, tales como los que residen en loci genéticos conocidos como MLO (*Mildew Locus O*).

De acuerdo con una realización, las plantas generadas por el presente método comprenden una mayor tolerancia al estrés, rendimiento aumentado, mayor calidad del rendimiento, tasa de crecimiento aumentada, en al menos aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o un 100 % en comparación con plantas no generadas por los presentes métodos.

Cualquier método conocido en la técnica para evaluar la tolerancia a la tensión aumentada puede usarse de acuerdo con la presente invención. Los métodos de ejemplo para evaluar una mayor tolerancia al estrés incluyen, pero sin limitación, regulación por disminución de *PagSAP1* en álamo para aumentar la tolerancia al estrés salino como se describe en Yoon, SK., Bae, EK., Lee, H. *et al.* *Trees* (2018) 32: 823. [www\(dot\)doi\(dot\)org/10.1007/s00468-018-1675-2](https://doi.org/10.1007/s00468-018-1675-2), y mayor tolerancia a la sequía en tomates mediante regulación por disminución de *SibZIP38* (Pan Y *et al.* *Genes* 2017, 8, 402; doi:10.3390/genes8120402).

Cualquier método conocido en la técnica para evaluar el aumento del rendimiento puede usarse de acuerdo con la presente invención. Los métodos de ejemplo para evaluar el aumento del rendimiento incluyen, pero sin limitación, expresión reducida de *DST* en arroz como se describe en Ar-Rafi Md. Faisal, *et al.*, *AJPS* Vol. 8 N.º 9, agosto de 2017 DOI: 10.4236/ajps.2017.89149; y la regulación por disminución de *BnFTA* en colza dio como resultado un mayor rendimiento, como se describe en Wang Y *et al.*, *Mol Plant*. 2009 Jan; 2(1): 191-200.doi: 10.1093/mp/ssn088).

Cualquier método conocido en la técnica para evaluar la tasa de crecimiento aumentada puede usarse de acuerdo con la presente invención. Los métodos de ejemplo para evaluar el aumento de la tasa de crecimiento incluyen, pero sin limitación, la expresión reducida de *BIG BROTHER* en *Arabidopsis* o *GA2-OXIDASA* da como resultado un aumento del crecimiento y la biomasa como se describe en Marcelo de Freitas Lima *et al.* *Biotechnology Research and Innovation*(2017)1,14—25.

Cualquier método conocido en la técnica para evaluar la calidad del rendimiento incrementado puede usarse de acuerdo con la presente invención. Los métodos de ejemplo para evaluar una mayor calidad del rendimiento incluyen, pero sin limitación, la regulación por disminución de *OsCKX2* en el arroz da como resultado la producción de más macollos, más granos y los granos eran más pesados como se describe en Yeh S_Y *et al.* *Rice* (N Y). 2015; 8: 36; y reducir los niveles de *OMT* en muchas plantas, que dan como resultado una acumulación alterada de lignina, incremento de la digestibilidad del material para fines industriales como se describe en Verma SR y Dwivedi UN, *South African Journal of Botany* Volume 91, marzo de 2014, páginas 107-125.

De acuerdo con una realización, el método permite además la generación de una planta que comprende mayor dulzura, mayor contenido de azúcar, mayor sabor, control mejorado de la maduración, mayor tolerancia al estrés hídrico, mayor tolerancia al estrés por calor y mayor tolerancia a la sal. Un experto en la técnica sabrá cómo utilizar los métodos descritos en el presente documento para elegir secuencias de ARN diana para la modificación.

De acuerdo con una realización, se proporciona un método para generar una planta tolerante o resistente a patógenos, el método que comprende modificar un gen que codifica o se procesa en una molécula silenciadora de ARN en una célula vegetal de acuerdo con el método de algunas realizaciones de la invención, en el que el ARN diana de interés es de un gen de la planta que confiere sensibilidad al patógeno, generando así la planta tolerante o resistente al patógeno.

De acuerdo con una realización, se proporciona un método para generar una planta tolerante o resistente a patógenos, el método que comprende modificar un gen que codifica o se procesa en una molécula silenciadora de ARN en una célula vegetal de acuerdo con el método de algunas realizaciones de la invención, en el que el ARN diana de interés es de un gen del patógeno, generando así la planta tolerante o resistente al patógeno.

De acuerdo con una realización, se proporciona un método para generar una planta tolerante o resistente a plagas, el método que comprende modificar un gen que codifica o se procesa en una molécula silenciadora de ARN en una célula vegetal de acuerdo con el método de algunas realizaciones de la invención, en el que el ARN diana de interés es de un gen de la plaga, generando así la planta tolerante o resistente a plagas.

Como se usa en el presente documento, el término "patógeno" se refiere a un organismo que afecta negativamente a las plantas al colonizar, dañar, atacarlos o infectarlos. Por lo tanto, un patógeno puede afectar al crecimiento, desarrollo, reproducción, cosecha o rendimiento de una planta. Esto incluye organismos que propagan enfermedades y/o dañan al huésped y/o compiten por los nutrientes del huésped. Los patógenos de las plantas incluyen, pero sin limitación, hongos, oomicetos, bacteria, virus, viroides, organismos similares a virus, fitoplasmas, protozoos, nematodos, insectos y plantas parásitas.

Los ejemplos no limitantes de patógenos incluyen, pero sin limitación, barrenador de cabeza redonda, tal como los barrenadores de cuernos largos; psílidos, tal como psílido rojo del eucalipto (*Glycaspis brimblecombei*), psílido de eucalipto, psílido australiano del eucalipto manchado, psílido del limón; escarabajos tortuga; gorgojos; escarabajos del olmo; armilaria de miel; *Thaumastocoris peregrinus*; avispas sésiles de las agallas (Cynipidae) tales como *Leptocybe invasa*, *Ophelimus maskelli* y *Selitrachodes globules*; orugas que se alimentan de follaje, tales como *Omnivorous looper*

y *Orange tortrix*; francotirador de alas vidriosas; y moscas blancas, tal como la mosca blanca gigante. Otros ejemplos no limitantes de patógenos incluyen pulgones tales como *Chaitophorus* spp., pulgón del álamo y *Periphyllus* spp.; escalas blindadas, tales como la escala Oystershell y la escala San José; gusano carpintero; barrenadores de la polilla de las alas claras tales como la polilla del avispon americano y las alas claras del álamo occidental; barrenadores de cabeza plana, tal como el barrenador del abedul de bronce y el barrenador del álamo de bronce; orugas que se alimentan de follaje, tal como el gusano tejedor de otoño, enrollador de árboles frutales, oruga de joroba roja, oruga de la polilla del satén, oruga del olmo espinoso, oruga de la tienda, polillas de mechón y mariposa cola de golondrina tigre occidental; mineros de la hoja, tal como barrenador del escudo del álamo; ácaros de las agallas y ampollas, tal como el ácaro de las agallas del chopo; pulgones de las agallas, tal como el pulgón del álamo; francotirador de alas vidriosas; escarabajos de las hojas y escarabajos pulgas; cochinillas; barrenador de álamos y sauces; barrenadores de cabeza redonda; moscas de sierra; escalas blandas, tal como la escala negra, escala blanda marrón, escala algodonosa del arce y lecanio de fruta europeo; saltarines, tales como el saltarín búfalo; y chinches del campo, tal como chinche de encaje y chinches lygus.

Otros ejemplos no limitantes de patógenos víricos de plantas incluyen, pero sin limitación, especies: *Virus del pardeamiento temprano del guisante* (PEBV), Género: *Tobravirus*. Especie: *virus de la mancha anular del pimiento* (PepRSV), Género: *Tobravirus*. Especie: *virus del mosaico de la sandía* (WMV), Género: *Potyvirus* y otros virus del Género *Potyvirus*. Especie: Género del *virus del mosaico del tabaco* (TMV), *Tobamovirus* y otros virus del género *Tobamovirus*. Especie: *virus de la patata* Género X (PVX), *Potexvirus* y otros virus del género *Potexvirus*. Por lo tanto, las presentes enseñanzas prevén el direccionamiento de virus de ARN así como de ADN (por ejemplo, virus Gemini o Bigeminivirus). Los virus Geminiviridae a los que se puede apuntar incluyen, pero sin limitación, bigeminivirus del mosaico de abutilón, bigeminivirus de la vena amarilla Ageratum, bigeminivirus del mosaico calicó de la judía, bigeminivirus del mosaico dorado de la judía, bigeminivirus del mosaico de la vena amarilla de Bhendi, bigeminivirus del mosaico africano de la yuca, bigeminivirus del mosaico indio de la yuca, bigeminivirus chino del tomate, bigeminivirus arrugado de la hoja de algodón, bigeminivirus del enrollamiento de la hoja de algodón, bigeminivirus del mosaico de la vena amarilla de Croton, bigeminivirus del mosaico amarillo Dolichos, bigeminivirus del mosaico de Euphorbia, bigeminivirus del mosaico amarillo de la judía grande, bigeminivirus del mosaico de Jatropha, bigeminivirus del mosaico dorado de la semilla de Lima, bigeminivirus del enrollamiento de la hoja del melón, bigeminivirus del mosaico amarillo del frijol mungo, bigeminivirus del enrollamiento de la hoja de okra, bigeminivirus de chile hausteco, bigeminivirus de pimiento de Texas, bigeminivirus del mosaico amarillo de la patata, bigeminivirus del mosaico de Rhynchosia, bigeminivirus del mosaico dorado serrano, bigeminivirus del enrollamiento de la hoja de calabaza, bigeminivirus del enrollamiento de la hoja del tabaco, bigeminivirus del enrollamiento de la hoja australiano del tomate, bigeminivirus del mosaico dorado del tomate, bigeminivirus del enrollamiento de la hoja indio del tomate, bigeminivirus arrugado de la hoja de tomate, bigeminivirus moteado del tomate, bigeminivirus de la rizadura amarilla del tomate, bigeminivirus del mosaico amarillo del tomate, bigeminivirus del acrobacia clorótica de la sandía y bigeminivirus del moteado rizado de la sandía.

Como se usa en el presente documento, el término "plaga" se refiere a un organismo que daña directa o indirectamente a la planta. Un efecto directo incluye, por ejemplo, alimentación de las hojas de la planta. El efecto indirecto incluye, por ejemplo, transmisión de un agente patógeno (por ejemplo, un virus, bacteria, etc.) a la planta. En este último caso, la plaga sirve como vector para la transmisión de patógenos. Las plagas de ejemplo incluyen, pero sin limitación, escarabajos, psíidos, insectos, nematodos, caracoles.

De acuerdo con una realización, el patógeno es un nematodo. Los nematodos de ejemplo incluyen, pero sin limitación, el nematodo barrenador (*Radopholus similis*), *Caenorhabditis elegans*, *Radopholus araccofeae*, *Pratylenchus coffeae*, nematodos de los nudos de la raíz (*Meloidogyne* spp.), nematodo del quiste (*Heterodera* y *Globodera* spp.), nematodo de lesión de la raíz (*Pratylenchus* spp.), nematodo del tallo (*Ditylenchus dipsaci*), nematodo del marchitamiento del pino (*Bursaphelenchus xylophilus*), el nematodo reniforme (*Rotylenchulus reniformis*), *Xiphinema index*, *Nacobbus aberrans* y *Aphelenchoides besseyi*.

De acuerdo con una realización, el patógeno es un hongo. Los hongos de ejemplo incluyen, pero sin limitación, *Fusarium oxysporum*, *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*), *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pyricularia grisea*, *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*), *Magnaporthe oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Puccinia* spp., *Fusarium graminearum*, *Blumeria graminis*, *Mycosphaerella graminicola*, *Colletotrichum* spp., *Ustilago maydis*, *Melampsora lini*, *Phakopsora pachyrhizi* y *Rhizoctonia solani*.

De acuerdo con una realización, para generar una planta resistente o tolerante a patógenos, la molécula de ARN no codificante está diseñada para dirigirse a un ARN de interés de un gen de la planta que confiere sensibilidad a un patógeno.

De acuerdo con una realización, un gen vegetal de ejemplo al que se apunta incluye, pero sin limitación, el gen eIF4E que confiere sensibilidad a la infección vírica en pepino.

De acuerdo con una realización, para generar una planta resistente o tolerante a patógenos, la molécula de ARN no codificante está diseñada para dirigirse a un ARN de interés de un gen del patógeno.

La determinación de los genes diana de la planta o del patógeno se puede lograr utilizando cualquier método conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, mediante análisis bioinformático de rutina.

De acuerdo con una realización, el gen patógeno del nematodo comprende los genes de calreticulina13 (CRT) o colágeno 5 (col-5) de *Radopholus similis*.

De acuerdo con una realización, el gen del patógeno fúngico comprende los genes FOW2, FRP1 y OPR de *Fusarium oxysporum*.

De acuerdo con una realización, el gen del patógeno incluye, por ejemplo, ATPasa vacuolar (vATPasa), dvssj 1 y dvssj2, α -tubulina y snf7.

De acuerdo con una realización específica, cuando la planta es una *Brassica napus* (colza), el ARN diana de interés incluye, pero sin limitación, un gen de *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*) (que causa, por ejemplo, el cancro del tallo de Phoma) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: AM933613.1); un gen del escarabajo pulga (*Phyllotreta vittula* o *Chrysomelidae*, por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: KT959245.1); o un gen de *Sclerotinia sclerotiorum* (que causa, por ejemplo, la pudrición del tallo por Sclerotinia) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: NW_001820833.1).

De acuerdo con una realización específica, cuando la planta es *Citrus x sinensis* (naranja), el ARN diana de interés incluye, pero sin limitación, un gen de *Citrus canker* (CCK) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: AE008925); un gen de *Candidatus Liberibacter* spp. (causando, por ejemplo, la enfermedad del enverdecimiento de los cítricos) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: CP001677.5); o un gen de la pudrición de la raíz por Armillaria (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: KY389267.1).

De acuerdo con una realización específica, cuando la planta es una *Elaeis guineensis* (palma de aceite), el ARN diana de interés incluye, pero sin limitación, un gen de *Ganoderma* spp. (que causa, por ejemplo, pudrición del tallo basal (BSR), también conocida como pudrición basal por *Ganoderma*) (por ejemplo, como se expone en el número de acceso de GenBank: U56128.1), un gen de oruga de ortiga o un gen de cualquiera de *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* (que causa, por ejemplo, pudrición de la raíz).

De acuerdo con una realización específica, cuando la planta es una *Fragaria vesca* (fresa silvestre), el ARN diana de interés incluye, pero sin limitación, un gen de *Verticillium dahlia* (que causa, por ejemplo, el marchitamiento por *Verticillium*) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: DS572713.1); o un gen de *Fusarium oxysporum* f.sp. fragariae (causando, por ejemplo, marchitez por *Fusarium*) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: KR855868.1);

De acuerdo con una realización específica, cuando la planta es una *Glycine max* (Soja), el ARN diana de interés incluye, pero sin limitación, un gen de *P. pachyrhizi* (que causa, por ejemplo, la roya de la soja, también conocida como roya asiática) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: DQ026061.1); un gen del áfido de la soja (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: KJ451424.1); un gen del virus del enanismo de la soja (SbDV) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: NC_003056.1); o un gen de la chinche apesosa verde (*Acrosternum hilare*) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: NW_020110722.1).

De acuerdo con una realización específica, cuando la planta es una *Gossypium raimondii* (algodón), el ARN diana de interés incluye, pero sin limitación, un gen de *Fusarium oxysporum* f.sp. vasinfectum (que causa, por ejemplo, el marchitamiento por *Fusarium*) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: JN416614.1); un gen del áfido de la soja (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: KJ451424.1); o un gen del gusano cogollero rosado (*Pectinophora gossypiella*) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: KU550964.1).

De acuerdo con una realización específica, cuando la planta es una *Oryza sativa* (arroz), el ARN diana de interés incluye, pero sin limitación, un gen de *Pyricularia grisea* (que causa, por ejemplo, la roya del arroz) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: AF027979.1); un gen de *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*) (que causa, por ejemplo, la enfermedad de Bakanae) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: AY862192.1); o un gen de un barrenador del tallo, por ejemplo, *Scirpophaga incertulas* Walker - barrenador amarillo del tallo, *S. innotata* Walker - barrenador blanco del tallo, *Chilo suppressalis* Walker - Barrenador del tallo del arroz, *Sesamia inferens* Walker - barrenador del tallo rosa (por ejemplo, como se expone en el número de acceso de GenBank: KF290773.1).

De acuerdo con una realización específica, cuando la planta es una *Solanum lycopersicum* (tomate), el ARN diana de interés incluye, pero sin limitación, un gen de *Phytophthora infestans* (que causa, por ejemplo, el tizón tardío) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: AY855210.1); un gen de una mosca blanca *Bemisia tabaci* (por ejemplo, *Gennadius*, por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: KX390870.1);

o un gen del geminivirus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate (TYLCV) (por ejemplo, como se expone en el número de acceso de GenBank: LN846610.1).

De acuerdo con una realización específica, cuando la planta es una *Solanum tuberosum* (patata), el ARN diana de interés incluye, pero sin limitación, un gen de *Phytophthora infestans* (que causa, por ejemplo, el tizón tardío) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: AY050538.3); un gen de *Erwinia* spp. (que causa, por ejemplo, pierna negra y podredumbre blanda) (por ejemplo, como se expone en el número de acceso de GenBank: CP001654.1); o un gen de nematodos formadores de quistes (por ejemplo, *Globodera pallida* y *G.rostochiensis*) (por ejemplo, como se expone en el número de acceso de GenBank: KF963519.1).

De acuerdo con una realización específica, cuando la planta es un *Theobroma cacao* (cacao), el ARN diana de interés incluye, pero sin limitación, un gen de un gen del basidiomiceto *Moniliophthora roreri* (que causa, por ejemplo, monoliasis del cacao) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: LATX01001521.1); un gen de *Moniliophthora perniciosa* (que causa, por ejemplo, la enfermedad de la escoba de bruja); o un gen de Mirids, por ejemplo, *Distantiella theobroma* y *Sahlbergella singularis*, *Helopeltis* spp, especie Monalonion.

De acuerdo con una realización específica, cuando la planta es una *Vitis vinifera* (uva o vida), el ARN diana de interés incluye, pero sin limitación, un gen de closterovirus GVA (que causa, por ejemplo, la enfermedad de la madera rugosa) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: AF007415.2); un gen del virus del enrollamiento de la hoja de la vid (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: FJ436234.1); un gen del virus de la enfermedad de la degeneración de la hoja en abanico de la vid (GFLV) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: NC_003203.1); o un gen de la enfermedad de la mancha de la vid (GFKV) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: NC_003347.1).

De acuerdo con una realización específica, cuando la planta es una *Zea mays* (maíz también conocido como maíz), el ARN diana de interés incluye, pero sin limitación, un gen de un gusano cogollero (por ejemplo, *Spodoptera frugiperda*) (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: AJ488181.3); un gen del barrenador europeo del maíz (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: GU329524.1); o un gen de gusanos de la raíz del maíz del norte y del oeste (por ejemplo, como se establece en el número de acceso de GenBank: NM_001039403.1).

De acuerdo con una realización específica, cuando la planta es una caña de azúcar, el ARN diana de interés incluye, pero sin limitación, un gen de un barrenador de entrenudos (por ejemplo, *Chilo Saccharifagus Indicus*), un gen de *Xanthomonas Albidneans* (que causa, por ejemplo, escaldadura de la hoja) o un gen de un virus de la hoja amarilla de la caña de azúcar (SCYLV).

De acuerdo con una realización específica, cuando la planta es trigo, el ARN diana de interés incluye, pero sin limitación, un gen de una *Puccinia striiformis* (que causa, por ejemplo, la roya lineal) o un gen de un áfido.

De acuerdo con una realización específica, cuando la planta es cebada, el ARN diana de interés incluye, pero sin limitación, un gen de una *Puccinia hordei* (que causa, por ejemplo, la roya de la hoja), un gen de *Puccinia striiformis* f. sp. *Hordei* (que causa, por ejemplo, la roya lineal), o un gen de un áfido.

De acuerdo con una realización específica, cuando la planta es un girasol, el ARN diana de interés incluye, pero sin limitación, un gen de una *Puccinia helianthi* (que causa, por ejemplo, la enfermedad de la roya); un gen de *Boerema macdonaldii* (que causa, por ejemplo, tallo negro del girasol); un gen de un gorgojo de la semilla (por ejemplo, rojo y gris), por ejemplo, *Smicronyx fulvus* (rojo); *Smicronyx sordidus* (gris); o un gen de *Sclerotinia sclerotiorum* (que causa, por ejemplo, la enfermedad de pudrición del tallo y la cabeza de por *Sclerotinia*).

De acuerdo con una realización específica, cuando la planta es una planta de caucho, el ARN diana de interés incluye, pero sin limitación, un gen de un *Microcyclus ulei* (que causa, por ejemplo, el tizón de la hoja de América del Sur (SALB)); un gen de *Rigidoporus microporus* (que causa, por ejemplo, la enfermedad de la raíz blanca); un gen de *Ganoderma pseudoferreum* (que causa, por ejemplo, la enfermedad de la raíz roja).

De acuerdo con una realización específica, cuando la planta es una planta de manzana, el ARN diana de interés incluye, pero sin limitación, un gen de *Neonectria ditissima* (que causa, por ejemplo, el cancro de la manzana), un gen de *Podosphaera leucotricha* (que causa, por ejemplo, oídio de la manzana) o un gen de *Venturia inaequalis* (que causa, por ejemplo, sarna de la manzana).

En la Tabla 1B se proporcionan ejemplos de moléculas de ARN no codificantes endógenas que pueden modificarse para dirigirse al ARN de interés (por ejemplo, un gen de un patógeno), ejemplos de secuencias de ARNg (es decir, un agente de edición de ADN) que pueden usarse para modificar las moléculas de ARN endógeno no codificante, y ejemplos de secuencias de nucleótidos para redirigir una especificidad de silenciamiento de la molécula de ARN endógeno no codificante hacia el ARN diana de interés, a continuación en el presente documento.

Tabla 1B: Ejemplos de diseños de oligo GEiGS para generar diferentes rasgos en varios huéspedes

Huésped, rasgo y molde de miARN	Información de oligo	Seq. de oligo	diferencia de sec. de la sv	Sg_sec	pam_diferencia	ARNgc_cadena
Huésped (negrita); Patógeno/plaga/ enfermedad (cursiva)		Secuencia de oligo GEiGS, que consiste en la secuencia precursora con su correspondiente madura reemplazada por un ARNpi dirigido a la molécula deseada - SEQ ID NO:	Número de cambios de nucleótidos entre el precursor de tipo salvaje y el oligo de GeiGs	Secuencia del ARN guía pequeño CRISPR/cas9 dirigido a la secuencia precursora para el intercambio - SEQ ID NO:	Número de cambios de nucleótidos entre el precursor de tipo salvaje y la secuencia GEiGS que caen en la región PAM del ARNgc	
<i>Brassica napus</i> (colza)						
AM933613.1/cancro del tallo del girasol (causado por <i>Leptosphaeria maculans</i> o pie negro - patógeno fúngico)						
bn-MIR169e	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	103	132	235	3	inv
bn-MIR156d	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	104	25	236	1	dir
bn-MIR169e	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	105	128	237	3	inv
bn-MIR169e	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	106	131	238	3	inv
<i>KT959245.1/Escarabajo pulga (Phyllotreta vittula o Chrysomelidae)</i>						
bn-MIR169e	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	107	138	239	3	inv
bn-MIR156d	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	108	29	240	1	dir
bn-MIR156b	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	109	76	241	1	dir
bn-MIR169e	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	110	133	242	3	inv
<i>NW_001820833.1/Pudrición del tallo por Sclerotinia (causada por Sclerotinia sclerotiorum, un patógeno fúngico)</i>						
bn-MIR169e	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	111	130	243	3	inv
bn-MIR390b	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	112	23	244	3	dir
bn-MIR156b	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	113	68	245	1	dir
bn-MIR169e	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	114	135	246	3	inv
<i>Citrus x sinensis</i> (naranja)						
AE008925/cancro de los cítricos (CCK)						

(continuación)

Huésped, rasgo y molde de miARN	Información de oligo	Seq. de oligo	diferencia de sec. de la sv	Sg_sec	pam_diferencia	ARNgc_cadena
csi-MIR167c	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNip de rasgo específico	115	173	247	3	dir
csi-MIR156a	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	116	24	248	3	inv
csi-MIR167c	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	117	150	249	3	dir
csi-MIR167c	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	118	173	250	2	dir
<i>CP001677.5/ Enfermedad del enverdecimiento de los cítricos causada por un patógeno transmitido por vectores (Candidatus Liberibacter spp.)</i>						
csi-MIR164a	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNip de rasgo específico	119	115	251	2	inv
csi-MIR482f	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	120	22	252	2	inv
csi-MIR398a	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	121	88	253	3	dir
csi-MIR164a	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	122	119	254	3	inv
<i>KY389267.1/ Pudrición de la raíz por Armillaria</i>						
csi-MIR167c	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNip de rasgo específico	123	168	255	3	dir
csi-MIR171a	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	124	21	256	3	inv
csi-MIR167c	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	125	144	257	1	dir
csi-MIR167c	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	126	182	258	3	dir
<i>Elaeis guineensis (palma aceitera)</i>						
<i>U56128.1/ pudrición del tallo basal (BSR), también conocida como pudrición basal por Ganoderma spp.)</i>						
egu-MIR172c	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNip de rasgo específico	127	89	259	1	inv
egu-MIR172c	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	128	53	260	1	inv
egu-MIR172c	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	129	74	261	1	inv

(continuación)

Huésped, rasgo y molde de miARN	Información de oligo	Seq. de oligo	diferencia de sec. de la sv	Sg_sec	pam_diferencia	ARNgc_cadena
egu-MIR172c	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	130	94	262	1	inv
Fragaria vesca (fresa silvestre)						
DS572713.1/ Marchitamiento por Verticillium (Verticillium dahlia)						
fve-MIR159c	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	131	100	263	3	dir
fve-MIR160b	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	132	22	264	3	inv
fve-MIR166a	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	133	56	265	3	dir
fve-MIR164b	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	134	95	266	3	dir
KR855868.1/ Marchitamiento por Fusarium (Fusarium oxysporum f.sp. fragariae)						
fve-MIR159c	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	135	97	267	3	dir
fve-MIR167b	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	136	17	268	1	inv
fve-MIR169a	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	137	69	269	3	inv
fve-MIR164b	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	138	94	270	3	dir
Glycine max (soja)						
DQ026061.1/ Roya de la soja causada por P. pachyrhizi (también conocida como roya asiática)						
gma-MIR167c	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	139	166	271	3	inv
gma-MIR1511	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	140	23	272	3	dir
gma-MIR167c	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	141	141	273	3	inv
gma-MIR167c	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	142	163	274	3	inv
KJ451424.1/ Pulgón de soja						
gma-MIR167c	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	143	163	275	3	inv

(continuación)

Huésped, rasgo y molde de miARN	Información de oligo	Seq. de oligo	diferencia de sec. de la sv	Sg_sec	pam_diferencia	ARNgc_cadena
gma-MIR168a	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	144	23	276	0	inv
gma-MIR167c	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	145	132	277	3	inv
gma-MIR167c	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	146	161	278	3	inv
<i>NC_003056.1/ virus del enanismo de la soja (SbDV)</i>						
gma-MIR167c	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNip de rasgo específico	147	165	279	3	inv
gma-MIR1516a	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	148	23	280	1	dir
gma-MIR167c	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	149	135	281	3	inv
gma-MIR167c	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	150	163	282	3	inv
<i>NW_020110722.1/ Chinche apestosa verde (Acrosternum hilare)</i>						
gma-MIR167c	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNip de rasgo específico	151	158	283	3	inv
gma-MIR162a	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	152	22	284	1	inv
gma-MIR167c	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	153	135	285	3	inv
gma-MIR167c	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	154	164	286	3	inv
<i>Gossypium raimondii (algodón)</i>						
<i>JN416614.1/ Marchitamiento por Fusarium (Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum)</i>						
gra-MIR8637	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNip de rasgo específico	155	154	287	3	inv
gra-MIR7486e	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	156	21	288	3	dir
gra-MIR8633	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	157	58	289	3	dir
gra-MIR8635	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	158	149	290	3	dir
<i>KJ451424.1/ Pulgón de soja</i>						

(continuación)

Huésped, rasgo y molde de miARN	Información de oligo	Seq. de oligo	diferencia de sec. de la sv	Sg_sec	pam_diferencia	ARNgc_cadena
gra-MIR8637	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	159	153	291	3	inv
gra-MIR157a	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	160	16	292	1	dir
gra-MIR8636	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	161	62	293	3	dir
gra-MIR8637	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	162	149	294	3	inv
<i>KU550964.1/ Gusano cogollero rosado (Pectinophora gossypiella)</i>						
gra-MIR8637	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	163	155	295	3	inv
gra-MIR157a	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	164	21	296	1	dir
gra-MIR8644	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	165	53	297	3	inv
gra-MIR8635	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	166	154	298	3	dir
Oryza sativa (arroz)						
<i>AF027979.1/ añublo del arroz (enfermedad fúngica causada por Pyricularia grisea)</i>						
osa-MIR166b	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	167	105	299	1	dir
osa-MIR156e	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	168	21	300	0	dir
osa-MIR160b	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	169	59	301	3	inv
osa-MIR166b	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	170	100	302	3	dir
<i>AY862192.1/ Enfermedad de Bakanae (enfermedad fúngica causada por Fusarium moniliforme y Gibberella fujikuroi)</i>						
osa-MIR166b	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	171	100	303	3	dir
osa-MIR160c	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	172	22	304	1	inv
osa-MIR156j	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	173	68	305	1	inv
osa-MIR166b	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	174	104	306	3	dir

(continuación)

Huésped, rasgo y molde de miARN	Información de oligo	Seq. de oligo	diferencia de sec. de la sv	Sg_sec	pam_diferencia	ARNgc_cadena
<i>KF290773.1/ Barrenador del tallo (Scirpophaga incertulas Walker - Barrenador amarillo del tallo, S. innota Walker-Barrenador del tallo blanco, Chilo suppressalis Walker - Barrenador del tallo del arroz, Sesamia inferens Walker - Barrenador rosado del tallo)</i>						
osa-MIR166b	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNip de rasgo específico	175	100	307	1	dir
osa-MIR156j	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	176	21	308	3	inv
osa-MIR160b	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	177	57	309	3	inv
osa-MIR166b	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	178	103	310	3	dir
Solanum lycopersicum (Tomate)						
<i>AY855210.1/Tizón tardío (Phytophthora infestans)</i>						
sly-MIR319b	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNip de rasgo específico	179	143	311	3	dir
sly-MIR156b	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	180	24	312	0	dir
sly-MIR395a	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	181	75	313	3	dir
sly-MIR319b	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	182	145	314	3	dir
<i>KX390870.1/ mosca blanca Bemisia tabaci (Gennadius)</i>						
sly-MIR319b	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNip de rasgo específico	183	144	315	3	dir
sly-MIR391	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	184	16	316	3	dir
Solanum lycopersicum (Tomate)						
sly-MIR319c	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	185	79	317	1	inv
sly-MIR319b	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	186	138	318	3	dir
<i>LN846610.1/ geminivirus del rizado amarillo de la hoja del tomate (TYLCV)</i>						
sly-MIR319b	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNip de rasgo específico	187	141	319	3	dir

(continuación)

Huésped, rasgo y molde de miARN	Información de oligo	Seq. de oligo	diferencia de sec. de la sv	Sg_sec	pam_diferencia	ARNgc_cadena
sly-MIR156b	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	188	24	320	0	dir
sly-MIR395a	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	189	81	321	3	dir
sly-MIR319b	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	190	143	322	3	dir
Solanum tuberosum (Patata)						
AY050538.3/Tizón tardío (<i>Phytophthora infestans</i>)						
stu-MIR6022	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNip de rasgo específico	191	110	323	1	dir
stu-MIR7988	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	192	19	324	1	inv
stu-MIR482d	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	193	50	325	3	inv
stu-MIR6022	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	194	106	326	1	dir
CP001654.1/ pierna negra y podredumbre blanda (<i>Erwinia</i> spp.)						
stu-MIR6022	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNip de rasgo específico	195	110	327	1	dir
stu-MIR7988	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	196	16	328	1	inv
stu-MIR482d	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	197	50	329	2	inv
stu-MIR6022	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	198	104	330	1	dir
KF963519.1/ Nematodos formadores de quistes (<i>Globodera pallida</i> y <i>G.rostochiensis</i>)						
stu-MIR6022	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNip de rasgo específico	199	107	331	1	dir
stu-MIR7985	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	200	20	332	3	dir
stu-MIR6024	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	201	49	333	0	inv
stu-MIR6022	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	202	107	334	1	dir
Theobroma cacao (cacao)						

(continuación)

Huésped, rasgo y molde de miARN	Información de oligo	Seq. de oligo	diferencia de sec. de la sv	Sg_sec	pam_diferencia	ARNgc_cadena
LATX01001521.1/ monoliasis del cacao causada por el basidiomiceto <i>Moniliophthora roreri</i>						
tcc-MIR169b	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNip de rasgo específico	203	100	335	3	dir
tcc-MIR167a	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	204	25	336	3	inv
tcc-MIR167b	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	205	52	337	1	dir
tcc-MIR169b	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	206	104	338	3	dir
Vitis vinifera (Uva)						
AF007415.2/ Enfermedad de la madera rugosa (closterovirus GVA)						
vvi-MIR167a	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNip de rasgo específico	207	154	339	3	dir
vvi-MIR164b	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	208	22	340	3	dir
vvi-MIR167a	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	209	108	341	3	dir
vvi-MIR167a	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	210	153	342	2	dir
FJ436234.1/ Virus del enrollamiento de la hoja de la vid						
vvi-MIR167a	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNip de rasgo específico	211	152	343	2	dir
vvi-MIR167c	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	212	20	344	3	inv
vvi-MIR167a	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	213	118	345	2	dir
vvi-MIR167a	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	214	152	346	3	dir
NC_003203.1/ Virus de la enfermedad de la hoja en abanico de la vid (GFLV): un nepovirus						
vvi-MIR167a	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNip de rasgo específico	215	158	347	2	dir
vvi-MIR166h	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	216	19	348	3	dir
vvi-MIR167a	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	217	118	349	2	dir

(continuación)

Huésped, rasgo y molde de miARN	Información de oligo	Seq. de oligo	diferencia de sec. de la sv	Sg_sec	pam_diferencia	ARNgc_cadena
vvi-MIR167a	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	218	156	350	3	dir
NC_003347.1/ Enfermedad de la mancha de la vid (GFKV)						
Vitis vinifera (Uva)						
vvi-MIR167a	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	219	161	351	2	dir
vvi-MIR166b	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	220	19	352	3	dir
vvi-MIR167a	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	221	127	353	2	dir
vvi-MIR167a	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	222	157	354	2	dir
Zea mays (maíz)						
AJ488181.3/Gusano cogollero (<i>Spodoptera frugiperda</i>)						
zma-MIR166a	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	223	100	355	0	dir
zma-MIR160c	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	224	20	356	2	dir
zma-MIR156f	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	225	64	357	0	dir
zma-MIR166a	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	226	101	358	3	dir
GU329524.1/ Barrenador europeo del maíz						
zma-MIR166a	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	227	103	359	1	dir
zma-MIR166h	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	228	20	360	1	inv
zma-MIR171f	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	229	62	361	3	inv
zma-MIR166a	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	230	106	362	3	dir
NM_001039403.1/ Gusanos de la raíz del maíz del norte y del oeste						
zma-MIR166a	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	231	107	363	0	dir
zma-MIR172d	Cambio mínimo/estructura perfecta/ARNpi de rasgo específico	232	20	364	3	inv

(continuación)

Huésped, rasgo y molde de miARN	Información de oligo	Seq. de oligo	diferencia de sec. de la sv	Sg_sec	pam_diferencia	ARNgc_cadena
zma-MIR166a	Cambio máximo/estructura alterada/ARNpi de rasgo específico	233	73	365	1	dir
zma-MIR166a	Cambio máximo/estructura perfecta/ARNpi no específico	234	105	366	3	dir

La Tabla 1B proporciona ejemplos de oligos GeiGS diseñados contra una variedad de objetivos en varios organismos huéspedes. Para cada combinación huésped diana, se proporcionan cuatro oligos: cambios de secuencia mínimos con estructura coincidente y ARNpi eficiente; cambios máximos de secuencia con estructura coincidente y ARNpi eficiente; cambios máximos de secuencia y estructura no coincidente y ARNpi eficiente; y cambios máximos de secuencia con estructura coincidente y ARNpi ineficiente.

De acuerdo con una realización, las plantas generadas por el presente método son más resistentes o tolerantes a los patógenos en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % en comparación con plantas no generadas por los presentes métodos (es decir, en comparación con plantas de tipo salvaje).

Cualquier método conocido en la técnica para evaluar la tolerancia o la resistencia a un patógeno de una planta puede usarse de acuerdo con la presente invención. Los métodos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, reducir la expresión de MYB46 en *Arabidopsis*, lo que resulta en una mayor resistencia a *Botrytis cinerea* como se describe en Ramirez V1, García-Andrade J, Vera P, Plant Signal Behav. 2011 Jun; 6(6):911-3. Epub 1 de junio de 2011; o la regulación por disminución de HCT en alfalfa promueve la activación de la respuesta de defensa en la planta como se describe en Gallego-Giraldo L. *et al.* New Phytologist (2011) 190: 627-639 doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03621.x).

De acuerdo con una realización, se proporciona un método para generar una planta resistente a herbicidas, comprendiendo el método modificar un gen que codifica o se procesa en una molécula silenciadora de ARN en una célula vegetal de acuerdo con los métodos de algunas realizaciones de la invención, en el que el ARN diana de interés es de un gen de la planta que confiere sensibilidad al herbicida, generando así la planta resistente a herbicidas.

De acuerdo con una realización, los herbicidas se dirigen a las vías que residen dentro de los plástidos (por ejemplo, dentro del cloroplasto).

Así, generar plantas resistentes a herbicidas, la molécula de ARN no codificante está diseñada para apuntar a un ARN de interés que incluye, pero sin limitación, el gen del cloroplasto *psbA* (que codifica la proteína de membrana Q_B de unión a quinona fotosintética, la diana del herbicida atrazina) y el gen para la EPSP sintasa (una proteína nuclear, sin embargo, su sobreexpresión o acumulación en el cloroplasto permite la resistencia de las plantas al herbicida glifosato, ya que aumenta la tasa de transcripción de las EPSP y reduce la renovación de la enzima).

De acuerdo con una realización, las plantas generadas por el presente método son más resistentes a los herbicidas en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o un 100 % en comparación con plantas no generadas por los presentes métodos.

El diseño de GEiGS con modificaciones/ediciones mínimas de nucleótidos en el ARN no codificante endógeno se puede lograr utilizando métodos *in silico*, que se basan en herramientas bioinformáticas que son bien conocidas por el experto en la materia.

De acuerdo con una realización, tal método se efectúa de la siguiente manera:

La siguiente información debe estar disponible: a) Secuencia diana a silenciar mediante silenciamiento génico inducido por edición génica (GEiGS) ("diana"); b) Elegir si el GEiGS (es decir, el ARN no codificante con actividad silenciadora modificada y/o especificidad) se expresaría de forma ubicua (por ejemplo, constitutivamente) o específicamente (por ejemplo, expresión específica de un determinado tejido, etapa de desarrollo, estrés, golpe de calor/frío, etc.).

Enviar esta información a conjuntos de datos de miARN disponibles públicamente o internamente (por ejemplo, secuenciación de ARN pequeño, secuencias genómicas, micromatrices, etc.) para filtrar (es decir, elegir) solo miARN relevantes que coincidan con los criterios de entrada: miARN que se expresan de acuerdo con el o los requisitos descritos anteriormente, tales como miRbase (Kozommará y Griffiths-Jones (2014)), tasRNAdb (Zhang Changqing, *et al.* (2013)) y mirEx 2.0 (Zielezinski, Andrzej *et al.* "mirEX 2.0 - an Integrated Environment for Expression Profiling of Plant microRNAs". BMC Plant Biology 15 (2015): 144. PMC. Web. 15 de septiembre de 2018).

Usando herramientas disponibles públicamente, se puede generar una lista de potentes secuencias de ARNpi específicas de la diana. Los miARN pueden alinearse contra las potentes secuencias de ARNpi y pueden elegirse los miARN más homólogos. Los miARN filtrados pueden tener una secuencia similar en la misma orientación que los ARNpi potentes.

- 5 Modificar las secuencias de miARN naturalmente maduras, que se califican para tener una alta homología con los ARNpi potentes específicos de la diana, para que coincida perfectamente con la secuencia de la diana. Esta modificación puede ocurrir en una cadena de miARN madura con la homología de diana más alta (por ejemplo, podría ser la guía de miARN original o la cadena pasajera). Este 100 % complementario a la diana puede potencialmente convertir la secuencia de miARN en un ARNpi.
- 10 La GE mínima puede lograrse filtrando secuencias de miARN con alta homología natural (complemento inverso) con la diana.
- 15 Uso de los genes de miARN modificados primarios para generar oligos de ADNmc (por ejemplo, ADNmc de 200-500 nt de longitud) y fragmentos de ADNbc (por ejemplo, fragmentos de 250-5000 nt de ADNbc solo o clonados dentro de plásmidos) en función de las secuencias de ADN genómico que flanquean la secuencia precursora de miARN modificada (pre-miARN). La secuencia de la cadena guía (cadena silenciadora) del miARN modificado puede diseñarse para que sea 100 % complementaria a la diana.
- 20 Modificar la secuencia de la otra región del gen de miARN para preservar el precursor del miARN original (no modificado) y la estructura madura, manteniendo el mismo perfil de apareamiento de bases.
- 25 Diseñar ARNgc para dirigirse específicamente al gen de miARN original no modificado (específico de los loci genómicos de miARN) y no a la versión modificada (es decir, las secuencias de oligo/fragmento).
- Analizar el sitio de la enzima de restricción comparativa entre el gen de miARN modificado y el original y resumir los sitios de restricción diferenciales. Dicho sistema de detección se basa en la PCR seguida de digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel.
- Validar como se ha tratado con detalle anteriormente.
- 30 Examinar la direccionalidad del ARN no codificante hacia otras dianas (por ejemplo, "efecto fuera de la diana"), usando métodos *in silico*, cuando el ARN no codificante endógeno (por ejemplo, miARN) comprende una alta homología natural con la diana (por ejemplo, un 60-90 %), para obtener un silenciamiento específico de la diana de interés.
- 35 Modificar mínimamente el ARN no codificante endógeno (por ejemplo, miARN) para aumentar su potencia para silenciar la diana de interés.
- 40 Validación del resultado de GEiGS de los genes de miARN primarios mínimamente editados para generar miARN candidatos refinados mínimamente editados. Un resultado primario de GEiGS experimentalmente efectivo (los genes de miARN primarios mínimamente editados) se considera miARN con una cadena guía o pasajera que se modifica para que coincida con la diana en un 100 %.
- 45 Generar varias secuencias de cadenas guía o pasajeras que se revierten gradualmente a la secuencia original (como se ilustra en la Figura 11).
- Mantener la secuencia semilla de manera que haya al menos 5 coincidencias de los siete nucleótidos semilla (nucleótidos 2-8 desde el extremo 5').
- 50 Probar los diversos genes de miARN candidatos refinados mínimamente editados para la eficiencia de silenciamiento de la diana. Elegir la inactivación mediada por el gen GE proporciona el silenciamiento más alto con la modificación mínima de la secuencia de miARN.
- 55 Probar posibles "efectos fuera de la diana" de candidatos refinados de miARN mínimamente editados. Una predicción significativa de "efectos fuera de la diana" afecta a la evaluación final de los genes de miARN refinados mínimamente editados.
- Probar los candidatos a genes de miARN mínimamente editados menos refinados en función de la validación experimental.
- Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a ± 10 %.
- 60 Las expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugaciones significan "que incluye pero sin limitación".
- La expresión "que consiste en" significa "que incluye y se limita a".
- 65 La expresión "que consiste esencialmente en" significa que la composición, el método o la estructura puede incluir ingredientes adicionales, etapas y/o partes, pero solo si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran

materialmente las características básicas y novedosas de la composición, el método o la estructura reivindicadas.

Como se utiliza en el presente documento, la forma en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias en plural, salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

A lo largo de esta solicitud, pueden presentarse diversas realizaciones de la presente invención en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es únicamente por conveniencia y brevedad y no debería interpretarse como una limitación inflexible sobre el alcance de la invención. En consecuencia, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha desvelado específicamente todos los posibles subintervalos así como valores numéricos individuales en ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 ha divulgado específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto es aplicable independientemente de la amplitud del intervalo.

Siempre que se indique un intervalo numérico en el presente documento, se pretende incluir cualquier número citado (fraccionario o entero) dentro del intervalo indicado. Las expresiones "que varía/varía entre" un primer número indicador y un segundo número indicador y "que varía/varía de" un primer número indicador "a" un segundo número indicador se usan indistintamente en el presente documento y se entiende que incluyen los números indicadores primero y segundo, y todos los números fraccionarios y enteros entre ellos.

Como se utiliza en el presente documento, el término "método" se refiere a formas, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea dada incluyendo, pero sin limitación, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos tanto conocidos como desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los especialistas de las ciencias químicas, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

Como se utiliza en el presente documento, el término "tratar" incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o invertir la progresión de una afección, aliviar sustancialmente síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

Se aprecia que determinadas características de la invención, que son, por claridad, descritas en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. En cambio, diversas características de la invención, que por razones de brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o según sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Determinadas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización no funcione sin esos elementos.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se han delineado anteriormente en el presente documento y como se reivindica más adelante en la sección de reivindicaciones encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Se entiende que cualquier número de identificación de secuencia (SEQ ID NO) desvelado en la presente solicitud puede referirse a una secuencia de ADN o una secuencia de ARN, dependiendo del contexto donde se menciona ese SEQ ID NO, incluso si ese SEQ ID NO se expresa solo en un formato de secuencia de ADN o en un formato de secuencia de ARN. Por ejemplo, los SEQ ID NO: 1-4 se expresan en un formato de secuencia de ADN (por ejemplo, citar T para timina), pero puede referirse a una secuencia de ADN que corresponde a una secuencia de ácido nucleico de ARN_g o a la secuencia de ARN de una secuencia de ácido nucleico de molécula de ARN. De forma análoga, aunque algunas secuencias se expresan en un formato de secuencia de ARN (por ejemplo, citar U para uracilo), dependiendo del tipo real de la molécula que se describe, puede referirse a la secuencia de una molécula de ARN que comprende un ARN_{bc} o a la secuencia de una molécula de ADN que corresponde a la secuencia de ARN que se muestra. En cualquier caso, se contemplan moléculas tanto de ADN como de ARN que tienen las secuencias desveladas con cualquier sustituto.

Ejemplos

A continuación se hace referencia a los siguientes ejemplos.

En general, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vol. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías expuestas en las patentes de los Estados Unidos

n.º 4 666 828; 4.683.202; 4.801.531; 5,192,659 y 5,272,057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); se describen ampliamente
 5 inmunoensayos disponibles en la bibliografía científica y de patentes, véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5,011,771 y 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and
 10 Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Se proporcionan otras referencias generales a lo largo del presente documento. Se cree que los procedimientos de las mismas son bien conocidos en la materia y se proporcionan para la comodidad del lector.

MATERIALES GENERALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Cultivo de células de Arabidopsis

20 Los cultivos de células de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Landsberg erecta) se mantuvieron en 100 ml de medio de cultivo líquido (4,4 g/l de sales de Murashige y Skoog (MS) con vitaminas [Duchefa, Haarlem, Países Bajos], 30 g/l de sacarosa, 0,5 mg/l de ácido 1-naftalenoacético (NAA) y 0,5 mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP) a 25 °C, fotoperíodo de 16 horas y agitación suave (100 rpm). Cada semana se transfirieron 6 ml de cultivo a medio nuevo.

Crecimiento de plantas

Las plántulas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Colombia-0) se esterilizaron superficialmente y se cultivaron en placas que contenían medio MS suplementado con 0,8 g/l de agar a 20 °C en un fotoperíodo de 16 horas.

Transformación estable del cultivo de células de Arabidopsis

Las *Agrobacterium* portadoras del plásmido pK7WGF2 se cultivaron en medio LB suplementado con 100 mg/l de espectinomicina a 28 °C hasta una DO de 0,8. Las bacterias se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en la misma cantidad de medio de cultivo de células vegetales. Cuatro días después de la transferencia a medio fresco,
 35 se incubaron 4 ml de células de *Arabidopsis* con 0,1 ml de la suspensión de *Agrobacterium* en una placa de Petri a 25 °C en oscuridad con agitación suave (130 rpm). Después de 48 horas, las células se recogieron mediante centrifugación y se lavaron cinco veces con medio de cultivo celular para eliminar la mayor parte de las bacterias. Por último, las células se resuspendieron en 2 ml de medio de cultivo celular y las placas se colocaron en una placa de Petri que contenía medio de cultivo celular suplementado con Phytigel al 0,4 %, 500 mg/l de timenten y 50 mg/l de
 40 kanamicina. Las placas se almacenaron a 25 °C en oscuridad hasta que se observó la formación de callos, generalmente después de 2 o 3 semanas

Callos embriogénicos de plátano:

45 El callo embriogénico del banano se desarrolla a partir de un explante inicial, tal como flores masculinas inmaduras o punta de brote, como lo describe Ma [Ma S.S., Proceedings of Symposium on Tissue culture of horticultural crops, Taipei, Taiwán, 8-9 de marzo de 1988, pág. 181-188] y Schoofs [Schoofs H., The origin of embryogenic cells in Musa. PhD thesis, KULeuven, Bélgica (1997)]. Las suspensiones de células embriogénicas se inician a partir de callos altamente embriogénicos recién desarrollados en medio líquido. El 80 % del medio se refresca cada 12-14 días hasta
 50 que la suspensión celular iniciada se establece por completo (6-9 meses).

Callos embrionarios de café:

Los callos embrionarios de café se obtienen como se ha descrito previamente [Etienne, H., Protocol for somatic
 55 embryogenesis in woody plants (2005) Springer. pág. 167-1795]. Resumiendo, las hojas jóvenes se esterilizan superficialmente, se cortan en piezas de 1 cm² y se colocan en medio MS semisólido de potencia media suplementado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético 2,26 µM (2,4-D), ácido indol-3-butírico (IBA) 4,92 µM e isopenteniladenina (iP) 9,84 µM durante un mes. A continuación, los explantes se transfieren a medio MS semisólido de potencia media que contiene 2,4-D 4,52 µM y 6-bencilaminopurina (6-BAP) 17,76 µM durante 6 a 8 meses hasta la regeneración de los
 60 callos embriogénicos. Los callos embriogénicos se mantienen en medios MS suplementados con 6-BAP 5 µM.

Los cultivos de suspensión celular se generan a partir de callos embriogénicos como se ha descrito previamente [Acuna, J.R. y M. de Pena, Plant Cell Reports (1991) 10(6): pág. 345-348]. Los callos embriogénicos (30 g/l) se colocan en medio MS líquido suplementado con 6-BAP 13,32 µM. Los matraces se colocan en una incubadora con agitación
 65 (110 rpm) a 28 °C. La suspensión celular se subcultiva/pasa cada dos a cuatro semanas hasta que se establece por completo. Los cultivos de suspensión celular se mantienen en medio MS líquido con 6-BAP 4,44 µM.

Canalización computacional para generar moldes de GEiGS

La canalización computacional de GEiGS aplica metadatos biológicos y permite una generación automática de moldes de ADN de GEiGS que se utilizan para editar mínimamente genes de ARN no codificantes (por ejemplo, genes de miARN), lo que conduce a una nueva ganancia de función. es decir, la redirección de su capacidad de silenciamiento a la secuencia diana de interés.

Como se ilustra en la figura 9, la canalización comienza con el llenado y el envío de entrada: a) secuencia diana que se va a silenciar mediante GEiGS; b) el organismo huésped para ser editado genéticamente y para expresar el GEiGS; c) se puede elegir si el GEiGS se expresaría de forma ubicua o no. Si se requiere una expresión GEiGS específica, se puede elegir entre algunas opciones (expresión específica de un determinado tejido, etapa de desarrollo, estrés, choque de calor/frío, etc.).

Cuando se envían todas las entradas requeridas, el proceso computacional comienza con la búsqueda entre conjuntos de datos de miARN (por ejemplo, secuenciación de ARN pequeño, micromatrices, etc.) y filtrado de solo los miARN relevantes que coinciden con los criterios de entrada. A continuación, las secuencias de miARN maduras seleccionadas se alinean contra la secuencia diana y se filtran los miARN con los niveles complementarios más altos. Estas secuencias de miARN maduras naturalmente complementarias a la diana se modifican luego para que coincidan perfectamente con la secuencia de la diana. Después, las secuencias de miARN maduras modificadas se pasan por un algoritmo que predice la potencia del ARNpi y se filtran las 20 principales con la puntuación de silenciamiento más alta. Estos genes de miARN modificados finales se utilizan luego para generar secuencias de ADNmc de 200-500 nt o 250-5000 nt de longitud de la siguiente manera:

los oligos de ADNmc de 200-500 nt y los fragmentos de ADNbc de 250-5000 nt se diseñan en función de la secuencia de ADN genómico que flanquea el miARN modificado. La secuencia de pre-miARN se encuentra en el centro del oligo. La secuencia de la cadena guía (silenciamiento) del miARN modificado es 100 % complementaria a la diana. Sin embargo, la secuencia de la cadena de miARN pasajero modificada se modifica aún más para preservar la estructura de miARN original (sin modificar), manteniendo el mismo perfil de apareamiento de bases.

A continuación, los ARNgc diferenciales están diseñados para dirigirse específicamente al gen de miARN original no modificado y no a la versión de intercambio modificada. Por último, se realiza un análisis comparativo del sitio de la enzima de restricción entre el gen de miARN modificado y el original y se resumen los sitios de restricción diferenciales.

Por lo tanto, la salida de la canalización incluye:

- a) Secuencia de fragmento de ADNbc de 200-500 nt u oligo ADNmc de 250-5000 nt con miARN mínimamente modificado
- b) 2-3 ARNgc diferenciales que se dirigen específicamente al gen miARN original y no al modificado
- c) Lista de sitios de enzimas de restricción diferenciales entre el gen de miARN modificado y original

Genes diana

Gen de la fitoeno desaturasa (PDS)

Fundamento:

El PDS es un gen esencial en la ruta de la biosíntesis de la clorofila y la pérdida de la función del PDS en las plantas da como resultado un fenotipo albino [Fan *et al.*, *Sci Rep* (2015) 5:12217]. Cuando se utiliza como gen diana en la estrategia de edición del genoma (GE) o ARNi, las plantas editadas positivamente se identifican fácilmente por la pérdida parcial o total de clorofila en las hojas y otros órganos (blaqueamiento).

Métodos:

se eligen miARN con un perfil de expresión ubicuo (depende de la aplicación, se pueden elegir miARN con un perfil de expresión específico para un determinado tejido, etapa de desarrollo, temperatura, estrés, etc.).

Los miARN se modifican a ARNpi dirigidos al gen de PDS de *Arabidopsis* (véase la Tabla 1A, a continuación). Después de la transfección y la clasificación con FACS (se usan RFP/GFP para identificar eventos de transfección Cas9/ARNgc positivos), las protoclonias (o callos) se transfieren a medios de regeneración sólidos (MS de potencia media + vitaminas B5, 20 g/l de sacarosa, 0,8 % de agar) hasta que se regeneren los brotes. La pérdida de pigmentación en estos brotes indica pérdida de función del gen PDS y GE correcta. No se observa ningún fenotipo albino en las plántulas de control transfectadas con una secuencia aleatoria portadora de oligo.

Gen de la proteína fluorescente verde (GFP)

Fundamento:

La GFP es una proteína compuesta por 238 restos de aminoácido (26,9 kDa) que exhibe una fluorescencia verde brillante cuando se expone a la luz en el rango azul a ultravioleta. Aunque muchos otros organismos marinos tienen

proteínas fluorescentes verdes similares, GFP tradicionalmente se refiere a la proteína aislada por primera vez de la medusa *Aequorea victoria*. La GFP de *A. victoria* tiene un pico de excitación mayor a una longitud de onda de 395 nm y uno menor a 475 nm. Su pico de emisión está a 509 nm, que está en la porción verde inferior del espectro visible. El rendimiento cuántico de fluorescencia (QY) de GFP es 0,79. La GFP del pensamiento de mar (*Renilla reniformis*) tiene un solo pico de excitación principal a 498 nm. GFP es una herramienta excelente en muchas áreas de la biología debido a su capacidad para formar cromóforos internos sin necesidad de cofactores accesorios, productos génicos o enzimas/sustratos distintos del oxígeno molecular.

Métodos:

se eligen miARN con un perfil de expresión ubicua (depende de la aplicación, se pueden elegir miARN con un perfil de expresión específico para un determinado tejido, etapa de desarrollo, temperatura, estrés, etc.).

Los miARN se modifican en ARNpi dirigidos al gen GFP (véase la Tabla 1A, a continuación). Después de la transfección, se realiza clasificación mediante FACS, aislamiento de protoplastos que expresan mCherry (mCherry se utiliza para identificar eventos de transfección positivos de Cas9/ARNgc) sin señal de GFP o con una señal baja. En el control (oligo con secuencia de ARNpi no diana), todos los protoplastos expresan mCherry y GFP. A continuación, el protoplasto GE candidato con éxito (mCherry positivo y GFP negativo) se regenera en plantas para análisis adicionales. Los protoplastos también se documentan cualitativamente bajo el microscopio. Para el análisis de cuantificación y proporciones se utilizó análisis FACS.

Tabla 1A: ID de genes diana

Nombre del gen	ID de la secuencia de consulta	Organismo de la secuencia de consulta
PDS	NM_001340908.1 (SEQ ID NO: 25)	Arabidopsis
	NM_117498 (SEQ ID NO: 26)	
ADH1	NC_003070.9	Arabidopsis
eGFP	AFA52654 (SEQ ID NO: 27)	<i>Aequorea victoria</i>

Diseño de ARNpi

Los ARNpi específicos de la diana están diseñados por diseñadores de ARNpi disponibles públicamente, como "BLOCK-iT™ RNAi Designer" de ThermoFisher Scientific y "Find siRNA sequences" de Invivogen.

Diseño de ARNgc

Los ARNgc están diseñados para apuntar a los genes endógenos de miARN utilizando el diseñador de ARNgc disponible públicamente, como se han descrito anteriormente en Park *et al.*, Bioinformatics (2015) 31(24): 4014-4016. Se diseñan dos ARNgc para cada casete, pero se expresa un solo ARNgc por célula para iniciar el intercambio de genes. Los ARNgc corresponden a la secuencia pre-miARN que se modifica después del intercambio.

Con el fin de maximizar la posibilidad de una elección eficiente de ARNgc, se usan dos algoritmos diferentes disponibles públicamente (CRISPER Design: [www\(dot\)crispr\(dot\)mit\(dot\)edu:8079/](http://www.crispr.mit.edu) and CHOPCHOP: [www\(dot\)chopchop\(dot\)cbu\(dot\)uib\(dot\)no/](http://www(dot)chopchop(dot)cbu(dot)uib(dot)no/)) y se selecciona el ARNgc de mayor puntuación de cada algoritmo.

Intercambio de diseño de oligo ADNmc:

El oligo ADNmc de 400 b se diseña en función de la secuencia de ADN genómico del gen miARN. La secuencia de pre-miARN se encuentra en el centro del oligo. A continuación, las secuencias de ARNpi de doble cadena se intercambian con las secuencias de miARN maduras de manera que la cadena de ARNpi guía (silenciadora) se mantiene 100 % complementaria a la diana. La secuencia de la cadena de ARNpi pasajero se modifica para preservar la estructura original de miARN, manteniendo el mismo perfil de apareamiento de bases.

Diseño de ADN plasmídico de intercambio

El fragmento de ADNbc de 4000 pb se diseña en función de la secuencia de ADN genómico del gen miARN. La secuencia de pre-miARN se encuentra en el centro del fragmento de ADNbc. A continuación, las secuencias de ARNpi de doble cadena se intercambian con las secuencias de miARN maduras de manera que la cadena de ARNpi guía (silenciadora) se mantiene 100 % complementaria a la diana. La secuencia de la cadena de ARNpi pasajero se modifica para preservar la estructura original de miARN, manteniendo el mismo perfil de apareamiento de bases. Por último, el fragmento se clona en un vector estándar (por ejemplo, pBluescript).

Plásmidos largos para intercambio:

Plásmido-1: GEiGS_mir173_si-GFP_1 (SEQ ID NO: 31)

Plásmido-2: GEiGS_mir173_si-GFP_2 (SEQ ID NO: 32)

Plásmido-3: GFIS_mir173_si-PDS_1 (SEQ ID NO: 33)
Plásmido-4: GEIGS_mir173_si-PDS_2 (SEQ ID NO: 34)
Plásmido-5: GEIGS_mir390a_si-GFP_1 (SEQ ID NO: 35)
Plásmido-6: GEIGS_mir390a_si-GFP_2 (SEQ ID NO: 36)
Plásmido-7: GEIGS_mir390a_si-PDS_1 (SEQ ID NO: 37)
Plásmido-8: GEIGS_mir390a_si-PDS2 (SEQ ID NO: 38)

Secuencias de ARNGc:

mir-390A de *Arabidopsis*:

1. CTATCCATCCTGAGTTTCATTGG (SEQ ID NO: 1);
2. AAGAATCTGTAAAGCTCAGGAGG (SEQ ID NO: 2);

mir-173 de *Arabidopsis*:

1. CTTGCAGAGAGAAATCACAGTGG (SEQ ID NO: 3);
2. GCTTACACAGAGAATCACAGAGG (SEQ ID NO: 4);

Lista de miARN endógenos que se intercambian:

1. mir-390A de *Arabidopsis*
2. mir-173 de *Arabidopsis*

Oligos de ADNmc utilizados para el intercambio de genes:

Oligo-1: GEIGS_mir173_si-GFP_1 (5' → 3') (SEQ ID NO: 5)
Oligo-2: GEIGS_mir173_si-GFP_2 (5' → 3') (SEQ ID NO: 6)
Oligo-3: GEIGS_mir173_si-PDS_1 (5' → 3') (SEQ ID NO: 7)
Oligo-4: GEIGS_mir173_si-PDS_2 (5' → 3') (SEQ ID NO: 8)
Oligo-5: GEIGS_mir390a_si-GFP_1 (5' → 3') (SEQ ID NO: 9)
Oligo-6: GEIGS_mir390a_si-GFP2 (5' → 3') (SEQ ID NO: 10)
Oligo-7: GEIGS_mir390a_si-PDS_1 (5' → 3') (SEQ ID NO: 11)
Oligo-8: GEIGS_mir390a_si-PDS2 (5' → 3') (SEQ ID NO: 12)

Clonación de ARNGc

El plásmido de transfección utilizado estaba compuesto por 4 módulos que comprenden de

- 1) mCherry dirigido por el promotor CsVMV terminado por una secuencia de terminación G7;
- 2) 2 × 35S::hCas9-35S-ter, es decir, hCas9 dirigido por el promotor 35S terminado por la secuencia de terminación AtuNos;
- 3) el promotor sintético AtU6-26 y/o U6 que dirige el ARNGc para la guía 1;

Diseño del plásmido

Para la expresión transitoria, se utiliza un plásmido que contiene tres unidades transcripcionales. La primera unidad transcripcional contiene el promotor CsVMV que dirige la expresión de mCherry y el terminador G7. La siguiente unidad transcripcional consiste en la expresión de Cas9 y el terminador 35S que dirigen el promotor 2x-35S. El tercero contiene el promotor U6 de *Arabidopsis* que expresa ARNGc para apuntar a genes de miARN (cada vector comprende un único ARNGc).

Diseño y clonación de CRISPR/CAS9 para apuntar a miR-173 y miR-390 e introducción de INTERCAMBIO para apuntar a GFP, AtPDS3 y AtADH1

Los presentes inventores han diseñado cambios en las secuencias de miR-173 y miR-390 maduros, en su contexto genómico, para apuntar a GFP, *AtPDS3* o *AtADH1*, al producir un pequeño ARN que invierte los complementos de los genes diana, visualizado en las Figuras 12A-G y 13A-G. Además, para mantener la estructura secundaria del transcrito precursor de miARN, se llevaron a cabo más cambios en el pri-miARN, como se especifica en las Figuras 12A-G, 13A-G, 14A-D y 15A-D y la Tabla 2 (más adelante). Estos fragmentos se clonaron en plásmidos PUC y se denominaron DONANTES y los fragmentos de ADN se denominan INTERCAMBIO. Para secuencias para modificar miR-173 - INTERCAMBIO1 e INTERCAMBIO 2 para apuntar a GFP, INTERCAMBIO3 y INTERCAMBIO4 para apuntar a AtPDS3 y INTERCAMBIO9 y INTERCAMBIO10 para apuntar a AtADH1 (véase la Tabla 2 a continuación). Para secuencias para modificar miR-390 - INTERCAMBIO5 y INTERCAMBIO6 para apuntar a GFP, INTERCAMBIO7 y INTERCAMBIO8 para apuntar a AtPDS3 y INTERCAMBIO11 y INTERCAMBIO12 para apuntar a AtADH1 (véase la Tabla 2 a continuación).

Los ARN guía dirigidos a miR-173 y miR-390 se introdujeron en el sistema de vector CRISPR/CAS9 para generar una escisión de ADN en los loci de miARN deseados. Estos se introdujeron conjuntamente en las plantas con los vectores DONANTES a través del protocolo de bombardeo de genes, para introducir las modificaciones deseadas a través de la reparación del ADN homólogo (HDR). Estos ARN guía se especifican en la Tabla 2, más adelante y se ilustran en las Figuras 12A y 13A.

Tabla 2: Secuencias y oligos utilizados en los experimentos

SEQ ID NO:	Objetivo
39	miR173
40	miR390
41	Secuencia de ARNgc utilizada para la orientación de miR173 en el sistema CRISPR/CAS9-GEiGSn. ⁹⁴
42	Secuencia de ARNgc utilizada para la orientación de miR173 en el sistema CRISPR/CAS9-GEiGSn. ⁹⁵
43	Secuencia de ARNgc utilizada para la orientación de miR390 en el sistema CRISPR/CAS9-GEiGSn. ⁹¹
44	Secuencia de ARNgc utilizada para la orientación de miR390 en el sistema CRISPR/CAS9-GEiGSn. ⁹³
45	GEiGS-ARNpi maduro dirigido a GFP utilizado en INTERCAMBIO5 (basado en miR390) y en INTERCAMBIO1 (basado en miR173)
46	Cadena complementaria de GEiGS-ARNpi maduro dirigido a GFP utilizado en INTERCAMBIO5 (basado en miR390) y en INTERCAMBIO1 (basado en miR173)
47	GEiGS-ARNpi maduro dirigido a GFP utilizado en INTERCAMBIO6 (basado en miR390) y en INTERCAMBIO2 (basado en miR173)
48	Cadena complementaria de GEiGS-ARNpi maduro dirigido a GFP utilizado en INTERCAMBIO6 (basado en miR390) y en INTERCAMBIO2 (basado en miR173)
49	GEiGS-ARNpi maduro dirigido a AtPDS3- utilizado en INTERCAMBIO7 (basado en miR390) y en INTERCAMBIO3 (basado en miR173)
50	Cadena complementaria de GEiGS-ARNpi maduro dirigido a AtPDS3- utilizado en INTERCAMBIO7 (basado en miR390) y en INTERCAMBIO3 (basado en miR173)
51	GEiGS-ARNpi maduro dirigido a AtPDS3- utilizado en INTERCAMBIO8 (basado en miR390) y en INTERCAMBIO4 (basado en miR173)
52	Cadena complementaria de GEiGS-ARNpi maduro dirigido a AtPDS3- utilizado en INTERCAMBIO8 (basado en miR390) y en INTERCAMBIO4 (basado en miR173)
53	GEiGS-ARNpi maduro dirigido a AtADH1- utilizado en INTERCAMBIO11 (basado en miR390) y en INTERCAMBIO9 (basado en miR173)
54	Cadena complementaria de GEiGS-ARNpi maduro dirigido a AtADH1- utilizado en INTERCAMBIO11 (basado en miR390) y en INTERCAMBIO9 (basado en miR173)
55	GEiGS-ARNpi maduro dirigido a AtADH1- utilizado en INTERCAMBIO 12 (basado en miR390) y en INTERCAMBIO10 (basado en miR173)
56	Cadena complementaria de GEiGS-ARNpi maduro dirigido a AtADH1- utilizado en INTERCAMBIO12 (basado en miR390) y en INTERCAMBIO10 (basado en miR173)
57	Transcrito primario de miR173 (pri-miR173)
58	Transcrito primario de INTERCAMBIO1 (utilizado en el vector donante para apuntar a GFP)
59	Transcrito primario de INTERCAMBIO2 (utilizado en el vector donante para apuntar a GFP)
60	Transcrito primario de INTERCAMBIO3 (utilizado en el vector donante para apuntar a PDS3)
61	Transcrito primario de INTERCAMBIO4 (utilizado en el vector donante para apuntar a PDS3)
62	Transcrito primario de INTERCAMBIO9 (utilizado en el vector donante para apuntar a ADH1)
63	Transcrito primario de INTERCAMBIO10 (utilizado en el vector donante para apuntar a ADH1)
64	Transcrito primario de miR390 (pri-miR390)
65	Transcrito primario de INTERCAMBIO5 (utilizado en el vector donante para apuntar a GFP)
66	Transcrito primario de INTERCAMBIO6 (utilizado en el vector donante para apuntar a GFP)
67	Transcrito primario de INTERCAMBIO7 (utilizado en el vector donante para apuntar a PDS3)
68	Transcrito primario de INTERCAMBIO8 (usado en el vector donante para apuntar a PDS3)
69	Transcrito primario de INTERCAMBIO11 (utilizado en el vector donante para apuntar a ADH1)
70	Transcrito primario de INTERCAMBIO12 (utilizado en el vector donante para apuntar a ADH1)
71	Secuencia de los loci de miR173
72	Secuencia oligo de INTERCAMBIO1 (utilizada en el vector donante para la modificación de miR173 para apuntar a GFP)
73	Secuencia oligo de INTERCAMBIO2 (utilizada en el vector donante para la modificación de miR173 para apuntar a GFP)
74	Secuencia oligo de INTERCAMBIO3 (utilizada en el vector donante para la modificación de miR173 para apuntar a PDS3)

(continuación)

SEQ ID NO:	Objetivo
75	Secuencia oligo de INTERCAMBIO4 (utilizada en el vector donante para la modificación de miR173 para apuntar a PDS3)
76	Secuencia oligo de INTERCAMBIO9 (utilizada en el vector donante para la modificación de miR173 para apuntar a ADH1)
77	Secuencia oligo de INTERCAMBIO10 (utilizada en el vector donante para la modificación de miR173 para apuntar a ADH1)
78	Secuencia oligo de los loci de miR390
79	Secuencia oligo de INTERCAMBIO5 (utilizada en el vector donante para la modificación de miR390 para apuntar a GFP)
80	Secuencia oligo de INTERCAMBIO6 (utilizada en el vector donante para la modificación de miR390 para apuntar a GFP)
81	Secuencia oligo de INTERCAMBIO7 (utilizada en el vector donante para la modificación de miR390 para apuntar a PDS3)
82	Secuencia oligo de INTERCAMBIO8 (utilizada en el vector donante para la modificación de miR390 para apuntar a PDS3)
83	Secuencia oligo de INTERCAMBIO11 (utilizada en el vector donante para la modificación de miR390 para apuntar a ADH1)
84	Secuencia oligo de INTERCAMBIO12 (utilizada en el vector donante para la modificación de miR390 para apuntar a ADH1)
85	qRT para la expresión del gen doméstico 18S (NC_037304) - Cebador directo
86	qRT para la expresión del gen doméstico 18S (NC_037304) - Cebador inverso
87	qRT para el análisis de la expresión de PDS3 (AT4G14210) - Cebador directo
88	qRT para el análisis de la expresión de PDS3 (AT4G14210) - Cebador inverso
89	qRT para el análisis de la expresión de ADH1 (AT1G77120) - Cebador directo
90	qRT para el análisis de la expresión de ADH1 (AT1G77120) - Cebador inverso
91	Cebador directo para la amplificación interna de miR390 y sus versiones modificadas
92	Cebador inverso para la amplificación interna de miR390 y sus versiones modificadas
93	Cebador directo para la amplificación externa de miR390 y sus versiones modificadas-reacción primaria
94	Inversa para la amplificación externa de miR390 y sus versiones modificadas-reacción primaria
95	Cebador directo para la amplificación externa de miR390 y sus versiones modificadas-reacción anidada
96	Inverso para la amplificación externa de miR390 y sus versiones modificadas-reacción anidada
97	Cebador directo para la amplificación interna de miR173 y sus versiones modificadas
98	Cebador inverso para la amplificación interna de miR173 y sus versiones modificadas
99	Cebador directo para la amplificación externa de miR173 y sus versiones modificadas-reacción primaria
100	Inversa para la amplificación externa de miR173 y sus versiones modificadas-reacción primaria
101	Cebador directo para la amplificación externa de miR173 y sus versiones modificadas-reacción anidada
102	Inverso para la amplificación externa de miR173 y sus versiones modificadas-reacción anidada

Aislamiento de protoplastos

- 5 Los protoplastos se aislaron incubando material vegetal (por ejemplo, hojas, callos, suspensiones celulares) en una solución de digestión (1 % de celulasa, 0,5 % de macroenzima, 0,5 % de driselasa, manitol 0,4 M, NaCl 154 mM, KCl 20 mM, MES 20 mM pH 5,6, CaCl₂ 10 mM) durante 4-24 horas a temperatura ambiente y agitación suave. Después de la digestión, el material vegetal restante se lavó con solución W5 (NaCl 154 mM, CaCl₂ 125 mM, KCl 5 mM, MES 2 mM pH 5,6) y la suspensión de protoplastos se filtró a través de un filtro de 40 µm. Después de centrifugar a 80 g
- 10 durante 3 minutos a temperatura ambiente, los protoplastos se resuspendieron en 2 ml de tampón W5 y se precipitaron por gravedad en hielo. El precipitado final de protoplastos se resuspendió en 2 ml de MMg (manitol 0,4 M, MgCl₂ 15 mM, MES 4 mM pH 5,6) y la concentración de protoplastos se determinó usando un hemocitómetro. La viabilidad de los protoplastos se estimó mediante tinción con azul tripán.

15 Transfección de plásmido mediada por polietilenglicol (PEG)

- La transfección de protoplastos con PEG se efectuó usando una versión modificada de la estrategia publicada por Wang [Wang *et al.*, Scientia Horticulture (2015) 191: pág. 82-89]. Los protoplastos se resuspendieron a una densidad de 2.5×10^6 protoplastos/ml en solución de MMg. Se añadieron 100-200 µl de suspensión de protoplastos a un tubo
- 20 que contenía el plásmido. La relación plásmido:protoplasto afecta en gran medida a la eficiencia de la transformación,

por lo tanto, se analizó un intervalo de concentraciones de plásmido en suspensión de protoplasto, 5-300 µg/µl. Se añadió solución de PEG (100-200 µl) a la mezcla y se incubó a 23 °C durante varios períodos de tiempo que oscilaron entre 10 y 60 minutos. Se optimizó la concentración de PEG4000, se analizó un intervalo de 20-80 % de PEG4000 en manitol 200-400 mM, solución de CaCl₂ 100-500 mM. A continuación, los protoplastos se lavaron en W5 y se centrifugaron a 80 g durante 3 minutos, previa resuspensión en 1 ml de W5 e incubación en oscuridad a 23 °C. Después de la incubación durante 24-72 horas, se detectó la fluorescencia por microscopía.

Clasificación FACS de células que expresan proteínas fluorescentes

24-72 horas después de la liberación del plásmido/ARN, las células se recolectaron y clasificaron para la expresión de proteínas fluorescentes usando un citómetro de flujo para enriquecer las células que expresan mCherry/Agente de edición como se ha descrito previamente [Chiang *et al.*, Sci Rep (2016) 6: 24356]. Esta etapa de enriquecimiento permite eludir la selección con antibióticos y recolectar solo células que expresan transitoriamente la proteína fluorescente, Cas9 y el ARNgc. Estas células pueden someterse a pruebas adicionales para la edición del gen diana mediante HR, lo que produce eventos de intercambio exitosos y la pérdida de la expresión génica correspondiente.

Bombardeo y regeneración de plantas

Preparación de raíz de Arabidopsis:

Se sembraron semillas de *Arabidopsis* esterilizadas con gas cloro (cv. Col-0) en placas MS sin sacarosa y se vernalizaron durante tres días en oscuridad a 4 °C, seguido de germinación vertical a 25 °C con luz constante. Después de dos semanas, las raíces se extirparon en segmentos de raíz de 1 cm y se colocaron en placas con medio inductor de callos (MIC: 1/2 MS con vitaminas B5, glucosa al 2 %, pH 5,7, 0,8 % de agar, 2 mg/l de IAA, 0,5 mg/l de 2,4-D, 0,05 mg/l de kinetina). Después de seis días de incubación en la oscuridad, a 25 °C, los segmentos de raíz se transfirieron a discos de papel de filtro y se colocaron en placas CIMM, (1/2 MS sin vitaminas, glucosa al 2 %, manitol 0,4 M, pH 5,7 y 0,8 % de agar) durante 4-6 horas, en preparación para el bombardeo.

Bombardeo

Las construcciones de plásmidos se introdujeron en el tejido de la raíz a través de PDS-1000/He Particle Delivery (Bio-Rad; PDS-1000/He System n.º1652257), se requirieron varias etapas preparatorias, descritas más adelante, para llevar a cabo este procedimiento.

Preparación de reserva de oro

Se mezclaron 40 mg de oro de 0,6 µm (Bio-Rad; n.º de cat: 1652262) con 1 ml de etanol al 100 %, se centrifugaron en pulsos hasta

obtener el sedimento y se retiró el etanol. Este procedimiento de lavado se repitió otras dos veces.

Una vez lavado, el sedimento se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril y se dispensó en tubos de 1,5 ml de volúmenes de trabajo alícuotas de 50 µl.

Preparación de perlas

En resumen, se realizó lo siguiente:

Un solo tubo era oro suficiente para bombardear 2 placas de raíces de *Arabidopsis*, (2 brotes por placa), por lo tanto, cada tubo se distribuyó entre 4 (1100 psi) discos de rotura biolística (Bio-Rad; n.º de cat: 1652329).

Los bombardeos que requieren múltiples placas de la misma muestra, los tubos se combinaron y los volúmenes de mezcla de ADN y CaCl₂/espermidina se ajustaron en consecuencia, para mantener la consistencia de la muestra y minimizar las preparaciones generales.

El siguiente protocolo resume el proceso de preparación de un tubo de oro, estos deben ajustarse de acuerdo con el número de tubos de oro utilizados.

Todos los procesos posteriores se llevaron a cabo a 4 °C en un termomezclador Eppendorf.

Se prepararon muestras de ADN plasmídico, comprendiendo cada tubo 11 µg de ADN añadido a una concentración de 1000 ng/µl

1) Se añadieron 493 µl de ddH₂O a 1 alícuota (7 µl) de espermidina (Sigma-Aldrich; S0266), dando una concentración final de espermidina 0,1 M. Se añadieron 1250 µl de CaCl₂ 2,5 M a la mezcla de espermidina, se agitó y se colocó en hielo.

2) Se colocó un tubo de oro previamente preparado en la termomezcladora y se hizo girar a una velocidad de

1400 rpm.

3) Se añadieron 11 µl de ADN al tubo, se agitó y se volvió a colocar en la termomezcladora giratoria.

4) Para la unión, la mezcla de ADN/partículas de oro, 70 µl de espermidina CaCl₂ se añadió a cada tubo (en el termomezclador).

5) Los tubos se agitaron enérgicamente durante 15-30 segundos y se colocaron en hielo durante aproximadamente 70 a 80 segundos.

6) La mezcla se centrifugó durante 1 minutos a 7000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se colocó en hielo.

7) Se añadieron 500 µl de etanol al 100 % a cada tubo y el sedimento se resuspendió mediante pipeteo y agitación vortical.

8) Los tubos se centrifugaron a 7000 rpm durante 1 minuto.

9) Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 50 µl de etanol al 100 % y se almacenó en hielo.

Preparación de macroportadores

En una campana de flujo laminar se realizó lo siguiente:

1) Los macroportadores (Bio-Rad; 1652335), pantallas de parada (Bio-Rad; 1652336) y los portadiscos macroportadores se esterilizaron y se secaron.

2) Los macroportadores se colocaron en plano en los soportes de discos de macroportadores.

3) La mezcla de oro recubierta de ADN se agitó y se esparció (5 µl) sobre el centro de cada disco Biolistic Rupture.

Se dejó evaporar el etanol.

PDS-1000 (Sistema de liberación de partículas de helio)

En resumen, se realizó lo siguiente:

La válvula reguladora de la botella de helio se ajustó a una presión de entrada de al menos 1300 psi. El vacío se creó presionando el interruptor vac/vent/ret y manteniendo presionado el interruptor de encendido durante 3 segundos. Esto aseguró que el helio se purgara en las tuberías.

Se colocaron discos de rotura de 1100 psi en isopropanol y se mezclaron para eliminar la estática.

1) Se colocó un disco de rotura en la tapa de retención del disco.

2) Se construyó el conjunto de lanzamiento del microportador (con una pantalla de parada y un microportador que contiene oro).

3) Se colocó callo de la raíz de *Arabidopsis* en placas de Petri de 6 m por debajo del conjunto de lanzamiento.

4) La presión de vacío se ajustó a 27 pulgadas de Hg (mercurio) y se abrió la válvula de helio (a aproximadamente 1100 psi).

5) Se liberó el vacío; se retiraron el conjunto de lanzamiento del microportador y la tapa de retención del disco de rotura.

6) Bombardeo sobre el mismo tejido (es decir, cada placa se bombardeó 2 veces).

7) Las raíces bombardeadas se colocaron posteriormente en placas MIC, en la oscuridad, a 25 °C, durante 24 horas adicionales.

Co-bombardeos

Al bombardear las combinaciones de plásmidos GEiGS, se mezclaron 5 µg (1000 ng/µl) del plásmido ARNgc con 8,5 µg (1000 ng/µl) de plásmido de intercambio y se añadieron 11 µl de esta mezcla a la muestra. Si se bombardea con más plásmidos GEiGS al mismo tiempo, la proporción de concentración de plásmidos de ARNgc y plásmidos de intercambio utilizados fue de 1:1,7 y se añadieron a la muestra 11 µg (1000 ng/µl) de esta mezcla. Si se co-bombardea con plásmidos no asociados con el intercambio de GEiGS, se mezclaron proporciones iguales y se añadieron 11 µg (1000 ng/µl) de la mezcla a cada muestra.

Regeneración de plantas

Para la regeneración de brotes, se llevó a cabo el protocolo modificado de Valvekens *et al.* D. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A (1988) 85(15): 5536-5540]. Las raíces bombardeadas se colocaron en placas de medios de inducción de brotes (SIM), que incluía 1/2 MS con vitaminas B5, glucosa al 2 %, pH 5,7, 0,8 % de agar, 5 mg/l de 2 iP, 0,15 mg/l de IAA. Las placas se dejaron en ciclos de 16 horas de luz a 25 °C-8 horas de oscuridad a 23 °C. Después de 10 días, las placas se transfirieron a placas MS con sacarosa al 3 %, agar al 0,8 % durante una semana, luego se transfirieron a placas similares nuevas. Una vez regeneradas las plantas, se extirparon de las raíces y se colocaron en placas MS con sacarosa al 3 %, agar al 0,8 %, hasta su análisis.

Formación de colonias y regeneración de plantas

Las células positivas para proteína fluorescente se muestrearon en parte y se usaron para la extracción de ADN y las

pruebas de edición del genoma (GE) y se sembraron en placas parcialmente a alta dilución en medio líquido para permitir la formación de colonias durante 28-35 días. Se recogieron las colonias, se cultivaron y se dividieron en dos alícuotas. Se usó una alícuota para la extracción de ADN y la prueba de edición del genoma (GE) y la prueba libre de

ADN CRISPR (véase más adelante), mientras que los demás se mantuvieron en cultivo hasta que se verificó su estado. Solo se seleccionaron los que mostraban claramente estar libres de ADN de GE y CRISPR. Las colonias se cultivaron en medio de cultivo durante aproximadamente 6-10 semanas. Las protocolonias (o callos) se subcultivaron en medios de regeneración (por ejemplo, vitaminas MS + B5 de potencia media, 20 g/l de sacarosa). Las plántulas regeneradas se colocaron en medio solidificado (agar al 0,8 %) con una intensidad de luz baja a 28 °C. Después de 2 meses, las plántulas se transfirieron al suelo y se colocaron en un invernadero a 80-100 % de humedad.

Inoculación de virus y liberación de ADN a plántulas de Arabidopsis

La savia de las hojas de *Arabidopsis* infectadas con el clon infeccioso p35S::TuMV-GFP de TuMV (0,1 mg/ml) se usa para inoculaciones mecánicas.

Propagación de plantas

Los clones que se secuenciaron y se predijo que habían perdido la expresión de los genes diana y se observó que estaban libres del ADN/ARN del sistema CRISPR se propagaron para su generación en grandes cantidades y, en paralelo, se diferenciaron para generar plántulas a partir de las cuales se realiza un ensayo funcional para evaluar el rasgo deseado.

Análisis fenotípico

Como se ha descrito anteriormente, tal como observando la pigmentación, la fluorescencia o la morfología dependiente del gen diana.

Selección de alcohol alílico

Para la selección de plantas con alcohol alílico, 10 días después del bombardeo, las raíces se colocaron en medios SIM. Las raíces se sumergieron en alcohol alílico 30 mM (Sigma-Aldrich, EE. UU.) durante 2 horas. Luego, las raíces se lavaron tres veces con medio MS y se colocaron en placas MS con sacarosa al 3 %, 0,8 % de agar. El proceso de regeneración se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente.

Genotipos

Las muestras de tejido se trataron y los amplicones se amplificaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. MyTaq Plant-PCR Kit (BioLine BIO 25056) para amplificación interna corta y Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific; F-130WH) para amplificaciones externas más largas. Los oligos utilizados para estas amplificaciones se especifican en la Tabla 2, anteriormente. Se identificaron diferentes modificaciones en los loci de miARN a través de diferentes patrones de digestión de los amplicones, de la siguiente manera:

Para las modificaciones de miR-390, el amplicón interno tenía una longitud de 978 pares de bases y para la amplificación externa, 2629 pares de bases. Para la identificación del swap 7, la digestión con NlaIII resultó en un tamaño de fragmento de 636 pares de bases, mientras que en la versión sv se dividió en 420 y 216 fragmentos largos.

Para la identificación del swap 8, la digestión con Hpy188I dio como resultado fragmentos de 293 y 339 pares de bases, mientras que en la versión sv este sitio estaba ausente y dio como resultado un fragmento de 632 de longitud. Para la preparación de los intercambios 11 y 12, la digestión con BclI dio como resultado un tamaño de fragmento de 662 pares de bases, mientras que en la versión sv se dividió en 147 y 417 fragmentos largos.

Para las modificaciones de miR-173, el amplicón interno tenía una longitud de 574 pares de bases, y para la amplificación externa anidada, tenía 466 pares de bases. Para la identificación del swap 3, la digestión con BslI dio como resultado fragmentos de 217 y 249 pares de bases en el amplicón externo y 317 y 149 en el interno. En la versión sv, este sitio estaba ausente y dio como resultado un fragmento de 466 de longitud en el amplicón externo y 574 en la reacción interna. Para la identificación del swap 4, la digestión con BtsI dio como resultado fragmentos de 212 y 254 pares de bases en el amplicón externo y de 212 y 362 en el interno. En la versión sv, este sitio estaba ausente y dio como resultado un fragmento de 466 de longitud en el amplicón externo y 574 en la reacción interna. Para la identificación del swap 9, la digestión con NlaIII dio como resultado fragmentos de 317 y 149 pares de bases en el amplicón externo y de 317 y 244 en el interno. En la versión sv, este sitio estaba ausente y dio como resultado un fragmento de 466 de longitud en el amplicón externo y 561 en la reacción interna. Para la identificación del swap 10, la digestión con NlaIII dio como resultado fragmentos de 375 y 91 pares de bases en el amplicón externo y de 375 y 186 en el interno. En la versión sv, este sitio estaba ausente y dio como resultado un fragmento de 466 de longitud en el amplicón externo y 561 en la reacción interna.

Aislamiento de ADN y ARN

Las muestras se recogieron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento. La trituración del

tejido se llevó a cabo en tubos colocados en hielo seco, utilizando morteros trituradores de tejidos de plástico (Axygen, EE.UU.). El aislamiento de ADN y ARN total del tejido molido se llevó a cabo utilizando el kit de purificación de ARN/ADN (cat. 48700; Norgen Biotek Corp., Canadá), según las instrucciones del fabricante. En el caso de una relación 260/230 baja ($< 1,6$), de la fracción de ARN, el ARN aislado se precipitó durante la noche a -20°C , con $1\ \mu\text{l}$ de glucógeno (cat. 10814010; Invitrogen, EE. UU.) acetato de sodio al $10\ \%$ v/v, $3\ \text{M}$ pH 5,5 (cat. AM9740, Invitrogen, EE. UU.) y 3 veces el volumen de etanol. La solución se centrifugó durante 30 minutos a máxima velocidad, a 4°C . A esto le siguieron dos lavados con etanol al $70\ \%$, secado al aire durante 15 minutos y resuspensión en agua libre de Nucleasa (cat. 10977035; Invitrogen, EE.UU.).

10 **Transcripción inversa (RT) y PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)**

Se trató un microgramo de ARN total aislado con ADNasa I según el manual del fabricante (AMPD1; Sigma-Aldrich, EE.UU.). La muestra se transcribió inversamente, siguiendo el manual del instructor del kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (cat 4368814; Applied Biosystems, US).

Para la expresión génica, El análisis de PCR en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR) se llevó a cabo en el sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch™ (BioRad, EE. UU.) y SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (S4438, Sigma-Aldrich, EE.UU.), según los protocolos del fabricante y se analizó con el programa administrador Bio-RadCFX (versión 3.1). Para el análisis de *AtADH1* (*AT1G77120*) se utilizó el siguiente conjunto de cebadores: Directo GTTGAGAGTGTGGAGAAGGAG SEQ ID NO: 367 e inverso CTCGGTGTGATCCTGAGAAG SEQ ID NO: 368; Para el análisis de *AtPDS3* (*AT4G14210*), se utilizó el siguiente conjunto de cebadores: Directo GTACTGCTGGTCCTTGCAG SEQ ID NO: 369 e inverso AGGAGCACTACGGAAGGATG SEQ ID NO: 370; Para el gen de calibración endógeno, se usó el gen de ARN ribosómico 18S (*NC_037304*) - Directo ACACCCTGGGAATTGGTTT SEQ ID NO: 371 e inverso GTATGCGCCAATAAGACCAC SEQ ID NO: 372.

25 **EJEMPLO 1A**

Silenciamiento génico inducido por edición del genoma (GEiGS)

Para diseñar oligos GEiGS, se requieren moléculas de ARN molde no codificantes (precursores) que se procesan y dan lugar a pequeñas moléculas de ARN silenciadoras derivadas (maduras). Se usaron dos fuentes de precursores y sus secuencias maduras correspondientes para generar oligos GEiGS. Para los miARN, las secuencias se obtuvieron de la base de datos miRBase [Kozomara, A. y Griffiths-Jones, S., Nucleic Acids Res (2014) 42: D68, ÑD73]. Los precursores y maduros de ARNtasi se obtuvieron de la base de datos ARNtasiDB [Zhang, C. et al, Bioinformatics (2014) 30: 1045, Ñ1046].

Las dianas de silenciamiento se eligieron en diversos organismos huésped (véase la Tabla 1B, anteriormente). Se diseñaron ARNpi contra estas dianas usando el software siRNArules [Holen, T., RNA (2006) 12: 1620, Ñ1625.]. Cada una de estas moléculas de ARNpi se usó para reemplazar las secuencias maduras presentes en cada precursor, generando oligos GEiGS "ingenuos". La estructura de estas secuencias ingenuas se ajustó para aproximarse lo más posible a la estructura del precursor de tipo salvaje utilizando el paquete ViennaRNA v2.6 [Lorenz, R. et al., ViennaRNA Package 2.0. Algorithms for Molecular Biology (2011) 6: 26]. Después del ajuste de la estructura, se calcularon el número de secuencias y los cambios de estructura secundaria entre el oligo de tipo salvaje y el modificado. Estos cálculos son esenciales para identificar oligos GEiGS potencialmente funcionales que requieren cambios de secuencia mínimos con respecto al tipo salvaje.

Se generaron pequeños ARN guía CRISPR/cas9 (ARNgc) contra los precursores de tipo salvaje utilizando el software CasOT [Xiao, A. et al., Bioinformatics (2014) 30: 1180, Ñ1182] (véase la Tabla 1B, anteriormente). Las ARNgc se seleccionaron cuando las modificaciones aplicadas para generar el oligo GEiGS afectan a la región PAM del ARNgc, haciéndolo ineficaz contra el oligo modificado.

50 **EJEMPLO 1B**

Silenciamiento génico de un gen vegetal endógeno - PDS

Con el fin de establecer un cribado de alto rendimiento para la evaluación cuantitativa del silenciamiento génico endógeno mediante el silenciamiento génico inducido por edición del genoma (GEiGS), los presentes inventores consideraron varios marcadores visuales potenciales. Los presentes inventores optaron por centrarse en los genes implicados en la acumulación de pigmentos, tales como los que codifican la fitoeno desaturasa (PDS). El silenciamiento de PDS provoca el fotoblanqueo (Figura 2B) que permite usarlo como robusta prueba de detección de plántulas después de la edición de genes como prueba de concepto (POC). Las Figuras 2A-C muestran un experimento representativo con plantas de *N. benthamiana* y *Arabidopsis* silenciadas para PDS. Las plantas muestran el fenotipo fotoblanqueador característico observado en plantas con cantidades disminuidas de carotenoides.

En el experimento POC, la elección de ARNpi se llevó a cabo del modo siguiente:
Para iniciar la maquinaria de ARNi en *Arabidopsis* o *Nicotiana benthamiana* contra el gen DE PDS usando la aplicación

GEiGS, existe la necesidad de identificar ARNpi efectivo de 21-24 pb que se dirija a PDS. Se utilizan dos enfoques para encontrar secuencias activas de ARNpi: 1) selección de la bibliografía, dado que el silenciamiento de PDS es un ensayo bien conocido en muchas plantas, los presentes inventores están identificando secuencias cortas de ARNpi bien caracterizadas en diferentes plantas que podrían coincidir al 100 % con el gen en *Arabidopsis* o *Nicotiana benthamiana*. 2) Hay muchos algoritmos públicos que se utilizan para predecir qué ARNpi será eficaz para iniciar el silenciamiento génico de un gen determinado. Dado que las predicciones de estos algoritmos no son del 100 %, los presentes inventores están utilizando solo secuencias que son el resultado de al menos dos algoritmos diferentes.

Para utilizar secuencias de ARNpi que silencian el gen PDS, los presentes inventores los están intercambiando con una secuencia de gen de ARN no codificante endógeno conocido usando el sistema CRISPR/Cas9 (por ejemplo, cambiando una secuencia de miARN, cambiando una secuencia larga de ARNbc, creando ARN antisentido, cambiando el ARNt, etc.). Hay muchas bases de datos de ARN no codificante caracterizados, por ejemplo, miARN; los presentes inventores eligen varios ARN no codificantes endógenos conocidos de *Arabidopsis* o *Nicotiana benthamiana*, por ejemplo, miARN con diferentes perfiles de expresión (por ejemplo, baja expresión constitutiva, alta expresión, inducida en el estrés, etc.). Por ejemplo, para intercambiar la secuencia endógena de miARN con ARNpi dirigido al gen PDS, los presentes inventores usan el enfoque de HR (recombinación homóloga). Usando HR, se contemplan dos opciones: usando una secuencia oligo de ADNmc de donante de alrededor de 250-500 nt que incluye, por ejemplo, la secuencia de miARN modificada en el medio o usando plásmidos que llevan un inserto de 1 Kb - 4 Kb que es casi un 100 % idéntico al miARN que rodea el genoma de la planta excepto los 2 x 21 pb del miARN y el *miARN que se cambia a ARNpi del PDS (500-2000 pb aguas arriba y aguas abajo del ARNpi, como se ilustra en la Figura 1). La transfección incluye las siguientes construcciones: sensor CRISPR:Cas9/GFP para rastrear y enriquecer células transformadas positivas, ARNgc que guían a Cas9 para producir una rotura de doble cadena (DSB) que es reparada por HR dependiendo del vector/oligo de inserción. El vector/oligo de inserción contiene dos regiones continuas de homología que rodean el locus diana que se reemplazan (es decir, miARN) y se modifican para llevar la mutación de interés (es decir, ARNpi). Si se utiliza plásmido, la construcción dirigida comprende o está libre de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción y se usa como molde para la recombinación homóloga que finaliza con el reemplazo del miARN con el ARNpi de elección. Después de la transfección a protoplastos, se usa FACS para enriquecer eventos transfectados con Cas9/ARNgc, los protoplastos se regeneran en plantas y las plántulas blanqueadas se examinan y califican (véase la Figura 1). Como control, los protoplastos se transfectan con un oligo que lleva una secuencia de direccionamiento aleatoria que no es PDS. Se espera que las plantas editadas positivas produzcan secuencias de ARNpi dirigidas a PDS y, por lo tanto, el gen de PDS se silencia y las plántulas se ven blancas en comparación con el control sin ARNg. Es importante señalar que después del intercambio, el miARN editado aún se procesará como miARN porque se mantiene el perfil original de apareamiento de bases. Sin embargo, el miARN procesado recién editado tiene una alta complementariedad con la diana (por ejemplo, 100 %) y, por lo tanto, en la práctica, el ARN pequeño recién editado actuará como ARNpi.

EJEMPLO 2

Silenciamiento génico de transgén "endógeno" - GFP

Otro enfoque rápido y sólido para verificar la eficiencia de GEiGS es silenciar un transgén que también es un gen marcador como GFP (proteína fluorescente verde). Hay pocas opciones fáciles para evaluar la efectividad del silenciamiento de GFP en la célula, por ejemplo, análisis FACS, PCR y microscopia. Para mostrar la POC del silenciamiento de GFP usando GEiGS, los presentes inventores usan líneas transgénicas de *Arabidopsis* o tabaco que expresan de forma estable GFP. Los protoplastos de plantas que expresan GFP se usan con metodología GEiGS para modificar ARN no codificante endógeno, por ejemplo, miARN para actuar como ARNpi potente para iniciar el mecanismo de silenciamiento de ARN dirigido al gen GFP. Cabe esperar que las plantas editadas positivas estén silenciadas para la expresión de GFP como se ilustra en la Figura 3. Por otra parte, el silenciamiento de GFP en plantas está bien caracterizado y hay muchas secuencias de ARN corto (ARNpi) disponibles que se pueden usar para iniciar el silenciamiento de GFP. Por lo tanto, para el intercambio de genes, los presentes inventores usan herramientas disponibles públicamente para generar ARNpi específico de GFP o usan moléculas de ARNpi conocidas disponibles en la bibliografía.

Para usar secuencias de ARNpi que silenciarán el gen de GFP, los presentes inventores los intercambian con una secuencia de gen de ARN no codificante endógeno conocido, por ejemplo secuencia del gen de miARN usando el sistema CRISPR/Cas9 (por ejemplo, cambiando una secuencia de miARN, cambiando una secuencia larga de ARNbc, creando ARN antisentido, cambiando el ARNt, etc.). Hay muchas bases de datos de ARN no codificantes caracterizados, por ejemplo, miARN, los presentes inventores eligen varios ARN no codificantes de *Arabidopsis* o *Nicotiana benthamiana* conocidos, por ejemplo, miARN con diferentes perfiles de expresión (por ejemplo, baja expresión constitutiva, alta expresión, inducida en el estrés, etc.). Por ejemplo, para intercambiar la secuencia endógena de miARN con ARNpi, los presentes inventores usan el enfoque de HR. En la HR se contemplan dos opciones: uso de una secuencia de oligos donantes de aproximadamente 250-500 pb que incluye, por ejemplo, la secuencia de ARNpi en el medio o utilizando plásmidos que expresan un inserto de 1 Kb - 4 Kb que es casi 100 % idéntico al miARN que rodea el genoma de la planta excepto los 2 x 21 pb del miARN y el *miARN que se cambia al ARNpi de la GFP (500-2000 pb aguas arriba y aguas abajo del ARNpi, véase la figura 1). La transfección incluye las siguientes construcciones: sensor CRISPR:Cas9/RFP para rastrear y enriquecer células transformadas positivas

usando, por ejemplo, el análisis FACS, ARNgc que guían a Cas9 para producir un DSB que es reparado por HR dependiendo del vector/oligo de inserción. El vector de inserción contiene dos regiones continuas de homología que rodean el locus diana que se reemplazan (es decir, miARN) y se modifican para llevar la mutación de interés (es decir, ARNpi). La construcción dirigida comprende o está libre de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción y se utiliza como molde para la recombinación homóloga que finaliza con el reemplazo del miARN por el ARNpi de elección. Después de la transfección a protoplastos, se usa FACS para enriquecer eventos transfectados positivos (usando el marcador de proteína fluorescente roja (RFP)), los protoplastos enriquecidos se puntúan para el silenciamiento de GFP bajo un microscopio (Figura 4). Se espera que los protoplastos editados positivos produzcan secuencias de ARNpi dirigidas a GFP y, por lo tanto, se espera que la expresión de GFP del transgén sea silenciada en comparación con los protoplastos de control. GFP es un método más rápido que PDS ya que las dos últimas etapas de recuperación y regeneración no son necesarias, la puntuación se puede realizar a nivel de protoplastos/células.

EJEMPLO 3

Silenciamiento génico de transgén-GFP exógeno en Arabidopsis

Además del ejemplo anterior de silenciamiento de GFP, otra forma de demostrar la eficiencia de GEiGS es silenciar un gen marcador como GFP (proteína fluorescente verde) en un ensayo de transformación de GFP transitorio. En este ejemplo, las primeras células vegetales (por ejemplo, *Arabidopsis*) se tratan usando GEiGS para expresar pequeñas moléculas de ARNpi dirigidas a GFP (el método para utilizar siGFP se analiza en el Ejemplo 2 anterior). Los protoplastos de control (por ejemplo, GEiGS-PDS) y los protoplastos editados usando GEiGS (que expresan siGFP) se transfectan luego con un plásmido que expresa por separado dos marcadores (sensor) GFP+RFP. Los protoplastos que expresan solo RFP pero no GFP en el tratamiento con GEiGS son los resultados del silenciamiento de GFP debido a la expresión de siGFP (como se ilustra en la Figura 5).

EJEMPLO 4

Plantas inmunizadas contra la infección por virus, silenciamiento del gen del virus exógeno (usando GFP como marcador)

Para probar que GEiGS es un método robusto para la inmunización de plantas con la capacidad de eliminar genes exógenos, los presentes inventores proporcionan un ejemplo de silenciamiento de un gen de virus. Existen varios virus que infectan a diferentes especies vegetales y que pueden ser utilizados en la presente POC: TuMV, CMV, TMV, etc.

El virus del mosaico del nabo (TuMV) se transmite de forma no persistente por pulgones y causa enfermedades prevalentes en cultivos de crucíferas en muchas partes del mundo. El genoma de TuMV, que es monocatenario, es una molécula de ARN de sentido positivo de aproximadamente 10.000 nt (número de acceso NC_002509). El TuMV tiene la misma organización genética típica de potyvirus tratada previamente por Urcuqui-Inchima *et al.* [Urcuqui-Inchima *et al.*, Virus Res. (2001) 74: 157-175]. Los síntomas de TuMV son moteados en áreas irregulares, circulares, amarillos y amplios. Las hojas más viejas a menudo se vuelven de color amarillo brillante por todas partes. La lámina a menudo se vuelve necrótica. Se hizo un uso extensivo de TuMV-GFP y TuMV-AS9-GFP deficiente en supresores para exponer las actividades de silenciamiento antiviral en *Arabidopsis*. Las plantas de tipo salvaje eran inmunes a TuMV-AS9-GFP, pero la inmunidad fue suprimida de forma eficaz por la pérdida de DCL2 y DCL4, lo que indica que TuMV normalmente enmascara los efectos de una respuesta antiviral dependiente de ARNpi [Hernan Garcia-Ruiz *et al.*, The Plant Cell (2010) 22: 481-496].

El virus del mosaico del pepino (CMV) es un virus fitopatógeno de la familia Bromoviridae. Es el miembro tipo del género de virus de plantas, Cucumovirus. Este virus tiene una distribución mundial y una gama de huéspedes muy amplia. De hecho, tiene la reputación de tener la gama de huéspedes más amplia de cualquier virus vegetal conocido. Puede transmitirse de una planta a otra tanto mecánicamente por la savia como por pulgones a través de estiletes. Este virus se encontró por primera vez en pepinos (*Cucumis sativus*) que mostraban síntomas de mosaico en 1934, de ahí el nombre de mosaico de pepino. Se desarrolló un vector de expresión basado en CMV que utiliza el mutante 3a MP para el movimiento de célula a célula independiente de CP. Este nuevo vector [Fujiki *et al.*, Virology (2008) 381(1): 136-142] se incorporó a un vector binario de agrobacterium y se administró a las plantas mediante agroinfiltración. Los resultados demuestran que este nuevo vector de expresión basado en CMV es muy prometedor para la producción de proteínas recombinantes.

El virus del mosaico del tabaco (TMV), un virus de ARN monocatenario que comúnmente infecta plantas solanáceas, una familia de plantas que incluye muchas especies, tales como petunias, tomates y tabaco. El virus causa un patrón de mosaico de manchas marrones en la superficie de las hojas. El virus no suele causar la muerte de la planta, pero puede impedir seriamente su crecimiento. Las hojas inferiores pueden sufrir "quemaduras de mosaico" en climas cálidos y secos, donde grandes áreas de la hoja mueren. Este virus no puede entrar en las plantas por sí solo. Las plantas generalmente se infectan a través de heridas en las plantas después de la manipulación humana o mediante equipos contaminados. Una vez dentro de la planta, el virus libera su código genético (ARN). La planta se confunde con este código, confundiendo con el suyo propio, y comienza a producir proteínas virales. Los sistemas de expresión basados en virus en plantas son particularmente atractivos frente a los sistemas de expresión transitorios alternativos

debido al alto nivel de multiplicación de genes y los niveles elevados concomitantes de expresión que se pueden lograr en un corto período de tiempo mientras se minimiza el deterioro de las actividades del huésped. El TMV es uno de los virus de plantas más estudiados y, por lo tanto, se ha convertido en una opción natural para el desarrollo de vectores. Los vectores basados en TMV han llevado a un rendimiento de proteína recombinante de hasta el 80 % de la proteína soluble total. La agroinfección es barata y reproducible, convirtiéndolo en un método preferido para administrar vectores de expresión viral en tejidos vegetales como parte del ADN-T de un vector binario transportado por *Agrobacterium tumefaciens*.

Los presentes inventores están usando TuMV-GFP para la infección de *Arabidopsis* o TMV-GFP para plantas de tabaco. Para crear plantas resistentes a la infección por virus, los presentes inventores usan un virus diseñado que expresa GFP tras la infección de la planta. El uso de dicho virus permitirá usar las mismas construcciones que se describen en el Ejemplo 3, anteriormente. La diferencia es que ahora la GFP se expresa a partir de la infección por el virus. Las plantas de control que están infectadas con virus-GFP (CMV o TMV) muestran expresión de GFP bajo el microscopio (Figura 6), sin embargo, se espera que las plantas GEiGS diseñadas para expresar siRNA GFP muestren niveles reducidos de GFP (Figura 6). En consecuencia, generar plantas GEiGS sin expresión de GFP después de la infección con virus-GFP demostrará que se logró silenciar el gen exógeno por ARNi y que GEiGS es un método eficaz para inmunizar plantas contra virus y potencialmente otros patógenos. Hay pocas opciones fáciles para evaluar la efectividad del silenciamiento de GFP en la célula, tal como el uso de análisis FACS, PCR y microscopía. El silenciamiento de GFP en plantas está bien caracterizado y hay muchas secuencias cortas de ARN disponibles (ARNpi) que son activas para iniciar el silenciamiento de GFP. Por lo tanto, para el intercambio de genes, los presentes inventores usan unas pocas moléculas de ARNpi conocidas disponibles en la bibliografía.

Para usar secuencias de ARNpi que silenciarán el gen de GFP, los presentes inventores los están intercambiando con un ARN no codificante endógeno conocido, por ejemplo, secuencia del gen de miARN utilizando el sistema CRISPR/Cas9 (como se ha tratado anteriormente, hay muchas otras opciones para introducir estas secuencias de ARNpi, como cambiar secuencias largas de ARNbc, creando ARN antisentido, cambiando el ARNt, etc.). Hay muchas bases de datos de ARN no codificante endógeno caracterizado, por ejemplo, miARN, los presentes inventores eligen varios ARN no codificantes de *Arabidopsis* o *Nicotiana benthamiana* conocidos, por ejemplo, miARN con diferentes perfiles de expresión (por ejemplo, baja expresión constitutiva, alta expresión, inducida en el estrés, etc.). Por ejemplo, para intercambiar la secuencia endógena de miARN con ARNpi, los presentes inventores usan el enfoque de HR. En la HR se contemplan dos opciones: uso de una secuencia de oligos donantes de aproximadamente 250-500 pb que incluye, por ejemplo, la secuencia de ARNpi en el medio o utilizando plásmidos que expresan un inserto de 1 Kb - 4 Kb que es casi 100 % idéntico al miARN que rodea el genoma de la planta excepto los 2 x 21 pb del miARN y el *miARN que se cambia al ARNpi de la GFP (500-2000 pb aguas arriba y aguas abajo del ARNpi, véase la figura 1). La transfección incluye las siguientes construcciones: sensor CRISPR:Cas9/RFP para rastrear y enriquecer células transformadas positivas usando, por ejemplo, el análisis FACS, ARNgc que guían a Cas9 para producir un DSB que es reparado por HR dependiendo del vector/oligo de inserción. El vector de inserción contiene dos regiones continuas de homología que rodean el locus diana que se reemplazan (es decir, miARN) y se modifican para llevar la mutación de interés (es decir, ARNpi). La construcción dirigida comprende o está libre de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción y se utiliza como molde para la recombinación homóloga que finaliza con el reemplazo del miARN por el ARNpi de elección. Después de la transfección a protoplastos, se usa FACS para enriquecer los eventos transfectados positivos, los protoplastos se regeneran en plantas y las plantas se infectan con el virus mediante inoculaciones mecánicas. Las plantas se califican para el silenciamiento de GFP bajo el microscopio (como se describe en la Figura 6). Se espera que los protoplastos editados positivos con GEiGS produzcan secuencias de ARNpi dirigidas a GFP y, por lo tanto, se espera que la expresión del gen de GFP del virus se silencie en comparación con las plantas de control sin editar.

EJEMPLO 5

Planta de plátano resistente a nematodos

El daño a la productividad del plátano debido a los nematodos es tremendo, alcanzando hasta un 50 % de pérdida de rendimiento en suelos no tratados. El problema se acentúa en las plantaciones tradicionales de plátano donde el monocultivo es una práctica común. La prohibición de nematicidas como bromuro de metilo en varias partes del mundo exacerbó el problema y deja a los agricultores con alternativas inapropiadas y poco confiables. *Radopholus similis*, el nematodo excavador, es el parásito nematodo del plátano de mayor importancia económica en el mundo. La infección por el nematodo excavador causa la enfermedad del derribo del plátano, amarillamiento del pimiento y disminución de la propagación de los cítricos. Estas enfermedades son el resultado de la infección por nematodos excavadores que destruyen el tejido de la raíz, dejando a las plantas con poco o ningún apoyo o capacidad para absorber agua y translocar nutrientes. Por los daños que provoca en los cítricos, plantas ornamentales y otras industrias agrícolas, a nivel mundial, el nematodo excavador es una de las plagas de plantas de nematodos más reguladas (Figura 7).

El ARN de interferencia (ARNi) se ha convertido en una herramienta invaluable de silenciamiento de genes para el análisis funcional en una amplia variedad de organismos, particularmente el nematodo modelo de vida libre *Caenorhabditis elegans*. Un número creciente de estudios han descrito su aplicación a nematodos parásitos de plantas. Los genes expresados en una variedad de tipos de células se silencian cuando los nematodos captan ARN

de doble cadena (ARNbc) o ARN de interferencia cortos (ARNpi) que provocan una respuesta sistémica de ARNi. Los extensos estudios de ARNpi con *C. elegans* sugieren que la prevención exitosa de que los nematodos completen su ciclo de vida se atribuye al silenciamiento de genes que se expresan temprano en el desarrollo embrionario. En *R. similis*, tales genes candidatos podrían ser Calreticulinal3 (CRT) o el gen colágeno 5 (col-5). La CRT es una proteína multifuncional de unión a Ca^{2+} que desempeña un papel clave en el parasitismo, la evasión inmunitaria, la reproducción y la patogenicidad de muchos parásitos animales y nematodos de plantas. Por lo tanto, CRT es una diana prometedora para controlar *R. similis*. Col-5 pertenece a los genes de colágeno de los nematodos que codifican proteínas que tienen una amplia gama de funciones. Entre sus productos más abundantes se encuentran los colágenos cuticulares, que incluyen aproximadamente el 80 % de las proteínas presentes en la cutícula del nematodo. Se ha encontrado que las estructuras de estos colágenos son sorprendentemente similares en las especies de nematodos parásitos y de vida libre estudiadas hasta ahora, y los genes que los codifican parecen constituir una gran familia multigénica cuya expresión está sujeta a la regulación del desarrollo.

Usando GEiGS, los presentes inventores están creando plantas de plátano que expresan moléculas de ARNpi que se transmiten desde sus raíces a los nematodos al alimentarse, y posteriormente inducen el silenciamiento de los genes de los nematodos. El silenciamiento de genes esenciales para la sucesión en el ciclo de vida inhibe la propagación de nematodos y anula los daños causados por nematodos. Los presentes inventores están cambiando algunos ARN no codificantes endógenos de plátano, por ejemplo, secuencias de miARN con secuencias cortas de los genes CRT o col-5. GEiGS se usa en protoplastos de plátano que se regeneran en plántulas y luego se analizan con diferentes nematodos para determinar su resistencia.

EJEMPLO 6

Planta de plátano resistente a Fusarium oxysporum

El género *Fusarium* incluye varias especies de hongos que se encuentran ampliamente distribuidos en suelos y sustratos orgánicos en todo el mundo. *Fusarium oxysporum* es una de las especies más relevantes de este género y es el agente causal de las pudriciones de raíces, enfermedades de marchitamiento y marchitamiento en más de 100 especies de plantas, incluyendo una amplia gama de cultivos hortícolas económicamente importantes, flores, árboles y una serie de cultivos de campo, tal como repollo, plátano y algodón. *Fusarium oxysporum* es un patógeno devastador que causa grandes pérdidas de rendimiento en una variedad de cultivos y el desarrollo de cultivos sostenibles y sostenibles, métodos respetuosos con el medio ambiente para mejorar la resistencia de los cultivos es crucial. *F. oxysporum* consiste en más de 120 formas especiales de cepas patógenas determinadas por sus plantas hospedantes primarias. Todas las cepas de *F. oxysporum* son saprófitas, siendo capaz de crecer y sobrevivir durante largos periodos sobre materia orgánica en el suelo haciéndolo muy difícil de controlar. Su ciclo de vida patogénico comienza con la germinación de esporas al reconocer un huésped adecuado. Una vez formadas las hifas, el patógeno ingresa a su huésped penetrando directamente en las raíces y lo coloniza dentro del xilema produciendo microconidios que conducen a la formación de micelio. La colonización y la producción de toxinas por el patógeno da como resultado el bloqueo del sistema vascular del huésped, causando síntomas característicos de la enfermedad, incluyendo coloración amarillenta de la vasculatura, aclaramiento de la vena, clorosis y necrosis en las nervaduras y hojas de las hojas, desprendimiento de hojas y marchitamiento. Una vez que la planta muere, el hongo esporula en las superficies de las hojas podridas. *F. oxysporum* es más prevalente en regiones tropicales y subtropicales y se espera que su rango geográfico se amplíe debido al cambio climático. Los métodos de control actuales para el marchitamiento por *Fusarium* son muy limitados y la rotación de cultivos es ineficaz debido a la gran variedad de huéspedes y su persistencia en el suelo. El manejo del marchitamiento por *Fusarium* se realiza principalmente a través de prácticas culturales e higiene de la granja que solo reducen la transmisión del inóculo, mientras que la esterilización del suelo solo se puede realizar en invernaderos. La fumigación del suelo con biocidas de amplio espectro, como el bromuro de metilo, es costosa y tiene muchos efectos peligrosos para el medio ambiente.

Hu han utilizado la tecnología de interferencia de ARN liberado por el huésped para silenciar parcialmente tres genes diferentes (FOW2, FRP1 y OPR) en el hongo hemibiotrófico *F. oxysporum* f. sp. *Conglutinans* [Hu et al., Front Chem. (2015) 20 (3):1]. La expresión de moléculas de ARN de doble cadena (ARNbc) dirigidas a genes de patógenos fúngicos se logró en varias líneas transgénicas de *Arabidopsis*. *F. oxysporum* que infectó las líneas transgénicas mostró niveles de ARNm sustancialmente reducidos en los tres genes diana, con un promedio de 75, 83 y 72 % de reducción para FOW2, FRP1 y OPR, respectivamente. El silenciamiento de genes patógenos tuvo un claro efecto positivo en la capacidad de las líneas transgénicas para combatir infecciones. Todas las líneas transgénicas mostraron una mayor resistencia a *F. oxysporum* con un retraso en el desarrollo de los síntomas de la enfermedad, especialmente las líneas FRP1 y OPR. Las tasas de supervivencia después de la infección fúngica fueron más altas en las líneas transgénicas en comparación con las plantas de tipo salvaje de control que mostraron consistentemente tasas de supervivencia del 10 %, con líneas FOW2 que muestran un 25 % de supervivencia; líneas FRP1 30-50 % de supervivencia y OPR entre 45 y 70 % de supervivencia. El efecto de regulación por disminución fue específico para los genes diana sin efectos imprevistos en los genes relacionados (Hu Z. (2015) citado anteriormente). Se demostró que en los hongos, tanto los ARNbc largos como los cortos se internalizan por igual e inducen al ARNi para silenciar los genes diana.

Los presentes inventores usan GEiGS para crear plantas de plátano resistentes a *F. oxysporum* cambiando algunos ARN no codificantes endógenos, por ejemplo, secuencias de miARN para apuntar específicamente a los genes de

hongos como FOW2, FRP1 y OPR. Los protoplastos editados se regeneran en plántulas y se exponen a *F. oxysporum* en un entorno controlado, las plantas resistentes se verifican para expresar el ARNpi relevante.

EJEMPLO 7

Árbol del café resistente al nematodo

El café es un género de plantas con flores cuyas semillas, llamados granos de café, se utilizan para hacer diversas bebidas y productos de café. Es un miembro de la familia de *Rubiaceae*. Son arbustos o pequeños árboles nativos de África tropical y meridional y Asia tropical. El café se clasifica como uno de los cultivos básicos más valiosos y ampliamente comercializados del mundo y es un importante producto de exportación de varios países, incluidos los de América Central y del Sur, el Caribe y África. Se ha atribuido una disminución constante en la producción de café a limitaciones bióticas y socioeconómicas. Entre las limitaciones bióticas menos estudiadas se encuentran los nematodos.

Los nematodos fitoparásitos se consideran una grave limitación para la producción de café en el mundo y especialmente en Vietnam (Figura 8). Las especies dominantes y más importantes son *Radopholus arabocoffeae* y *Pratylenchus coffeae*. Ambas especies son responsables de la muerte de plantas menores de 5 años. Convencionalmente, el método principal para controlar *P. coffeae* es por medios químicos; no existe una estrategia particular de control contra *R. arabocoffeae*.

Los presentes inventores usan la estrategia GEiGS (como se describe en el Ejemplo 5 anterior) para crear árboles de *Coffea canephora* (*Robusta*) que expresan moléculas de ARNpi que se transmiten desde sus raíces a los nematodos al alimentarse y, posteriormente, inducir el silenciamiento de los genes de los nematodos. El silenciamiento de genes esenciales para la sucesión en el ciclo de vida inhibe la propagación de nematodos y anula los daños causados por nematodos. Por lo tanto, los presentes inventores cambian algunos ARN no codificantes endógenos, por ejemplo, secuencias de miARN con secuencias cortas de los genes de nematodos. GEiGS se usa en protoplastos de café que se regeneran en plántulas y luego se analizan con diferentes nematodos para determinar su resistencia.

EJEMPLO 8

Generación de plantas con miARN endógeno modificado para apuntar a diferentes genes

Mínimas modificaciones en los loci genómicos de un miARN, en su secuencia de reconocimiento (que madurará a un miARN) puede conducir a un nuevo sistema para regular nuevos genes, de manera no transgénica. Por lo tanto, se utilizó un método de expresión transitoria libre de agrobacterias, para introducir estas modificaciones por bombardeo de raíces de *Arabidopsis* y su regeneración para su posterior análisis. Los presentes inventores habían elegido apuntar a dos genes, *PDS3* y *ADH1* en plantas de *Arabidopsis*.

Los carotenoides desempeñan un papel importante en muchos procesos fisiológicos de las plantas y el gen de la fitoeno desaturasa (*PDS3*) codifica una de las enzimas importantes en la ruta de biosíntesis de carotenoides, su silenciamiento produce un fenotipo albino/blanqueado. En consecuencia, las plantas con expresión reducida de *PDS3* exhiben niveles reducidos de clorofila, hasta albino completo y enanismo.

La alcohol deshidrogenasa (*ADH1*) comprende un grupo de enzimas deshidrogenasas que catalizan la interconversión entre alcoholes y aldehídos o cetonas con la reducción concomitante de NAD⁺ o NADP⁺. El propósito metabólico principal de esta enzima es la descomposición de sustancias tóxicas alcohólicas dentro de los tejidos. Las plantas que albergan una expresión reducida de *ADH1* exhiben una mayor tolerancia al alcohol alílico. En consecuencia, las plantas con *ADH1* reducido son resistentes al efecto tóxico del alcohol alílico, por lo que su regeneración se realizó con selección de alcohol alílico.

Se eligieron dos miARN bien establecidos para ser modificados, miR-173 y miR-390, que previamente se demostró que se expresan a lo largo del desarrollo de la planta [Zielezinski A *et al.*, BMC Plant Biology (2015) 15: 144]. Para introducir la modificación, se utilizó un sistema de 2 componentes. El primero, se utilizó el sistema CRISPR/CAS9, para generar una escisión en los loci miR-173 y miR-390, a través de ARN guía específicos diseñados (Figuras 12A y 13A; y la Tabla 2, anteriormente), para promover la reparación del ADN homólogo (HDR) en el sitio. El segundo, una secuencia DONANTE, con la modificación deseada de la secuencia de miARN, para apuntar a los genes recién asignados, se introdujo como molde para el HDR (Figuras 12A-G, 13A-G, 14A-D y 15A-D; Tabla 2, anteriormente). Adicionalmente, dado que la estructura secundaria del transcrito primario del miARN (pri-miARN) es importante para la correcta biogénesis y actividad del miARN maduro, se introdujeron modificaciones adicionales en la cadena complementaria en el pri-miARN y se analizaron en mFOLD ([www\(dot\)unafold\(dot\)rna\(dot\)Albany\(dot\)edu](http://www(dot)unafold(dot)rna(dot)Albany(dot)edu)) para la conservación de la estructura (Figuras 12A-G y 13A-G). En total, se diseñaron dos guías para cada loci de miARN y dos secuencias DONANTES diferentes (secuencias de miARN modificadas) para cada gen (Figuras 14A-D y 15A-D, y Tabla 2, anteriormente).

EJEMPLO 9***Bombardeo y regeneración de plantas***

Las construcciones GEiGS se bombardearon en raíces previamente preparadas (como se explica con detalle en la sección de materiales y procedimientos experimentales, más arriba) y se regeneraron. Las plántulas se seleccionaron a través del fenotipo blanqueado para los transformantes PDS3 y la supervivencia en el tratamiento con alcohol alílico para los transformantes ADH1. Para validar el intercambio en comparación con sin intercambio, es decir, tipo salvaje retenido, estas plantas se seleccionaron posteriormente para la inserción a través de cebadores específicos que abarcaban la región modificada seguido de digestión de restricción (Figura 16).

EJEMPLO 10***Validación de genotipos de selección de fenotipos***

Como se ha tratado anteriormente, la prueba de concepto (POC) para el sistema de edición de genes se estableció utilizando rasgos fenotípicos bien conocidos, fitoeno desaturasa (PDS3) y alcohol desaturasa (ADH1) como dianas.

Como se ha mencionado anteriormente, las plantas que albergan una expresión reducida de ADH1 exhiben una mayor tolerancia al alcohol alílico. Por lo tanto, las plantas bombardeadas con miARN modificado para dirigirse a ADH1 se regeneraron en medios que contenían alcohol alílico 30 mM y se compararon con la tasa de regeneración de las plantas de control. 118 plantas seleccionadas con alcohol alílico GEiGSn.^{º3}+INTERCAMBIO11 sobrevivieron, en comparación con 51 plantas de control en medios de alcohol alílico (datos no mostrados). De los GEiGSn.^{º3}+INTERCAMBIO11 seleccionados, se demostró que 5 albergaban al DONANTE (datos no mostrados). La gran cantidad de plantas que se regeneran en las plantas tratadas con DONANTE, podría deberse a una expresión transitoria, durante el proceso de bombardeo, también.

Por lo tanto, la selección de PDS3 y ADH1 mediante fenotipo blanqueado (Figura 16) y la selección de alcohol alílico (Figura 17), respectivamente, proporcionan un medio ideal para la selección de plántulas transformadas para el genotipado.

La región de intercambio de 4 kb se evaluó principalmente a través de cebadores internos y la diferenciación de amplicón específico del tipo salvaje original para la inserción a través de la variación de la digestión con enzimas de restricción.

ADH1 (Figura 17) mostró un genotipo comparativo de plantas seleccionadas con alcohol alílico con el patrón de restricción de presencia de DONANTE esperado en comparación con el plásmido DONANTE restringido y no restringido. PDS3 (Figura 16) mostró una comparación de los fenotipos de las muestras bombardeadas con y sin DONANTE y sus respectivos patrones diferenciales de digestión con enzimas de restricción en comparación con los del plásmido DONANTE restringido y no restringido. Estos resultados proporcionaron una asociación clara del fenotipo albino/blanqueado de PDS3 con el patrón de restricción esperado. Se llevó a cabo PCR externa posterior que combina pruebas internas, dentro de la región de intercambio, junto con cebador externo, fuera y específico de la región genómica a la que se realizó el intercambio (datos no mostrados). Se obtuvo una validación adicional del Intercambio a través de la secuenciación de Sanger de los amplicones de PCR, para evaluar la heterocigosidad, homocigosidad o presencia de Intercambio DONANTE (datos no mostrados).

EJEMPLO 11***Los miARN modificados reducen la expresión de su nuevo gen diana***

Con el fin de verificar el potencial de los miARN modificados en el sistema GEiGS para regular a la baja la expresión de sus nuevas dianas designadas, el análisis de la expresión génica se llevó a cabo mediante qRT-PCR (PCR cuantitativa en tiempo real). Se extrajo el ARN y se transcribió inversamente, de las plantas regeneradas identificadas positivamente y comparadas con plantas regeneradas, tratadas en paralelo, pero no se introdujeron con las construcciones de modificación relevantes. En el caso, cuando miR-173 se modificó para apuntar a PDS3 (GEiGSn.^{º4}+INTERCAMBIO4), se observó una reducción del 83 % en el nivel de expresión génica, en promedio, (Figura 18). En plantas con miR-390 modificado para apuntar a ADH1 (GEiGSn.^{º3}+INTERCAMBIO11), se observó un cambio similar en la expresión génica, el 82 % de los niveles en las plantas testigo (Figura 19). Considerados en conjunto, estos resultados corroboran los métodos de edición de genes para modificar miARN endógenos para apuntar con éxito a nuevos genes y reducir su expresión, reemplazando la secuencia de reconocimiento diana en la transcripción de miARN en el locus endógeno.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Tropic Biosciences UK Limited MAORI, Eyal GALANTY, Yaron PIGNOCCHI, Cristina CHAPARRO GARCÍA, Ángela MEIR, Ofir

<120> MODIFICACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE MOLÉCULAS DE ARN NO CODIFICANTES DE PLANTAS PARA SILENCIAR LA EXPRESIÓN GÉNICA

5	<130> 74277	
	<150> Gran Bretaña 1715113.5	
	<151> 19/09/2017	
10	<150> Gran Bretaña 1715116.8	
	<151> 19/09/2017	
	<150> Gran Bretaña 1719516.5	
	<151> 23/11/2017	
15	<160> 417	
	<170> PatentIn versión 3.5	
20	<210> 1	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Arabidopsis thaliana	
25	<400> 1	
	ctatccatcc tgagtttcat tgg	23
	<210> 2	
	<211> 23	
	<212> ADN	
30	<213> Arabidopsis thaliana	
	<400> 2	
	aagaatctgt aaagctcagg agg	23
35	<210> 3	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Arabidopsis thaliana	
40	<400> 3	
	cttgacagaga gaaatcacag tgg	23
	<210> 4	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Arabidopsis thaliana	
	<400> 4	
	gcttacacag agaatcacag agg	23
50	<210> 5	
	<211> 400	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Oligo-1: GEiGS_mirl73_si-GFP_I	
60	<400> 5	

ES 2 915 576 T3

```
gcataaaaaa gtcaacaaaa cttaaagcgg cggctctcatc gtaatctcag cccaataccc      60
tattttcctc tcccctatat aaatactttc ttcttctact gatcttcttc tcacaaataa      120
acccaaatat atcaatctac tgtgttggtg attaagtact taagtcgtgc tgcttcatgt      180
ggagtgggtca aaaaagttgt agttttctta aagtctcttt cctctccaca taagcaggac      240
gagttaagag cttgctccct aaacttatct ctctgatgat ttaatgtag agatcttcgt      300
aaatctatgt gtttgataga tctgatgcgt tttttgagtt gatgatttga ttatttttca      360
ctggaaagta tctcattagg gtaacgataa tgttttatgg      400
```

<210> 6
 <211> 400
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligo-2: GEiGS_mirl73_si-GFP_2
 <400> 6

```
gcataaaaaa gtcaacaaaa cttaaagcgg cggctctcatc gtaatctcag cccaataccc      60
tattttcctc tcccctatat aaatactttc ttcttctact gatcttcttc tcacaaataa      120
acccaaatat atcaatctac tgtgttggtg attaagtact tagttgtact ccagcttggtg      180
ccagtgggtca aaaaagttgt agttttctta aagtctcttt cctctggcaa agctgcagta      240
caactaagag cttgctccct aaacttatct ctctgatgat ttaatgtag agatcttcgt      300
aaatctatgt gtttgataga tctgatgcgt tttttgagtt gatgatttga ttatttttca      360
ctggaaagta tctcattagg gtaacgataa tgttttatgg      400
```

<210> 7
 <211> 400
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligo-3: GEiGS_mirl73_si-PDS_I
 <400> 7

```
gcataaaaaa gtcaacaaaa cttaaagcgg cggctctcatc gtaatctcag cccaataccc      60
tattttcctc tcccctatat aaatactttc ttcttctact gatcttcttc tcacaaataa      120
acccaaatat atcaatctac tgtgttggtg attaagtact ttatccacac aaactacctg      180
caagtgggtca aaaaagttgt agttttctta aagtctcttt cctcttgtag tagtttagtgt      240
ggataaagag cttgctccct aaacttatct ctctgatgat ttaatgtag agatcttcgt      300
aaatctatgt gtttgataga tctgatgcgt tttttgagtt gatgatttga ttatttttca      360
ctggaaagta tctcattagg gtaacgataa tgttttatgg      400
```

ES 2 915 576 T3

<210> 8
 <211> 400
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Oligo-4: GEiGS_mirl73_si-PDS_2

10

<400> 8

gcataaaaaa	gtcaacaaaa	cttaaagcgg	cggctctcatc	gtaatctcag	cccaataccc	60
tattttcctc	ttccctatat	aaatactttc	ttcttctact	gatcttcttc	tcacaaataa	120
acccaaatat	atcaatctac	tgtgttggtg	attaagtact	ttgacaatcc	agccaatcca	180
gcagtgggtca	aaaaagttgt	agttttctta	aagtctcttt	cctctgctga	ttggcaggat	240
tgtcaaagag	cttgctccct	aaacttatct	ctctgatgat	ttaatgttag	agatcttcgt	300
aatcttatgt	gtttgataga	tctgatgcgt	tttttgagtt	gatgatttga	ttatttttca	360
ctggaaagta	tctcattagg	gtaacgataa	tgttttatgg			400

<210> 9
 <211> 400
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Oligo-5: GEiGS_mir390a_si-GFP_I

20

<400> 9

agaggagatg	acgtgtgttc	cttcgaaccc	gagttttggt	cgtctataaa	tagcaccttc	60
tcttctcctt	cttcctcact	tccatctttt	tagcttcact	atctctctat	aatcggtttt	120
atcttttctt	aagtcacaac	caaaaaaac	aaagtagaga	agaatctgta	aagtcgtgct	180
gcttcatgtg	gatgatgatc	acattcggtt	tctatttttt	ccacatgaag	aagcacgact	240
tgattggctc	ttcttactac	aatgaaaaag	gccgaggcaa	aacgcctaaa	atcacttgag	300
aatcaattct	ttttactgtc	catttaagct	atctttttata	aacgtgtctt	attttctatc	360
tcttttggtt	aaactaagaa	actatagtat	tttgtctaaa			400

<210> 10
 <211> 400
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Oligo-6: GEiGS_mir390a_si-GFP_2

30

<400> 10

ES 2 915 576 T3

```

agaggagatg acgtgtgttc cttcgaaccc gagttttggt cgtctataaa tagcaccttc      60
tcttctcctt cttcctcact tccatctttt tagcttcact atctctctat aatcgggttt      120
atctttctct aagtcacaac ccaaaaaaac aaagtagaga agaatctgta agttgtactc      180
cagcttgtgc catgatgatc acattcggtt tctatTTTTT ggcacaagct tgagtacaac      240
tgattggctc ttcttactac aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag      300
aatcaattct ttttactgtc catttaagct atcttttata aacgtgtctt attttctatc      360
tcttttgttt aaactaagaa actatagtat tttgtctaaa      400

```

<210> 11
 <211> 400
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligo-7: GEiGS_mir390a_si-PDS_I

<400> 11

```

agaggagatg acgtgtgttc cttcgaaccc gagttttggt cgtctataaa tagcaccttc      60
tcttctcctt cttcctcact tccatctttt tagcttcact atctctctat aatcgggttt      120
atctttctct aagtcacaac ccaaaaaaac aaagtagaga agaatctgta tatccacaca      180
aactacctgc aatgatgatc acattcggtt tctatTTTTT tgcaggtagt gtgtgtggat      240
agattggctc ttcttactac aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag      300
aatcaattct ttttactgtc catttaagct atcttttata aacgtgtctt attttctatc      360
tcttttgttt aaactaagaa actatagtat tttgtctaaa      400

```

<210> 12
 <211> 400
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligo-8: GEiGS_mir390a_si-PDS_2

<400> 12

```

agaggagatg acgtgtgttc cttcgaaccc gagttttggt cgtctataaa tagcaccttc      60
tcttctcctt cttcctcact tccatctttt tagcttcact atctctctat aatcgggttt      120
atctttctct aagtcacaac ccaaaaaaac aaagtagaga agaatctgta tgacaatcca      180
gccaatccag catgatgatc acattcggtt tctatTTTTT gctggattgg atggattgtc      240
agattggctc ttcttactac aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag      300
aatcaattct ttttactgtc catttaagct atcttttata aacgtgtctt attttctatc      360

```

```

tcttttgttt aaactaagaa actatagtat tttgtctaaa      400

```

<210> 13

<211> 1005
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico del promotor de CaMV-35S

<400> 13

```

tttggagagg acaggcttct tgagatcctt caacaattac caacaacaac aaacaacaaa      60
caacattaca attactatctt acaattacag tgcactctag aggatccatg gtgagcaagg      120
gcgaggagct gttcaccggg gtggtgccca tcctggctga gctggacggc gacgtaaacg      180
gccacaagtt cagcgtgaga ggcgagggcg agggcgatgc caccaacggc aagctgaccc      240
tgaagttcat ctgcaccacc ggcaagctgc ccgtgccctg gccaccctc gtgaccaccc      300
tgacctacgg cgtgcagtgc ttcagccgct accccgacca catgaagcag cactgacttct      360
tcaagtccgc catgcccga ggctacgtcc aggagcgcac catctctttc aaggacgacg      420
gcacttacaa gaccgcgcc gaggtgaagt tcgagggcga caccctgggtg aaccgcatcg      480
agctgaaggg catcgacttc aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag ctggagtaca      540
acttcaacag ccacaacgtc tatatcactg ccgacaagca gaagaacggc atcaaggcca      600
acttcaagat ccgccacaac gttgaggacg gcagcgtgca gctcgccgac cactaccagc      660
agaacacccc catcggcgac ggccccgtgc tgctgcccgga caaccactac ctgagcaccc      720
agtccgttct gagcaaagac cccaacgaga agcgcgatca catggtcctg ctggagtctg      780
tgaccgccgc cgggatcact ctcggcattg acgagctgta caagtaaagc ggccgcccgg      840
ctgcagatcg ttcaaacatt tggcaataaa gtttcttaag attgaatcct gttgccggtc      900
ttgcgatgat tatcatataa tttctgttga attacgttaa gcatgtaata attaacatgt      960
aatgcatgac gttatttatg agatgggttt ttatgattag agtcc                        1005

```

10

<210> 14
 <211> 855
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico del terminador NOS

20 <400> 14

```

gctcgcccat gccgagagtg atcccggcgg cggtcacgaa ctccagcagg accatgtgat      60
cgcgcttctc gttgggggtct ttgctcagaa cggactgggt gctcaggtag tggttgtcgg      120
gcagcagcac ggggccgtcg ccgatggggg tggtctgctg gtagtggtcg gcgagctgca      180
cgctgccgtc ctcaacgttg tggcggatct tgaagttggc cttgatgccg ttcttctgct      240

```

		tgctcggcagt gatatagacg ttgtggctgt tgaagttgta ctccagcttg tgccccagga	300
		tgttgccgctc ctccctgaag tcgatgccct tcagctcgat gcggttcacc aggggtgctgc	360
		cctcgaactt cacctcggcg cgggtcttgt aagtgccgctc gtccttgaaa gagatgggtgc	420
		gtccctggac gtagccttcg ggcatggcgg acttgaagaa gtcgtgctgc ttcatgtggt	480
		cggggtagcg gctgaagcac tgcacgccgt aggtcagggg ggtcacgagg gtgggccagg	540
		gcacggggcag cttgccggtg gtgcagatga acttcagggg cagcttgccg ttggtggcat	600
		cgccctcgcc ctgcctctc acgtgaaact tgtggccgtt tacgtcgccg tccagctcga	660
		ccaggatggg caccaccccg gtgaacagct cctcgccctt gtcaccatg gatcctctag	720
		agtcgactgt aattgtaaat agtaattgta atgttgtttg ttgtttgttg ttgttggtaa	780
		ttgttgaagg atctcaagaa gcctgtcctc tccaaatgaa atgaacttcc ttatatagag	840
		gaagggtctt gcgaa	855
5		<210> 15 <211> 215 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10		<220> <223> Secuencia de ácido nucleico del terminador de CaMV-35S	
		<400> 15	
		cgctctgtca tcgttacaat caacatgcta ccctccgcga gatcatccgt gtttcaaacc	60
		cggcagctta gttgccgttc ttccgaatag catcggtaac atgagcaaag tctgccgcct	120
		tacaacggct ctcccgtga cgccgtcccg gactgatggg ctgcctgtat cgagtgggtga	180
		ttttgtgccg agctgccggt cggggagctg ttggc	215
15		<210> 16 <211> 216 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20		<220> <223> Secuencia de ácido nucleico de G7-ter	
		<400> 16	
		gatccccgt cgacagctag ctatatcatc aatttatgta ttacacataa tatcgcactc	60
		agtctttcat ctacggcaat gtaccagctg atataatcag ttattgaaat atttctgaat	120
		ttaaacttgc atcaataaat ttatgttttt gcttggacta taatacctga cttgttattt	180
25		tatcaataaa tatttaaact atatttcttt caagat	216
30		<210> 17 <211> 516 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
		<220> <223> Secuencia de ácido nucleico del promotor de CsVMV	

<400> 17

```
ccagaaggta attatccaag atgtagcatc aagaatccaa tgtttacggg aaaaactatg      60
gaagtattat gtaagctcag caagaagcag atcaatatgc ggcacatatg caacctatgt      120
tcaaaaatga agaattgtaca gatacaagat cctatactgc cagaatacga agaagaatac      180
gtagaaattg aaaaagaaga accagggcga gaaaagaatc ttgatgacgt aagcactgac      240
gacaacaatg aaaagaagaa gataaggctc gtgattgtga aagagacata gaggacacat      300
gtaagggtga aaatgtaagg gcggaaagta accttatcac aaaggaatct tatccccac      360
tacttatcct tttatatttt tccgtgtcat ttttgccctt gagttttcct atataaggaa      420
ccaagtccgg catthgtgaa aacaagaaaa aatttgggtg aagctattht ctttgaagta      480
ctgaggatac aacttcagag aaatttgtaa gtttgt                                     516
```

5

<210> 18
<211> 636
<212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana

10

<400> 18

```
gtcgacgagt cagtaataaa cggcgtcaaa gtggttgacg ccggcacaca cgagtcgtgt      60
ttatcaactc aaagcacaaa tacttttcct caacctaaaa ataaggcaat tagccaaaaa      120
caactttgag tgtaaacac gctcaataga cgtgtcattt tattattagc tattgcttca      180
ccgccttagc tttctcgtga cctagtcgtc ctcgtctttt cttcttcttc ttctataaaa      240
caatacccaa agagctcttc ttcttcacaa ttcagatttc aatttctcaa aatcttaaaa      300
actttctctc aattctctct accgtgatca aggtaaattt ctgtgttcct tattctctca      360
aaatcttcga ttttggtttc gttcgatccc aatttcgtat atgttctttg gtttagattc      420
tgttaatctt agatcgaaga cgattttctg ggtttgatcg ttagatatca tcttaattct      480
cgattagggt tcatagata tcatccgatt tgttcaaata atttgagttt tgtcgaataa      540
ttactcttcg atttgtgatt tctatctaga tctggtgtta gtttctagtt tgtgcgatcg      600
aattttaga ttaatctgag tttttctgat taacag                                     636
```

15

<210> 19
<211> 4140
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Secuencia de ácido nucleico pco_Cas9_NLS

<400> 19

ES 2 915 576 T3

atggataaga agtactctat cggactcgat atcggaaacta actctgtggg atgggctgtg	60
atcaccgatg agtacaaggt gccatctaag aagttcaagg ttctcggaaa caccgatagg	120
cactctatca agaaaaacct tatcgggtgct ctccctcttcg attctggtga aactgctgag	180
gctaccgagac tcaagagaac cgctagaaga aggtacacca gaagaaagaa caggatctgc	240
tacctccaag agatcttctc taacgagatg gctaaagtgg atgattcatt cttccacagg	300
ctogaagagt cattcctcgt ggaagaagat aagaagcacg agaggcacc cttcttcgga	360
aacatcgttg atgaggtggc ataccacgag aagtacccta ctatctacca cctcagaaaag	420
aagctcgttg attctactga taaggctgat ctgaggctca tctacctcgc tctcgctcac	480
atgatcaagt tcagaggaca cttcctcatc gaggggtgatc tcaacctga taactctgat	540
gtggataagt tgttcatcca gctcgtgcag acctacaacc agcttttcga agagaaccct	600
atcaacgctt caggtgtgga tgctaaggct atcctctctg ctaggctctc taagtcaaga	660
aggcttgaga acctcattgc tcagctccct ggtgagaaga agaacggact ttctcggaaac	720
ttgatcgctc tctctctcgg actcaccctt aacttcaagt ctaacttcga tctcgctgag	780
gatgcaaagc tccagctctc aaaggatacc tacgatgatg atctcgataa cctcctcgct	840
cagatcggag atcagtacgc tgatttggtc ctcgctgcta agaacctctc tgatgctatc	900
ctcctcagtg atatcctcag agtgaacacc gagatcacca aggctccact ctgagcttct	960
atgatcaaga gatacgatga gcaccaccag gatctcacac ttctcaaggc tcttggttaga	1020
cagcagctcc cagagaagta caaagagatt ttcttcgatc agtctaagaa cggatacgct	1080
ggttacatcg atggtgggtg atctcaagaa gagttctaca agttcatcaa gcctatcctc	1140
gagaagatgg atggaaccga ggaactcctc gtgaagctca atagagagga tcttctcaga	1200
aagcagagga ccttcgataa cggatctatc cctcatcaga tccacctcgg agagttgcac	1260
gctatcctta gaaggcaaga ggatttctac ccattcctca aggataacag ggaaaagatt	1320
gagaagattc tcaccttcag aatcccttac tacgtgggac ctctcgctag aggaaactca	1380
agattcgctt ggatgaccag aaagtctgag gaaaccatca ccccttgga cttcgaagag	1440
gtggtggata aggtgctag tgctcagtct ttcatcgaga ggatgaccaa cttcgataag	1500
aaccttccaa acgagaaggt gctccctaag cactctttgc tctacgagta cttcaccgtg	1560
tacaacgagt tgaccaaggt taagtacgtg accgagggaa tgaggaagcc tgcttttttg	1620
tcaggtgagc aaaagaaggc tatcgttgat ctcttggtca agaccaacag aaaggtgacc	1680
gtgaagcagc tcaaagagga ttacttcaag aaaatcgagt gcttcgattc agttgagatt	1740
tctggtggtg aggatagggt caacgcattc ctcggaacct accacgatct cctcaagatc	1800
attaaggata aggatttctt ggataacgag gaaaacgagg atatcttgga ggatatcggt	1860
cttaccctca ccctctttga agatagagag atgattgaag aaaggctcaa gacctacgct	1920

ES 2 915 576 T3

catctcttcg	atgataaggt	gatgaagcag	ttgaagagaa	gaagatacac	tggttgggga	1980
aggctctcaa	gaaagctcat	taacggaatc	agggataagc	agtctggaaa	gacaatcctt	2040
gatttcctca	agtctgatgg	attcgctaac	agaaacttca	tgagctcat	ccacgatgat	2100
tctctcacct	ttaaagagga	tatccagaag	gctcaggttt	caggacaggg	tgatagtctc	2160
catgagcata	tcgctaacct	cgctggatct	cctgcaatca	agaagggaat	cctccagact	2220
gtgaagggtg	tggatgagtt	ggtgaagggtg	atgggaaggc	ataagcctga	gaacatcggtg	2280
atcgaaatgg	ctagagagaa	ccagaccact	cagaaggggac	agaagaactc	tagggaaagg	2340
atgaagagga	tcgaggaagg	tatcaaagag	cttggatctc	agatcctcaa	agagcaccct	2400
gttgagaaca	ctcagctcca	gaatgagaag	ctctacctct	actacctcca	gaacggaagg	2460
gatatgtatg	tggatcaaga	gttggatatc	aacaggctct	ctgattacga	tgttgatcat	2520
atcgtgccac	agtcattctt	gaaggatgat	tctatcgata	acaagggtgct	caccagggtct	2580
gataagaaca	ggggtgaagag	tgataacgtg	ccaagtgaag	aggttgtgaa	gaaaatgaag	2640
aactattgga	ggcagctcct	caacgctaag	ctcatcactc	agagaaagtt	cgataacttg	2700
actaaggctg	agaggggagg	actctctgaa	ttggataagg	caggattcat	caagaggcag	2760
cttgtggaaa	ccaggcagat	cactaagcac	gttgcacaga	tcctcgattc	taggatgaac	2820
accaagtacg	atgagaacga	taagttgatc	agggaagtga	aggttatcac	cctcaagtca	2880
aagctcgtgt	ctgatttcag	aaaggatttc	caattctaca	aggtagggga	aatcaacaac	2940
taccaccacg	ctcacgatgc	ttaccttaac	gctgttggtg	gaaccgctct	catcaagaag	3000
tatcctaagc	tcgagtcaga	gttcgtgtac	ggtgattaca	agggtgtacga	tgtgaggaag	3060
atgatcgcta	agtctgagca	agagatcgga	aaggctaccg	ctaagtattt	cttctactct	3120
aacatcatga	atttcttcaa	gaccgagatt	accctcgcta	acgggtgagat	cagaaagagg	3180
ccactcatcg	agacaaacgg	tgaaacaggt	gagatcggtg	gggataaggg	aagggtatttc	3240
gctaccgtta	gaaagggtgct	ctctatgcca	cagggtgaaca	tcgttaagaa	aaccgaggtg	3300
cagaccggtg	gattctctaa	agagtctatc	ctccctaaga	ggaactctga	taagctcatt	3360
gctaggaaga	aggattggga	ccctaagaaa	tacggtgggt	tcgattctcc	taccgtggct	3420
tactctgttc	tcgttggtgc	taaggttgag	aagggaaaga	gtaagaagct	caagtctgtt	3480
aaggaacttc	tcggaatcac	tatcatggaa	aggatcatct	tcgagaagaa	cccaatcgat	3540
ttcctcgagg	ctaagggata	caaagagggt	aagaaggatc	tcatcatcaa	gctcccaaag	3600
tactcactct	tcgaactcga	gaacggtaga	aagaggatgc	tcgcttctgc	tggtgagctt	3660
caaaagggaa	acgagcttgc	tctcccatct	aagtacgtta	actttcttta	cctcgcttct	3720
cactacgaga	agttgaaggg	atctccagaa	gataacgagc	agaagcaact	tttcgttgag	3780

ES 2 915 576 T3

	cagcacaagc actacttggga tgagatcatc gagcagatct ctgagttctc taaaaggggtg	3840
	atcctcgctg atgcaaacct cgataagggtg ttgtctgctt acaacaagca cagagataag	3900
	cctatcaggg aacaggcaga gaacatcatc catctcttca cccttaccaa cctcggtgct	3960
	cctgctgctt tcaagtactt cgatacaacc atcgatagga agagatacac ctctacccaa	4020
	gaagtgcctg atgctaccct catccatcag tctatcactg gactctacga gactaggatc	4080
	gatctctcac agctcggtgg tgattcaagg gctgatccta agaagaagag gaaggtttga	4140
5	<210> 20 <211> 263 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia de ácido nucleico de AtuNoster	
	<400> 20	
	gtcaagcaga tcgttcaaac atttggcaat aaagtttctt aagattgaat cctggtgccg	60
	gtcttgcgat gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca	120
	tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg tttttatgat tagagtcccg caattataca	180
	tttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg	240
	tgatcatctat gttactagat cga	263
15	<210> 21 <211> 1147 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Clon de la construcción sintética eGFP-OsP5SM_E/R gen eGFP (eGFP)	
	<400> 21	
	atgtctagag tgagcaaggc cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccac cctggtcgag	60
	ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgatgcc	120
	acctacggca agctgaccct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg	180
	cccaccctcg tgaccaccct gacctacggc gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac	240
	atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca ggaggtagat	300
	ttatgcatcc tcttgtcatg agaagtcgaa ttgttcccat tctgtgtgtt gcagctacag	360
	atggagatac atagagatac tcgtggattt tgcttagtgt tgagttttgt tctggttgtg	420
	aactaaaagt ttatacattt gcaggaaata aatagccttt tgtttaaatc aaaaggtctt	480
	acctatgtta gtgtgaagca ttggatccca aagaactcca aaatgcgatg aggcatattt	540
	aatcttgtct ggactagtaa caggttggga tgaccacctg tgaagctcca acaggattgc	600
25	ctcctcacgc aatgtttgag gtctgatgtt caatagcttg ttttgtttca ctttgctttg	660

gacttttcttt	tcgccaatga	gctatgtttc	tgatggtttt	cactcttttg	gtgtgtagag	720
aaccatcttc	ttcaaggacg	acggcaacta	caagaccgcg	gccgaggtga	agttcgaggg	780
cgacaccctg	gtgaaccgca	tcgagctgaa	gggcatcgac	ttcaaggagg	acggcaacac	840
ctggggcaca	agctggagta	caactacaac	agccacaacg	tctatatcat	ggccgacaag	900
cagaagaagg	catcaagggtg	aacttcaaga	tccgccacaa	catcgaggac	ggcagcgtgc	960
agctcgccga	ccactacagc	agaacacccc	catcggcgac	ggccccgtgc	tgctgcccga	1020
caaccactac	ctgagcacc	agtccgccct	gagcaaagac	cccaacgaga	agcgcgatca	1080
catggtcctg	ctggagttcg	tgaccgccgc	cgggatcact	ctcggcattg	acgagctgta	1140
caagtaa						1147

<210> 22

<211> 2074

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 22

caattatgtg	ttaaagatac	aaacttttgt	ctgatttgct	tccaccggtt	tcacctaaga	60
tactcaattt	tcttactttt	tgtgtgtttt	gtaattctaa	ttcttttata	gcttcaattt	120
ttagattcat	tgaagcagtt	gtgagttaag	ttggagaaaa	tggttggtgt	tgggaatgtt	180
tctgcggcga	atttgcctta	tcaaaacggg	tttttgagg	cactttcatc	tggaggttgt	240
gaactaatgg	gacatagctt	tagggttccc	acttctcaag	cgcttaagac	aagaacaagg	300
aggaggagta	ctgctggtcc	tttgcaggta	gtttgtgtgg	atattccaag	gccagagcta	360
gagaacactg	tcaatttctt	ggaagctgct	agtttatctg	catccttccg	tagtgctcct	420
cgctctgcta	agcctttgaa	agttgtaatt	gctgggtgctg	gattggctgg	attgtcaact	480
gcaaagtacc	tggctgatgc	aggccacaaa	cctctgttgc	ttgaagcaag	agatgttctt	540
ggtggaaaga	tagctgcatg	gaaggatgaa	gatggggact	ggtatgagac	tggtttacat	600
atcttcttcg	gtgcttatcc	gaatgtgcag	aatttatattg	gagaacttgg	gatcaatgat	660
cggttgcagt	ggaaggaaca	ctccatgatt	tttgctatgc	caagtaaacc	tggagaattt	720
agtagatttg	acttcccaga	tgtcctacca	gcacccttaa	atggtatttg	ggctattttg	780
cggacaacg	agatgctgac	atggccagag	aaaataaagt	ttgctattgg	acttttgcca	840
gccatggtcg	gcggtcaggc	ttatgttgag	gccaagatg	gtttatcagt	caaagaatgg	900
atggaaaagc	agggagtacc	tgagcgcgtg	accgacgagg	tgtttattgc	catgtcaaag	960
gcgctaaact	ttataaaccc	tgatgaactg	tcaatgcaat	gcattttgat	agctttgaac	1020
cggtttcttc	aggaaaaaca	tggttccaag	atggcattct	tggtatggtta	tcctccggaa	1080
aggctttgta	tgccagtagt	ggatcatatt	cgatcactag	gtggggaagt	gcaacttaat	1140

tctaggataa agaaaattga gctcaatgac gatggcacgg ttaagagttt cttactcact	1200
aatggaagca ctgtcgaagg agacgcttat gtgtttgccg ctccagtcga taccctgaag	1260
ctcctttttac cagatccctg gaaagaaata ccgtacttca agaaattgga taaattagtt	1320
ggagtaccag ttattaatgt tcatatatgg tttgatcgaa aactgaagaa cacatatgat	1380
cacctactct ttagcagaag taaccttctg agcgtgtatg ccgacatgtc ctttaacttgt	1440
aaggaatatt acgatcctaa ccggtcaatg ctggagctag tatttgcacc agcagaggaa	1500
tggatatcac ggactgattc tgacatcata gatgcaacaa tgaaagaact tgagaaactc	1560
ttccctgatg aaatctcagc tgaccaaagc aaagctaaaa ttctgaagta ccatgtcggt	1620
aagactccaa gatctgtgta caagaccatc ccaaactgtg aacctatgtcgc tcctctacaa	1680
agatcaccta ttgaaggatt ctacttagct ggagattaca caaaacagaa gtacttagct	1740
tccatggaag gcgctgtcct ctctggcaaa ttctgctctc agtctattgt tcaggattac	1800
gagctactgg ctgcgtctgg accaagaaag ttgtcggagg caacagtatc atcatcatga	1860
gaagaggaca aaacttaag atgatttgct tgtaagcatt attatttggtg tataaatctc	1920
attgcaatcc aaacttaacc ttactctctt cagtaaatga atctcacaga ttgacatct	1980
cacgtttctg tcaattttat aattttttaa aagtaattac tgtcgacctt ttgtaatcat	2040
agtgatttat cattatgtct ctctttttaa aacc	2074

<210> 23

<211> 1419

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 23

ggagcatctt cattcttaag atatgaagat aatcttcaaa aggcccttgga gaatctgaaa	60
gaagagaagc aggccattt atatgggaaa gaacaatagt atttcttata taggccatt	120
taagttgaaa acaatcttca aaagtccac atcgcttaga taagaaaacg aagctgagtt	180
tatatacagc tagagtcgaa gtagtgattg tgagacggat atcaatacgc aaaccgcctc	240
tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag	300
cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca cccaggctt	360
tacactttat gcttccggct cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca	420
catactagag aaagaggaga aatactagat ggcttcctcc gaggacgtta tcaaagagtt	480
catgcgtttc aaagttcgta tggaagggtc cgtaaacggt cacgagttcg aaatcgaagg	540
tgaaggtgaa ggtcgtccgt acgaagggtac ccagaccgct aaactgaaag ttaccaaaag	600
tggtccgctg ccgttcgctt gggacatcct gtccccgcag ttccagtacg gttccaaagc	660
ttacgttaaa caccggctg acatcccgga ctacctgaaa ctgtccttcc cggaagggtt	720

5

10

caa atgggaa cgtgttatga acttcgagga cgggtggtgtt gttaccgtta cccaggactc	780
ctccctgcaa gacggtgagt tcatctacaa agttaaactg cgtggtacca acttcccgtc	840
cgacggtccg gttatgcaga aaaaaacat ggggtgggaa gcttccaccg aacgtatgta	900
cccggaggac ggtgctctga aaggtgaaat caaaatgcgt ctgaaactga aagacggtgg	960
tcactacgac gctgaagtta aaaccaccta catggctaaa aaaccggttc agctgccggg	1020
tgcttacaaa accgacatca aactggacat cacctccac aacgaggact acaccatcgt	1080
tgaacagtac gaacgtgctg aaggtcgtca ctccaccggt gcttaataac gctgatagt	1140
ctagtgtaga tcgctactag agccaggcat caaataaaac gaaaggctca gtcgaaagac	1200
tgggcctttc gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc tctactagag tcacactggc	1260
tcaccttcgg gtgggccttt ctgcgtttat acgtctcagt tttagagcta gaaatagcaa	1320
gttaaaataa ggctagtccg ttatcaactt gaaaaagtgg caccgagtcg gtgctttttt	1380
tctagacca gctttcttgt acaaagttgg cattacgct	1419

<210> 24

<211> 1286

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Promotor pol 3 sintético U6III para la expresión de ARNgc

<400> 24

```

ggagtatgat caaaagtccc acatcgatca ggtgatatat agcagcttag tttatataat      60
gatagagtcg acatagcgat tgggagacgc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg      120
gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgagcg      180
caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc caggctttac actttatgct      240
tccggctcgt atgttggtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacat actagagaaa      300
gaggagaaat actagatggc ttcctccgag gacgttatca aagagttcat gcgtttcaaa      360
gttcgtatgg aaggttccgt taacggtcac gagttcgaat tcgaagggtga aggtgaagggt      420
cgtccgtacg aaggtaccca gaccgctaaa ctgaaagtta ccaaagggtg tccgctgccg      480
ttcgcttggg acatcctgtc cccgcagttc cagtacggtt ccaaagctta cgtaaacaac      540
ccggctgaca tcccggacta cctgaaaactg tccttcccgg aaggtttcaa atgggaacgt      600
gttatgaact tcgaggacgg tgggtgtgtt accgttacct aggactcctc cctgcaagac      660
ggtgagttca tctacaaagt taaactgcgt ggtaccaact tcccgtccga cgggtccggt      720
atgcagaaaa aaaccatggg ttgggaagct tccaccgaac gtatgtacct ggaggacggt      780
gctctgaaag gtgaaatcaa aatgcgtctg aaactgaaag acggtggtca ctacgacgct      840
gaagttaaaa ccacctacat ggctaaaaaa ccggttcagc tgccgggtgc ttacaaaacc      900
gacatcaaac tggacatcac ctcccacaac gaggactaca ccatcggtga acagtacgaa      960
cgtgctgaag gtcgtcactc caccggtgct taataacgct gatagtgcta gtgtagatcg     1020
ctactagagc caggcatcaa ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gcctttcggtt     1080
ttatctgttg tttgtcgggtg aacgctctct actagagtca cactggctca ccttcgggtg     1140
ggcctttctg cgtttatacg tctccgtttt agagctagaa atagcaagtt aaaataaggc     1200
tagtccgtta tcaacttgaa aaagtggcac cgagtcggtg ctttttttct agaccagct      1260
ttcttgtaca aagttggcat tacgct                                     1286

```

5 <210> 25
 <211> 2074
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

10 <400> 25

ES 2 915 576 T3

caattatgtg ttaaagatac aaacttttgt ctgatttgct tccaccggtt tcacctaaga	60
tactcaattt tcttactttt tgtgtgtttt gtaattctaa ttcttttata gcttcaattt	120
ttagattcat tgaagcagtt gtgagttaag ttggagaaaa tggttgtgtt tgggaatgtt	180
tctgcggcga atttgcctta tcaaaacggg tttttggagg cactttcatc tggaggttgt	240
gaactaatgg gacatagctt tagggttccc acttctcaag cgcttaagac aagaacaagg	300
aggaggagta ctgctggtcc tttgcaggta gtttgtgtgg atattccaag gccagagcta	360
gagaacactg tcaatttctt ggaagctgct agtttatctg catccttccg tagtgctcct	420
cgtcctgcta agcctttgaa agttgtaatt gctggtgctg gattggctgg attgtcaact	480
gcaaagtacc tggctgatgc aggccacaaa cctctgttgc ttgaagcaag agatgttctt	540
ggtggaaaga tagctgcatg gaaggatgaa gatggggact ggtatgagac tggtttacat	600
attttcttcg gtgcttatcc gaatgtgcag aatttatattg gagaacttgg gatcaatgat	660
cggttgcagt ggaaggaaca ctccatgatt tttgctatgc caagtaaacc tggagaattt	720
agtagatttg acttcccaga tgtcctacca gcacccttaa atggtatttg ggctattttg	780
cggaacaacg agatgctgac atggccagag aaaataaagt ttgctatttg acttttgcca	840
gcatgggtcg gcggtcaggc ttatgttgag gcccaagatg gtttatcagt caaagaatgg	900
atggaaaagc agggagtacc tgagcgcgtg accgacgagg tgtttattgc catgtcaaag	960
gcgctaaact ttataaaccc tgatgaactg tcaatgcaat gcattttgat agctttgaac	1020
cggtttcttc aggaaaaaca tggttccaag atggcattct tggatggtaa tcctccggaa	1080
aggctttgta tgccagtagt ggatcatatt cgatcactag gtggggaagt gcaacttaat	1140
tctaggataa agaaaattga gctcaatgac gatggcacgg ttaagagttt cttactcact	1200

aatggaagca ctgtcgaagg agacgcttat gtgtttgccg ctccagtcga taccctgaag	1260
ctcctttttac cagatccctg gaaagaaata ccgtacttca agaaattgga taaattagtt	1320
ggagtaccag ttattaatgt tcatatatgg tttgatcgaa aactgaagaa cacatatgat	1380
cacctactct ttagcagaag taaccttctg agcgtgtatg ccgacatgtc cttaacttgt	1440
aaggaatatt acgatcctaa ccggtcaatg ctggagctag tatttgacc agcagaggaa	1500
tggatatcac ggactgattc tgacatcata gatgcaacaa tgaaagaact tgagaaactc	1560
ttccctgatg aaatctcagc tgaccaaagc aaagctaaaa ttctgaagta ccatgtcggt	1620
aagactccaa gatctgtgta caagaccatc ccaaactgtg aaccatgtcg tcctctacaa	1680
agatcaccta ttgaaggatt ctacttagct ggagattaca caaaacagaa gtacttagct	1740
tccatggaag gcgctgtcct ctctggcaaa ttctgctctc agtctattgt tcaggattac	1800
gagctactgg ctgcgtctgg accaagaaag ttgtcggagg caacagtatc atcatcatga	1860
gaagaggaca aaacttaaag atgatttgct tgtaagcatt attatttggt tataaatctc	1920
attgcaatcc aaacttaacc ttactctctt cagtaaatga atctcacaga ttgacatct	1980
cacgtttctg tcaattttat aattttttaa aagtaattac tgcgcacctt ttgtaatcat	2040
agtgatttat cattatgtct ctctttttaa aacc	2074

<210> 26
 <211> 2290
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

 <400> 26

5

ES 2 915 576 T3

ctttggtggg caaaaacata ttagctgaga ggtcaatttc tttttcccct aaaccaaatt	60
acgttgagat gcatggtctc tctctactca attaaccaaa taaggaaaag aatcatatgg	120
tcatcaattc gtaaatcaaa attttaattt gtgtggtatt taatccatct acatgtttcg	180
taagcaacaa aagagcttgg tctgaaaacc aaacaagacc atatgggcac tcgaatactc	240
cattttgtta tcggctactt ccactagcct cctccttcgc tgcgtctcct gtttctctac	300
ttcacgatta ctcgctagat tcattgaagc agttgtgagt taagttggag aaaatggttg	360
tgtttgggaa tgtttctgcg gcgaatttgc cttatcaaaa cgggtttttg gaggcacttt	420
catctggagg ttgtgaacta atgggacata gctttagggt tcccacttct caagcgctta	480
agacaagaac aaggaggagg agtactgctg gtcctttgca ggtagtttgt gtggatattc	540
caaggccaga gctagagaac actgtcaatt tcttggaagc tgctagttta tctgcatcct	600
tccgtagtgc tcctcgtcct gctaagcctt tgaaagttgt aattgctggt gctggattgg	660
ctggattgtc aactgcaaag tacctggctg atgcaggcca caaacctctg ttgcttgaag	720
caagagatgt tcttggtgga aagatagctg catggaagga tgaagatggg gactggtatg	780

```

agactggttt acatattttc ttcgggtgctt atccgaatgt gcagaattta tttggagaac      840
ttgggatcaa tgatcggttg cagtgggaag aacactccat gatttttgct atgccaagta      900
aacctggaga atttagtaga tttgacttcc cagatgtcct accagcacc ttaaattggtta      960
tttgggctat tttgcggaac aacgagatgc tgacatggcc agagaaaata aagtttgcta     1020
ttggactttt gccagccatg gtcggcggtc aggccttatgt tgaggcccaa gatggtttat     1080
cagtcaaaga atggatggaa aagcaggag tacctgagcg cgtgaccgac gaggtgttta     1140
ttgccatgtc aaaggcgcta aactttataa accctgatga actgtcaatg caatgcattt     1200
tgatagcttt gaaccgggtt cttcaggaaa aacatggttc caagatggca ttcttggtat     1260
gtaatcctcc ggaaaggctt tgtatgccag tagtggatca tattcgatca ctaggtgggg     1320
aagtgcaact taattctagg ataaagaaaa ttgagctcaa tgacgatggc acggttaaga     1380
gtttcttact cactaatgga agcactgtcg aaggagacgc ttatgtgttt gccgctccag     1440
tcgatatcct gaagctcctt ttaccagatc cctggaaaga aataccgtac ttcaagaaat     1500
tggataaatt agttggagta ccagttatta atgttcatat atggtttgat cgaaaaactga     1560
agaacacata tgatcaccta ctcttttagc gaagtaacct tctgagcgtg tatgccgaca     1620
tgtccttaac ttgtaaggaa tattacgatc ctaaccggtc aatgctggag ctagtatttg     1680
caccagcaga ggaatggata tcacggactg attctgacat catagatgca acaatgaaag     1740
aacttgagaa actcttcctt gatgaaatct cagctgacca aagcaaagct aaaattctga     1800
agtaccatgt cgtaagact ccaagatctg tgtacaagac catcccaaac tgtgaaccat     1860
gtcgtcctct acaaagatca cctattgaag gattctactt agctggagat tacacaaaac     1920
agaagtactt agcttccatg gaaggcgctg tcctctctgg caaattctgc tctcagtcta     1980
ttgttcagga ttacgagcta ctggctgctg ctggaccaag aaagttgtcg gaggcaacag     2040
tatcatcatc atgagaagag gacaaaactt aaagatgatt tgcttgtaag cattattatt     2100
tgtgtataaa tctcattgca atccaaactt aaccttactc tcttcagtaa atgaatctca     2160
cagatttgac atctcacgtt tctgtcaatt ttataatttt taaaagtaa ttactgtcga     2220
ccttttgtaa tcatagtgat ttatcattat gtctctcttt taaaacctt ttctggtaca     2280
aattataaaa                                     2290

```

<210> 27
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de eGFP [construcción sintética]

<400> 27

ES 2 915 576 T3

Met Ser Arg Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro
 1 5 10 15
 Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val
 20 25 30
 Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys
 35 40 45
 Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val
 50 55 60
 Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His
 65 70 75 80
 Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val
 85 90 95
 Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg
 100 105 110
 Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu
 115 120 125
 Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu
 130 135 140
 Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln
 145 150 155 160
 Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp
 165 170 175
 Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly
 180 185 190
 Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser
 195 200 205
 Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu
 210 215 220
 Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr
 225 230 235 240
 Lys

ES 2 915 576 T3

	<210> 28		
	<211> 107		
	<212> ADN		
	<213> Arabidopsis thaliana		
5	<400> 28		
	guagagaaga aucuguaaag cucaggaggg auagcgccau gaugaucaca uucguuau	60	
	auuuuuuggc gcuauccauc cugaguuuca uuggcucuuc uuacuac	107	
10	<210> 29		
	<211> 102		
	<212> ADN		
	<213> Arabidopsis thaliana		
15	<400> 29		
	uaaguacuuu cgcuugcaga gagaaucac aguggucaa aaaguuguag uuuucuuaaa	60	
	gucucuuucc ucugugauuc ucuguguaag cgaaagagcu ug	102	
20	<210> 30		
	<211> 711		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Secuencia de ácido nucleico que codifica mCherry,		
	<400> 30		
	atggtgagca agggcgagga ggataacatg gccatcatca aggagtcat gcgcttcaag	60	
	gtgcacatgg agggctccgt gaacggccac gagttcgaga tcgaggcgga gggcgagggc	120	
	cgcccctacg agggcaccca gaccgccaag ctgaaggtga ccaagggtgg ccccctgccc	180	
	ttcgcctggg acatcctgtc ccctcagttc atgtacggct ccaaggccta cgtgaagcac	240	
	cccgccgaca tccccgacta cttgaagctg tccttccccg agggcttcaa gtgggagcgc	300	
	gtgatgaact tcgaggacgg cggcgtggtg accgtgaccc aggactcctc cctgcaggac	360	
	ggcgagttca tctacaaggt gaagctgcgc ggcaccaact tcccctccga cggcccagta	420	
	atgcagaaga aaaccatggg ctgggaggcc tcctccgagc ggatgtaccc cgaggacggc	480	
	gccctgaagg gcgagatcaa gcagaggctg aagctgaagg acggcgcca ctacgacgct	540	
	gaggtcaaga ccacctaaa ggccaagaag cccgtgcagc tgcccggcgc ctacaacgtc	600	
	aacatcaagt tggacatcac ctcccacaac gaggactaca ccatcgtgga acagtacgaa	660	
	cgcgccgagg gccgccactc caccggcggc atggacgagc tgtacaagtg a	711	
30	<210> 31		
	<211> 4100		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> Plásmido 1: GEiGS_mirl73_si-GFP_I		
40	<400> 31		

ES 2 915 576 T3

cacttatcat ttagacagta gatttttaaat ttgtattttac aatttcacaaa ctgaaattca	60
tttgtaatca aagaaaaaca aaacaagaaa agggaggagg agtgggattt gggttgctta	120
acagtattat atatacacgt cgtaggttaa tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta	180
tgaacatggt tttaacaaat tggtaaattc atgtcattgt tgtagcactt tagcgaggcc	240
agcaaaatgg cgttcttgga aagggcatgg cggcccgagg cggccaggga tatgtgtgca	300
gctagaagga ttagaaggag taacttcacc tttttgtaga aactgtaa attgccaagacg	360
ctcgtttggt aaatacctta acgcttcggt tgctggaatg tgtaccacca ttagtagaag	420
aaagtataat aagactatta atgcaagaga ttttttcata ttccttttct aagagtagaa	480
tggaatgaat aaatgaatga atgaaatagg gtttttcttg ttttagatcct gtcgcacccg	540
agaataatag aagctgaatt aattgggtgaa gagttttatg gtggcgatgt tgtatttata	600
gagggaaatg atttcaagtt tacaatggga tttttaattt gttttgttga ctattatctt	660
gcggagagat cttgactggt gacatgtatg tagtggttgt tattaaaata aatgcatttt	720
tgtagaccog attcttaaat atgttaggca tggcacaatt gtttagactgt aaaagcttga	780
gtagagacat cggcacaatt tgtttacaag aattctctat aaaatattat acaaattgat	840
cggtagaaat tagatggaac attttgaatt aatgtttgac aatgtataaa ttggtttggt	900
caatatctag gaatgaaac aagagctgct tcaaatgtgt tccattctta agtatacata	960
gaggtggctt gatgggaagt ttcatggaag tgtagtttta tatctacttc caaatcgtt	1020
gatctgtttc ttatctcaag ctaaacatgt ttagaaaaga tgtgttaaaa acatgtgaca	1080
aaaaaagagt caaatgtttg gcaacaagg tacttagatt tttggcatct attcaaatat	1140
aatagaatcc caaaattatg atatttgtca atcaaatttg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1200
aaagattcta caaaagatca aacgtattgc cgtagattta tcataatttt aattctttca	1260
cactaccact agtccactac catatagtga tgagataatc cataatcata aataagatat	1320
aactttcgaa ttcttggttt tgttgcctca aagttgttgg atcattattt ttacgtaaa	1380
tgtggcttaa tgagaattta tgtttgtggg aattgtagtt tgctccaac ttttttttt	1440
tttttttgaa cacgtagttt gcttccaact tagtttatct ttttcttatt tcaagttaa	1500
catgtaaaaa aacatgtgac gacgaaattc aatcagttcc tccaatgttt ggcagaagcc	1560
aaatctttgg taaacaaagt aatttttttg ccatttgatt ggttagtata ggagaattta	1620
aaaacgacga taaggtttag gtaaattatt tcatttgaaa ataattgagc accgttaata	1680
attttcatcc ataaaataat atttcaaaga tgatatttga tccccattaa attcattcgt	1740
aaccaaaaaa aagttatgaa aaaagagtgg tcgtgtgagt tgcccaagca ccattataat	1800

ES 2 915 576 T3

aaaaaataaaa	ataattagca	agtaataagg	aataaaatcc	tgtaattata	gctgaaaaaag	1860
gaaaaatatt	tgagaccgt	cagattcgaa	tctgaacaaa	gcataaaaaa	gtcaacaaaa	1920
cttaaagcgg	cggctctcatc	gtaatctcag	cccaataccc	tattttcctc	tcccctatat	1980
aaatactttc	ttcttctact	gatcttcttc	tcacaaataa	acccaaatat	atcaatctac	2040
tgtgttggtg	attaagtact	taagtcgtgc	tgcttcatgt	ggagtgggtca	aaaaagttgt	2100
agttttctta	aagtctcttt	cctctccaca	taagcaggac	gagttaagag	cttgctccct	2160
aaacttatct	ctctgatgat	ttaatgttag	agatcttcgt	aaatctatgt	gtttgataga	2220
tctgatgcgt	tttttgagtt	gatgatttga	ttatttttca	ctggaaagta	tctcattagg	2280
gtaacgataa	tgttttatgg	atttggttgt	ataacagatc	catgaaatct	tgactgggtta	2340
taaaatctga	ataatgtatt	tcaatttgga	gattcgggtga	taaaaattac	tgatttacga	2400
atgacattta	tatcgataga	tgagtttgct	gatttggttg	ttaaattgat	aaatcaagga	2460
catgagaaac	tgtttttgta	tgctaatttg	tccatggaat	aaaattggga	ggtgaggacc	2520
gtgagggtag	tcaggaaacc	ttaatattga	agttgatgtt	gaaccaacaa	atctgcccaa	2580
aatgataaaa	agttgatgcc	gagcccacaa	attttgatga	caatcgataa	gccaagccc	2640
aaaaggcatc	tgtacctgag	cccattattc	tttcattact	agcaaaaagg	atgcattaga	2700
gaccccggtg	tagtaaattg	acctcacaat	tcactattgt	attgtatacg	tacatttcaa	2760
gcgtaattaa	accctcatat	ttttatacgc	tttaaatata	attggccttt	aattagctca	2820
aataaactag	atgtcgtacg	tgatcacggt	ggatgaaatc	aatggtatta	tgaaaagact	2880
gtacatgatt	tcaaataatt	taatgtggtc	gtaaaaattg	ttgtttatag	tggaattga	2940
agacaacaac	gttactgaaa	cacatacaga	ttgaaatttc	gatcatttac	ttgcaaagtg	3000
ttaccgtgga	ggcgtggcgt	ggacgtaagg	taccataatg	gtttgtgtta	cagtcacgcc	3060
actacactcg	aattcaagct	accatattat	aatacgttgt	tgattagaaa	aaatagtcgc	3120
caattttctt	taaaacaaat	ttcagttttt	atttgtcagc	aaaaaaaaact	tactaacaca	3180
acggaagaac	acaaaaatta	gggagttgct	cacagagcaa	aagtaataga	aatgggaaaa	3240
gctaataatac	gtccgagtag	gaaactaatc	ttgcaaaaac	tgatgaaagc	aatcagaagc	3300
cttgacgttt	gtctggagag	aggaattgtg	ttttggatca	ctttgttcag	tttgttgtgg	3360
atcgtcttcc	gttacgttct	caccaaaaat	atttcataat	gaaacaaaaa	aattaattaa	3420
taatggtagc	ttagaatgcc	aagttgagaa	cagatttgca	gtttgtcccg	gaatgatcaa	3480
gtagagcatt	catagtgtct	tgccaatatg	gtgtgatcaa	cgaagtttga	caaaaccgtg	3540
aagatatagg	aacatgtaat	catgcggctc	tccatacaat	acatcttggt	gacaaagttc	3600
ccaagacctc	attctacaaa	ccaatgtttc	ttttttcttt	ttcttttttg	tgatagtttt	3660
tgcaatcaaa	tgttgtaaaa	ctatgattgg	aaatactact	gtattttacc	gaaaacttta	3720

ttatatatag tcattaacac tcattaccaa tcacataatc aatagtctat tttgattata	3780
caactttttaa acaataaaga catgtttata cagatttggt ttaaattagt actccctata	3840
ttttagaaaa ttttattttg tttcatatta tagaatgtct tggaaagttc tatgtaaatt	3900
taaatgtatt tagtaacttg tgacgatttt atattatgta gtctttttta ggatttggtg	3960
atTTTTTaaa ataaattttt taaagaaaaa aaacaaatta ttttaataaa catgccttta	4020
ccttatacag tttatatttt gaaagagaga tagtatgttt taggatatat ttaaagaaaa	4080
aaaaataact ctttaattta	4100

<210> 32

<211> 4100

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido 2: GEiGS_mirl73_si-GFP_2

<400> 32

cacttatcat ttagacagta gattttaaat ttgtatttac aatttcaaaa ctgaaattca	60
tttgtaatca aagaaaaaca aaacaagaaa agggaggagg agtgggattt gggttgctta	120
acagtattat atatacacgt cgtagttaa tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta	180
tgaacatggg tttaccaa attgtaaattc atgtcattgt tgtagcactt tagcgaggcc	240
agcaaaatgg cgttcttgga aagggcattg cggcccgtgg cggccaggga tatgtgtgca	300
gctagaagga ttagaaggag taacttcacc tttttgtaga aactgtaaat tgccaagacg	360
ctcgtttggt aaatacctta acgcttcggt tgctggaatg tgtaccacca ttagtagaag	420
aaagtataat aagactatta atgcaagaga ttttttcata ttccttttct aagagtagaa	480
tggaatgaat aaatgaatga atgaaatagg gtttttcttg tttagatcct gtcgcacccg	540
agaataatag aagctgaatt aattgggtgaa gagttttatg gtggcgatgt tgtatttata	600
gagggaaatg atttcaagtt tacaatggga tttttaattt gttttgttga ctattatctt	660
gcggagagat cttgactgtt gacatgtatg tagtgtttgt tattaaaata aatgcatttt	720
tgtagacccg attcttaaat atgttaggca tgggtcaaatt gttagactgt aaaagcttga	780
gtagagacat cgggtcaactt tgtttacaag aattctctat aaaatattat acaaattgat	840
cggtagaaat tagatggaac attttgaatt aatgtttgac aatgtataaa ttgggttggt	900
caatatctag gaatgaaaac aagagctgct tcaaagttgt tccattctta agtatacata	960
gaggtggcct gatgggaagt ttcatggaag tgtagtttta tatctacttc caaattcggt	1020
gatctgtttc ttatctcaag ctaaacaatg ttagaaaaga tgtgttaaaa acatgtgaca	1080
aaaaaagagt caaatgtttg gcaaacaagg tacttagatt tttggcatct attcaaatat	1140

ES 2 915 576 T3

aatagaatcc	caaaattatg	atatttgtca	atcaaatttg	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1200
aaagattcta	caaaagatca	aacgtattgc	cgtagattta	tcataatttt	aattcctttca	1260
cactaccact	agtccactac	catatagtga	tgagataatc	cataatcata	aataagatat	1320
aactttcgaa	ttcttgtttt	tgttgcctca	aagttggttg	atcattattt	tttacgtaaa	1380
tgtggcttaa	tgagaattta	tgtttgtggg	aattgtagtt	tgcttccaac	tttttttttt	1440
tttttttgaa	cacgtagttt	gcttccaact	tagtttatct	ttttcttatt	tcaagttaaa	1500
catgtaaaaa	aacatgtgac	gacgaaattc	aatcagttcc	tccaatgttt	ggcagaagcc	1560
aaatccttgg	taaacaaagt	aatttttttg	ccatttgatt	ggtagtata	ggagaattta	1620
aaaacgacga	taaggtttag	gtaaattatt	tcatttgaaa	ataattgagc	accgttaata	1680
attttcatcc	ataaaataat	atttcaaaga	tgatatttga	tccccattaa	attcattcgt	1740
aacccaaaaa	aagttatgaa	aaaagagtgg	tcgtgtgagt	tgcccaagca	ccattataat	1800
aaaaaataaa	ataattagca	agtaataagg	aataaaatcc	tgtaattata	gctgaaaaag	1860
gaaaaatatt	tgagagaccg	cagattcgaa	tctgaacaaa	gcataaaaaa	gtcaacaaaa	1920
cttaaagcgg	cgggtctcatc	gtaatctcag	cccaatacc	tattttcctc	tcccctatat	1980
aaatactttc	ttcttctact	gatcttcttc	tcacaaataa	acccaaatat	atcaatctac	2040
tgtgttggtg	attaagtact	tagttgtact	ccagcttggtg	ccagtgggtca	aaaaagttgt	2100
agttttctta	aagtctcttt	cctctggcaa	agctgcagta	caactaagag	cttgctccct	2160
aaacttatct	ctctgatgat	ttaatgttag	agatcttcgt	aaatctatgt	gtttgataga	2220
tctgatgcgt	tttttgagtt	gatgatttga	ttatttttca	ctggaaagta	tctcattagg	2280
gtaacgataa	tgttttatgg	atttggttgt	ataacagatc	catgaaatct	tgactgggtta	2340
taaaatctga	ataatgtatt	tcaatttgga	gattcgggtga	taaaaattac	tgatttacga	2400
atgacattta	tatcgataga	tgagtttgct	gatttggttg	ttaaattgat	aatcaagga	2460
catgagaaac	tgtttttgta	tgctaatttg	tccatggaat	aaaattggga	ggtgaggacc	2520
gtgagggtag	tcaggaaacc	ttaatattga	agttgatggt	gaaccaacaa	atctgcccaa	2580
aatgataaaa	agttgatgcc	gagcccacaa	attttgatga	caatcgataa	gcccagccc	2640
aaaaggcatc	tgtacctgag	cccattattc	tttcattact	agcaaaaagg	atgcattaga	2700
gaccccggtg	tagtaaattg	acctcacaat	tcactattgt	attgtatacg	tacatttcaa	2760
gcgtaattaa	accctcatat	ttttatacgc	tttaaatata	attggccttt	aattagctca	2820
aataaactag	atgtcgtacg	tgatcacggt	ggatgaaatc	aatggtatta	tgaaaagact	2880
gtacatgatt	tcaaataatt	taatgtggtc	gtaaaaattg	ttgtttatag	tggaattga	2940
agacaacaac	gttactgaaa	cacatacaga	ttgaaatttc	gatcatttac	ttgcaaagtg	3000
ttaccgtgga	ggcgtggcgt	ggacgtaagg	taccataatg	gtttgtgtta	cagtcacgcc	3060

actacactcg aattcaagct accatattat aatacgttgt tgattagaaa aaatagtcgc	3120
caatcttctt taaaacaaat ttcagttttt atttgtcagc aaaaaaaact tactaacaca	3180
acggaagaac acaaaaatta gggagttgct cacagagcaa aagtaataga aatgggaaaa	3240
gctaataatg gtccgagtag gaaactaatc ttgcaaaaac tgatgaaagc aatcagaagc	3300
cttgacgttt gtctggagag aggaattgtg ttttgatca ctttggtcag tttgttgtgg	3360
atcgtcttcc gttacgttct caccaaaaat atttcataat gaaacaaaaa aattaattaa	3420
taatggtagc ttagaatgcc aagttgagaa cagatttgca gtttggtccg gaatgatcaa	3480
gtagagcatt catagtgtct tgccaatatg gtgtgatcaa cgaagtttga caaaaccgtg	3540
aagatatagg aacatgtaat catgcggtc tccatacaat acatcttggt gacaaagttc	3600
ccaagacctc attctacaaa ccaatgtttc tttttctttt ttcttttttg tgatagtttt	3660
tgcaatcaaa tgttgtaaaa ctatgattgg aaatactact gtattttacc gaaaacttta	3720
ttatatatag tcattaacac tcattaccaa tcacataatc aatagtctat tttgattata	3780
caacttttaa acaataaaga catgtttata cagatttggg ttaaattagt actccctata	3840
ttttagaaaa ttttatattg tttcatatta tagaatgtct tggaaagttc tatgtaaatt	3900
taaatgtatt tagtaacttg tgacgatttt atattatgta gtctttttta ggatttgttg	3960
atttttttaa ataaattttt taaagaaaaa aaacaaatta ttttaataaa catgccttta	4020
ccttatacag tttatatattt gaaagagaga tagtatgttt taggatatat ttaaagaaaa	4080
aaaaataact ctttaattta	4100

<210> 33
 <211> 4100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Plásmido 3: GEiGS_ mir173_si-PDS_I

<400> 33

cacttatcat ttagacagta gatttttaa atgtatttac aatttcaaaa ctgaaattca	60
tttgtaatca aagaaaaaca aaacaagaaa agggaggagg agtgggattt gggttgctta	120
acagtattat atatacacgt cgtaggttaa tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta	180
tgaacatggt tttaccaa attgtaaattc atgtcattgt ttagcactt tagcgaggcc	240
agcaaaatgg cggtcttgga aaggcatgg cggcccgtgg cggccaggga tatgtgtgca	300
gctagaagga ttagaaggag taacttcacc tttttgtaga aactgtaaat tgccaagacg	360
ctcgtttggt aaatacctta acgcttcggt tgctggaatg tgtaccacca ttagtagaag	420
aaagtataat aagactatta atgcaagaga ttttttcata ttccttttct aagagtagaa	480

tggaatgaat	aatgaatga	atgaaatagg	gtttttcttg	tttagatcct	gtcgcacccg	540
agaataatag	aagctgaatt	aattggtgaa	gagttttatg	gtggcgatgt	tgtattttata	600
gagggaaatg	atttcaagtt	tacaatggga	tttttaattt	gttttggtga	ctattatctt	660
gcggagagat	cttgactgtt	gacatgtatg	tagtgtttgt	tattaaaata	aatgcatttt	720
tgtagacccg	attcttaaat	atgttaggca	tggtcaaatt	gtagactgt	aaaagcttga	780
gtagagacat	cgggtcaactt	tgtttacaag	aattctctat	aaaatattat	acaaattgat	840
cggtagaaat	tagatggaac	attttgaatt	aatgtttgac	aatgtataaa	ttggtttggt	900
caatatctag	gaatgaaaac	aagagctgct	tcaaagttgt	tccattctta	agtatacata	960
gaggtggctt	gatgggaagt	ttcatggaag	tgtagtttta	tatctacttc	caaattcggt	1020
gatctgtttc	ttatctcaag	ctaaacatgt	ttagaaaaga	tgtgttaaaa	acatgtgaca	1080
aaaaaagagt	caaatgtttg	gcaaacaagg	tacttagatt	tttggcatct	attcaaatat	1140
aatagaatcc	caaaattatg	atatttgtca	atcaaatttg	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1200
aaagattcta	caaaagatca	aacgtattgc	cgtagattta	tcataatttt	aattctttca	1260
cactaccact	agtcactac	catatagtga	tgagataatc	cataatcata	aataagatat	1320
aactttcgaa	ttcttgtttt	tgttgcctca	aagttgttgg	atcattattt	tttacgtaaa	1380
tgtggcttaa	tgagaattta	tgtttggtgg	aattgtagtt	tgcttccaac	tttttttttt	1440
tttttttgaa	cacgtagttt	gcttccaact	tagtttatct	ttttcttatt	tcaagttaaa	1500
catgtaaaaa	aacatgtgac	gacgaaattc	aatcagttcc	tccaatgttt	ggcagaagcc	1560
aatcttttgg	taaacaaagt	aatttttttg	ccatttgatt	ggttagtata	ggagaattta	1620
aaaacgacga	taaggtttag	gtaaattatt	tcatttgaaa	ataattgagc	accgttaata	1680
attttcatcc	ataaaataat	atttcaaaga	tgatatttga	tccccattaa	attcattcgt	1740
aacccaaaaa	aagttatgaa	aaaagagtgg	tcgtgtgagt	tgcccaagca	ccattataat	1800
aaaaaataaa	ataattagca	agtaataagg	aataaaatcc	tgtaattata	gctgaaaaag	1860
gaaaaatatt	tggagaccgt	cagattcgaa	tctgaacaaa	gcataaaaaa	gtcaacaaaa	1920
cttaaagcgg	cgggtctcatc	gtaatctcag	cccaataccc	tattttcctc	tcccctatat	1980
aaatactttc	ttcttctact	gatcttcttc	tcacaaataa	acccaaatat	atcaatctac	2040
tgtgttggtg	attaagtact	ttatccacac	aaactacctg	caagtgggtca	aaaaagttgt	2100
agttttctta	aagtctcttt	cctcttgacg	tagtttagtg	ggataaagag	cttgctccct	2160
aaacttatct	ctctgatgat	ttaatgttag	agatcttcgt	aaatctatgt	gtttgataga	2220
tctgatgcgt	tttttgagtt	gatgatattga	ttatttttca	ctggaaagta	tctcattagg	2280
gtaacgataa	tgttttatgg	atttggttgt	ataacagatc	catgaaatct	tgactgggtta	2340
taaaatctga	ataatgtatt	tcaatttgga	gattcgggtga	taaaaattac	tgattttacga	2400

atgacattta	tatcgataga	tgagtttgct	gatttggttg	ttaaattgat	aatcaagga	2460
catgagaaac	tgtttttgta	tgctaatttg	tccatggaat	aaaattggga	ggtgaggacc	2520
gtgagggtag	tcaggaaacc	ttaatattga	agttgatggt	gaaccaacaa	atctgcccaa	2580
aatgataaa	agttgatgcc	gagcccacaa	attttgatga	caatcgataa	gcccaagccc	2640
aaaaggcatc	tgtacctgag	cccattattc	tttcattact	agcaaaaagg	atgcattaga	2700
gaccccggtg	tagtaaatg	acctcacaat	tcactattgt	attgtatacg	tacatttcaa	2760
gcgtaattaa	accctcatat	ttttatacgc	tttaaataa	attggccttt	aattagctca	2820
aataaactag	atgtcgtacg	tgatcacggt	ggatgaaatc	aatggtatta	tgaaaagact	2880
gtacatgatt	tcaaatat	taatgtggtc	gtaaaaattg	ttgtttatag	tggaattga	2940
agacaacaac	gttactgaaa	cacatacaga	ttgaaatttc	gatcatttac	ttgcaaagtg	3000
ttaccgtgga	ggcgtggcgt	ggacgtaagg	taccataatg	gtttgtgtta	cagtcacgcc	3060
actacactcg	aattcaagct	accatattat	aatacgttgt	tgattagaaa	aaatagtcgc	3120
caat	tttctt	taaaacaaat	ttcagttttt	at	ttgtcagc	3180
aaaaaaaact	tactaacaca					
acggaagaac	acaaaaatta	gggagttgct	cacagagcaa	aagtaataga	aatgggaaaa	3240
gctaataatac	gtccgagtag	gaaactaatc	ttgcaaaaac	tgatgaaagc	aatcagaagc	3300
cttgacgttt	gtctggagag	aggaattgtg	ttttggatca	ctttgttcag	tttgttgtgg	3360
atcgtcttcc	gttacgttct	caccaaaaat	at	ttcataat	gaaacaaaaa	3420
aat	taattaa					
taatggtagc	ttagaatgcc	aagttgagaa	cagatttgca	gtttgtcccg	gaatgatcaa	3480
gtagagcatt	catagtgtct	tgccaatatg	gtgtgatcaa	cgaagtttga	caaaaccgtg	3540
aagatatagg	aacatgtaat	catgcggctc	tccatacaat	acatcttggt	gacaaagttc	3600
ccaagacctc	attctacaaa	ccaatgtttc	ttttttcttt	ttctttttgg	tgatagtttt	3660
tgcaatcaaa	tgttgtaaaa	ctatgattgg	aaatactact	gtat	tttacc	3720
gaaaacttta						
ttatatatag	tcattaacac	tcattaccaa	tcacataatc	aatagtctat	tttgattata	3780
caacttttaa	acaataaaga	catgtttata	cagatttggt	ttaaattagt	actccctata	3840
ttttagaaaa	ttttat	tttttg	tttcatatta	tagaatgtct	tggaagttc	3900
tatgtaaatt						
taaatgtatt	tagtaacttg	tgacgatttt	atattatgta	gtctttttta	ggatttgttg	3960
at	tttttaaaa	ataaattttt	taaagaaaaa	aaacaaatta	ttttaataaaa	4020
catgccttta						
ccttatacag	tttatat	tttt	gaaagagaga	tagtatgttt	taggatatat	4080
ttaaagaaaa						
aaaaataact	ctttaattta					4100

<210> 34
 <211> 4100
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido 4: GEiGS_mir173_si-PDS_2

5

<400> 34

cacttatcat ttagacagta gatttttaaat ttgtatttac aatttcaaaa ctgaaattca	60
tttgtaatca aagaaaaaca aaacaagaaa agggaggagg agtgggattt gggttgctta	120
acagtattat atatacacgt cgtagttaa tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta	180
tgaacatggt tttaacaaat tggtaaattc atgtcattgt tgtagcactt tagcgaggcc	240
agcaaaatgg cgttcttgga aagggcatgg cggcccgtgg ccgccaggga tatgtgtgca	300
gctagaagga ttagaaggag taacttcacc tttttgtaga aactgtaaat tgccaagacg	360
ctcgtttggt aaatacctta acgcttcggt tgctggaatg tgtaccacca ttagtagaag	420
aaagtataat aagactatta atgcaagaga ttttttcata ttccttttct aagagtagaa	480
tggaaatgaat aaatgaatga atgaaatagg gtttttcttg tttagatcct gtcgcacccg	540
agaataatag aagctgaatt aattggtgaa gagttttatg gtggcgatgt tgtatttata	600
gagggaaatg atttcaagtt tacaatggga tttttaattt gttttgttga ctattatctt	660
gcggagagat cttgactggt gacatgtatg tagtgtttgt tattaaaata aatgcatttt	720
tgtagacccg attcttaaat atgttaggca tgggtcaaatt gttagactgt aaaagcttga	780
gtagagacat cgggtcaactt tgtttacaag aattctctat aaaatattat acaaattgat	840
cggtagaaat tagatggaac attttgaatt aatgtttgac aatgtataaa ttggtttgggt	900
caatatctag gaatgaaaac aagagctgct tcaaagttgt tccattctta agtatacata	960
gagtggtgctt gatgggaagt ttcatggaag tgtagtttta tatctacttc caaattcgtt	1020
gatctgtttc ttatctcaag ctaaacatgt ttagaaaaga tgtgttaaaa acatgtgaca	1080
aaaaaagagt caaatgtttg gcaaacaagg tacttagatt tttggcatct attcaaatat	1140
aatagaatcc caaaattatg atatttgtca atcaaatttg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1200
aaagattcta caaaagatca aacgtattgc cgtagattta tcataatttt aattctttca	1260
cactaccact agtccactac catatagtga tgagataatc cataatcata aataagatat	1320
aactttcgaa ttcttggttt tgttgcctca aagttgttgg atcattattt tttacgtaaa	1380
tgtggcttaa tgagaattta tgtttggtgg aattgtagtt tgcttccaac tttttttttt	1440
tttttttgaa cacgtagttt gcttccaact tagtttatct ttttcttatt tcaagttaaa	1500
catgtaaaaa aacatgtgac gacgaaattc aatcagttcc tccaatgttt ggagaagcc	1560
aaatctttgg taaacaaagt aatttttttg ccatttgatt ggtagtata ggagaattta	1620
aaaacgacga taaggtttag gtaaattatt tcatttgaaa ataattgagc accgttaata	1680
attttcatcc ataaaataat atttcaaaga tgatatttga tccccattaa attcattcgt	1740

aaccaaaaaa aagttatgaa aaaagagtgg tcgtgtgagt tgcccaagca ccattataat	1800
aaaaaataaa ataattagca agtaataagg aataaaatcc tgtaattata gctgaaaaag	1860
gaaaaatatt tggagaccgt cagattcgaa tctgaacaaa gcataaaaaa gtcaacaaaa	1920
cttaaagcgg cggctctcatc gtaatctcag cccaataccc tattttcctc tcccctatat	1980
aaatactttc ttcttctact gatcttcttc tcacaaataa acccaaatat atcaatctac	2040
tgtgttggtg attaagtact ttgacaatcc agccaatcca gcagtgggtca aaaaagttgt	2100
agttttctta aagtctcttt cctctgctga ttggcaggat tgtcaaagag cttgctccct	2160
aaacttatct ctctgatgat ttaatgttag agatcttcgt aaatctatgt gtttgataga	2220
tctgatgcgt tttttgagtt gatgatttga ttatttttca ctggaaagta tctcattagg	2280
gtaacgataa tgttttatgg atttggttgt ataacagatc catgaaatct tgactggtta	2340
taaaatctga ataatgtatt tcaatttggg gattcgggtga taaaaattac tgatttacga	2400
atgacattta tatcgataga tgagtttgct gatttggttg ttaaattgat aaatcaagga	2460
catgagaaac tgtttttgta tgctaatttg tccatggaat aaaattggga ggtgaggacc	2520
gtgagggtag tcaggaaacc ttaatattga agttgatggt gaaccaacaa atctgcccaa	2580
aatgataaa agttgatgcc gagcccacaa attttgatga caatcgataa gcccaagccc	2640
aaaaggcatc tgtacctgag cccattattc tttcattact agcaaaaagg atgcattaga	2700
gaccccggtg tagtaaattg acctcacaat tcaactattgt attgtatacg tacatttcaa	2760
gcgtaattaa accctcatat ttttatacgc tttaaatata attggccttt aattagctca	2820
aataaactag atgtcgtacg tgatcacggt ggatgaaatc aatgggtatta tgaaaagact	2880
gtacatgatt tcaaataatt taatgtggtc gtaaaaattg ttgtttatag tggaaattga	2940
agacaacaac gttactgaaa cacatacaga ttgaaatttc gatcatttac ttgcaaagtg	3000
ttaccgtgga ggcgtggcgt ggacgtaagg taccataatg gtttgtgtta cagtcacgcc	3060
actacactcg aattcaagct accatattat aatacgttgt tgattagaaa aaatagtcgc	3120
caattttctt taaaacaaat ttcagttttt atttgtcagc aaaaaaaact tactaacaca	3180
acggaagaac acaaaaatta gggagttgct cacagagcaa aagtaataga aatgggaaaa	3240
gctaataatac gtccgagtag gaaactaatc ttgcaaaaac tgatgaaagc aatcagaagc	3300
cttgacgttt gtctggagag aggaattgtg ttttgatca ctttgttcag tttgttgtgg	3360
atcgtcttcc gttacgttct caccaaaaat atttcataat gaaacaaaaa aattaattaa	3420
taatggtagc ttagaatgcc aagttgagaa cagatttgca gtttgtcccg gaatgatcaa	3480
gtagagcatt catagtgtct tgccaatatg gtgtgatcaa cgaagtttga caaaaccgtg	3540
aagatatagg aacatgtaat catgcggctc tccatacaat acatcttggt gacaaagttc	3600

ES 2 915 576 T3

```

ccaagacctc attctacaaa ccaatgtttc ttttttcttt ttcttttttg tgatagtttt 3660
tgcaatcaaa tggttgtaaaa ctatgattgg aaatactact gtattttacc gaaaacttta 3720
ttatatatag tcattaacac tcattaccaa tcacataatc aatagtctat ttgattata 3780
caacttttaa acaataaaga catgtttata cagatttggg tttaaattagt actccctata 3840
ttttagaaaa ttttattttg tttcatatta tagaatgtct tggaaagttc tatgtaaatt 3900
taaatgtatt tagtaacttg tgacgatttt atattatgta gtctttttta ggatttggtg 3960
atttttttaa ataaattttt taaagaaaaa aaacaaatta ttttaataaa catgccttta 4020
ccttatacag tttatatttt gaaagagaga tagtatgttt taggatatat tttaaagaaaa 4080
aaaaataact ctttaattta 4100

```

<210> 35
 <211> 4000
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Plásmido 5: GEiGS_ mir390a _si-GFP_I
 <400> 35

ES 2 915 576 T3

accctcattg attttggtgg ccaaactctt gatcgtattc ttttaggaac agtaattaat	60
tttaaatttg agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc	120
attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact	180
cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata	240
ggggaacata atcattattt gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa	300
aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat tttttttcgt	360
ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaagt tttgctgcat	420
ccaatctaata acaccgttaa acaataaaat ttgttatctc tcaaactctga tcatctattc	480
caacctgact gttttattct agtattttaa ggccagggtat aacgaaaaca aagaaaaaag	540
ttcagcgacc aagacatttt gacatcaggc tcaaacggtc aaaccacga aaacttttac	600
ctcattttctt aaccacgcag tgttatttga atagccttaa taggctaata caaaacaaca	660
agccatcgat tacagtttta actataatat taaaaaatct taaacaaaaa caagaaaaga	720
tatatattcc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gttagctctt	780
tcgacaaaat cattataaat taggccattt tgtaagttag ttctttttatc gacaagccat	840
tataacttag gtaattttgt aagttagctg gactataacc aatttttttg tttcacatct	900
agagtataaa acacatatat attgaccgta caactttagt caaattagaa actctgtttt	960
atctgcagaa aagaaaaaaa aagaggatga attatgtaaa tacttcagga ttagaaataa	1020
tgatcatgta tatctcttga tatgaataca tattttactt gactagtacc gtagtcggca	1080

ggaaaatgac	acaaacaacc	atctaaaaag	ataaagtaag	aactaaaaag	tcttgacatt	1140
cattagttta	atcattttct	gttaacatat	atggaaaaaa	caaacttcac	cgttatttac	1200
ctgaatttac	ctatttggtt	aagaattgta	cctctggacc	tctagtat	tatatacacc	1260
taaaaatata	attttggtcg	ggaaaatata	actctgttta	attaattaaa	ttttcagtat	1320
tgtgtaagt	taattataga	aatcaatttt	atccgcgtaa	caaaataata	taaaattata	1380
ctttcaaatac	cacgaatata	tattgtgaag	tctcatagtt	tgcaaataag	cattgggtctt	1440
cggccgacaa	aaaaaaaaagc	attgggtcttc	gaatatTTTTg	aatatcggac	caatgggtata	1500
taattaataa	tatgtggtat	ataaatacat	atTTattttaa	atcacaaatag	gatatgcaat	1560
gtgtgtatat	atacatatac	gtaattaaag	tccgggttaa	actgatagca	tatattataa	1620
tagatgcatc	tataattgtt	cgtcaacaaa	agcattatca	tgtattttga	attaagcttc	1680
cttcattttct	gtgaatcaaa	aggcctcaga	agaagaaact	aaagtcaaac	aatcaacggg	1740
atccaataaa	tcacatctgg	actatatagt	atcaataactt	tccacactaa	aaaagctaag	1800
aaatttaata	aatacattat	tatagggggg	aaaaaaagggt	agtcatcaga	tatatatttt	1860
ggtaagaaaa	tatagaaatg	aataatttca	cgtttaacga	agaggagatg	acgtgtgttc	1920
cttcgaaccc	gagttttgtt	cgtctataaa	tagcaccttc	tcttctcctt	cttcctcact	1980
tccatctttt	tagcttcact	atctctctat	aatcgggtttt	atctttctct	aagtcacaac	2040
ccaaaaaaac	aaagtagaga	agaatctgta	aagtcgtgct	gcttcatgtg	gatgatgatc	2100
acattcgtta	tctatttttt	ccacatgaag	aagcacgact	tgattggctc	ttcttactac	2160
aatgaaaaag	gccgaggcaa	aacgcctaaa	atcacttgag	aatcaattct	ttttactgtc	2220
catttaagct	atcttttata	aacgtgtctt	atTTtctatc	tcttttgttt	aaactaagaa	2280
actatagtat	tttgtctaaa	acaaaacatg	aaagaacaga	ttagatctca	tcttttagtct	2340
ctttctccgg	tgcatgcagc	caccgtcggg	taagtttcat	ctgtatttta	ttaattaatt	2400
acaattatta	gtgttcttat	taccgttttg	gtaaaattag	ttaattaatg	tcgggtccaaa	2460
cattctaaac	caattattct	gaaaagggtg	aacgccaatc	agttatatac	aatattctta	2520
cattaaagta	gaatcggaga	tgttacatac	taacccaaaag	ttacatatac	tagtatcatt	2580
ttctttaaga	tttgttttagg	atttactcac	tttatagtgc	tcgcggttgg	ggtcagggtta	2640
agtggggaac	agatatgctc	tgcatgaacc	acgtggacca	acatgcatat	acacagttac	2700
atTTattttt	tctagtaggt	tcatttgcaa	atTTtccagt	atcttgtatg	ttatcttcat	2760
ggtgagtttt	ttggtcgcac	attcttggtg	attcttcttc	tacgttttca	ctttcttctt	2820
cagagacctt	attaatatgt	taattgcatg	aatttatgta	acattcaaga	aaaagagatc	2880
gaatacaaga	aaccggaaat	tttaatttcta	atTTgaattc	tatgcatgtt	tgtttctttg	2940

```

ccaatttagt acgaatatat ttatgggccg gagttctaac caaagatagt tgctctgtat 3000
atagaagtta tacatctcgc ttgtttaaac taaataacta tttagtttgt cttggtagtc 3060
cagtgacttt ctgcaaacat tgggatttat aatatagtca aaacgttggg atatgtagta 3120
ttcatttttcg ttgtaaaaat cattatatatt tgcaaagggt gcaacgtaaa acgttgtatt 3180
gaatttagga gaaagtagcc atttacaatg aatttttagtg acaaactggt gtatacagcc 3240
tgtgccacta agtatgtcta tatctaaatt tggaatggat gataaccagt attgggtcaat 3300
aatggataat ttggtattta gaattactaa tttgggtattt tagtgacaaa ctggtgtatg 3360
gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcatatggt 3420
atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggt ttaagggtta atcagtaatc 3480
gatccgacca atcatataca agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa 3540
tgctattaca aagggtttttt cttttcaaaa tacagcctaa tgctactaca aaattctaata 3600
gttataaaaat aatcatagga gaagtaaacc ccggtattta attaatacct tacaaaactta 3660
cattattgat aaagttgaat gaagagttat atgggtccatt tagtattatt tacttaatat 3720
gatactagtg ttagacgtgt tactgtattt caacgtgcat aatcagggtg ttcaaaaaga 3780
gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcattg gaggtgctc 3840
tgctgatgct gcacggcgct gcaactctct caataaattc ttttaactaa cgctccaatt 3900
ttcgatgtaa attggctgac ttcaattcta tgccttactc ttgtactcta tgtttcttta 3960
tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa 4000

```

<210> 36
 <211> 4000
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Plásmido 6: GEiGS_ mir390a _si-GFP_2

<400> 36

ES 2 915 576 T3

accctcattg attttggtgg ccaaactctt gatcgtattc ttttaggaac agtaattaat	60
tttaaatttg agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc	120
attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact	180
cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata	240
ggggaacata atcattattht gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa	300
aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat tttttttcgt	360
ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaatg tttgctgcat	420
ccaatctaata acaccgttaa acaataaaaat ttgttatctc tcaaactctga tcatctattc	480
caacctgact gttttattct agtattttta ggccaggtat aacgaaaaca aagaaaaaag	540

ttcagcgacc aagacatthtt gacatcaggc tcaaacggtc aaaccacga aaactthttac	600
ctcattthctt aaccacgcag tgthatttga atagccttaa taggctaata caaaacaaca	660
agccatcgat tacagthttta actataatat taaaaaatct taaacaaaa caagaaaaga	720
tatatattcc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gttagctctt	780
tcgacaaaat cattataaat taggccattt tgtaagttag ttctthttatc gacaagccat	840
tataacttag gtaattthtg aagttagctg gactataacc aathththtg thtcacatct	900
agagtataaa acacatatat attgaccgta caactthagt caaattagaa actctgthtt	960
atctgcagaa aagaaaaaaa aagaggatga attatgtaaa tacttcagga ttagaaataa	1020
tgatcatgta tatctcttga tatgaataca taththtactt gactagtacc gtagtcggca	1080
ggaaaatgac acaacaacc atctaaaaag ataaagtaag aactaaaaag tcttgacatt	1140
cattagthta atcaththct gthaacatat atggaaaaaa caacttcac cgthattthac	1200
ctgaattthac ctaththgggt aagaattgta cctctggacc tctagtattt tatatacacc	1260
taaaaatata aththggctg ggaaaatata actctgthta attaatthaa ththtcagtat	1320
tgthgtaagt taattataga aatcaathth atccgcgtaa caaaataata taaaattata	1380
ctthcaaact cacgaatata taththgaag tctcatagtt tgcaaataag cattggctct	1440
cggccgacaa aaaaaaaagc attggctctc gaataththtg aatatcggac caatggatata	1500
taattaataa tatgtggtat ataaatacat aththththaa atcacaaatag gatatgcaat	1560
gtgtgtatat atacatatac gtaattthaa tccgggtthaa actgatagca tatattataa	1620
tagatgcact tataattgth cgtcaaaaa agcattatca tgtaththga attaagcttc	1680
cttcaththct gtgaatcaaa aggcctcaga agaagaaact aaagtcaaac aatcaacggg	1740
atccaataaa tcacatctgg actatatagt atcaatactt tccacactaa aaaagctaag	1800
aaaththata aatacattat tatagggggg aaaaaagggt agtcatcaga tatatathth	1860
ggtaagaaaa tatagaaatg aataaththca cgtthaacga agaggagatg acgtgtgttc	1920
cttcgaaccc gagththtgth cgtctataaa tagcaccttc tcttctctct ctctctcact	1980
tccatctthth tagcttcact atctctctat aatcggtthth atctthctct aagtcacaac	2040
ccaaaaaac aaagtagaga agaactctgta agthgtactc cagcttgthgc catgatgac	2100
acattcgtta tctathththth ggcacaagct tgagtacaac tgattggctc thcttactac	2160
aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag aatcaattct ththtactgtc	2220
caththaaact atctththata aacgtgtctt aththctatc tctththgth aaactaagaa	2280
actatagtat ththgtctaaa acaaaacatg aaagaacaga ttagatctca tctthtagtct	2340
ctthctccgg tgcagtcagc caccgtcggg taagththcat ctgtaththta ttaattaatt	2400

acaattatta gtgttcttat taccgttttg gtaaaattag ttaattaatg tccgtccaaa 2460
cattctaaac caattattct gaaaaggggtg aacgccaatc agttatatac aatattctta 2520
cattaaagta gaatcggaga tggtacatac taacccaaaag ttacatatac tagtatcatt 2580
ttctttaaga ttgttttagg atttactcac ttatagtgcc tccggttggt gggtcagggtg 2640
agtggggaac agatatgctc tgcatagaac acgtggacca acatgcatat acacagttac 2700
atttattttt tctagtaggt tcatttgcaa attttccagt atcttgtatg ttatcttcat 2760
gggtgagttt ttgggtcgcat attcttgggtg attcttcttc tacgttttca ctttcttctt 2820
cagagacctt attaatatgt taattgcatg aatttatgta acattcaaga aaaagagatc 2880
gaatacaaga aaccggaaat ttaatttcta atttgaattc tatgcatggt tgtttctttg 2940
ccaatttagt acgaatatat ttatgggtccg gagttctaac caaagatagt tgctctgtat 3000
atagaagtta tacatctcgc ttgtttaaac taaataacta tttagtttgt cttggtagtc 3060
cagtgaactt ctgcaaacat tgggatttat aatatagtca aaacgttggg atatgtagta 3120
ttcattttcg ttgtaaaaat cattatattt tgcaaagggt gcaacgtaaa acgttgtatt 3180
gaatttagga gaaagtagcc atttacaatg aatttttagtg acaaactgtt gtatacagcc 3240
tgtgccacta agtatgtcta tatctaaatt tgggaatggat gataaccagt attgggtcaat 3300
aatggataat ttgggtattta gaattactaa ttgggtattt tagtgacaaa ctgttgtatg 3360
gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcatatggt 3420
atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggt ttaaggttta atcagtaatc 3480
gatccgacca atcatataca agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa 3540
tgctattaca aagggtttttt cttttcaaaa tacagcctaa tgctactaca aaattcta 3600
gttataaaat aatcatagga gaagtaaacc ccggtattta attaatcct taaaaactta 3660
cattattgat aaagttgaat gaagagttat atgggtccatt tagtattatt tacttaatat 3720
gatactagtg ttagacgtgt tactgtattt caacgtgcat aatcagggtg ttcaaaaaga 3780
gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcattg gaggtgctc 3840
tgctgatgct gcacggcgct gcaactctct caataaattc ttttaactaa cgctccaatt 3900
ttcgatgtaa attggctgac ttcaattcta tgccttactc ttgtactcta tgtttcttta 3960
tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa 4000

<210> 37

<211> 4000

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido 7: GEiGS_ mir390a _si-PDS_I

<400> 37

accctcattg attttggtgg ccaaactctt gatcgtattc ttttaggaac agtaattaat	60
tttaaatttg agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc	120
attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact	180
cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata	240
ggggaacata atcattattt gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa	300
aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat tttttttcgt	360
ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaatg tttgctgcat	420
ccaatctaata acaccgttaa acaataaaat ttgttatctc tcaaacttga tcatctattc	480
caacctgact gttttattct agtattttaa ggccagggtat aacgaaaaa aagaaaaaag	540
ttcagcgacc aagacatttt gacatcaggc tcaaacggtc aaaccacga aaacttttac	600
ctcattttctt aaccacgcag tgttatttga atagccttaa taggctaata caaaacaaca	660
agccatcgat tacagtttta actataatat tacaaaatct taaacaaaa caagaaaaga	720
tatatattcc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gttagctctt	780
tcgacaaaat cattataaat taggccattt tgtaagttag ttcttttatc gacaagccat	840
tataacttag gtaattttgt aagttagctg gactataacc aatttttttg tttcacatct	900
agagtataaa acacatatat attgaccgta caactttagt caaattagaa actctgtttt	960
atctgcagaa aagaaaaaaa aagaggatga attatgtaaa tacttcagga ttagaaataa	1020
tgtcatcgta tatctcttga tatgaatata tattttactt gactagtacc gtagtcggca	1080
ggaaaatgac acaacaacc atctaaaaag ataaagtaag aactaaaaag tcttgacatt	1140
cattagttta atcattttct gttaacatat atggaaaaaa caaacttcac cgttatttac	1200
ctgaatttac ctatttgggt aagaattgta cctctggacc tctagtattt tatatacacc	1260
taaaaatata attttggtcg ggaaaatata actctgttta attaattaa ttttcagtat	1320
tgtgtaagtg taattataga aatcaatttt atccgcgtaa caaaataata taaaattata	1380
ctttcaaatac cacgaatata tattgtgaag tctcatagtt tgcaaataag cattggtctt	1440
cggccgacaa aaaaaaagc attggtcttc gaatattttg aatatcggac caatggtata	1500
taattaataa tatgtggtat ataaatacat atttatttaa atcacaaatg gatatgcaat	1560
gtgtgtatat atacatatac gtaattaaag tccgggttaa actgatagca tatattataa	1620
tagatgcata tataattggt cgtcaacaaa agcattatca tgtattttga attaagcttc	1680
cttcattttct gtgaatcaaa aggcctcaga agaagaaact aaagtcaaac aatcaacggg	1740
atccaataaa tcacatctgg actatatagt atcaatactt tccacactaa aaaagctaag	1800
aaatttaata aatacattat tatagggggg aaaaaaaggt agtcatcaga tatatatattt	1860

ggtaagaaaa tatagaaatg aataatttca cgtttaacga agaggagatg acgtgtgttc	1920
cttcgaaccc gagttttgtt cgtctataaa tagcaccttc tcttctcctt cttcctcact	1980
tccatctttt tagcttcact atctctctat aatcgggttt atctttctct aagtcacaac	2040
ccaaaaaac aaagtagaga agaatctgta tatccacaca aactacctgc aatgatgatc	2100
acattcgtta tctatTTTTt tgcaggtagt gtgtgtggat agattggctc ttcttactac	2160
aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag aatcaattct ttttactgtc	2220
catttaagct atcttttata aacgtgtctt attttctatc tcttttgttt aaactaagaa	2280
actatagtat tttgtctaaa acaaaacatg aaagaacaga ttagatctca tctttagtct	2340
ctttctccgg tgcagtcagc caccgtcggg taagtttcat ctgtatttta ttaattaatt	2400
acaattatta gtgttcttat taccgttttg gtaaaattag ttaattaatg tcggtccaaa	2460
cattctaaac caattattct gaaaagggtg aacgccaatc agttatatac aatattctta	2520
cattaaagta gaatcggaga tgttacatac taaccaaag ttacatatac tagtatcatt	2580
ttctttaaga tttgtttagg atttactcac tttatagtgc tcgcggttg ggtcagggtta	2640
agtggggaac agatatgctc tgcattgaacc acgtggacca acatgcatat acacagttac	2700
atttatTTTT tctagtaggt tcatttgcaa attttccagt atcttgtagt ttatcttcat	2760
ggtgagtttt ttggtcgcatt attcttggtg attcttcttc tacgttttca ctttcttctt	2820
cagagacctt attaatatgt taattgcatg aatttatgta acattcaaga aaaagagatc	2880
gaatacaaga aaccggaaat ttaatttcta atttgaattc tatgcatggt tgtttctttg	2940
ccaatttagt acgaatatat ttatgggtccg gagttctaac caaagatagt tgctctgtat	3000
atagaagtta tacatctcgc ttgtttaaac taaataacta tttagtttgt cttggtagtc	3060
cagtgcactt ctgcaaacat tgggatttat aatatagtca aaacgttggg atatgtagta	3120
ttcattttctg ttgtaaaaat cattatatatt tgcaaagggt gcaacgtaaa acgttgattt	3180
gaatttagga gaaagtagcc atttacaatg aatttttagtg acaaactggt gtatacagcc	3240
tgtgccacta agtatgtcta tatctaaatt tggaatggat gataaccagt attggtcaat	3300
aatggataat ttggtattta gaattactaa tttggtattt tagtgacaaa ctggtgtatg	3360
gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcattatgtt	3420
atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggt ttaaggttta atcagtaatc	3480
gatccgacca atcatataca agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa	3540
tgctattaca aaggtttttt cttttcaaaa tacagcctaa tgctactaca aaattctaatt	3600
gttataaaat aatcatagga gaagtaaacc ccggtattta attaataacct tacaactta	3660
cattattgat aaagttgaat gaagagttat atggtccatt tagtattatt tacttaatat	3720
gatactagtg ttagacgtgt tactgtattt caacgtgcat aatcagggtg ttcaaaaaga	3780

gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcattgt gaggctgctc 3840
 tgctgatgct gcacggcgct gcaactctct caataaattc ttttaactaa cgctccaatt 3900
 ttcgatgtaa attggctgac ttcaattcta tgccttactc ttgtactcta tgtttcttta 3960
 tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa 4000

<210> 38
 <211> 4000
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Plásmido 8: GEiGS_ mir390a _si-PDS_2

<400> 38

accctcattg attttgggtg ccaaaactctt gatcgtattc ttttaggaac agtaattaat 60
 tttaaatttg agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc 120
 attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact 180
 cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata 240
 ggggaacata atcattatctt gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa 300
 aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat tttttttcgt 360
 ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaatg tttgctgcat 420
 ccaatctaata acaccgttaa acaataaaaat ttgttatctc tcaaactctga tcatctattc 480
 caacctgact gttttattct agtattttaa ggccaggtat aacgaaaaca aagaaaaaag 540
 ttcagcgacc aagacatttt gacatcaggc tcaaacggtc aaaccacga aaacttttac 600
 ctcatctctt aaccacgcag tgttatttga atagccttaa taggctaata caaaacaaca 660
 agccatcgat tacagtttta actataatat tacaaaatct taaacaaaa caagaaaaga 720
 tatatatcc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gttagctctt 780
 tcgacaaaat cattataaat taggccattt tgtaagttag ttctttttatc gacaagccat 840
 tataacttag gtaattttgt aagttagctg gactataacc aatttttttg tttcacatct 900
 agagtataaa acacatatat attgaccgta caactttagt caaattagaa actctgtttt 960
 atctgcagaa aagaaaaaaa aagaggatga attatgtaaa tacttcagga ttagaaataa 1020
 tgtcatcgta tatctcttga tatgaataca ttttttactt gactagtacc gtagtcggca 1080
 ggaaaatgac acaaaacacc atctaaaaag ataaagtaag aactaaaaag tcttgacatt 1140
 cattagttta atcattttct gttaacatat atggaaaaaa caaacttcac cgttatttac 1200
 ctgaatttac ctatttgggt aagaattgta cctctggacc tctagtattt tatatacacc 1260
 taaaaatata attttgggtg ggaaaatata actctgttta attaatataa ttttcagtat 1320

tgtgtaagtg taattataga aatcaatddd atccgcgtaa caaaataata taaaattata	1380
ctttcaaadc cacgaatata tattgtgaag tctcatagtt tgcaaataag cattggtcctt	1440
cggccgacaa aaaaaaaagc attggtcttc gaatatdddg aatatcggac caatggtata	1500
taattaataa tatgtggtat ataaatacat atttattdaa atcacaatag gatatgcaat	1560
gtgtgtatat atacatatac gtaattaaag tccgggttaa actgatagca tatattataa	1620
tagatgcadc tataattggt cgtcaacaaa agcattatca tgtatdddga attaagcttc	1680
cttcatttdct gtgaatcaaa aggcctcaga agaagaaact aaagtcaaac aatcaacggg	1740
atccaataaa tcacatctgg actatatagt atcaatactt tccacactaa aaaagctaa	1800
aaattdtaata aatacattat tatagggggg aaaaaaagggt agtcacaga tatatatddd	1860
ggtaagaaaa tatagaaatg aataattdca cgttdaacga agaggagatg acgtgtgttc	1920
cttcgaaccc gagtdtdgtt cgtctataaa tagcaccttc tcttctcctt ctctctcact	1980
tccatctddd tagcttcact atctctctat aatcggtdtdt atcttdctct aagtcacaac	2040
ccaaaaaac aaagtagaga agaatctgta tgacaatcca gccaatccag catgatgadc	2100
acattcgtta tctattdtdt gctggattgg atggattgtc agattggctc ttcttactac	2160
aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag aatcaattct ttdtactgtc	2220
catttaagct atcttdtata aacgtgtctt attdtctadc tcttdtgtdt aaactaagaa	2280
actatagtat ttdgtctaaa acaaaacatg aaagaacaga ttagatctca tcttdagtct	2340
cttdtctcgg tgcagtcagc caccgtcggg taagtdtcat ctgtattdta ttaattaatt	2400
acaattatta gtgttcttat taccgttdtg gtaaaattag ttaattaatg tcggtccaaa	2460
cattctaaac caattattdt gaaaagggtg aacgccaatc agttatatac aatattctta	2520
cattaaagta gaatcggaga tgttacatac taaccaaag ttacatatac tagtatcatt	2580
ttcttdtaaga ttdgttdtagg attdactcac ttdatagtgc tcgcggttg ggtcagggtta	2640
agtggggaac agatatgctc tgcatgaacc acgtggacca acatgcatac acacagttac	2700
attdattdtdt tctagtaggt tcatttgcaa attdtccagt atcttgtagt ttatcttcat	2760
ggtgagtdtdt ttggtcgcac attdcttggtg attdctcttc tacgttdtca cttdctctct	2820
cagagacctt attaatatgt taattgcatg aattdatgta acattcaaga aaaagagadc	2880
gaatacaaga aaccggaaat ttaattdcta attdgaattc tatgcatggt tgttdcttdg	2940
ccaattdtagt acgaatatat ttatggtdcg gagtdtcaac caaagatagt tgctctgtat	3000
atagaagtta tacatctcgc ttgttdtaaac taaataacta ttdagtdtdt cttdgtagtc	3060
cagtgaacttd ctgcaaacat tgggatttat aatatagtca aaacgttggg atatgtagta	3120
ttcatttdtcg ttgtaaaaaat cattatattdt tgcaaagggt gcaacgtaaa acgttgtagt	3180
gaattdtagga gaaagtagcc attdacaatg aattdtagtg acaaacgtgt gtatacagcc	3240

tgtgccacta agtatgtcta tatctaaatt tggaatggat gataaccagt attggtcaat	3300
aatggataat ttggtattta gaattactaa tttggtattt tagtgacaaa ctggtgtatg	3360
gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcatatgtt	3420
atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggt ttaagggtta atcagtaatc	3480
gatccgacca atcatataca agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa	3540
tgctattaca aagggtttttt cttttcaaaa tacagcctaa tgctactaca aaattcta	3600
gttataaaat aatcatagga gaagtaaacc ccggtattta attaatacct taaaaactta	3660
cattattgat aaagttgaat gaagagttat atgggccatt tagtattatt tacttaatat	3720
gatactagtg ttagacgtgt tactgtattt caacgtgcat aatcagggtg ttcaaaaaga	3780
gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcattg gaggctgctc	3840
tgctgatgct gcacggcgct gcaactctct caataaattc ttttaactaa cgctccaatt	3900
ttcgatgtaa attggctgac ttcaattcta tgccttactc ttgtactcta tgtttcttta	3960
tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa	4000

5 <210> 39
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 39
 ttcgcttgca gagagaaatc ac 22

15 <210> 40
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 40
 aagctcagga gggatagcgc c 21

25 <210> 41
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 41
 cttgcagaga gaaatcacag tgg 23

35 <210> 42
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
5	<400> 42 gcttacacag agaatcacag agg	23
10	<210> 43 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 43 aagaatctgt aaagctcagg agg	23
20	<210> 44 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 44 ctatccatcc tgagttcat tgg	23
30	<210> 45 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 45 aagtcgtgct gcttcagtgc g	21
45	<210> 46 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 46 ccacataagc aggacgagtt aa	22
55	<210> 47 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
60	<400> 47 agttgtactc cagctgtgc c	21
65	<210> 48 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
5	<400> 48 gcaaagctgc agtacaacta a	21
10	<210> 49 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 49 tatccacaca aactacctgc a	21
20	<210> 50 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 50 gcagtagtta gtgtggataa a	21
30	<210> 51 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 51 tgacaatcca gccaatccag c	21
45	<210> 52 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 52 ctgattggca ggattgtcaa a	21
55	<210> 53 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
60	<400> 53 taaagatcgg caacacatga t	21
65	<210> 54 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
5	<400> 54 tcagtgttgg cgatcttta	19
10	<210> 55 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 55 tgacctttct tgggttttagc c	21
20	<210> 56 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 56 gctaaccat gaaaggtca	19
30	<210> 57 <211> 102 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 57 taagtacttt cgcttgcaga gagaaatcac agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa	60
40	gtctcttttcc tctgtgattc tctgtgtaag cgaaagagct tg	102
45	<210> 58 <211> 102 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 58 taagtactta agtcgtgctg cttcatgtgg agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa	60
	gtctcttttcc tctccacata agcaggacga gttaagagct tg	102
55	<210> 59 <211> 102 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	

	<400> 59		
	taagtactta gttgtactcc agcttgtgcc agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa	60	
	gtctctttcc tctggcaaag ctgcagtaca actaagagct tg	102	
5	<210> 60 <211> 102 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 60		
	taagtacttt atccacacaa actacctgca agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa	60	
	gtctctttcc tcttgcaagta gttagtgtgg ataaagagct tg	102	
15			
	<210> 61 <211> 102 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
25	<400> 61		
	taagtacttt gacaatccag ccaatccagc agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa	60	
	gtctctttcc tctgctgatt ggcaggattg tcaaagagct tg	102	
30	<210> 62 <211> 102 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 62		
	taagtacttt aaagatcggc aacacatgat agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa	60	
	gtctctttcc tctgatcagt gttggcgatc ttaagagct tg	102	
40			
	<210> 63 <211> 102 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
50	<400> 63		
	taagtacttt gacctttctt gggtttagcc agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa	60	
	gtctctttcc tctgggctaa cccatgaaag gtcaagagct tg	102	
	<210> 64		

	<211> 107		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 64		
	gtagagaaga atctgtaaag ctcaggaggg atagcgccat gatgatcaca ttcgttatct	60	
10	atTTTTtggc gctatccatc ctgagtttca ttggctcttc ttactac	107	
	<210> 65		
	<211> 107		
	<212> ADN		
15	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
20	<400> 65		
	gtagagaaga atctgtaaag tctgtctgct tcatgtggat gatgatcaca ttcgttatct	60	
	atTTTTtcca catgaagaag cacgacttga ttggctcttc ttactac	107	
	<210> 66		
25	<211> 107		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 66		
	gtagagaaga atctgtaatg tgtactccag cttgtgccat gatgatcaca ttcgttatct	60	
	atTTTTtggc acaagcttga gtacaactga ttggctcttc ttactac	107	
35	<210> 67		
	<211> 107		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 67		
45	gtagagaaga atctgtatat ccacacaaac tacctgcaat gatgatcaca ttcgttatct	60	
	atTTTTttgc aggtagtgtg tgtggataga ttggctcttc ttactac	107	
	<210> 68		
50	<211> 107		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
55	<223> Oligonucleótido monocatenario		

	<400> 68		
	gtagagaaga atctgtatga caatccagcc aatccagcat gatgatacaca ttcggttatct	60	
	atctttttgct ggattggatg gattgtcaga ttggctcttc ttactac	107	
5	<210> 69 <211> 107 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 69		
	gtagagaaga atctgtataa agatcggaac cacatgatata gatgatacaca ttcggttatct	60	
15	atctttttatc atgtgttacc gatctttaca ttggctcttc ttactac	107	
	<210> 70 <211> 107 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
25	<400> 70		
	gtagagaaga atctgtatga cctttcttgg gtttagccat gatgatacaca ttcggttatct	60	
	atctttttggc taaaccccag aaaggtcaca ttggctcttc ttactac	107	
30	<210> 71 <211> 4100 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 71		

cacttatcat	ttagacagta	gatttttaaat	ttgtattttac	aattttcaaaa	ctgaaattca	60
tttgtaatca	aagaaaaaca	aaacaagaaa	agggaggagg	agtgggattt	gggttgctta	120
acagtattat	atatacacgt	cgtaggttaa	tcaataaaatt	atgagcaggt	gtagtagcta	180
tgaacatggt	tttaccaaat	tggtaaattc	atgtcattgt	tgtagcactt	tagcgaggcc	240
agcaaaatgg	cgttcttgga	aagggcatgg	cggcccgtgg	ccgccaggga	tatgtgtgca	300
gctagaagga	ttagaaggag	taacttcacc	tttttgtaga	aactgtaaat	tgccaagacg	360
ctcgtttggt	aaatacctta	acgcttcggt	tgctggaatg	tgtaccacca	ttagtagaag	420
aaagtataat	aagactatta	atgcaagaga	ttttttcata	ttccttttct	aagagtagaa	480
tggaatgaat	aaatgaatga	atgaaatagg	gtttttcttg	tttagatcct	gtcgcacccg	540
agaataatag	aagctgaatt	aattggtgaa	gagttttatg	gtggcgatgt	tgtattttata	600
gagggaaatg	atttcaagtt	tacaatggga	tttttaattt	gttttggtga	ctattatctt	660
gcggagagat	cttgactggt	gacatgtatg	tagtgtttgt	tattaaaata	aatgcatttt	720
tgtagacccg	attcttaaat	atgttaggca	tggtcaaatt	gttagactgt	aaaagcttga	780
gtagagacat	cgggtcaactt	tgtttacaag	aattctctat	aaaatattat	acaaattgat	840
cggtagaaaat	tagatggaac	attttgaatt	aatgtttgac	aatgtataaa	ttgggttggt	900
caatatctag	gaatgaaaac	aagagctgct	tcaaagttgt	tccattctta	agtatacata	960
gaggtggctt	gatgggaagt	ttcatggaag	tgtagtttta	tatctacttc	caaattcggt	1020
gatctgtttc	ttatctcaag	ctaaacatgt	ttagaaaaga	tgtgttaaaa	acatgtgaca	1080
aaaaaagagt	caaatgtttg	gcaaacaagg	tacttagatt	tttggcatct	attcaaatat	1140
aatagaatcc	caaaattatg	atatttgtca	atcaaatttg	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1200
aaagattcta	caaaagatca	aacgtattgc	cgtagattta	tcataatttt	aattctttca	1260
cactaccact	agtccactac	catatagtga	tgagataatc	cataatcata	aataagatat	1320
aactttcgaa	ttcttgtttt	tgttgcctca	aagttgttgg	atcattattt	tttacgtaaa	1380
tgtggcttaa	tgagaattta	tgtttgtggg	aattgtagtt	tgcttccaac	tttttttttt	1440
tttttttgaa	cacgtagttt	gcttccaact	tagtttatct	ttttcttatt	tcaagttaaa	1500
catgtaaaaa	aacatgtgac	gacgaaattc	aatcagttcc	tccaatgttt	ggcagaagcc	1560
aaatccttgg	taaacaaagt	aatttttttg	ccatttgatt	ggtaggtata	ggagaattta	1620
aaaacgacga	taagggttag	gtaaattatt	tcatttgaaa	ataattgagc	accgttaata	1680

attttcatcc ataaaaataat atttcaaaga tgatatttga tccccattaa attcattcgt	1740
aaccaaaaaa aagttatgaa aaaagagtgg tcgtgtgagt tgcccaagca ccattataat	1800
aaaaaataaa ataattagca agtaataagg aataaaatcc tgtaattata gctgaaaaag	1860
gaaaaatatt tggagaccgt cagattcgaa tctgaacaaa gcataaaaaa gtcaacaaaa	1920
cttaaagcgg cggctctcatc gtaatctcag cccaataccc tattttcctc tcccctatat	1980
aaatactttc ttcttctact gatcttcttc tcacaaataa acccaaatat atcaatctac	2040
tgtgttggtg attaagtact ttcgcttgca gagagaaatc acagtgggtca aaaaagttgt	2100
agttttctta aagtctcttt cctctgtgat tctctgtgta agcgaaagag cttgctccct	2160
aaacttatct ctctgatgat ttaatgttag agatcttcgt aaatctatgt gtttgataga	2220
tctgatgcgt tttttgagtt gatgatttga ttatttttca ctggaaagta tctcattagg	2280
gtaacgataa tgttttatgg atttggttgt ataacagatc catgaaatct tgactggtta	2340
taaaatctga ataatgtatt tcaatttgga gattcgggtga taaaaattac tgattttacga	2400
atgacattta tatcgataga tgagtttgct gatttggttg ttaaattgat aaatcaagga	2460
catgagaaac tgtttttgta tgctaatttg tccatggaat aaaattggga ggtgaggacc	2520
gtgagggtag tcaggaaacc ttaatattga agttgatgtt gaaccaacaa atctgcccaa	2580
aaatgataaa agttgatgcc gagcccacaa attttgatga caatcgataa gcccaagccc	2640
aaaaggcatc tgtacctgag cccattattc tttcattact agcaaaaagg atgcattaga	2700
gaccccggtg tagtaaattg acctcacaat tcactattgt attgtatacg tacatttcaa	2760
gcgtaattaa accctcatat ttttatacgc tttaaatata attggccttt aattagctca	2820
aataaaactag atgtcgtacg tgatcacggt ggatgaaatc aatgggtatta tgaaaagact	2880
gtacatgatt tcaaataattt taatgtggtc gtaaaaattg ttgtttatag tggaaattga	2940
agacaacaac gttactgaaa cacatacaga ttgaaatttc gatcatttac ttgcaaagtg	3000
ttaccgtgga ggcgtggcgt ggacgtaagg taccataatg gtttgtgtta cagtcacgcc	3060
actacactcg aattcaagct accatattat aatacgttgt tgattagaaa aaatagtcgc	3120
caattttctt taaaacaaat ttcagttttt atttgtcagc aaaaaaaact tactaacaca	3180
acggaagaac acaaaaatta gggagttgct cacagagcaa aagtaataga aatgggaaaa	3240
gctaataatac gtccgagtag gaaactaatc ttgcaaaaac tgatgaaagc aatcagaagc	3300
cttgacgttt gtctggagag aggaattgtg ttttgatca ctttgttcag tttgtgtgg	3360
atcgtcttcc gttacgttct caccaaaaat atttcataat gaaacaaaaa aattaattaa	3420
taatggtagc ttagaatgcc aagttgagaa cagatttgca gtttgtcccg gaatgatcaa	3480
gtagagcatt catagtgtct tgccaatatg gtgtgatcaa cgaagtttga caaaaccgtg	3540

aagatatagg aacatgtaat catgcggctc tccatacaat acatcttggt gacaaagttc	3600
ccaagacctc attctacaaa ccaatgtttc ttttttcttt ttcttttttg tgatagtttt	3660
tgcaatcaaa tgttgtaaaa ctatgattgg aaatactact gtattttacc gaaaacttta	3720
ttatatatag tcattaacac tcattaccaa tcacataatc aatagtctat ttgattata	3780
caacttttaa acaataaaga catgtttata cagatttggt tttaaattagt actccctata	3840
ttttagaaaa ttttattttg tttcatatta tagaatgtct tggaaagttc tatgtaaatt	3900
taaatgtatt tagtaacttg tgacgatttt atattatgta gtctttttta ggatttggtg	3960
atttttttaa ataaattttt taaagaaaaa aaacaaatta ttttaataaa catgccttta	4020
ccttatacag tttatatttt gaaagagaga tagtatgttt taggatatat ttaaagaaaa	4080
aaaaataact cttaattta	4100

<210> 72

<211> 4100

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 72

ES 2 915 576 T3

cacttatcat ttagacagta gatttttaaat ttgtatttac aatttcaaaa ctgaaattca	60
tttgtaatca aagaaaaaca aaacaagaaa agggaggagg agtgggattt gggttgctta	120
acagtattat atatacacgt cgttagttaa tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta	180
tgaacatggt tttaacaaat tggtaaattc atgtcattgt tgtagcactt tagcgaggcc	240
agcaaaatgg cgttcttgga aagggcatgg cggcccgtgg ccgccaggga tatgtgtgca	300
gctagaagga ttagaaggag taacttcacc tttttgtaga aactgtaaat tgccaagacg	360
ctcgtttggt aaatacctta acgcttcggt tgctggaatg tgtaccacca ttagtagaag	420
aaagtataat aagactatta atgcaagaga ttttttcata ttccttttct aagagtagaa	480
tggaatgaat aaatgaatga atgaaatagg gtttttcttg tttagatcct gtcgcacccg	540
agaataatag aagctgaatt aattggtgaa gagttttatg gtggcgatgt tgtatttata	600
gagggaaatg atttcaagtt tacaatggga tttttaattt gttttgttga ctattatctt	660
gcggagagat cttgactggt gacatgtatg tagtgtttgt tattaaaata aatgcatttt	720
tgtagacccg attcttaaat atgttaggca tgggtcaaatt gttagactgt aaaagcttga	780
gtagagacat cggccaactt tgtttacaag aattctctat aaaatattat acaaattgat	840
cggtagaaat tagatggaac attttgaatt aatgtttgac aatgtataaa ttggtttggt	900
caatatctag gaatgaaaac aagagctgct tcaaagttgt tccattctta agtatacata	960
gaggtggctt gatgggaagt ttcatggaag tgtagtttta tatctacttc caaatcggtt	1020

gatctgtttc ttatctcaag ctaaacaatgt ttagaaaaga tgtgttaaaa acatgtgaca	1080
aaaaaagagt caaatgtttg gcaaacaagg tacttagatt tttggcatct attcaaatat	1140
aatagaatcc caaaattatg atatttgtca atcaaatttg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1200
aaagattcta caaaagatca aacgtattgc cgtagattta tcataatttt aattctttca	1260
cactaccact agtcactac catatagtga tgagataatc cataatcata aataagatat	1320
aactttcgaa ttcttgtttt tgttgcctca aagttgttgg atcattattt ttacgtaaa	1380
tgtggcttaa tgagaattta tgtttgtggg aattgtagtt tgcttccaac tttttttttt	1440
tttttttgaa cacgtagttt gcttccaact tagtttatct ttttcttatt tcaagttaaa	1500
catgtaaaaa aacatgtgac gacgaaattc aatcagttcc tccaatgttt ggcagaagcc	1560
aaatctttgg taaacaaagt aatttttttg ccatttgatt ggtagtata ggagaattta	1620
aaaacgacga taaggtttag gtaaattatt tcatttgaaa ataattgagc accgttaata	1680
attttcatcc ataaaataat atttcaaaga tgatatttga tccccattaa attcattcgt	1740
aacccaaaaa aagttatgaa aaaagagtgg tcgtgtgagt tgcccaagca ccattataat	1800
aaaaaataaa ataattagca agtaataagg aataaaatcc tgtaattata gctgaaaaag	1860
gaaaaatatt tggagaccgt cagattcgaa tctgaacaaa gcataaaaaa gtcaacaaaa	1920
cttaaagcgg cggctctcatc gtaatctcag cccaataccc tattttcctc tcccctatat	1980
aaatactttc ttcttctact gatcttcttc tcacaaataa acccaaatat atcaatctac	2040
tgtgttggtg attaagtact taagtcgtgc tgcttcatgt ggagtgggtca aaaaagttgt	2100
agttttctta aagtctcttt cctctccaca taagcaggac gagttaagag ctgctccct	2160
aaacttatct ctctgatgat ttaatgtag agatcttcgt aaatctatgt gtttgataga	2220
tctgatgcgt tttttgagtt gatgatttga ttatttttca ctggaaagta tctcattagg	2280
gtaacgataa tgttttatgg atttggttgt ataacagatc catgaaatct tgactggtta	2340
taaaaatctga ataatgtatt tcaatttggg gattcgggtga taaaaattac tgatttacga	2400
atgacattta tatcgataga tgagtttgct gatttggttg ttaaattgat aaatcaagga	2460
catgagaaac tgtttttgta tgctaatttg tccatggaat aaaattggga ggtgaggacc	2520
gtgagggtag tcaggaaacc ttaatattga agttgatgtt gaaccaacaa atctgcccaa	2580
aatgataaa agttgatgcc gagcccacaa attttgatga caatcgataa gcccaagccc	2640
aaaaggcatc tgtacctgag ccattattc tttcattact agcaaaaagg atgcattaga	2700
gaccccggtg tagtaaattg acctcacaat tcactattgt attgtatacg tacatttcaa	2760
gcgtaattaa accctcatat ttttatacgc tttaaataata attggccttt aattagctca	2820
aataaactag atgtcgtacg tgatcacggt ggatgaaatc aatggtatta tgaaaagact	2880

gtacatgatt tcaaatat	ttt taatgtggtc	gtaaaaattg	ttgtttatag	tggaattga	2940
agacaacaac gttactgaaa	cacatacaga	ttgaaatttc	gatcatttac	ttgcaaagt	3000
ttaccgtgga ggcgtggcgt	ggacgtaagg	taccataatg	gtttgtgtta	cagtcacgcc	3060
actacactcg aattcaagct	accatattat	aatacgttgt	tgattagaaa	aaatagtcgc	3120
caattttctt taaaacaaat	ttcagttttt	atttgtcagc	aaaaaaaaact	tactaacaca	3180
acggaagaac acaaaaatta	gggagttgct	cacagagcaa	aagtaataga	aatgggaaaa	3240
gctaataatac gtccgagtag	gaaactaatc	ttgcaaaaac	tgatgaaagc	aatcagaagc	3300
cttgacgttt gtctggagag	aggaattgtg	ttttggatca	ctttgttcag	tttgttgtgg	3360
atcgtcttcc gttacgttct	caccaaaaat	atttcataat	gaaacaaaaa	aattaattaa	3420
taatggtagc ttagaatgcc	aagttgagaa	cagatttgca	gtttgtcccg	gaatgatcaa	3480
gtagagcatt catagtgtct	tgccaatatg	gtgtgatcaa	cgaagtttga	caaaaccgtg	3540
aagatatagg aacatgtaat	catgcggctc	tccatacaat	acatcttggt	gacaaagttc	3600
ccaagacctc attctacaaa	ccaatgtttc	ttttttcttt	ttcttttttg	tgatagtttt	3660
tgcaatcaaa tgttgtaaaa	ctatgattgg	aaatactact	gtattttacc	gaaaacttta	3720
ttatatatag tcattaacac	tcattaccaa	tcacataatc	aatagtctat	tttgattata	3780
caacttttaa acaataaaga	catgtttata	cagatttggt	ttaaattagt	actccctata	3840
ttttagaaaa ttttattttg	tttcatatta	tagaatgtct	tggaagttc	tatgtaaatt	3900
taaatgtatt tagtaacttg	tgacgatttt	atattatgta	gtctttttta	ggatttggtg	3960
attttttaaa ataaattttt	taaagaaaaa	aaacaaatta	ttttaataaa	catgccttta	4020
ccttatacag tttatatattt	gaaagagaga	tagtatgttt	taggatatat	ttaaagaaaa	4080
aaaaataact ctttaattta					4100

<210> 73

<211> 4100

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 73

ES 2 915 576 T3

cacttatcat ttagacagta gatttttaa	60
ttgtatttac aatttcaaaa ctgaaattca	
tttgtaatca aagaaaaaca aaacaagaaa	120
aggaggagg agtgggattt gggttgctta	
acagtattat atatacacgt cgtagttaa	180
tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta	
tgaacatggt ttaccaaatt tggtaaattc	240
atgtcattgt ttagcactt tagcgaggcc	
agcaaatgg cgttcttgga aaggcatgg	300
cggcccgtag cgcagga tatgtgtgca	
gctagaagga ttagaaggag taacttcacc	360
ttttgtaga aactgtaaat tgccaagacg	

ctcgtttggt	aaatacctta	acgcttcggt	tgctggaatg	tgtaccacca	ttagtagaag	420
aaagtataat	aagactatta	atgcaagaga	ttttttcata	ttccttttct	aagagtagaa	480
tggaatgaat	aaatgaatga	atgaaatagg	gtttttcttg	tttagatcct	gtcgcacccg	540
agaataatag	aagctgaatt	aattggtgaa	gagttttatg	gtggcgatgt	tgtattttata	600
gagggaaatg	atttcaagtt	tacaatggga	tttttaattt	gttttggtga	ctattatcct	660
gcggagagat	cttgactggt	gacatgtatg	tagtgtttgt	tattaaaata	aatgcatttt	720
tgtagacccg	attcttaa	atgttaggca	tggtcaaatt	gtagactgt	aaaagcttga	780
gtagagacat	cgtcaactt	tgtttacaag	aattctctat	aaaatattat	acaaattgat	840
cggtagaaat	tagatggaac	attttgaatt	aatgtttgac	aatgtataaa	ttggtttggt	900
caatatctag	gaatgaaaac	aagagctgct	tcaaagttgt	tccattctta	agtatacata	960
gaggtggctt	gatgggaagt	ttcatggaag	tgtagtttta	tatctacttc	caaattcggt	1020
gatctgtttc	ttatctcaag	ctaaacatgt	ttagaaaaga	tgtgttaaaa	acatgtgaca	1080
aaaaaagagt	caaagtgttg	gcaaacaagg	tacttagatt	tttggcatct	attcaaatat	1140
aatagaatcc	caaaattatg	atatttgtca	atcaaatttg	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1200
aaagattcta	caaaagatca	aacgtattgc	cgtagattta	tcataatttt	aattctttca	1260
cactaccact	agtccactac	catatagtga	tgagataatc	cataatcata	aataagatat	1320
aactttcgaa	ttcttggttt	tgttgcctca	aagttgttgg	atcattattt	tttacgtaaa	1380
tgtggcttaa	tgagaattta	tgtttggtgg	aattgtagtt	tgcttccaac	tttttttttt	1440
tttttttgaa	cacgtagttt	gcttccaact	tagtttatct	ttttcttatt	tcaagttaaa	1500
catgtaaaaa	aacatgtgac	gacgaaattc	aatcagttcc	tccaatgttt	ggcagaagcc	1560
aaatcttttg	taaacaaagt	aatttttttg	ccatttgatt	ggttagtata	ggagaattta	1620
aaaacgacga	taaggtttag	gtaaattatt	tcatttgaaa	ataattgagc	accgttaata	1680
attttcatcc	ataaaataat	atttcaaaga	tgatatttga	tccccattaa	attcattcgt	1740
aaccaaaaaa	aagttatgaa	aaaagagtgg	tcgtgtgagt	tgccaagca	ccattataat	1800
aaaaaataaa	ataattagca	agtaataagg	aataaaatcc	tgtaattata	gctgaaaaag	1860
gaaaaatatt	tggagaccgt	cagattcgaa	tctgaacaaa	gcataaaaaa	gtcaacaaaa	1920
cttaaagcgg	cgtctcatc	gtaatctcag	cccaataccc	tattttcctc	tcccctatat	1980
aaatactttc	ttcttctact	gatcttcttc	tcacaaataa	accxaaatat	atcaatctac	2040
tgtgttggtg	attaagtact	tagttgtact	ccagcttggtg	ccagtgggtca	aaaaagttgt	2100
agttttctta	aagtctcttt	cctctggcaa	agctgcagta	caactaagag	cttgctccct	2160
aaacttatct	ctctgatgat	ttaatgttag	agatcttcgt	aatctatgt	gtttgataga	2220

ES 2 915 576 T3

tctgatgcgt	tttttgagtt	gatgatttga	ttatttttca	ctggaaagta	tctcattagg	2280
gtaacgataa	tgttttatgg	atttggttgt	ataacagatc	catgaaatct	tgactggtta	2340
taaaatctga	ataatgtatt	tcaatttggga	gatttcggtga	taaaaattac	tgattttacga	2400
atgacattta	tatcgataga	tgagtttgct	gatttggttg	ttaaattgat	aaatcaagga	2460
catgagaaac	tgtttttgta	tgctaatttg	tccatggaat	aaaattggga	ggtgaggacc	2520
gtgagggtag	tcaggaaacc	ttaatattga	agttgatggt	gaaccaacaa	atctgcccaa	2580
aaatgataaa	agttgatgcc	gagcccacaa	attttgatga	caatcgataa	gcccagcccc	2640
aaaaggcatc	tgtacctgag	cccattattc	tttcattact	agcaaaaagg	atgcattaga	2700
gaccccggtg	tagtaaattg	acctcacaat	tcactattgt	attgtatacg	tacatttcaa	2760
gcgtaattaa	accctcatat	ttttatacgc	tttaaataata	attggccttt	aattagctca	2820
aataaactag	atgtcgtacg	tgatcacggt	ggatgaaatc	aatgggtatta	tgaaaagact	2880
gtacatgatt	tcaaataattt	taatgtggtc	gtaaaaattg	ttgtttatag	tggaattga	2940
agacaacaac	gttactgaaa	cacatacaga	ttgaaatttc	gatcatttac	ttgcaaagtg	3000
ttaccgtgga	ggcgtggcgt	ggacgtaagg	taccataatg	gtttgtgtta	cagtcacgcc	3060
actacactcg	aattcaagct	accatattat	aatacgttgt	tgattagaaa	aaatagtcgc	3120
caattttctt	taaaacaaat	ttcagttttt	atttgtcagc	aaaaaaaaact	tactaacaca	3180
acggaagaac	acaaaaatta	gggagttgct	cacagagcaa	aagtaataga	aatgggaaaa	3240
gctaataatac	gtccgagtag	gaaactaatc	ttgcaaaaac	tgatgaaagc	aatcagaagc	3300
cttgacgttt	gtctggagag	aggaattgtg	ttttggatca	ctttgttcag	tttgttgtgg	3360
atcgtcttcc	gttacgttct	caccaaaaat	atttcataat	gaaacaaaaa	aattaattaa	3420
taatggtagc	ttagaatgcc	aagttgagaa	cagatttgca	gtttgtcccg	gaatgatcaa	3480
gtagagcatt	catagtgtct	tgccaatatg	gtgtgatcaa	cgaagtttga	caaaaccgtg	3540
aagatatagg	aacatgtaat	catgcggtc	tccatacaat	acatcttggt	gacaaagttc	3600
ccaagacctc	attctacaaa	ccaatgtttc	ttttttcttt	ttctttttgg	tgatagtttt	3660
tgcaatcaaa	tgttgtaaaa	ctatgattgg	aaatactact	gtattttacc	gaaaacttta	3720
ttatatatag	tcattaacac	tcattaccaa	tcacataatc	aatagtctat	tttgattata	3780
caacttttaa	acaataaaga	catgtttata	cagatttggt	ttaaattagt	actccctata	3840
ttttagaaaa	ttttattttg	tttcatatta	tagaatgtct	tggaagttc	tatgtaaatt	3900
taaatgtatt	tagtaacttg	tgacgatttt	atattatgta	gtctttttta	ggatttggtg	3960
attttttaaa	ataaattttt	taaagaaaaa	aaacaaatta	ttttaataaa	catgccttta	4020
ccttatacag	tttatatttt	gaaagagaga	tagtatgttt	taggatatat	ttaaagaaaa	4080
aaaaataact	ctttaattta					4100

<210> 74
<211> 4100

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 74

cacttatcat	ttagacagta	gattttaaat	ttgtatttac	aattttcaaaa	ctgaaattca	60
tttgtaatca	aagaaaaaca	aaacaagaaa	agggaggagg	agtgggattt	gggttgctta	120
acagtattat	atatacacgt	cgttagttaa	tcaataaatt	atgagcaggt	gtagtagcta	180
tgaacatggt	tttaccaaat	tggtaaattc	atgtcattgt	tgtagcactt	tagcgaggcc	240
agcaaaatgg	cgttcttgga	aagggcatgg	cggcccgtag	cggccaggga	tatgtgtgca	300
gctagaagga	ttagaaggag	taacttcacc	tttttgtaga	aactgtaaat	tgccaagacg	360
ctcgtttggg	aaatacctta	acgcttcggt	tgtgtggaat	tgtaccacca	ttagtagaag	420
aaagtataat	aagactatta	atgcaagaga	ttttttcata	ttccttttct	aagagtagaa	480
tggaatgaat	aaatgaatga	atgaaatagg	gtttttcttg	tttagatcct	gtcgaccccg	540
agaataatag	aagctgaatt	aattggtgaa	gagttttatg	gtggcgatgt	tgtattttata	600
gagggaaatg	atttcaagtt	tacaatggga	tttttaattt	gttttgttga	ctattatctt	660
gcggagagat	cttgactgtt	gacatgtatg	tagtgtttgt	tattaaaata	aatgcatttt	720
tgtagacccg	attcttaaat	atgttaggca	tggtcaaatt	gttagactgt	aaaagcttga	780
gtagagacat	cgggtcaactt	tgtttacaag	aattctctat	aaaatattat	acaaattgat	840
cggtagaaat	tagatggaac	attttgaatt	aatgtttgac	aatgtataaa	ttgggttggt	900
caatatctag	gaatgaaaac	aagagctgct	tcaaagttgt	tccattctta	agtatacata	960
gaggtggctt	gatgggaagt	ttcatggaag	tgtagtttta	tatctacttc	caaattcgtt	1020
gatctgtttc	ttatctcaag	ctaaacatgt	ttagaaaaga	tgtgttaaaa	acatgtgaca	1080
aaaaaagagt	caaatgtttg	gcaaacaagg	tacttagatt	tttggcatct	attcaaatat	1140
aatagaatcc	caaaattatg	atatttgtca	atcaaatttg	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1200
aaagattcta	caaaagatca	aacgtattgc	cgtagattta	tcataatttt	aattctttca	1260
cactaccact	agtccactac	catatagtga	tgagataatc	cataatcata	aataagatat	1320
aactttcgaa	ttcttgtttt	tgttgcctca	aagttgttgg	atcattattt	tttacgtaaa	1380
tgtggcttaa	tgagaattta	tgtttggggg	aattgtagtt	tgcttccaac	tttttttttt	1440
tttttttgaa	cacgtagttt	gcttccaact	tagtttatct	ttttcttatt	tcaagttaaa	1500
catgtaaaaa	aacatgtgac	gacgaaattc	aatcagttcc	tccaatgttt	ggcagaagcc	1560

aaatcttttg	taaacaaagt	aatttttttg	ccatttgatt	ggtagtata	ggagaattta	1620
aaaacgacga	taaggtttag	gtaaattatt	tcatttgaaa	ataattgagc	accgttaata	1680
attttcatcc	ataaaataat	atttcaaaga	tgatatttga	tccccattaa	attcattcgt	1740
aaccaaaaaa	aagttatgaa	aaaagagtgg	tcgtgtgagt	tgcccaagca	ccattataat	1800
aaaaaataaa	ataattagca	agtaataagg	aataaaatcc	tgtaattata	gctgaaaaag	1860
gaaaaatatt	tggagaccgt	cagattcgaa	tctgaacaaa	gcataaaaaa	gtcaacaaaa	1920
cttaaagcgg	cggctctcatc	gtaatctcag	cccaataccc	tattttcctc	tcccctatat	1980
aaatactttc	ttcttctact	gatcttcttc	tcacaaataa	acccaaatat	atcaatctac	2040
tgtgttggtg	attaagtact	ttatccacac	aaactacctg	caagtggcca	aaaaagttgt	2100
agttttctta	aagtctcttt	cctcttcgag	tagttagtgt	ggataaagag	cttgctccct	2160
aaacttatct	ctctgatgat	ttaatgttag	agatcttcgt	aaatctatgt	gtttgataga	2220
tctgatgcgt	tttttgagtt	gatgatttga	ttatttttca	ctggaaagta	tctcattagg	2280
gtaacgataa	tgttttatgg	atttggttgt	ataacagatc	catgaaatct	tgactggtta	2340
taaaatctga	ataatgtatt	tcaatttggg	gattcgggtg	taaaaattac	tgattttacga	2400
atgacattta	tatcgataga	tgagtttgct	gatttggttg	ttaaattgat	aatcaagga	2460
catgagaaac	tgtttttgta	tgctaatttg	tccatggaat	aaaattggga	ggtgaggacc	2520
gtgagggtag	tcaggaaacc	ttaatattga	agttgatggt	gaaccaacaa	atctgcccaa	2580
aatgataaaa	agttgatgcc	gagcccacaa	attttgatga	caatcgataa	gcccagcccc	2640
aaaaggcatc	tgtacctgag	cccattattc	tttcattact	agcaaaaagg	atgcattaga	2700
gaccccggtg	tagtaaattg	acctcacaat	tcactattgt	attgtatacg	tacatttcaa	2760
gcgtaattaa	accctcatat	ttttatacgc	tttaaatata	attggccttt	aattagctca	2820
aataaactag	atgtcgtacg	tgatcacggt	ggatgaaatc	aatgggtatta	tgaaaagact	2880
gtacatgatt	tcaaataattt	taatgtggtc	gtaaaaattg	ttgtttatag	tggaattga	2940
agacaacaac	gttactgaaa	cacatacaga	ttgaaatttc	gatcatttac	ttgcaaagtg	3000
ttaccgtgga	ggcgtggcgt	ggacgtaagg	taccataatg	gtttgtgtta	cagtcacgcc	3060
actacactcg	aattcaagct	accatattat	aatacgttgt	tgattagaaa	aatagtcgc	3120
caattttctt	taaaacaaat	ttcagttttt	atttgtcagc	aaaaaaaaact	tactaacaca	3180
acggaagaac	acaaaaatta	gggagttgct	cacagagcaa	aagtaataga	aatgggaaaa	3240
gctaataatac	gtccgagtag	gaaactaatc	ttgcaaaaac	tgatgaaagc	aatcagaagc	3300
cttgacgttt	gtctggagag	aggaattgtg	ttttggatca	ctttgttcag	tttgttgtgg	3360
atcgtcttcc	gttacgttct	cacaaaaaat	atttcataat	gaaacaaaaa	aattaattaa	3420
taatggtagc	ttagaatgcc	aagttgagaa	cagatttgca	gtttgtcccg	gaatgatcaa	3480

gtagagcatt catagtgtct tgccaatatg gtgtgatcaa cgaagtttga caaaaccgtg	3540
aagatatagg aacatgtaat catgcggctc tccatacaat acatcttggt gacaaagttc	3600
ccaagacctc attctacaaa ccaatgtttc ttttttcttt ttcttttttg tgatagtttt	3660
tgcaatcaaa tgttgtaaaa ctatgattgg aaatactact gtattttacc gaaaacttta	3720
ttatatatag tcattaacac tcattaccaa tcacataatc aatagtctat tttgattata	3780
caactttttaa acaataaaga catgtttata cagatttggt tttaaattagt actccctata	3840
ttttagaaaa ttttattttg tttcatatta tagaatgtct tggaaagttc tatgtaaatt	3900
taaatgtatt tagtaacttg tgacgatttt atattatgta gtctttttta ggatttggtg	3960
atTTTTTaaa ataaattttt taaagaaaaa aaacaaatta ttttaataaa catgccttta	4020
ccttatacag tttatatattt gaaagagaga tagtatgttt taggatatat ttaaagaaaa	4080
aaaaataact ctttaattta	4100

<210> 75
 <211> 4100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido monocatenario
 <400> 75

ES 2 915 576 T3

cacttatcat ttagacagta gattttaaat ttgtatttac aatttcaaaa ctgaaattca	60
tttgtaatca aagaaaaaca aaacaagaaa agggaggagg agtgggattt gggttgctta	120
acagtattat atatacacgt cgtagttaa tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta	180
tgaacatggt tttaacaaat tggtaaattc atgtcattgt tgtagcactt tagcgaggcc	240
agcaaatgg cgttcttgga aaggcatgg cgcccgtgg ccgccaggga tatgtgtgca	300
gctagaagga ttagaaggag taacttcacc tttttgtaga aactgtaaat tgccaagacg	360
ctcgtttggg aaatacctta acgcttcgtt tgctggaatg tgtaccacca ttagtagaag	420
aaagtataat aagactatta atgcaagaga ttttttcata ttccttttct aagagtagaa	480
tggaatgaat aaatgaatga atgaaatagg gtttttcttg tttagatcct gtcgcacccg	540
agaataatag aagctgaatt aattggtgaa gagttttatg gtggcgatgt tgtatttata	600
gagggaaatg atttcaagtt tacaatggga tttttaattt gttttgttga ctattatctt	660
gcggagagat cttgactggt gacatgtatg tagtgtttgt tattaataa aatgcatttt	720
tgtagacccg attcttaaat atgttaggca tgggtcaaatt gttagactgt aaaagcttga	780
gtagagacat cgggtcaactt tgtttacaag aattctctat aaaatattat acaaattgat	840
cggtagaaat tagatggaac attttgaatt aatgtttgac aatgtataaa ttggtttggt	900

caatatctag	gaatgaaaac	aagagctgct	tcaaagttgt	tccattctta	agtatacata	960
gaggtggctt	gatgggaagt	ttcatggaag	tgtagtttta	tatctacttc	caaattcgtt	1020
gatctgtttc	ttatctcaag	ctaaacatgt	ttagaaaaga	tgtgttaaaa	acatgtgaca	1080
aaaaaagagt	caaatgtttg	gcaaacaagg	tacttagatt	tttggcatct	attcaaatat	1140
aatagaatcc	caaaattatg	atatttgtca	atcaaatttg	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1200
aaagattcta	caaaagatca	aacgtattgc	cgtagattta	tcataatttt	aattctttca	1260
cactaccact	agtccactac	catatagtga	tgagataatc	cataatcata	aataagatat	1320
aactttcgaa	ttcttgTTTT	tgttgcctca	aagttgttgg	atcattatTT	tttacgtaaa	1380
tgtggcttaa	tgagaattta	tgTTTgtggg	aattgtagtt	tgcttccaac	TTTTTTTTT	1440
TTTTTTTgaa	cacgtagttt	gcttccaact	tagtttatct	TTTTcttatt	tcaagttaaa	1500
catgtaaaaa	aacatgtgac	gacgaaattc	aatcagttcc	tccaatgttt	ggcagaagcc	1560
aaatctttgg	taaacaaagt	aattTTTTTg	ccatttgatt	ggttagtata	ggagaattta	1620
aaaacgacga	taaggTTtag	gtaaattatt	tcatttgaaa	ataattgagc	accgttaata	1680
atTTTcatcc	ataaaataat	atTTTcaaaga	tgatatttga	tccccattaa	attcattcgt	1740
aacccaaaaa	aagttatgaa	aaaagagtgg	tcgtgtgagt	tgcccaagca	ccattataat	1800
aaaaaataaa	ataattagca	agtaataagg	aataaaatcc	tgtaattata	gctgaaaaag	1860
gaaaaatatt	tgagagaccgt	cagattcgaa	tctgaacaaa	gcataaaaaa	gtcaacaaaa	1920
cttaaagcgg	cggTctcatc	gtaatctcag	cccaataccc	tattttcctc	tcccctatat	1980
aaatactttc	ttcttctact	gatcttcttc	tcacaaataa	acccaaatat	atcaatctac	2040
tgtgttggtg	attaagtact	ttgacaatcc	agccaatcca	gcagtgggtca	aaaaagttgt	2100
agTTTTctta	aagtctcttt	cctctgctga	ttggcaggat	tgtcaaagag	cttgctccct	2160
aaacttatct	ctctgatgat	ttaatgttag	agatcttcgt	aaatctatgt	gtttgataga	2220
tctgatgcgt	TTTTtgagtt	gatgatttga	ttatttttca	ctggaaagta	tctcattagg	2280
gtaacgataa	tgTTTTatgg	atTTTggttg	ataacagatc	catgaaatct	tgactgggtta	2340
taaaaatctga	ataatgtatt	tcaatttgga	gattcgggtga	taaaaattac	tgattttacga	2400
atgacattta	tatcgataga	tgagTTtgct	gatttggttg	ttaaattgat	aaatcaagga	2460
catgagaaac	tgTTTTtgta	tgctaatttg	tccatggaat	aaaattggga	ggtgaggacc	2520
gtgagggtag	tcaggaaacc	ttaatattga	agttgatgtt	gaaccaacaa	atctgcccaa	2580
aaatgataaa	agttgatgcc	gagcccacaa	atTTTgatga	caatcgataa	gcccaagccc	2640
aaaaggcatc	tgtacctgag	cccattattc	tttcattact	agcaaaaagg	atgcattaga	2700
gaccccggtg	tagtaaaattg	acctcacaat	tcactattgt	attgtatacg	tacatttcaa	2760
gcgtaattaa	accctcatat	TTTTatacgc	TTTaaatata	attggccttt	aattagctca	2820

aataaactag atgtcgtacg tgatcacggt ggatgaaatc aatggtatta tgaaaagact	2880
gtacatgatt tcaaataat taaatgtggtc gtaaaaattg ttgtttatag tggaaattga	2940
agacaacaac gttactgaaa cacatacaga ttgaaatttc gatcatttac ttgcaaagt	3000
ttaccgtgga ggcgtggcgt ggacgtaagg taccataatg gtttgtgtta cagtcacgcc	3060
actacactcg aattcaagct accatattat aatacgttgt tgattagaaa aaatagtcgc	3120
caattttctt taaaacaaat ttcagttttt atttgtcagc aaaaaaaact tactaacaca	3180
acggaagaac acaaaaatta gggagttgct cacagagcaa aagtaataga aatgggaaaa	3240
gctaataatg gtccgagtag gaaactaatc ttgcaaaaac tgatgaaagc aatcagaagc	3300
cttgacgttt gtctggagag aggaattgtg ttttggtatca ctttggtcag tttgtgtgg	3360
atcgtcttcc gttacgttct caccaaaaat atttcataat gaaacaaaaa aattaattaa	3420
taatggtagc ttagaatgcc aagttgagaa cagatttgca gtttgtcccg gaatgatcaa	3480
gtagagcatt catagtgtct tgccaatatg gtgtgatcaa cgaagtttga caaaaccgtg	3540
aagatatagg aacatgtaat catgcggtc tccatacaat acatcttggt gacaaagttc	3600
ccaagacctc attctacaaa ccaatgtttc ttttttctt ttcttttttg tgatagtttt	3660
tgcaatcaaa tgttgtaaaa ctatgattgg aaatactact gtattttacc gaaaacttta	3720
ttatatatag tcattaacac tcattaccaa tcacataatc aatagtctat tttgattata	3780
caactttttaa acaataaaga catgtttata cagatttggg ttaaattagt actccctata	3840
ttttagaaaa ttttattttg tttcatatta tagaatgtct tggaaagttc tatgtaaatt	3900
taaatgtatt tagtaacttg tgacgatttt atattatgta gtctttttta ggatttggtg	3960
atttttttaa ataaattttt taaagaaaaa aaacaaatta ttttaataaa catgccttta	4020
ccttatacag tttatatttt gaaagagaga tagtatgttt taggatatat ttaaagaaaa	4080
aaaaataact ctttaattta	4100

<210> 76

<211> 4100

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 76

cacttatcat ttagacagta gatttttaaat ttgtatttac aatttcaaaa ctgaaattca	60
tttgtaatca aagaaaaaca aaacaagaaa agggaggagg agtgggattt gggttgctta	120
acagtattat atatacacgt cgttagttaa tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta	180
tgaacatggt tttaacaaat tggtaaattc atgtcattgt tgtagcactt tagcgaggcc	240

agcaaaatgg	cgttcttgga	aagggcatgg	cggcccgtgg	cgccagggga	tatgtgtgca	300
gctagaagga	ttagaaggag	taacttcacc	tttttgtaga	aactgtaa	tgccaagacg	360
ctcgttttgt	aaatacctta	acgcttcgtt	tgttggaatg	tgtaccacca	ttagtagaag	420
aaagtataat	aagactatta	atgcaagaga	ttttttcata	ttccttttct	aagagtagaa	480
tggaatgaat	aaatgaatga	atgaaatagg	gtttttcttg	tttagatcct	gtcgcacccg	540
agaataatag	aagctgaatt	aattggtgaa	gagttttatg	gtggcgatgt	tgtattttata	600
gagggaaatg	atttcaagtt	tacaatggga	tttttaattt	gttttggtga	ctattatctt	660
gcggagagat	cttgactggt	gacatgtatg	tagtgtttgt	tattaaaata	aatgcatttt	720
tgtagacccg	attcttaaat	atgttaggca	tggtcaaatt	gttagactgt	aaaagcttga	780
gtagagacat	cgggtcaactt	tgtttacaag	aattctctat	aaaatattat	acaaattgat	840
cggtagaaat	tagatggaac	attttgaatt	aatgtttgac	aatgtataaa	ttggtttggt	900
caatatctag	gaatgaaaac	aagagctgct	tcaaagttgt	tccattctta	agtatacata	960
gaggtggctt	gatgggaagt	ttcatggaag	tgtagtttta	tatctacttc	caaattcggt	1020
gatctgtttc	ttatctcaag	ctaaacatgt	ttagaaaaga	tgtgttaaaa	acatgtgaca	1080
aaaaaagagt	caaatgtttg	gcaaacaagg	tacttagatt	tttggcatct	attcaaatat	1140
aatagaatcc	caaaattatg	atatttgtca	atcaaatttg	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	1200
aaagattcta	caaaagatca	aacgtattgc	cgtagattta	tcataatttt	aattctttca	1260
cactaccact	agtccactac	catatagtga	tgagataatc	cataatcata	aataagatat	1320
aactttcgaa	ttcttgtttt	tgttgcctca	aagttgttgg	atcattattt	tttacgtaaa	1380
tgtggcttaa	tgagaattta	tgtttggtgg	aattgtagtt	tgcttccaac	tttttttttt	1440
tttttttgaa	cacgtagttt	gcttccaact	tagtttatct	ttttcttatt	tcaagttaaa	1500
catgtaaaaa	aacatgtgac	gacgaaattc	aatcagttcc	tccaatgttt	ggcagaagcc	1560
aaatcttttg	taaacaaagt	aatttttttg	ccatttgatt	ggtagtata	ggagaattta	1620
aaaacgacga	taagggttag	gtaaattatt	tcatttgaaa	ataattgagc	accgttaata	1680
attttcatcc	ataaaataat	atttcaaaga	tgatatttga	tccccattaa	attcattcgt	1740
aaccaaaaaa	aagttatgaa	aaaagagtgg	tcgtgtgagt	tgccaagca	ccattataat	1800
aaaaaataaa	ataattagca	agtaataagg	aataaaatcc	tgtaattata	gctgaaaaag	1860
gaaaaatatt	tgagagaccg	cagattcgaa	tctgaacaaa	gcataaaaaa	gtcaacaaaa	1920
cttaaagcgg	cgggtctcatc	gtaatctcag	cccaataccc	tattttcctc	tcccctatat	1980
aaatactttc	ttcttctact	gatcttcttc	tcacaaataa	acccaaatat	atcaatctac	2040
tgtgttggtg	attaagtact	ttaaagatcg	gcaacacatg	atagtgtgtca	aaaaagttgt	2100
agttttctta	aagtctcttt	cctctgatca	gtgttggcga	tctttaagag	cttgctccct	2160

aaacttatct ctctgatgat ttaatgttag agatcttcgt aaatctatgt gtttgataga	2220
tctgatgcgt tttttgagtt gatgatttga ttatttttca ctggaaagta tctcattagg	2280
gtaacgataa tgttttatgg atttggttgt ataacagatc catgaaatct tgactggtta	2340
taaaatctga ataatgtatt tcaatttgga gattcgggtga taaaaattac tgattttacga	2400
atgacattta tatcgataga tgagtttgct gatttggttg ttaaattgat aaatcaagga	2460
catgagaaac tgtttttgta tgctaatttg tccatggaat aaaattggga ggtgaggacc	2520
gtgagggtag tcaggaaacc ttaatatga agttgatgtt gaaccaacaa atctgcccaa	2580
aaatgataaa agttgatgcc gagccacaa attttgatga caatcgataa gcccaagccc	2640
aaaaggcatc tgtacctgag cccattattc tttcattact agcaaaaagg atgcattaga	2700
gaccccggtg tagtaaattg acctcacaat tcactattgt attgtatacg tacatttcaa	2760
gcgtaattaa accctcatat ttttatacgc tttaaatata attggccttt aattagctca	2820
aataaactag atgtcgtacg tgatcacggt ggatgaaatc aatggtatta tgaaaagact	2880
gtacatgatt tcaaataatt taatgtggtc gtaaaaattg ttgtttatag tggaaattga	2940
agacaacaac gttactgaaa cacatacaga ttgaaatttc gatcatttac ttgcaaagtg	3000
ttaccgtgga ggcgtggcgt ggacgtaagg taccataatg gtttgtgtta cagtcacgcc	3060
actacactcg aattcaagct accatattat aatacgttgt tgattagaaa aaatagtcgc	3120
caattttctt taaaacaaat ttcagttttt atttgtcagc aaaaaaaact tactaacaca	3180
acggaagaac acaaaaatta gggagttgct cacagagcaa aagtaataga aatgggaaaa	3240
gctaataaac gtccgagtag gaaactaatc ttgcaaaaac tgatgaaagc aatcagaagc	3300
cttgacgttt gtctggagag aggaattgtg ttttgatca ctttgttcag tttgttgtgg	3360
atcgtcttcc gttacgttct caccaaaaat atttcataat gaaacaaaaa aattaattaa	3420
taatggtagc ttagaatgcc aagttgagaa cagatttgca gtttgtcccg gaatgatcaa	3480
gtagagcatt catagtgtct tgccaatatg gtgtgatcaa cgaagtttga caaaaccgtg	3540
aagatatagg aacatgtaat catgcggctc tccatacaat acatcttggt gacaaagttc	3600
ccaagacctc attctacaaa ccaatgtttc ttttttcttt ttcttttttg tgatagtttt	3660
tgcaatcaaa tgttgtaaaa ctatgattgg aaatactact gtattttacc gaaaacttta	3720
ttatatatag tcattaacac tcattaccaa tcacataatc aatagtctat tttgattata	3780
caacttttaa acaataaaga catgtttata cagatttggt ttaaattagt actccctata	3840
ttttagaaaa ttttattttg tttcatatta tagaatgtct tggaaagttc tatgtaaatt	3900
taaatgtatt tagtaacttg tgacgatttt atattatgta gtctttttta ggatttggtg	3960
attttttaaa ataaattttt taaagaaaaa aaacaaatta ttttaataaa catgccttta	4020

ccttatacag tttatatattt gaaagagaga tagtatgttt taggatatat ttaaagaaaa 4080
aaaaataact ctttaattta 4100

5 <210> 77
 <211> 4100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido monocatenario
 <400> 77

cacttatcat ttagacagta gattttaaat ttgtatttac aatttcaaaa ctgaaattca	60
tttgtaatca aagaaaaaca aaacaagaaa aggaggagg agtgggattt gggttgctta	120
acagtattat atatacacgt cgtagttaa tcaataaatt atgagcaggt gtagtagcta	180
tgaacatggg tttaacaaat tggtaaattc atgtcattgt tgtagcactt tagcgaggcc	240
agcaaaatgg cgttcttgga aagggcattg cggcccgagg cggccaggga tatgtgtgca	300
gctagaagga ttagaaggag taacttcacc tttttgtaga aactgtaaat tgccaagacg	360
ctcgtttggt aaatacctta acgcttcggt tgctggaatg tgtaccacca ttagtagaag	420
aaagtataat aagactatta atgcaagaga ttttttcata ttccttttct aagagtagaa	480
tggaatgaat aaatgaatga atgaaatagg gtttttcttg ttttagatcct gtcgcacccg	540
agaataatag aagctgaatt aattgggtgaa gagttttatg gtggcgatgt tgtatttata	600
gagggaaatg atttcaagtt tacaatggga tttttaattt gttttgttga ctattatctt	660
gcggagagat cttgactggt gacatgtatg tagtgtttgt tattaaaata aatgcatttt	720
tgtagacccg attcttaaat atgttaggca tgggtcaaatt gttagactgt aaaagcttga	780
gtagagacat cgggtcaactt tgtttacaag aattctctat aaaatattat acaaattgat	840
cggtagaaat tagatggaac attttgaatt aatgtttgac aatgtataaa ttggtttggt	900
caatatctag gaatgaaaac aagagctgct tcaaagttgt tccattctta agtatacata	960
gaggtggctt gatgggaagt ttcattggaag tgtagtttta tatctacttc caaattcggt	1020
gatctgtttc ttatctcaag ctaaacatgt ttagaaaaga tgtgttaaaa acatgtgaca	1080
aaaaaagagt caaatgtttg gcaaacaagg tacttagatt tttggcatct attcaaatat	1140
aatagaatcc caaaattatg atatttgtca atcaaatttg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1200
aaagattcta caaaagatca aacgtattgc cgtagattta tcataatttt aattctttca	1260
cactaccact agtcactac catatagtga tgagataatc cataatcata aataagatat	1320
aactttcgaa ttcttgtttt tgttgcctca aagttgttgg atcattattt tttacgtaaa	1380
tgtggcttaa tgagaattta tgtttggtgg aattgtagtt tgcttccaac tttttttttt	1440
tttttttgaa cacgtagttt gcttccaact tagtttatct ttttcttatt tcaagttaaa	1500

ES 2 915 576 T3

catgtaaaaa	aacatgtgac	gacgaaattc	aatcagttcc	tccaatgttt	ggcagaagcc	1560
aaatcttttg	taaacaaagt	aatTTTTTTTg	ccatttgatt	ggtagtata	ggagaattta	1620
aaaacgacga	taaggtttag	gtaaattatt	tcatttgaaa	ataattgagc	accgttaata	1680
attttcatcc	ataaaataat	atttcaaaga	tgatatttga	tccccattaa	attcattcgt	1740
aaccaaaaaa	aagttatgaa	aaaagagtgg	tcgtgtgagt	tgcccaagca	ccattataat	1800
aaaaaataaa	ataattagca	agtaataagg	aataaaatcc	tgtaattata	gctgaaaaag	1860
gaaaaatatt	tggagaccgt	cagattcgaa	tctgaacaaa	gcataaaaaa	gtcaacaaaa	1920
cttaaagcgg	cggctctcatc	gtaatctcag	cccaataccc	tattttcctc	tcccctatat	1980
aaatactttc	ttcttctact	gatcttcttc	tcacaaataa	acccaaatat	atcaatctac	2040
tgtgttggtg	attaagtact	ttgacctttc	ttgggtttag	ccagtgggtca	aaaaagttgt	2100
agttttctta	aagtctcttt	cctctgggct	aacccatgaa	aggtcaagag	cttgctccct	2160
aaacttatct	ctctgatgat	ttaatgttag	agatcttcgt	aatctatgt	gtttgataga	2220
tctgatgcgt	tttttgagtt	gatgatttga	ttatttttca	ctggaaagta	tctcattag	2280
gtaacgataa	tgttttatgg	atttggttgt	ataacagatc	catgaaatct	tgactggtta	2340
taaaatctga	ataatgtatt	tcaatttgga	gattcgggtga	taaaaattac	tgatttacga	2400
atgacattta	tatcgataga	tgagtttgct	gatttggttg	ttaaattgat	aatcaagga	2460
catgagaaac	tgtttttgta	tgctaatttg	tccatggaat	aaaattggga	ggtgaggacc	2520
gtgagggtag	tcaggaaacc	ttaatattga	agttgatgtt	gaaccaacaa	atctgcccaa	2580
aatgataaa	agttgatgcc	gagcccacaa	attttgatga	caatcgataa	gcccagccc	2640
aaaaggcatc	tgtacctgag	cccattattc	tttcattact	agcaaaaagg	atgcattaga	2700
gaccccggtg	tagtaaattg	acctcacaat	tcactattgt	attgtatacg	tacatttcaa	2760
gcgtaattaa	accctcatat	ttttatacgc	tttaaataa	attggccttt	aattagctca	2820
aataaactag	atgtcgtacg	tgatcacggg	ggatgaaatc	aatggtatta	tgaaaagact	2880
gtacatgatt	tcaaataatt	taatgtggtc	gtaaaaattg	ttgtttatag	tggaattga	2940
agacaacaac	gttactgaaa	cacatacaga	ttgaaatttc	gatcatttac	ttgcaaagt	3000
ttaccgtgga	ggcgtggcgt	ggacgtaagg	taccataatg	gtttgtgtta	cagtcacgcc	3060
actacactcg	aattcaagct	accatattat	aatacgttgt	tgattagaaa	aaatagtcgc	3120
caattttctt	taaaacaaat	ttcagttttt	atttgtcagc	aaaaaaaact	tactaacaca	3180
acggaagaac	acaaaaatta	gggagttgct	cacagagcaa	aagtaataga	aatgggaaaa	3240
gctaataatac	gtccgagtag	gaaactaatc	ttgcaaaaac	tgatgaaagc	aatcagaagc	3300
cttgacgttt	gtctggagag	aggaattgtg	ttttggatca	ctttgttcag	tttgttgtgg	3360

atcgtcttcc gttacgttct caccaaaaat atttcataat gaaacaaaaa aattaattaa	3420
taatggtagc ttagaatgcc aagttgagaa cagatttgca gtttggtcccgaatgatcaa	3480
gtagagcatt catagtgtct tgccaatatg gtgtgatcaa cgaagtttga caaaaccgtg	3540
aagatatagg aacatgtaat catgcggctc tccatacaat acatcttggt gacaaagttc	3600
ccaagacctc attctacaaa ccaatgtttc ttttttcttt ttcttttttggt gatagtttt	3660
tgcaatcaaa tgttgtaaaa ctatgattgg aaatactact gtattttacc gaaaacttta	3720
ttatatatag tcattaacac tcattaccaa tcacataatc aatagtctat tttgattata	3780
caacttttaa acaataaaga catgtttata cagatttgggt ttaaattagt actccctata	3840
ttttagaaaa ttttattttg tttcatatta tagaatgtct tggaaagttc tatgtaaatt	3900
taaatgtatt tagtaacttg tgacgatttt atattatgta gtctttttta ggatttggtg	3960
atttttttaa ataaattttt taaagaaaaa aaacaaatta ttttaataaa catgccttta	4020
ccttatacag tttatatattt gaaagagaga tagtatgttt taggatatat ttaaagaaaa	4080
aaaaataact ctttaattta	4100

<210> 78

<211> 4000

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 78

ES 2 915 576 T3

accctcattg attttggtgg ccaaactctt gatcgtattc ttttaggaac agtaattaat	60
tttaaatttg agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc	120
attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact	180
cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata	240
ggggaacata atcattatctt gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa	300
aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat tttttttcgt	360
ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaagtg tttgctgcat	420
ccaatctaata acaccgttaa acaataaaaat ttgttatctc tcaaactctga tcatctattc	480
caacctgact gttttattct agtattttaa ggccagggtat aacgaaaaca aagaaaaaag	540
ttcagcgcacc aagacatttt gacatcaggc tcaaacgggc aaaccacga aaacttttac	600
ctcatttctt aaccacgcag tgttatttga atagccttaa taggctaata caaaacaaca	660
agccatcgat tacagtttta actataatat tacaaaatct taaacaaaa caagaaaaga	720
tatatattcc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gttagctctt	780
tcgacaaaat cattataaat taggccattt tgtaagttag ttctttttatc gacaagccat	840

tataacttag gtaatthttgt aagttagctg gactataacc aatthttthttg tttcacatct	900
agagtataaa acacatatat attgaccgta caactthtagt caaattagaa actctgtthtt	960
atctgcagaa aagaaaaaaa aagaggatga attatgtaaa tacttcagga ttagaaataa	1020
tgtcatcgta tatctcttga tatgaatata taththtactt gactagtacc gtagtcggca	1080
ggaaaatgac acaaacaacc atctaaaaag ataaagtaag aactaaaaag tcttgacatt	1140
cattagthtta atcaththtct gttaacatat atggaaaaaa caaacttcac cgthaththac	1200
ctgaaththac ctaththgggt aagaattgta cctctggacc tctagtathth tatatacacc	1260
taaaaatata aththtggtcg ggaaaatata actctgtthta athtaathaa ththtcagtat	1320
tgtgtaagtg taattataga aatcaathth atccgcgtaa caaaataata taaaattata	1380
ctthcaaadc cacgaatata tathgtgaag tctcatagtt tgcaataag cattggtctt	1440
cggccgacaa aaaaaaaagc attggtcttc gaaththttg aatatcggac caatggtata	1500
taathaataa tatgtggtat ataaatacat aththaththaa atcacatag gatatgcaat	1560
gtgtgtatat atacatatat gtaaththaaag tccgggttaa actgatagca tataththaa	1620
tagatgcadc tataathgtt cgtcaacaaa agcaththtca tgtaththtga athtaagcttc	1680
ctthcaththtct gtgaaththaa aggcctcaga agaagaaact aaagtcaaac aatcaacggg	1740
atccaataaa tcacatctgg actatatagt atcaatactt tccacactaa aaaagctaag	1800
aaaththata aatacathth tatagggggg aaaaaaagggt agtcaththaga tataththth	1860
ggtaagaaaa tatagaaatg aataaththca cgththaacga agaggagatg acgtgtgttc	1920
cttcgaaccc gagththtgtt cgtctataaa tagcaccttc tcttctcctt cttcctcact	1980
tccatctthth tagcttcact atctctctat aatcggtthth atctthtctt aagtcacaa	2040
ccaaaaaaac aaagtagaga agaathctgta aagctcagga gggatagcgc catgatgadc	2100
acathctgth tctathththth ggcgctatcc atcctgagtt tcaththggtc thctthactac	2160
aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcaththgag aatcaaththt thththactgc	2220
caththaaagt atctththata aacgtgtctt athththctatc tctththgtth aaactaagaa	2280
actatagtat ththgtctaaa aaaaaacatg aaagaacaga ttagatctca thththtagtct	2340
ctthtctccgg tgcagtcagc caccgtcggg taagththcat ctgtaththta thtaathaatt	2400
acaaththata gtgtthcttht taccgtththt gtaaaaththg thtaathaatt tgggtccaaa	2460
caththtaaac caathththt gaaaagggtg aacgcacaatc agththatac aathththth	2520
caththaaagta gaatcggaga gtthacatac taacaaaaag thacatatat tagtatcath	2580
thctththaaaga ththgtthtagg athththctac thththtagtgc tgcgggtthg ggtcagggt	2640
agtggggaac agaththgctc tgcaththgacc acgtggacca acathththt acacagthth	2700

ES 2 915 576 T3

```

atattattttt tctagtaggt tcatttgcaa attttccagt atcttgtatg ttatcttcat      2760
ggtgagtttt ttggtcgcat attcttgggtg attcttcttc tacgttttca ctttcttctt      2820
cagagacctt attaatatgt taattgcatg aatttatgta acattcaaga aaaagagatc      2880
gaatacaaga aaccggaaat ttaatttcta atttgaattc tatgcatggt tgtttctttg      2940
ccaatttagt acgaatatat ttatgggtccg gagttctaac caaagatagt tgctctgtat      3000
atagaagtta tacatctcgc ttgtttaaac taaataacta tttagtttgt cttggtagtc      3060
cagtgacttt ctgcaaacat tgggatttat aatatagtca aaacgttggg atatgtagta      3120
ttcattttcg ttgtaaaaat cattatatatt tgcaaagggt gcaacgtaaa acgttgtatt      3180
gaatttagga gaaagtagcc atttacaatg aatttttagtg acaaactggt gtatacagcc      3240
tgtgccacta agtatgtcta tatctaaatt tggaatggat gataaccagt attgggtcaat      3300
aatggataat ttggtattta gaattactaa tttgggtatt tagtgacaaa ctggtgtatg      3360
gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcatatggt      3420
atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggt ttaaggttta atcagtaatc      3480
gatccgacca atcatataca agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa      3540
tgctattaca aagggtttttt cttttcaaaa tacagcctaa tgctactaca aaattctaatt      3600
gttataaaat aatcatagga gaagtaaacc ccggtattta attaatacct tacaaaactta      3660
cattattgat aaagttgaat gaagagttat atgggtccatt tagtattatt tacttaatat      3720
gatactagtg ttagacgtgt tactgtattt caacgtgcat aatcaggttg ttcaaaaaga      3780
gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcatgt gaggctgctc      3840
tgctgatgct gcacggcgct gcaactctct caataaattc ttttaactaa cgctccaatt      3900
ttcgatgtaa attggctgac ttcaattcta tgccttactc ttgtactcta tgtttcttta      3960
tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa      4000

```

<210> 79
 <211> 4000
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido monocatenario
 <400> 79

ES 2 915 576 T3

accctcattg attttgggtgg ccaaactcctt gatcgtattc ttttaggaac agtaattaat	60
tttaaatttg agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc	120
attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact	180
cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata	240
ggggaacata atcattatctt gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa	300

aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat tttttttcgt	360
ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaatg tttgctgcat	420
ccaatctaata acaccgttaa acaataaaaat ttgttatctc tcaaactctga tcatctattc	480
caacctgact gttttattct agtattttta ggccaggtat aacgaaaaca aagaaaaaag	540
ttcagcgacc aagacatttt gacatcaggc tcaaacggtc aaaccacga aaacttttac	600
ctcattttctt aaccacgcag tgttatttga atagccttaa taggctaata caaaacaaca	660
agccatcgat tacagtttta actataatat tacaaaatct taaacaaaa caagaaaaga	720
tatatattcc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gttagctctt	780
tcgacaaaat cattataaat taggccattt tgtaagttag ttcttttctc gacaagccat	840
tataacttag gtaattttgt aagtttagctg gactataacc aatttttttg tttcacatct	900
agagtataaa acacatatat attgaccgta caactttagt caaattagaa actctgtttt	960
atctgcagaa aagaaaaaaa aagaggatga attatgtaaa tacttcagga ttagaaataa	1020
tgatcatcgta tatctcttga tatgaatata tattttactt gactagtacc gtagtcggca	1080
ggaaaatgac acaacaacc atctaaaaag ataaagtaag aactaaaaag tcttgacatt	1140
cattagttta atcattttct gttaacatat atggaaaaaa caaacttcac cgttatttac	1200
ctgaattttac ctatttggtt aagaattgta cctctggacc tctagtattt tatatacacc	1260
taaaaatata attttggtcg ggaaaatata actctgttta attaattaaa ttttcagtat	1320
tgtgtaagtg taattataga aatcaatttt atccgcgtaa caaaataata taaaattata	1380
ctttcaaatc cacgaatata tattgtgaag tctcatagtt tgcaataaag cattggtctt	1440
cggccgacaa aaaaaaaagc attggtcttc gaatattttg aatatcggac caatggtata	1500
taattaataa tatgtggtat ataaatacat atttatttaa atcacaatag gatatgcaat	1560
gtgtgtatat atacatatac gtaattaaag tccgggttaa actgatagca tatattataa	1620
tagatgcac tataattggt cgtcaacaaa agcattatca tgtattttga attaagcttc	1680
cttcattttct gtgaatcaaa aggcctcaga agaagaaact aaagtcaaac aatcaacggg	1740
atccaataaa tcacatctgg actatatagt atcaatactt tccacactaa aaaagctaag	1800
aaatttaata aatacattat tatagggggg aaaaaaagg agtcatcaga tatatatattt	1860
ggtaagaaaa tatagaaatg aataatttca cgtttaacga agaggagatg acgtgtgttc	1920
cttcgaaccc gagttttggt cgtctataaa tagcaccttc tcttctcctt cttcctcact	1980
tccatctttt tagcttcact atctctctat aatcggtttt atctttctct aagtcacaac	2040
ccaaaaaac aaagtagaga agaactctgta aagtcgtgct gcttcatgtg gatgatgatc	2100
acattcgtta tctatttttt ccacatgaag aagcacgact tgattggctc ttcttactac	2160

aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag aatcaattct ttttactgtc	2220
catttaagct atcttttata aacgtgtcctt attttctatc tcttttgttt aaactaagaa	2280
actatagtat tttgtctaaa acaaaacatg aaagaacaga ttagatctca tcttttagtct	2340
ctttctccgg tgcagtcagc caccgtcggg taagtttcat ctgtatttta ttaattaatt	2400
acaattatta gtgttcttat taccgttttg gtaaaattag ttaattaatg tcggtccaaa	2460
cattctaaac caattattct gaaaagggtg aacgccaatc agttatatac aatattctta	2520
cattaaagta gaatcggaga tgttacatac taacccaaaag ttacatatac tagtatcatt	2580
ttctttaaga tttgtttagg atttactcac tttatagtgc tcgcggttg ggtcagggtta	2640
agtggggaac agatatgctc tgcataaacc acgtggacca acatgcatat acacagttac	2700
atttattttt tctagtaggt tcatttgcaa attttccagt atcttgtatg ttatcttcat	2760
ggtgagtttt ttggtcgc atctcttggtg attcttcttc tacgttttca ctttcttctt	2820
cagagacctt attaatatgt taattgcatg aatttatgta acattcaaga aaaagagatc	2880
gaatacaaga aaccggaaat ttaatttcta atttgaattc tatgcatgtt tgtttctttg	2940
ccaatttagt acgaatatat ttatgggtccg gagttctaac caaagatagt tgctctgtat	3000
atagaagtta tacatctcgc ttgtttaaac taaataacta tttagtttgt cttggtagtc	3060
cagtgaactt ctgcaaaccat tgggatttat aatatagtca aaacgttggg atatgtagta	3120
ttcattttcg ttgtaaaaat cattatatat tgcaaagggt gcaacgtaaa acgttgtatt	3180
gaatttagga gaaagtagcc atttacaatg aatttttagtg acaaactgtt gtatacagcc	3240
tgtgccacta agtatgtcta tatctaaatt tggaatggat gataaccagt attggtcaat	3300
aatggataat ttggtattta gaattactaa tttggtattt tagtgacaaa ctggtgtatg	3360
gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcatatgtt	3420
atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggt ttaagggtta atcagtaatc	3480
gatccgacca atcatataca agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa	3540
tgctattaca aaggtttttt cttttcaaaa tacagccta tgctactaca aaattcta	3600
gttataaaat aatcatagga gaagtaaacc ccggtattta attaatacct tacaaaactta	3660
cattattgat aaagtgaat gaagagtat atgggtccatt tagtattatt tacttaatat	3720
gatactagtg ttagacgtgt tactgtattt caacgtgcat aatcaggttg ttcaaaaaga	3780
gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcatgt gaggctgctc	3840
tgctgatgct gcacggcgct gcaactctct caataaattc ttttaactaa cgctccaatt	3900
ttcgaatgaa attggctgac ttcaattcta tgcttactc ttgtactcta tgtttcttta	3960
tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa	4000

<211> 4000
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 80

```

accctcattg attttggtgg ccaaactctt gatcgtattc ttttaggaac agtaattaat      60
tttaaatttg agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc      120
attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact      180
cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata      240
ggggaacata atcattattht gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa      300
aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat tttttttcgt      360
ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaatg tttgctgcat      420
ccaatcta at acaccgttaa acaataaaat ttgttatctc tcaaactctga tcatctattc      480
caacctgact gttttattct agtattttta ggccaggat aacgaaaaca aagaaaaaag      540
ttcagcgacc aagacattht gacatcaggc tcaaacgggc aaaccacga aaacttttac      600
ctcattttct aaccacgcag tgttatttga atagccttaa taggctaata caaaacaaca      660
agccatcgat tacagtttta actataatat taaaaaatct taaacaaaaa caagaaaaga      720
tatatatthc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gttagctctt      780
tcgacaaaa at cattataaat taggccattt tgtaagttag ttctttttatc gacaagccat      840
tataacttag gtaattttgt aagttagctg gactataacc aatttttttg tttcacatct      900
agagtataaa acacatatat attgaccgta caacttttagt caaattagaa actctgtttt      960
atctgcagaa aagaaaaaaa aagaggatga attatgtaaa tacttcagga ttagaaataa     1020
tgtcatcgta tatctcttga tatgaatata tatttttactt gactagtacc gtagtcggca     1080
ggaaaatgac acaacaacc atctaaaaag ataaagtaag aactaaaaag tcttgacatt     1140
cattagttta atcattttct gttaacatat atggaaaaaa caaacttcac cgttatttac     1200
ctgaatttac ctatttggtg aagaattgta cctctggacc tctagtattt tatatacacc     1260
taaaaatata attttggtcg ggaaaatata actctgttta attaattaaa ttttcagtat     1320
tgtgtaagtg taattataga aatcaatttt atccgcgtaa caaaataata taaaattata     1380
ctttcaaata cagcaatata tattgtgaag tctcatagtt tgcaaataag cattggtctt     1440
cggccgacaa aaaaaaaagc attggtcttc gaatatthtg aatatcggac caatggtata     1500
taattaataa tatgtggtat ataaatacat atttattthta atcacaaatg gatatgcaat     1560
gtgtgtatat atacatatac gtaattaaag tccgggttaa actgatagca tatattataa     1620

```

10

tagatgcatc tataattggt cgtcaacaaa agcattatca tgtatattga attaatgttc	1680
cttcattttct gtgaatcaaaa aggccctcaga agaagaaact aaagtcaaac aatcaacggg	1740
atccaataaaa tcacatctgg actatatagt atcaatactt tccacactaa aaaagctaag	1800
aaatttaata aatacattat tatagggggg aaaaaaaggt agtcatcaga tatatatattt	1860
ggtaagaaaa tatagaaatg aataatttca cgtttaacga agaggagatg acgtgtgttc	1920
cttcgaaccc gagttttgtt cgtctataaa tagcaccttc tcttctcctt cttcctcact	1980
tccatctttt tagcttcact atctctctat aatcggtttt atctttctct aagtcacaac	2040
ccaaaaaac aaagtagaga agaactctgta agttgtactc cagcttgtgc catgatgatc	2100
acattcggtta tctatttttt ggcacaagct tgagtacaac tgattggctc ttcttactac	2160
aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag aatcaattct ttttactgtc	2220
catttaagct atcttttata aacgtgtctt attttctatc tcttttgttt aaactaagaa	2280
actatagtat tttgtctaaa acaaaacatg aaagaacaga ttagatctca tcttttagtct	2340
ctttctccgg tgcagtcagc caccgtcggg taagtttcat ctgtatttta ttaattaatt	2400
acaattatta gtgttcttat taccgttttg gtaaaattag ttaattaatg tcggtccaaa	2460
cattctaaac caattattct gaaaagggtg aacgccaatc agttatatac aatattctta	2520
cattaaagta gaatcggaga tgttacatac taacccaaaag ttacatatac tagtatcatt	2580
ttctttaaga tttgtttagg atttactcac tttatagtgc tcgcggttg ggtagggta	2640
agtggggaac agatatgctc tgcatagaacc acgtggacca acatgcatat acacagttac	2700
atattttttt tctagtaggt tcatttgcaa attttccagt atcttgtagt ttatcttcatt	2760
ggtgagtttt ttggtcgcat attcttggtg attcttcttc tacgttttca ctttcttctt	2820
cagagacctt attaatatgt taattgcatg aatttatgta acattcaaga aaaagagatc	2880
gaatacaaga aaccggaaat ttaatttcta atttgaattc tatgcatggt tgtttctttg	2940
ccaatttagt acgaatatat ttatgggtccg gagttctaac caaagatagt tgctctgtat	3000
atagaagtta tacatctcgc ttgtttaaac taaataacta tttagtttgt cttggtagtc	3060
cagtgacttt ctgcaaacat tgggatttat aatatagtca aaacggtggg atatgtagta	3120
ttcatttttcg ttgtaaaaat cattatatatt tgcaaaggtt gcaacgtaaa acgttgattt	3180
gaatttagga gaaagtagcc atttacaatg aatttttagtg aaaaactggt gtatacagcc	3240
tgtgccacta agtatgtcta tatctaaatt tggaatggat gataaccagt attggtcaat	3300
aatggataat ttggtattta gaattactaa tttggtattt tagtgacaaa ctgttgtagt	3360
gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcatatggt	3420
atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggt ttaaggttta atcagtaatc	3480
gatccgacca atcatataca agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa	3540

tgctattaca aaggtttttt cttttcaaaa tacagcctaa tgctactaca aaatttcta	3600
gttataaaat aatcatagga gaagtaaacc ccggtattta attaatacct tacaaactta	3660
cattattgat aaagttgaat gaagagttat atgggtccatt tagtattatt tacttaatat	3720
gatactagtg ttagacgtgt tactgtatct caacgtgcat aatcaggttg ttcaaaaaga	3780
gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcattgt gaggtctgtc	3840
tgctgatgct gcacggcgct gcaactctct caataaattc ttttaactaa cgctccaatt	3900
ttcgatgtaa attggctgac ttcaattcta tgccttactc ttgtactcta tgtttcttta	3960
tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa	4000

<210> 81

<211> 4000

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 81

accctcattg attttggtgg ccaaactctt gatcgtattc ttttaggaac agtaattaat	60
tttaaatttg agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc	120
attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact	180
cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgtata	240
ggggaacata atcattattt gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa	300
aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat tttttttcgt	360
ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaatg tttgctgcat	420
ccaatctaata acaccgttaa acaataaaaat ttgttatctc tcaaactctga tcatctattc	480
caacctgact gttttattct agtattttaa ggccaggtat aacgaaaaca aagaaaaaag	540
ttcagcgacc aagacatttt gacatcaggc tcaaacggct aaaccacga aaacttttac	600
ctcatttctt aaccacgcag tgttatttga atagccttaa taggctaata caaaacaaca	660
agccatcgat tacagtttta actataatat tacaaaatct taaacaaaaa caagaaaaga	720
tatatattcc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gttagctctt	780
tcgacaaaat cattataaat taggccattt tgtaagttag ttctttttatc gacaagccat	840
tataacttag gtaattttgt aagttagctg gactataacc aatttttttg tttcacatct	900
agagtataaa acacatatat attgaccgta caactttagt caaattagaa actctgtttt	960
atctgcagaa aagaaaaaaa aagaggatga attatgtaaa tacttcagga ttagaaataa	1020
tgatcatcgt tatctcttga tatgaatata tattttactt gactagtacc gtagtcggca	1080

ggaaaatgac	acaaacaacc	atctaaaaag	ataaagtaag	aactaaaaag	tcttgacatt	1140
cattagttta	atcattttct	gttaacatat	atggaaaaaa	caaacttcac	cgttattttac	1200
ctgaattttac	ctatttgggt	aagaattgta	cctctggacc	tctagtattt	tatatacacc	1260
taaaaatata	attttggtcg	ggaaaatata	actctgttta	attaattaaa	ttttcagtat	1320
tgtgtaagtg	taattataga	aatcaatttt	atccgcgtaa	caaaataata	taaaattata	1380
ctttcaaadc	cacgaatata	tattgtgaag	tctcatagtt	tgcaaataag	cattgggtctt	1440
cggccgacaa	aaaaaaaaagc	attgggtcttc	gaatattttg	aatatcggac	caatgggtata	1500
taattaataa	tatgtggtat	ataaatacat	atttatttta	atcacaatag	gatatgcaat	1560
gtgtgtatat	atacatatac	gtaattaaag	tccgggttaa	actgatagca	tatattataa	1620
tagatgcac	tataattgtt	cgtcaacaaa	agcattatca	tgtattttga	attaagcttc	1680
cttcattttct	gtgaatcaaa	aggcctcaga	agaagaaact	aaagtcaaac	aatcaacggg	1740
atccaataaa	tcacatctgg	actatatagt	atcaatactt	tccacactaa	aaaagctaag	1800
aaatttaata	aatacattat	tatagggggg	aaaaaaaggt	agtcacacaga	tatatatttt	1860
ggtaagaaaa	tatagaaatg	aataatttca	cgtttaacga	agaggagatg	acgtgtgttc	1920
cttcgaaccc	gagttttgtt	cgtctataaa	tagcaccttc	tcttctcctt	cttcctcact	1980
tccatctttt	tagcttcact	atctctctat	aatcggtttt	atctttctct	aagtcacaac	2040
ccaaaaaaac	aaagtagaga	agaatctgta	tatccacaca	aactacctgc	aatgatgatc	2100
acattcgtta	tctatttttt	tgcaggtagt	gtgtgtggat	agattggctc	ttcttactac	2160
aatgaaaaag	gccgaggcaa	aacgcctaaa	atcacttgag	aatcaattct	ttttactgtc	2220
catttaagct	atcttttata	aacgtgtctt	attttctatc	tcttttgttt	aaactaagaa	2280
actatagtat	tttgtctaaa	acaaaacatg	aaagaacaga	ttagatctca	tcttttagtct	2340
ctttctccgg	tgcagtcagc	caccgtcggg	taagtttcat	ctgtatttta	ttaattaatt	2400
acaattatta	gtgttcttat	taccgttttg	gtaaaattag	ttaattaatg	tcgggtccaaa	2460
cattctaaac	caattattct	gaaaaggggtg	aacgccaatc	agttatatac	aatattctta	2520
cattaaagta	gaatcggaga	tgttacatac	taaccaaaag	ttacatatac	tagtatcatt	2580
ttctttaaga	tttgtttagg	atttactcac	tttatagtgc	tcgcggttgg	ggtcagggtta	2640
agtggggaac	agatatgctc	tgcatgaacc	acgtggacca	acatgcatat	acacagttac	2700
atttattttt	tctagtaggt	tcatttgcaa	attttccagt	atcttgtagt	ttatcttcat	2760
ggtgagtttt	ttggtcgcat	attcttggtg	attcttcttc	tacgttttca	ctttcttctt	2820
cagagacctt	attaatatgt	taattgcatg	aatttatgta	acattcaaga	aaaagagatc	2880
gaatacaaga	aaccggaaat	ttaatttcta	atttgaattc	tatgcatggt	tgtttctttg	2940
ccaatttagt	acgaatatat	ttatggtccg	gagttctaac	caaagatagt	tgctctgtat	3000

atagaagtta tacatctcgc ttgttttaaac taaataacta tttagtttgt cttggtagtc	3060
cagtgacttt ctgcaaacat tgggatttat aatatagtca aaacgttggg atatgtagta	3120
ttcatttttcg ttgtaaaaat cattatatatt tgcaaagggt gcaacgtaaa acgttgtatt	3180
gaatttagga gaaagtagcc atttacaatg aatttttagtg acaaaactggt gtatacagcc	3240
tgtgccacta agtatgtcta tatctaaatt tggaatggat gataaccagt attggtcaat	3300
aatggataat ttggtattta gaattactaa tttggtattt tagtgacaaa ctggtgtatg	3360
gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcatatggt	3420
atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggt ttaaggttta atcagtaatc	3480
gatccgacca atcatataca agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa	3540
tgctattaca aagggtttttt cttttcaaaa tacagcctaa tgctactaca aaattcta	3600
gttataaaat aatcatagga gaagtaaacc ccggtattta attaatacct tacaaaactta	3660
cattattgat aaagttgaat gaagagttat atggtccatt tagtattatt tacttaatat	3720
gatactagtg ttagacgtgt tactgtattt caacgtgcat aatcaggttg ttcaaaaaga	3780
gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcatgt gaggctgctc	3840
tgctgatgct gcacggcgct gcaactctct caataaattc ttttaactaa cgctccaatt	3900
ttcgatgtaa attggctgac ttcaattcta tgccttactc ttgtactcta tgtttcttta	3960
tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa	4000

<210> 82

<211> 4000

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 82

accctcattg attttgggtg ccaaactctt gatcgtattc ttttaggaac agtaattaat	60
tttaaatttg agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc	120
attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact	180
cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata	240
ggggaacata atcattattt gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa	300
aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat tttttttcgt	360
ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaagtg tttgctgcat	420
ccaatctaata acaccgttaa acaataaaaat ttgttatctc tcaaactctga tcatctattc	480
caacctgact gttttattct agtattttta ggccaggtat aacgaaaaca aagaaaaaag	540

ttcagcgacc	aagacatthtt	gacatcaggc	tcaaacggtc	aaaccacga	aaacttttac	600
ctcattttctt	aaccacgcag	tggtatttga	atagccttaa	taggctaata	caaaacaaca	660
agccatcgat	tacagtttta	actataatat	tacaaaatct	taaaccaaaa	caagaaaaga	720
tatatattcc	gtaaaattaa	aataatattt	ttaatatagt	cattatgtaa	gtagctctt	780
tcgacaaaat	cattataaat	taggccattt	tgtaagttag	ttctttttatc	gacaagccat	840
tataacttag	gtaattttgt	aagttagctg	gactataacc	aatttttttg	tttcacatct	900
agagtataaa	acacatatat	attgaccgta	caactttagt	caaattagaa	actctgtttt	960
atctgcagaa	aagaaaaaaa	aagaggatga	attatgtaaa	tacttcagga	ttagaaataa	1020
tgatcatcgt	tatctcttga	tatgaatata	tattttactt	gactagtacc	gtagtcggca	1080
ggaaaatgac	acaaacaacc	atctaaaaag	ataaagtaag	aactaaaaag	tcttgacatt	1140
cattagttta	atcattttct	gttaacatat	atggaaaaaa	caaacttcac	cgttatthac	1200
ctgaattttac	ctatttggtt	aagaattgta	cctctggacc	tctagtattt	tatatacacc	1260
taaaaatata	attttggctg	ggaaaatata	actctgttta	attaattaaa	ttttcagtat	1320
tgtgtaagt	taattataga	aatcaatttt	atccgcgtaa	caaaataata	taaaattata	1380
ctttcaaata	cacgaatata	tattgtgaag	tctcatagtt	tgcaaataag	cattggtctt	1440
cggccgacaa	aaaaaaaagc	attggtcttc	gaatatthtg	aatatcggac	caatggtata	1500
taattaataa	tatgtggtat	ataaatacat	atthatttaa	atcacaaatag	gatatgcaat	1560
gtgtgtatat	atacatatac	gtaattaaag	tccgggttaa	actgatagca	tattattata	1620
tagatgcatc	tataattgtt	cgtcaacaaa	agcattatca	tgtattttga	attaagcttc	1680
cttcattttct	gtgaatcaaa	aggcctcaga	agaagaaact	aaagtcaaac	aatcaacggg	1740
atccaataaa	tcacatctgg	actatatagt	atcaataactt	tccacactaa	aaaagctaag	1800
aaatttaata	aatacattat	tatagggggg	aaaaaaagg	agtcacacaga	tatatatttt	1860
ggtaagaaaa	tatagaaatg	aataattttca	cgttttaacga	agaggagatg	acgtgtgttc	1920
cttcgaaccc	gagttttgtt	cgtctataaa	tagcaccttc	tcttctcctt	cttcctcact	1980
tccatctttt	tagcttcact	atctctctat	aatcggtttt	atctttctct	aagtcacaac	2040
ccaaaaaaac	aaagtagaga	agaatctgta	tgacaatcca	gccaatccag	catgatgatc	2100
acattcgtta	tctatttttt	gctggattgg	atggattgtc	agattggctc	ttcttactac	2160
aatgaaaaag	gccgaggcaa	aacgcctaaa	atcacttgag	aatcaattct	ttttactgtc	2220
catttaagct	atcttttata	aacgtgtctt	atthttctatc	tcttttgtht	aaactaagaa	2280
actatagtat	tttgtctaaa	acaaaacatg	aaagaacaga	ttagatctca	tcttttagtct	2340
ctttctccgg	tgcatgcagc	caccgtccgg	taagtttcat	ctgtattttta	ttaattaatt	2400
acaattatta	gtgttcttat	taccgttttg	gtaaaattag	ttaattaatg	tcggtccaaa	2460

cattctaaac caattattct gaaaaggggtg aacgccaatc agttatatac aatattctta	2520
cattaaagta gaatcggaga tgttacatac taacccaaaag ttacatatac tagtatcatt	2580
ttctttaaga tttgttttagg atttactcac tttatagtgc tcgcggttgg ggtcagggtta	2640
agtggggaac agatatgctc tgcatgaacc acgtggacca acatgcatat acacagttac	2700
atttattttt tctagtaggt tcatttgcaa attttccagt atcttgtatg ttatcttcat	2760
ggtgagtttt ttgggtcgcat attcttggtg attcttcttc tacgttttca ctttcttctt	2820
cagagacctt attaatatgt taattgcatg aatttatgta acattcaaga aaaagagatc	2880
gaatacaaga aaccggaaat ttaatttcta atttgaattc tatgcatggt tgtttctttg	2940
ccaatttagt acgaatatat ttatgggtccg gagttctaac caaagatagt tgctctgtat	3000
atagaagtta tacatctcgc ttgtttaaac taaataacta tttagtttgt cttggtagtc	3060
cagtgacttt ctgcaaacat tgggatttat aatatagtca aaacgttggg atatgtagta	3120
ttcatttttcg ttgtaaaaat cattatatatt tgcaaagggt gcaacgtaaa acgttgtatt	3180
gaatttagga gaaagtagcc atttacaatg aatttttagtg acaaactggt gtatacagcc	3240
tgtgccacta agtatgtcta tatctaaatt tggaatggat gataaccagt attggtcaat	3300
aatggataat ttggtattta gaattactaa tttggatttt tagtgacaaa ctgttgtatg	3360
gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcatatggt	3420
atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggt ttaaggttta atcagtaatc	3480
gatccgacca atcatataca agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa	3540
tgctattaca aagggtttttt cttttcaaaa tacagcctaa tgctactaca aaattcta	3600
gttataaaat aatcatagga gaagtaaacc ccggtattta attaatacct tacaaaactta	3660
cattattgat aaagttgaat gaagagttat atgggtccatt tagtattatt tacttaatat	3720
gatactagtg ttagacgtgt tactgtattt caacgtgcat aatcagggtg ttcaaaaaga	3780
gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcattg gaggtgctc	3840
tgctgatgct gcacggcgct gcaactctct caataaattc ttttaactaa cgctccaatt	3900
ttcgatgtaa attggctgac ttcaattcta tgccttactc ttgtactcta tgtttcttta	3960
tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa	4000

<210> 83

<211> 4000

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 83

accctcattg attttgggtgg ccaaactctt gatcgtattc ttttaggaac agtaattaat	60
tttaaatttg agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc	120
attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact	180
cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata	240
ggggaacata atcattatctt gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa	300
aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat tttttttcgt	360
ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaagc tttgctgcat	420
ccaatctaata acaccgttaa acaataaaaat ttgttatctc tcaaactctga tcatctattc	480
caacctgact gttttattct agtattttta ggccagggtat aacgaaaaca aagaaaaaag	540
ttcagcgacc aagacatttt gacatcaggc tcaaacggtc aaaccacga aaacttttac	600
ctcatttctt aaccacgcag tgttatttga atagccttaa taggctaata caaaacaaca	660
agccatcgat tacagtttta actataatat taaaaaatct taaacaaaa caagaaaaga	720
tatatattcc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gttagctctt	780
tcgacaaaat cattataaat taggccattt tgtaagttag ttctttttatc gacaagccat	840
tataacttag gtaattttgt aagttagctg gactataaacc aatttttttg tttcacatct	900
agagtataaa acacatatat attgaccgta caactttagt caaattagaa actctgtttt	960
atctgcagaa aagaaaaaaa aagaggatga attatgtaa tacttcagga ttagaaaata	1020
tgtcatcgta tatctcttga tatgaatata tattttactt gactagtacc gtagtcggca	1080
ggaaaatgac acaacaacc atctaaaaag ataaagtaag aactaaaaag tcttgacatt	1140
cattagttta atcattttct gttaacatat atggaaaaaa caaacttcac cgttatttac	1200
ctgaatttac ctatttgggt aagaattgta cctctggacc tctagtattt tatatacacc	1260
taaaaatata attttgggtc ggaaaatata actctgttta attaatataa ttttcagtat	1320
tgtgtaagt taattataga aatcaatttt atccgcgtaa caaataata taaaattata	1380
ctttcaaact cacgaatata tattgtgaag tctcatagtt tgcaaataag cattggtctt	1440
cggccgacaa aaaaaaagc attggtcttc gaatattttg aatatcggac caatggtata	1500
taattaataa tatgtggtat ataaatacat atttatttta atcacaatag gatatgcaat	1560
gtgtgtatat atacatatac gtaattaaag tccgggttaa actgatagca tatattataa	1620
tagatgcata tataattggt cgtcaacaaa agcattatca tgtattttga attaagcttc	1680
cttcatttct gtgaatcaaa aggcctcaga agaagaaact aaagtcaaac aatcaacggg	1740
atccaataaa tcacatctgg actatatagt atcaatactt tccacactaa aaaagctaag	1800
aaatttaata aatacattat tatagggggg aaaaaaagggt agtcatcaga tatatatattt	1860
ggtaagaaaa tatagaaatg aataatttca cgtttaacga agaggagatg acgtgtgttc	1920

cttcgaaccc gagttttgtt cgtctataaa tagcaccttc tcttctcctt cttcctcact	1980
tccatccttt tagcttcact atctctctat aatcggtttt atctttctct aagtcacaac	2040
ccaaaaaac aaagtagaga agaatctgta taaagatcgg caacacatga tatgatgatc	2100
acattcgtta tctatttttt atcatgtgtt accgatcttt acattggctc ttcttactac	2160
aatgaaaaag gccgaggcaa aacgcctaaa atcacttgag aatcaattct ttttactgtc	2220
catttaagct atcttttata aacgtgtctt attttctatc tcttttggtt aaactaagaa	2280
actatagtat tttgtctaaa acaaaacatg aaagaacaga ttagatctca tctttagtct	2340
ctttctccgg tgcagtcagc caccgtcggg taagtttcat ctgtatttta ttaattaatt	2400
acaattatta gtgttcttat taccgttttg gtaaaattag ttaattaatg tcggtccaaa	2460
cattctaaac caattattct gaaaagggtg aacgccaatc agttatatac aatattctta	2520
cattaaagta gaatcggaga tgttacatac taacccaaaag ttacatatac tagtatcatt	2580
ttctttaaga tttgtttagg atttactcac tttatagtgc tcgcggttg ggtcagggtta	2640
agtggggaac agatatgctc tgcatagaacc acgtggacca acatgcatat acacagttac	2700
atttattttt tctagtaggt tcatttgcaa attttccagt atcttgtatg ttatcttcat	2760
ggtgagtttt ttggtcgc atctcttggtg attcttcttc tacgttttca ctttcttctt	2820
cagagacctt attaatatgt taattgcatg aatttatgta acattcaaga aaaagagatc	2880
gaatacaaga aaccggaaat ttaatttcta atttgaattc tatgcatgtt tgtttctttg	2940
ccaatttagt acgaatatat ttatggtccg gagttctaac caaagatagt tgctctgtat	3000
atagaagtta tacatctcgc ttgttttaaac taaataacta tttagtttgt cttggtagtc	3060
cagtgacttt ctgcaaacat tgggatttat aatatagtca aaacgttggg atatgtagta	3120
ttcattttcg ttgtaaaaaat cattatatat tgcaaagggt gcaacgtaaa acgttgtatt	3180
gaatttagga gaaagtagcc atttacaatg aatttttagtg acaaactgtt gtatacagcc	3240
tgtgccacta agtatgtcta tatctaaatt tggaatggat gataaccagt attggtcaat	3300
aatggataat ttggtattta gaattactaa tttggtattt tagtgacaaa ctggtgtatg	3360
gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcatatgtt	3420
atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggt ttaaggttta atcagtaatc	3480
gatccgacca atcatataca agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa	3540
tgctattaca aagggtttttt cttttcaaaa tacagcctaa tgctactaca aaattctaata	3600
gttataaaat aatcatagga gaagtaaacc ccggtattta attaatacct tacaaaactta	3660
cattattgat aaagttgaat gaagagttat atgggtccatt tagtattatt tacttaatat	3720
gatactagtg ttagacgtgt tactgtattt caacgtgcat aatcaggttg ttcaaaaaga	3780

ES 2 915 576 T3

```

gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcatgt gaggctgctc 3840
tgctgatgct gcacggcgct gcaactctct caataaattc ttttaactaa cgctccaatt 3900
ttcgatgtaa attggctgac ttcaattcta tgccttactc ttgtactcta tgtttcttta 3960
tctattaataa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa 4000

```

<210> 84

<211> 4000

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 84

accctcattg attttggtgg ccaaactctt gatcgtattc ttttaggaac agtaattaat	60
tttaaatttg agaaaaatgt agtgatgaaa gtgagatata tgggacgcac tattgaaagc	120
attgtccaca ccgcatgatg tgagattgat gtgaatatgg taactaataa caccagact	180
cacttttatg agaaaatgta tcttaaaaaa tgttattcat caaagcttag atgcgctata	240
ggggaacata atcattatctt gaaaagaacc aattcaaata tttttttttt taagagttaa	300
aatcctatat aacataacca tccaaacttt gggcatgaac acaacaatat tttttttcgt	360
ttttgataaa ttctttcaat tgcaatcaaa acttaccagc tatacaaagt tttgctgcat	420
ccaatctaata acaccgttaa acaataaaat ttgttatctc tcaaactctga tcatctattc	480
caacctgact gttttattct agtattttaa ggccagggtat aacgaaaaca aagaaaaaag	540
ttcagcgacc aagacatttt gacatcaggc tcaaacgggc aaaccacga aaacttttac	600
ctcatttctt aaccacgcag tgttatttga atagccttaa taggctaata caaaacaaca	660
agccatcgat tacagtttta actataatat taaaaaatct taaacaaaaa caagaaaaga	720
tatatattcc gtaaaattaa aataatattt ttaatatagt cattatgtaa gttagctctt	780
tgcacaaaat cattataaat taggccattt tgtaagttag ttcttttatc gacaagccat	840
tataacttag gtaattttgt aagttagctg gactataacc aatttttttg tttcacatct	900
agagtataaa acacatatat attgaccgta caactttagt caaattagaa actctgtttt	960
atctgcagaa aagaaaaaaa aagaggatga attatgtaaa tacttcagga ttagaaataa	1020
tgtcatcgta tatctcttga tatgaataca tattttactt gactagtacc gtagtcggca	1080
ggaaaatgac acaacaacc atctaaaaag ataaagtaag aactaaaaag tcttgacatt	1140
cattagttta atcattttct gttaacatat atggaaaaaa caaacttcac cgttattttac	1200
ctgaattttac ctatttgggt aagaattgta cctctggacc tctagtattt tatatacacc	1260
taaaaatata attttggtcg ggaaaatata actctgttta attaattaaa ttttcagtat	1320
tgtgtaagtg taattataga aatcaatttt atccgcgtaa caaataata taaaattata	1380

ctttcaaatac	cacgaatata	tattgtgaag	tctcatagtt	tgcaaataag	cattgggtctt	1440
cggccgacaa	aaaaaaaaagc	attgggtcttc	gaatatttttg	aatatcggac	caatgggtata	1500
taattaataa	tatgtggtat	ataaatacat	atttatttaa	atcacaatag	gatatgcaat	1560
gtgtgtatat	atacatatac	gtaattaaag	tccgggttaa	actgatagca	tatattataa	1620
tagatgcatc	tataattggt	cgtcaacaaa	agcattatca	tgtattttga	attaagcttc	1680
cttcattttct	gtgaatcaaa	aggcctcaga	agaagaaact	aaagtcaaac	aatcaacggg	1740
atccaataaa	tcacatctgg	actatatagt	atcaatactt	tccacactaa	aaaagctaag	1800
aaatttaata	aatacattat	tatagggggg	aaaaaaaggt	agtcatcaga	tatatatttt	1860
ggtaagaaaa	tatagaaatg	aataatttca	cgtttaacga	agaggagatg	acgtgtgttc	1920
cttcgaaccc	gagttttggt	cgtctataaa	tagcaccttc	tcttctcctt	cttcctcact	1980
tccatctttt	tagcttcact	atctctctat	aatcggtttt	atctttctct	aagtcacaac	2040
ccaaaaaaac	aaagtagaga	agaatctgta	tgacctttct	tgggttttagc	catgatgac	2100
acattcggtta	tctatttttt	ggctaaaccc	cagaaaggtc	acattgggtc	ttcttactac	2160
aatgaaaaag	gccgaggcaa	aacgcctaaa	atcacttgag	aatcaattct	ttttactgtc	2220
catttaagct	atcttttata	aacgtgtctt	atcttctatc	tcttttggtt	aaactaagaa	2280
actatagtat	tttgtctaaa	acaaaacatg	aaagaacaga	ttagatctca	tcttttagtct	2340
ctttctccgg	tgcagtcagc	caccgtcggg	taagtttcat	ctgtatttta	ttaattaatt	2400
acaattatta	gtgttcttat	taccgttttg	gtaaaattag	ttaattaatg	tcgggtccaaa	2460
cattctaaac	caattattct	gaaaagggtg	aacgccaatc	agttatatac	aatattctta	2520
cattaaagta	gaatcggaga	tgttacatac	taaccaaag	ttacatatac	tagtatcatt	2580
ttctttaaga	tttgtttagg	atttactcac	tttatagtgc	tcgcggttgg	ggtcagggtta	2640
agtggggaac	agatatgctc	tgcatgaacc	acgtggacca	acatgcatat	acacagttac	2700
atctattttt	tctagtaggt	tcatttgcaa	atcttccagt	atcttgtagt	ttatcttcat	2760
ggtgagtttt	ttgggtcgc	attcttggtg	attcttcttc	tacgttttca	ctttcttctt	2820
cagagacctt	attaatatgt	taattgcatg	aatttatgta	acattcaaga	aaaagagatc	2880
gaatacaaga	aaccggaaat	ttaatttcta	atctgaattc	tatgcatggt	tgtttctttg	2940
ccaatttagt	acgaatatat	ttatgggtccg	gagttctaac	caaagatagt	tgctctgtat	3000
atagaagtta	tacatctcgc	ttgtttaaac	ttaaataacta	tttagtttgt	cttggttagtc	3060
cagtgacttt	ctgcaaacat	tgggatttat	aatatagtca	aaacgttggg	atatgtagta	3120
ttcatttttcg	ttgtaaaaat	catttatattt	tgcaaaggtt	gcaacgtaaa	acgttggtatt	3180
gaatttagga	gaaagtagcc	atctacaatg	aatttttagtg	acaaactggt	gtatacagcc	3240

tgtgccacta agtatgtcta tatctaaatt tggaatggat gataaccagt attggtcaat	3300
aatggataat ttggtattta gaattactaa tttggtattt tagtgacaaa ctggtgtatg	3360
gaatttagga gaacgcgttc ccaagctata tattatatgt atttcattct ttcatatgtt	3420
atattatgaa ttgttataaa aaagaccaat gagcaacggg ttaagggtta atcagtaatc	3480
gatccgacca atcatatata agttcctaac acatcttcta actactgagt aaaatagtaa	3540
tgctattaca aagggttttt cttttcaaaa tacagcctaa tgctactaca aaattcta	3600
gttataaaat aatcatagga gaagtaaacc ccggtattta attaatacct taaaaactta	3660
cattattgat aaagttgaat gaagagttat atgggtccatt tagtattatt tacttaatat	3720
gatactagtg ttagacgtgt tactgtattt caacgtgcat aatcagggtg ttcaaaaaga	3780
gagaggatag gtcttcttct tctgtaattt gctgggaccg caagtcattg gaggctgctc	3840
tgctgatgct gcacggcgct gcaactctct caataaattc ttttaactaa cgctccaatt	3900
ttcgatgtaa attggctgac ttcaattcta tgccttactc ttgtactcta tgtttcttta	3960
tctattaaaa tccaactctg cttttgaacc caaaaaacaa	4000

5 <210> 85
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 85
 acaccctggg aattggtt 19

15 <210> 86
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 86
 gtatgcgcca ataagaccac 20

25 <210> 87
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 87
 gtactgctgg tccttgcag 20

35 <210> 88
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
5	<400> 88 aggagcacta cggaaggatg	20
10	<210> 89 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
20	<400> 89 gttgagagtg ttggagaagg ag	22
25	<210> 90 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
35	<400> 90 ctcgggtgtg atcctgagaa g	21
40	<210> 91 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 91 agcttccttc atttctgtga atc	23
55	<210> 92 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
65	<400> 92 ctgttcccca cttaccctga c	21
	<210> 93 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 93 ctcctcatct gattccttct c	21
	<210> 94 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
5	<400> 94 ctgttcccca cttaccctga c	21
10	<210> 95 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
15	<400> 95 gtgtgtggaa agtttatcaa cac	23
20	<210> 96 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
25	<400> 96 gttagtatgt aacatctccg attctac	27
30	<210> 97 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 97 agagtgtcg tgtgagttgc	20
40	<210> 98 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 98 ccagtcaaga ttcatggat ctgtt	25
55	<210> 99 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
60	<400> 99 ctaacataat cgagaacaga tggaagac	28
65	<210> 100 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
5	<400> 100 ttctcatgtc cttgatttat caatttaaca ac	32
10	<210> 101 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 101 agagtgtgtcg tgtgagttgc	20
20	<210> 102 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 102 cgcatcagat ctatcaaaca cataga	26
30	<210> 103 <211> 277 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 103	
	gcuacucugg ugaaccaucg uuggccaugc uugccuuauu cucccauggc aaucuuacua	60
	cggccguagg aaacuucucc ggacaagcga auaggcuuca cagacucuaac gaaaaccccu	120
	aaaacaaaca cuaacaaagg gacugaagag ccuaccacca cccaaugcgu cgauuacuga	180
	cgcacguacg uggucagcga aggcgcugag cucgugguau uggcagcggg gaacagaaua	240
	aucaaacaag ccaacggugg uaucauccag aacaucu	277
40	<210> 104 <211> 110 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 104 cgcaaagaaa gaggaggagg augaugagua aacaaaugca cucugcaugu ucgaugcaca	60
	ugcaucucuu gcuugcucu ugauccaucu uucuugcucc ggcaccgagu	110
	<210> 105	

	<211> 277	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 105	
	gaaucuguuc ucaucuuuuc cuuaggggug uuuaccuguu cugccacguu aucucuucuu	60
	uccuugauuc cgacggaacc aaauaaugu ggccaggaca gacagacaac gaaaacccaa	120
	aaaacaaaca cgaacaaugu uagucaauuc uggcguccaa cauaacgc au gcaacacgua	180
	ugcgcgagcg uugggagugg aagcauucgc cggaaggaaa cagcaaaggu gaagagaaua	240
10	gagagugcgu ugaggaggag gaugaugagu aaugacg	277
	<210> 106	
	<211> 277	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
20	<400> 106	
	gaccagguua ugaccccgug gguucaagac augccacuag cagccgagcu aagccugccg	60
	ucacuaaaca accuuugucu agagaauacg cuaugcuaca aaauagcgac gaaaacccua	120
	caaacaauuc ccaacaacgc ucguuaauag uauacugccg cgaauugcgc uaaacacuag	180
	cgcaugcaag cggcgagcuu acgagcuccg augacgguaa cgccaagguc gaagugcugg	240
	uucauauugg gauucguggg guucacuaau ccgcccu	277
25	<210> 107	
	<211> 277	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 107	
	ggcccaggua cgauggaguc cauucaggac uugcuagcaa cgcacgcgag gggcgauugg	60
	ugugucauug aggcuuagcg acagauaaua uauaacauaa gacguccuac gaaaaaccua	120
	caaacaauca cuaacaaagg aagucaagug uuaucacacu caucuaagcu cuagaacaga	180
	agcucccacg agguagugug aggcuuucgc aaauugaua gguaacuggc gaucguugc	240
	uccaaaucag gauggauucu auucgauauu uagagaa	277
35	<210> 108	
	<211> 110	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
5	<400> 108	
	cgcaaagaaa cucaaagaaa auuuucgaua aacaaaugca cuucgcauga acgaugcguu	60
	ugcaucccuu gcuuguugaa guauuuau cuuagggcucc ggcaccgauu	110
10	<210> 109	
	<211> 208	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 109	
	uuggugggag ggcuaaggcug gcgguacguu auucugaaaa aaauuuacgg acgugaugca	60
	agcacauaug gauguugcau gacacggccg gugcauguga acaaaaacaa aaccaaggca	120
	aaagagcgag agagagagca ugcauugcaa aucugucgug uuuuuuuuug gguggcagcc	180
20	accuggaug cggcauccuu cagaccga	208
	<210> 110	
	<211> 277	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
30	<400> 110	
	gcuacggguu uggcccuacg gguacgagac gagcugaugu cacccgagu acuccuacau	60
	acgcuguauc caacggaucc agagacaaua ggggucaaga uuacgagaua gaaaacccag	120
	cacacaauau ugaacauuuu uuuaagaguug auccacacca caucgugcag uuaacacaau	180
	ugcaagcacg uggugagcgc agacguucga cuguauguaa agacaaaguc gaaaugaugu	240
	uucucaucgg uauucguggg guucacuaau ccuaucc	277
35	<210> 111	
	<211> 277	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 111	

	gcaucuuugc guccgucuuu cgugcucgac uugccgguac ccgccaugac aaaccuccga	60
	gcuaugugua gugccuaccc auauaacacc caucucuaaa cguaauucuaa gaaaaaccac	120
	aaaacaauug cgaacaaggg aggcgacuag agauccaccu caucgagcuu ugacuacuaa	180
	agcugcuacg gggucgggua agggcccag gaguuuggaa aguaaguggu gaaggggugc	240
	uacagauuug uauggaagau gagacugcaa aaguacc	277
5	<210> 112 <211> 105 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 112	
	gaagagaaga aucuguaaag uuuagaaagg auaaacaaac cacgaucaca cacaucgaua	60
	uacuuuuguu uguccauucu gagcuucacu ggcucuucuu acuuc	105
15	<210> 113 <211> 208 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 113	
	ucggucgggu aguuacgcug gcaucgauug auggauagua auauaaaagu cagucuugcg	60
	agcacagaug gauguaucuu cacaccaccu guggaugacu aaaaaagaa aaccaaggca	120
	aaagagcgag agagagagcc cgcagggcaa cgguuucguu guuacuauac cguugcagcc	180
25	accguaaaac cuccucugc cgaaccga	208
30	<210> 114 <211> 277 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
35	<400> 114	
	gagucggguu uggcccugug aaucagguc augcgucccu cugccuagug aagccacccc	60
	ucgcugggga ugucguccac agagaacaga acggucugca gacgcacuac gaaaaccauu	120
	gaaacuagcc caaacaaga gggucaccag auugccagcu cgcggugcuc acagaacgug	180
	agcaggaaaag gguugaggcc auggucucgu ccgaggggua agccacagug gaaaagaggg	240
	aacauaaugg gauucguggg guucacuaau ccuugca	277
	<210> 115	

	<211> 341		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 115		
	aacgagaugc caacuucuca agauugcaaa agcaaccagc uaguacguug guacacacca	60	
	augggauaac cggucagcaa uuagauccug uuaccaucaa caggauccga gggcucaucc	120	
	ccgaugagga aucggauccg ccaucagauc ucgagcaaga accaagaggu cugccggauu	180	
	aucuccuuag aauccaaaca cgaccagggg uggacccguu ccuuccucgc ccccaaaaag	240	
	uaagggcgga ggaaugaguu ccugguuguu ucaggagag agaucagcauc aucggcguug	300	
10	auugguaccg gcuuugcagc uggagggguu ggcaacucgc c	341	
	<210> 116		
	<211> 103		
	<212> ADN		
15	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
20	<400> 116		
	agagagagcu acaggccggc gcuggagagc auacgcaggu aaauuuauua gaaaauaacu	60	
	uugcaggugc gugcucucua agcgucggcc ugcgccaucu ugg	103	
	<210> 117		
25	<211> 341		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 117		
	ugggggaggg uccaggcauc agggaugaaa agcaagcagc uaccugguug agacaguucg	60	
	acaauacuac ccuaaagcag ugugauugaa uuacugagaa uuugaucuu ggacucguug	120	
	caagcgagca aaaguuggg auguaacuuc gcgaggaagc aggaagcgga gucauggguu	180	
	aucgccagau aaaccaagca cuucgucagc cccaggguga ccuauguggc ccccgaaaau	240	
	uaagggccua ggucacguug ugacggagu uacugguggg uuugaugagc ucaguauguc	300	
	aagggaacca ugguucguga uagugucugg accuaccccg u	341	
35	<210> 118		
	<211> 341		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		

	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 118	
	agagugauuu auucgugggg uucacuaaau cguaagcaac gcugaugcca ucauaggau	60
	guaaugaagc cggauagaua caaguugcua uuuccaaua uagcaaccu ggaggcugcg	120
	cagcagcuca aaugguucgg ggucagauca ucgggcaaug acgaagaua ucauaggggu	180
	agcgcgugag aagccaacca cgcucugcga ucgagccuua acucgagcgc ccacaaaaag	240
	gaagggugga guuaagccuu guagagcguu uccgcgcgug guaguacagc cgcgcaguau	300
5	uacgacuccu gugguuagua aguccgcgag uaagacacug g	341
	<210> 119	
	<211> 239	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
15	<400> 119	
	gcggaggguca aguucuccuc auuauaaaaca ugaagguguc ucucguccua acacacagcg	60
	aucaacaaaa aguaacuaac ccacacauau gguagaaacc aaaaccuuaa cguggauacc	120
	cuuauucugc guauaaguuu gacaaaauuc gggggaagga accauguuug uauugggcgg	180
	agcaagcgcg uggcuccuag agcacgucgg ccacaaagca cguuggggac caagaacgg	239
20	<210> 120	
	<211> 94	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 120	
	gggaagucuu ggauugugga gaauuuaaaa agaaauaacu uucgucacga acgaaagcaa	60
	uuauuuuuua acaccaccac agccuaagau uuuc	94
30	<210> 121	
	<211> 225	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 121	

	caacagaaga gacacccccg aggagagaac cugcucaucu uuaauguuuu uuuuugaaaac	60
	cugaccagcg ccgcuccugc cugcaacaac cauccaucag aacaaaaagu ucguauaggcg	120
	aaaggccaau gauggugggc aggucucuccc uuggggaagu cuagcgucuaa cgagcugggg	180
	ucugaugguu ucacaauugc uaaaacuugu gcuucaggug acaaa	225
5	<210> 122 <211> 239 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 122	
	ggggagagca uggauucgug guuccugugg auagccccgc acauaaucgc acuucguccc	60
	auaaacaaaa acaaaagaaa ccacacaacc uguagaaacc aaaacaggug gcaccgauca	120
	cgacccggug ccgccgcuca gacaugaguu auguguacac agauucgugg gguucacuaa	180
	uccuaaccac ccagcucgua gcgggucggg cguaucacuu gggauccggcu caagauccg	239
15	<210> 123 <211> 341 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 123	
	accgugagau uuuuaggug agcgagggua gucaaacaga cgauggucag uaauuuuuu	60
	ggcgcuacgc ccuuuaugua ccauggugcg ggccgggawu cguaucaccu ggaaucauuu	120
	cgaauauga aaggggaggg auuagaacgu acgaccaacu agcaagugug uugagggau	180
	aucuccuuua gcuccaaauca cuagcacagg auguccuugc ucuaauucugc ccccaaaaau	240
	aaagggcaua ggguaaagac uguguuagug cuagggagac auucuaaagc gcugcauagg	300
25	aaucgguccu ucuacccucu ugaucucaaa gaucacacgu a	341
30	<210> 124 <211> 96 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
35	<400> 124	
	gacaacuggu uauuggugcg gggcguaaag aaaacggugc ucaauacuuu uugagcuccg	60
	cuuucugaac guucuguaau gaaacgagu gccacg	96
	<210> 125	

<211> 341
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 125

cgugggagau	aaaauuauuu	uugauacacu	agagagcauc	uacaguuaaa	auaaagauuu	60
ugaguagcac	cccacagguu	ucaguacuuu	uggcuaaaau	aaaguaccag	guuuucuuuc	120
cuaaagaaua	auuggugggg	gacuaagauc	ucgcgcgaau	augaagaggu	cugugggau	180
agcucccucg	aagccaauca	cgcuaaagg	cccaacuaga	ucgucucggc	ccccuaaaac	240
gaaggguuac	gguuuacuug	cuugagcguu	ucagggggug	augcguuacc	aacggagacg	300
uauggguccc	gcaguguggg	auggugguuu	uauuacccaa	g		341

10

<210> 126
 <211> 341
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Oligonucleótido monocatenario

20 <400> 126

gcugggagg	guuaguggag	uuacacggau	gggaaccacc	cuaccuugau	auaaacauau	60
uaaccuaga	cagagaggga	gaaggucucu	ggucaugcuc	agagacccaa	ggggucuaau	120
cuauagacga	auugcuuugu	agguguuggc	ucgcgaaacu	aaaaagaguu	gagucgggaa	180
aucgccagau	ugaccaaucu	cacacauugg	gguaacggga	ccauccucgc	ccacaaaaag	240
gaagggcggg	gguccuauua	gguguguggc	gacuggcgag	gguucgcagc	uacgcagugg	300
aucguucccg	acauucgugg	gguucacuaa	uccuaccac	a		341

25 <210> 127
 <211> 193
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 127

ggguucuucc	agaagggcgg	acaaccaacg	gcgaccgccc	ccuagggacc	ccaggcggac	60
guuaaguuag	gauuucccau	uuacauucgg	augggaugug	ggcgagccgc	cgucacgaaa	120
acggcggcag	cgccaagagc	gcuggacguu	cgcagaagac	agaaccuggu	ugcucgcucu	180
ucuggaagaa	ccu					193

35

<210> 128

	<211> 193		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 128		
	ggguuuuuuc agaagggugg acauccaucg cccaucuccg cuugugcccc ccaggagaag	60	
	gguacgccag gauuucggau agagugaccu auucgaggag uuuccgccgc ugccucgaaa	120	
	gcagcggcug cuccaacuga gcagaagaag cucuuaaaac agaaccugga ugcucgcucu	180	
10	ucuggaagaa ccu	193	
	<210> 129		
	<211> 193		
	<212> ADN		
15	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
20	<400> 129		
	ggguucuuuc aggaggguga acaucccacg ccgaccucuc auuauugccc ccaggaggau	60	
	gguaacaacug gucgucuauu ugaagugcua aguggaggug ccccggcugc ugacccgaaa	120	
	ucagcagcag cuccaaaaga gcuggggggg cgugaaaucc agaaccggga ugcucgcucu	180	
	ucuggaagaa ccu	193	
	<210> 130		
25	<211> 193		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 130		
	gcggugguau ugcuuuuca ucagccugcg cccaucacac cagggggcag acaugugaag	60	
	ggcaauacag gacuacuagc uaaaagacgg gcugguuggg uagcagcugc aggcgcgaaa	120	
35	ucugcagccg ccccaaaagg gcgggggcug cccacaaggc agaacaaggc uguuggaggg	180	
	gaaugccau ugc	193	
	<210> 131		
40	<211> 216		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 131		

	gggaaucaga cauggcgaga uuucaucggg aucuggggcg agggcgaggg cgugacagug	60
	gggagcgag ucgauacaug caccaggcac acccaguauc gccuuggaaa gcaaggcgca	120
	cuggguccgc cggauzcaug ugacgagugc aacgcgcccg cugcaagcau cgcgacucgu	180
	uccagauucc gaugauucuc cgucgcacug augccc	216
5	<210> 132 <211> 89 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 132	
	caugcuaucg gugcuucgua cgguaauugc agagagcaca ucgaacaccg auggccuccg	60
	uggaugucgu auguggugcc guuaguaug	89
15	<210> 133 <211> 142 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 133	
25	gcggccugaa acaccguuug auuggugugc uggggucaac guguccaag ccagaagacg	60
	ucagcaaggg aagaacaggu guuccugggc gaugaacgcg uuggugcuuc uacaucaacc	120
	gaagguaaac uuucacgcaa cg	142
30	<210> 134 <211> 186 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 134	
	guggcgugac cugagcaagu auucgugggg uucacuaauc cugaccgacc cuugcgagc	60
	ccaggcgucc augauuggua agucacccca caaagugcaa gaccagaag gacagccagg	120
	uugccuaaac cagcagaggg ucggcgagcg uuggugagga ccgccgaugc augaccacca	180
40	cgccac	186
45	<210> 135 <211> 216 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
5	<400> 135		
	uggauacacg cgugggaaga ucuggucuuc uugaccgguc uugguuaggu caugacgggg	60	
	guccgcgcag uccacucagg cgcucggcac ccccgcuacc uucacggaaa gugugaagcg	120	
	gcggggcagc cagucgccug agaggagugc aacgcagccc ccgcaagaau aacagaggac	180	
	uggucaagaa gacuaucug uuucggagug uagcca	216	
10	<210> 136		
	<211> 83		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 136		
	uacguauauu guguaguuaa uuucacucagg uguguguggg guuacggugc accuccaaua	60	
	gugaagacua ucagcaucac gua	83	
20	<210> 137		
	<211> 140		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 137		
30	cccggaguuu gugggcaagu cgcucguac gacuucaagg aacagccucc gaaaacagga	60	
	guacauguga gauagaauaa uuccugggcc ggcucccugu ugucuuguug ugcgaacaag	120	
	acaugccggg agcucccggg	140	
35	<210> 138		
	<211> 186		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 138		
	aaggugggag uggagagaga auucgugggg uucacuauc cucacuagcu cuggcccuag	60	
	aggugacacc cggauaugga aagcuccaca cggugagaca gccguaacgg gugcucaacu	120	
	ugggcagagc cagccgggag cuagccagag uugguggaag ccgccaguuc acuagcugcc	180	
	caccuu	186	

5	<210> 139		
	<211> 375		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 139		
	uuugcgaggc uagcaacugg auucuacuau auaaaaacac agacuuggaa ucaugucacc	60	
	caccaggacu cuccgagaau ccccguccga aagacaugaa cggguggaaa aagacucuca	120	
	aucaucgacg acaagcuaac acaagguauc caguaaggua cucuaaagga gguugaugug	180	
15	auggagcacu guagaacacg ugcuaaacuc acaucgacua aagaugagug uucaaggucg	240	
	ucaaguaucc gagccaggau acaaacgacu cacacauauu gguccuauac ccuaaaggau	300	
	acccuccgaa agggcaauuc ggacagcaaa agcuguguuu uccuauaugg uagauguggu	360	
	uguuagccac gcaaa	375	
	<210> 140		
20	<211> 99		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
25	<400> 140		
	ucagcguaug uaguaggcuc ugcuucauca aguggucuuug uguucaaauu cagcuccaag	60	
	cacaugguca acuggauucu acuaauauug ugaauauaa	99	
	<210> 141		
	<211> 375		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 141		
35	cuugcgaggu cagcgugucc auccaacuua uguaaugcuc ccaugcaaug uuuguccacc	60	
	ccagaggccu uauuuuaaag cugaugcuac cagggcaaaa aauggugaaa aaccacucua	120	
	gacaaauccg auauccaacu ucaaggcuuc cagguaguau cacgaaacgu gaaacacgug	180	
	aaggaucuuu gcagagcaug ggauaaaauc acguguuuug gucuggaguu uccaugaca	240	
	ucaagucgca gagccaugcg acaaauuuu cagaauaaau gcagugaaua cgacaaggaa	300	
35	gcccuccuga cgguuaauca gggcgggccc uagggggguau uccauucggg cucuuaugcg	360	
	cguugaccac gcaau	375	

5	<210> 142		
	<211> 375		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 142		
	aaagagaggg auucgugggg uucacuaauc cguuagccuc acaccccuua uucccucacc	60	
	ucucaugccu uagaaugaag caccagucac uagagggaaa aaaggcgaaa aaccuuucca	120	
	aacaauagug agcaccaaac ccaagguaag cagcugguag cuugaagcaa guuauacggg	180	
15	gcggaaaaaca gaagaucucg uuuuaaacc cguauaaga accaagagcg cucacuggcc	240	
	ccaaguuucu gagccaagaa acaaggguca cagcuguguu guugcuacua caagaaguuu	300	
	accaccaga aggccaaucu gguuagcacg ggguggggcu accacggguu aguaagucug	360	
	cggaucccac ucuuc	375	
	<210> 143		
20	<211> 375		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
25	<400> 143		
	auugugaggg caaacagaag auuaaggggu ugucuaccgc ucaccuauua cugucacacc	60	
	uagcaugccc agaaccugug caccuccac aagugauagc aauggcgaaa aaaccaucca	120	
	accaacagug cuccagaaaa ccaaggcuuc caggacggau cucuaaggga gacaauaggg	180	
	ugggauauau gaagaucauu guauaaaggu ccuguugugc caguagguuc cacaccucuc	240	
30	ccaauaggcu gagccaagcu uaaagagagg ccgacggaac guauacaauu cauuaaggaa	300	
	gccacuagu agcgcaagcu agucaccaga gggagcggua gccacaauuc cuuauguuuu	360	
	guuuggucac acaaa	375	
	<210> 144		
	<211> 125		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 144		

		cacugugcgg ucucuaauac gacuguucag agugaugaac cgguuuccgc gcggaacgga	60
		ggagcgggcg ccggcgccga auuggaucgu uccucugagc agcuguaucg gaggccgagg	120
		ugaac	125
5		<210> 145 <211> 375 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10		<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 145	
		uuugagaggc caggaaggau auuacgauga ugaauccac auacuugauu guuacucacc	60
		uugcaagccc accgugugag cuccaccacau uagaguaacu guaggggaaa aaaccuagac	120
		uucaacugac cuucacaaac acaagguuuc cagucggauu cacuaacggu gauaaaaguu	180
		ucgguaccuu cuagaagaug gguaaaaaaaa acuuuuauug auuuagagca aacacuuuau	240
		gcaaugguca gagccaugac caaauaugga cagacuuguu guaacaaaaua cggaaaggaa	300
		acccaccaca agggcaaugu gguaagcaaa agauguggga uccucauugu cguggcuccu	360
		ucuuggucac ucaac	375
15		<210> 146 <211> 375 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20		<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 146	
		gaugagaggu uuggaggggu aaugccauug cguugcacac auacuuccac uuugcccacc	60
		ccucauggcg ccgacggcac caccagcaaa uagggcaaac agagaccaa aauucuuaa	120
		cacaaacacu cgcgggcaau acaagguaac cagugagggc gaccaaaggu uugucuagcg	180
		aggguacucg gcagagcuag gguaaaaguu gcuggacacg uaacugacau cgaaagaucu	240
		gcaagugucu gagccaagac auaauagauc cggaggauug ggguccagcu cccaaagguu	300
		acccaccagg aggacaacuu ggucaucaua agaugugugc gccauguggu ggcuucucuu	360
25		uccaaaccac ucaua	375
30		<210> 147 <211> 375 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido monocatenario	

	<400> 147	
	aacgagaggu augauaaaac augcuuauga augaaucac ucacugcgcc cauucccaac	60
	ccggaugccu uaugaugaag cacgcgauuc gagggaauga auuagggaaua aagcuaacua	120
	cgcaaacuaa uaccacaaag ucaagguugc cagaggggaa cacgaaccgu gauaagagag	180
	gaggcucgcc guagaacgcg ugggaaaacu ucucuuauga gacuugugag aacaauuacc	240
	acaagaucac gagccaggga ucaaugguga ccgagucuaa ggagcaauuc cacuaaggua	300
	acccacccga agggcaauug gguaaucaac aggagugguu ugccauuugu aagaucuuuu	360
	gucguaucac ucguc	375
5	<210> 148 <211> 111 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 148	
	cauguuugga uacuaguuaa uauuaauguu uaaagcuacu cuacaaaaaa uauaugauau	60
15	auuuccggua gaguagcuuu aaauauugau auuggcuagu auccaaacag a	111
	<210> 149 <211> 375 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
25	<400> 149	
	uuugggaggu cuaguuaaau uuaauguuua auuuaaucuc agacuauuau uugucacacc	60
	acuaaugccu gaggcucaag caccagaaau aagugacaac auugguguaa aauccagccu	120
	cccaagucua aucgaacaau ucaaggcugc cagauagucu cacuaagggu gguuaaagcg	180
	aggguggcgu guagaacacc gucaaaaauc gcuuuagcgc gucgagauuu cgcaauaucu	240
	ucaagucucu gagccaagag auaaaagaua cccaagaaau gucguaaga ccauaaggca	300
	gcccaccuga agggcaauca gguuaucauu agcuggggguu gccaguugug cuccacguug	360
	aguggaucac ccaac	375
30	<210> 150 <211> 375 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 150	

	gacgugaggu uuggaggggu aaugccauug cguaaacccc cgacucagaa uucucccacc	60
	gcacagcgca agcuccuuac guccugacaa gagggagAAC auuggggaaa aagccagcca	120
	cacaaguaac uaaagcaaaa ugaagguguc cagaaacuuc cccaagggg guaaaacgug	180
	uggggguugcc gaagaucgug cgacaaagac acguuuuagg guuucgagcg cgcaauuacu	240
	ccaagugacu gagccaaguu auaagaguga ccgaagcguu ggaaugagga gcuuaggggc	300
	acccgccugg agggcaaccg ggcaagcagg agcggggguu uccacgcggu ggcuucuccc	360
	ucugaaucac acgug	375
5	<210> 151 <211> 375 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 151	
	guagcgaggu cgaaucuugu uuauaacuua aguuugucgc uaaccuggcg cagucucacc	60
	ucaccagcca uagacuauag cuccugucAU aagagauuga aaugguuaaa aaccCAUaca	120
	uacaaaucug auacccaaac ucaaggauuc caggaaguau ggccaauugu caauucaguc	180
	augggucaca gcagagcucg uggcaaacug acuggauuac acuuagguuu cccagucacg	240
	ucaacugucc gagccaggac agaaacguga ggcacgaagc guaacggaua caucaaggaa	300
	ucccuccuga aggacaauua gggcaacaaa gguagcggca gccacuuggg uugaaccgag	360
	guucgaucac gcuag	375
15	<210> 152 <211> 102 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 152	
25	gugaagccac uggauuggauc gguucaaucc ucucuuccgg aaucguuguu gaacauaaga	60
	accuagaauc gaggauuaaa cuuauuuuuu uagcgcucac uc	102
30	<210> 153 <211> 375 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 153	

	guugugaggg cgaauucuugu uuauaacuua acuaaaucac ccacucaagu cugcgucacc	60
	acucauauuu uaggcuaagg uaccaggcca uagacguagu aauggagaaa aaaccaucga	120
	aucaaaacua cccuacaaaa ccaagguuuc cgaugaguau cacuacgagu gaaaauagcu	180
	ggggaguuua gaagaucugg ggcuaaaacg gcuguuuugc ccuuugagua uacauugucu	240
	gcaagagucu gagccaagac ucaacagaua ccgagauacu ggaaugaaua cccaaaggaa	300
	accucccua agggcaauag gggcaccacg aggggugguu uccaguuggg uugggugaag	360
	auucgcucac gcaaa	375
5	<210> 154 <211> 375 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 154	
	gaugugagua auucgugggg uucacuaauc cgguuaccac agacagccua augacacacc	60
	acacaugcca agccgcuuag caccugccac aaguguuaua aacgccgaaa aaugcgucua	120
	cacaaccauu ugaaccaaag acaagguacc cagcaaguau cuccaaagga ggaauaagug	180
	aggugugccg agagacucgg ggcaaaaauu acuuguucag cguugguguu cgcauucua	240
	ccaagcuccu gagccaagga gcaagugaga cucaggaaca guaaaaaaua ccugaagggg	300
	accucccacg aggacaacgu gggcaugacc ugcuguggua gcuccggguu gguaagucug	360
	cggaauacac gcaua	375
15	<210> 155 <211> 367 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 155	
	aguaccgagg gaaacgagau gcugcucuaa uaauggcgga uagccccaac uucacaacua	60
	ucggggccuuc cggugcacga gcgagguuc uuagagcuag caagucccuc gguaagauuc	120
	cacagccugu gggacagcua cucacagggc ccuaccggac agcuggaagu agacuuggua	180
	ugccugacgu aacagaccag uuacucagac agccaaaucc auaucguaca aaugauagga	240
	aagagggauu uuaccgaggg aaccaauuaa cucuaagaac ccucacuaag ugaccgggag	300
25	agcugguagu uauggauuga gggcuaaaag cuauuguaug gguagcauuc uguuucccuc	360
	gauacug	367

5	<210> 156		
	<211> 87		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 156		
	cacgucagca cgacagggaug ccaaugcaaa aaaacguguc cuugagggcg cguuuuuuug	60	
	cauugggcauc cugucacgcu gacgugg	87	
15	<210> 157		
	<211> 168		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
20	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 157		
	ggaggacaac augccaaugc aaaaaaaguu uugguagaag gagacgguaac gcagagcaga	60	
	agaggaacgg uggacuuaac ugagaccauc uucuccuaga uaagaucuca caaacccuc	120	
	uccaugcaga ucuacuaagg aucugcugcg uugguguguu guccuccc	168	
25			
	<210> 158		
	<211> 372		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 158		
35	guggacgguc auucgugggg uucacuaaau caaaagaaga cgcagaucc aaaggacaag	60	
	uuuagggcca uguugcccu agacacagag gauggcccg cggugucacu ggguuagggg	120	
	aggaccucug ggcgaaggaa aucagagcac acggccuggc ucuaucuaa acccgugcau	180	
	aguaaacggc agaugugggu aagaacacca cauuauagcac gggauaggaga cggacccagg	240	
	ccaaaauucg gaacauggcu cccuaaccu ggugacaccg ccaggccaaua ggggcaaac	300	
	augaccuua auucaucua uggguccgag agcuccuuac ggauuaguga acuuugcggu	360	
	ugaccgugca cc	372	
40	<210> 159		
	<211> 367		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> Oligonucleótido monocatenario		

	<400> 159	
	cguaccacgg uggcagggag aagagaacga uauuugcaaa uugccccugc gucucgcauu	60
	acgggcuaaa cuguuccggc uaguagggac aaugagcuag caagucuauc ugugguuaga	120
	aacacccugu acuacaggca aguacgggac cagacauggc agcgugacuc agacggggca	180
	cgccaguagu uucagcccag agacacugac ggccccaacg acauaaaaca auuuauugcg	240
	aaauuucuaa cuacagauag aaccaacuaa cucauuguuc ccacgagaac ggauaguuu	300
	agccguggug caagaccaga gggcaaaagg caauugucgu ucucuuuuug uugccgccgu	360
	gauacga	367
5	<210> 160 <211> 101 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 160	
	guugcaaca gaagauaag ggguuagaug auggcgugca aucaggaguc uugaagcaau	60
	gcaucccacu ccuugggucu cuugaugcuu cuguuuucac c	101
15		
	<210> 161 <211> 214 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
25	<400> 161	
	ggcugucggc cucgcuaggu auguuuaaca auguuaugcc aagcgguggg ccaaaaacuc	60
	gaaaaacaac ccuuugagg aguaggcgcu gcagucaaaac ccuguacucc ccgacgggau	120
	cuccgaugag aucggagaca aaacacgggu cuaaaaccga gcuaagacac cagggcacaa	180
	uauuguuaag uguccuuggu ggcaccagcc gccc	214
30	<210> 162 <211> 367 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 162	
	ugggccaagg uauucguggg guucacuaau ccucggcaca acgccccuuc uccgcugaaa	60
	accggcguaa cauuaccugu acgcaugccc auagagcgag ccagccgcac ugucucuacg	120

		aacagccagu uuucacagcua aaaacugggc cccauccggc agcggaagga auaccaggca	180
		ugccgcuaagg aacagucuaag uuccagcgac agccugaaca cguucauaca agugaauugu	240
		aauaucguag agacagugcg gaccaacucc cucuaugggc gcgccuaaaa ggaguguuac	300
		agcgguuuuc gauggaaga gggcguaaag cugagggug gugaguccu uggauaccu	360
		gacucau	367
5	<210> 163 <211> 367 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 163		
		gguaaccaugg ugcacagcag uauuugugua uaugugccga acgccccuc aucucguggc	60
		aggggcaau caucagagg ucguaugguc ucugugccag ccagccuuc agccguccua	120
		aauaaccagg uugacaguca caaucugggc accacucguc agcgagagga acacggggua	180
		ugccaauguu gacaggaaag ucagauugc gggccuaaca acuucuuaca aaagaagugu	240
		aagauuagga cggcugaaag gaccaauga cgcggggacc acacaauau cuauugauuu	300
		agcccugcca caagguagga gggcguaaag cacauguaca cgaauacugg ugugcaccau	360
		gauacca	367
15	<210> 164 <211> 101 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
25	<400> 164		
		gcuguugggu ggaguuccag aguaaagaug agggagugca auuaggaguc uugaagcaau	60
		gcauccccgu ccuuuugcu cuggaaucuu cauucacac c	101
30	<210> 165 <211> 148 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 165		

		agaggagccc cuggucgauc augguacgca augaacgucg ucauguaucg accuaaggac	60
		aaucggcagau gauuaacuuu cuuaaacaga cccgagcaug acacauggcg acccucauag	120
		ugugcuuggg uccguuacgg acuccgac	148
5		<210> 166 <211> 372 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10		<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 166	
		ggggucggcc auucgugggg uucacuaaau caacguguga ccggcggggc ggagcucaca	60
		uauagugccu gguagccuca agagucggag guuugcccua cugucgguca guguuugggg	120
		gggaccuccu uacgaaggaa aaaggagcaa gcggccaggc uguauaaaga acccuuggga	180
		uuaacauggc acuagcgggu aagaacaccg cuaauuucaa ggguuguuuu cauaccuugg	240
		ccaaaagacc aaacacaucc ccccaaacgu ugacuggcgg ugaggcaguu gaggcuaaac	300
		cagacgcuaa augcaagcac ugucuccucg agcagacgac ggguuggugg guccugugau	360
		uggccgagcc cc	372
15		<210> 167 <211> 206 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20		<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 167	
		gggugccgaa gcaauccgag gcuuuuuacu ugguugcuug gucggcaggg aaucaaacuc	60
		ucgcgugaau uaugccguug ucgucgccc uucucguucc ggggagcccu aaaaccugac	120
		uaaauaaaua uagccuucua ugugaugagu ugugaugaua gccgaaccaa gggccugauc	180
25		aagaaguucc ggacauuucg gcaccc	206
30		<210> 168 <211> 104 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35		<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 168	
		ggcgcgagcu accacaagau guacggcaaa cggccggggc ugacggcacc ggcggucgug	60
		ccgucgcggc cgcuugcugu augaucuuug ugguagccgg ugcc	104
		<210> 169	

	<211> 139		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 169		
	aagguccgga accgaacggc aagagagcuc ggcaagggcc ugaucaagaa cucuuggauc	60	
	ucaagccaag gagugggugg cugauggggg uucuugguuc uguccuuauc gagcggggcca	120	
10	aguucacgcu aucagccuu	139	
	<210> 170		
	<211> 206		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
20	<400> 170		
	ggggggcccau ccaaucugag gauucguggg guucacuaau ccccccuaaa agugacucac	60	
	acguccgggc gagccuuuuc gcgaugaccg aucucgagcc gguguucacg caaaaacauc	120	
	ccacgaaagc uugaauccag gguguaguga gcucacgucu ggggaggguu gaugagccau	180	
	gcgggucccc agacagaugg gcccc	206	
25	<210> 171		
	<211> 206		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 171		
	gggagccccg ccaagaugag gauccgaauu uauguaccuu aucgucaccc gauuacgcuc	60	
	acgggagucg ccagcuugac uauuucacca agccagaucg agugaucgcg aaaaucgaaa	120	
	cgaagucacu ggccagacau uccguagagc gcugaugccg gaugaauagg gagcaugauc	180	
	ucggaucccc auccagcggg gcuccc	206	
35	<210> 172		
	<211> 99		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 172		
45			

	ggaauaggggc uggcugucac gucgacacuc aucuagagca acaaacuucu gcgagagguu	60
	gccuaugaug gauguugaug uuacagccaa cuuuauucc	99
5	<210> 173 <211> 165 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 173	
	ugggggcgagg gcggguacgg gaacacguua gcugugaucg uugauguuac agccaacuuu	60
	aaggguagcgg cgggcaguac ucagcggggg uucuuccucc acccccgagg auggucggau	120
	cgagggaaca ugcgacgucg ccccgccccg caacccccgc ccua	165
15	<210> 174 <211> 206 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 174	
	gggagccagu gcaaucugag gauucguggg guucacuaau cccucgacg aaugcucac	60
	accuacuua gcuucggcgc uagaucgccc auccaggucc ccugaccacg caaaaggau	120
	agaagcgcaa gugaagacg ugggugguga gacguagacg gaggaggguu gaugagucaa	180
25	acgagucucc agacacacug gcuccc	206
30	<210> 175 <211> 206 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
35	<400> 175	
	gggagccuau ccaaaaggau ugggauuau cuggggguuug gccuacuucg aguuaaggac	60
	acggguggca ucccguagac ggguuagccg cgaacgauug uccaaucccu aaacuguagc	120
	agcgucucgg gaucagccaa cccgucgugc ugugacgucu guagagcuua aguuuaguua	180
	aaucuuaacc cuucagaugg gcuccc	206
40	<210> 176 <211> 165 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	

	<400> 176	
	uuggggcggg gcgggaucga gcauauaaaa ggcgagauug aggucuggau agaguugca	60
	cacggcgcgg cgccagcca ucggcgggau gccugcccc gcccgugca agcugcuauu	120
5	ccagauuuua ucucucauca cuccucccg cccccccgc cccga	165
	<210> 177	
	<211> 139	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
15	<400> 177	
	aaggacucgu acaggccggc uagagagcgu aaacuuuua uauuguuuua cucuuggggc	60
	acauuccuug gcgugauagg aggccggggg uggggcgguu ugaggagau acgcgugcca	120
	agggcccucg cccuccuu	139
20	<210> 178	
	<211> 206	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 178	
	gggagccgag ccaaucagag guuggagggg uaaugccauu gccgacgagu auccaccggc	60
	ucgugugauc gcuccauagc uggucucccg aggcagugcg cgggcacgaa caaacaggc	120
	agaagcuaga gugcagucaa cgugauguug gauggggaag gucgagcgau gacguugcaa	180
30	cuucaacccc ugacaguucg gcuccc	206
	<210> 179	
	<211> 292	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 179	

	gaaccaaugc ggaagauacc aaugcacggu cgcauguaaa auugggcagu uggucaguuu	60
	uguuggggug aagucuugcc ccaguuagcc gggaggaaag auauuacacc cgacucauuc	120
	ugacgaacgc cucagguagu augcaaccug auacugaggu gaacggcaga augaugcggg	180
	uguauauauc caccuccgcu aacugggcga agacuucacu ccaacauaac ggacccgcug	240
	ucaccggccc auacccgacg uauugggcuc uuugguaaca guggucgggu uc	292
5	<210> 180 <211> 84 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 180	
	auaccgagau aagcagagga agaauaaaua ggugcuaauu ggaagcugca ccuacauucc	60
	uuuuuauucug uuuaguuuug guag	84
15	<210> 181 <211> 199 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 181	
	agggcguaacc aggagguaug aagccucgca ugggagauuc gcgagguaau gggguagacu	60
	ucguaaaagg cgcaaacaag cucgcacaaa agcgugagga ugauguagcu aaagaugcau	120
	aaaucaacag cgauucacgc acccagggug auucguggac cucuuguuga gagcuguacu	180
25	uuggauagua agacgcccu	199
30	<210> 182 <211> 292 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
35	<400> 182	
	cgccccauga guuagaaacg aguucggggc caaaguucua acacguaggu uggaaagggg	60
	uuggugaacc uugcggacac ggaggucgug gucggaggag aaauaucgcc cgacgcuugc	120
	ccgcuaaccc gugaggugcc aggaaacgcg auacucacgg gaaggagggg agguugcggg	180
	cgauaaaauuc gguccggacg accuccgcgu ucgugggguu cacuaauccc guuccuaccu	240
	accccgguca cugaauggcg aacuugguuc uaaauuacaa ggagaacggg ug	292

5	<210> 183		
	<211> 292		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 183		
	gccccacuaa gcuugaagcc auucccgcg cucgggagaa aagcgggcgu gggauauuuu	60	
	guugugcuga caugucuagc aacgggaugac gaagguuaag aaauaucgcc cgacucgucc	120	
	ucacaaacgc cagagcacga acgcaaccgu acacucuggc gaaugggggg acgaagcggg	180	
15	cgaauuuuc acgccuuuca uccguugagg gacauguuag cauaauaaaa aguccagcgc	240	
	ccuacggugc ccacaagacg gaauggaguc gagauaaaaa ugggacgggg gc	292	
	<210> 184		
	<211> 91		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 184		
	aaggcuugcu acuguggagc aaucuuucug aacgauagag aaaaugggau uuaauuuuau	60	
25	ggucagaaug auacuccaca auacuaagcc u	91	
	<210> 185		
	<211> 195		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 185		
	ggaggguaacc uagccggcug uaacuugugg acuaucggcg ggguaauggg gggcaacuag	60	
	cugccgaccc auuccuccau cccguccgug gcuacgagag ggugggcgcg acuuggaau	120	
35	agggaaugga gcgggagaua guuggagucc ccgcccuggc cuauccuuuu cagguuguag	180	
	ccucugauga gcucu	195	
	<210> 186		
	<211> 292		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 186		

	gccccacucu gacagagacc augucgcgca auaugaacaa acgggggcuga gggagguggc	60
	uugguggacc uugcgaacct auagguagac gagguuaccg aaaagacgcc cgacucuggc	120
	auacaaacct gguuggaucc aagaaaugau aaacgaccgg gaaugggugc cagaagcggg	180
	uguuauuuuc ucgccccuuc aucugugcau ucgugggguu cacuaaucca gcuccaucag	240
	ccgacagcau cgccaaauug acauggguuc uguaggacua agugcagggg gc	292
5	<210> 187 <211> 292 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 187	
	ggccccgagg ucuugugccc aaagacaugu cugagacucc agggggaagu ggguaauua	60
	guuuuaggug uauccacuc ucagguaggc gaagguuagg auugcccccc cgacgcaggc	120
	uuacaaacgc ggauggguug acggaagaac agacauccgu gaaugagagu cugucacggg	180
	ggggacaauc gcaccuuccu aucugagcuu ggcauauuu uaaaaaaaa cuaccaacuu	240
	ucgaagacuu cugaaagacu uuuuggcggc agguucuaaa ggugagcggg uc	292
15	<210> 188 <211> 84 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 188	
	uugggauaug uuaggaaaua agaaaaucga ggugcuaauu ggaagcugca ccuuaggucc	60
25	ucuugauucc uagccguauc ucau	84
30	<210> 189 <211> 199 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
35	<400> 189	
	agggcuuuca cgggcuuucgu aggccuugcu aagagauuuu uaaaaauua cuggaugacu	60
	uagaaaaua cgcaaacaag uagaaauaa cgcaugugug gugcguugcc aaagaagugu	120
	uccacaaaag auacgcaugc uccaucuuag uuugggggac uuucuuacga gagcccgaag	180
	cuagagggag agaagcccu	199
	<210> 190	

	<211> 292		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 190		
	guccccaacc aguuguagcc aaucggaug cugauggaca acacguaaga aggauguggc	60	
	uuggugagcu ccgcggaccc guagguuuuu gugggaguug aucgugauc cgacucaugc	120	
	acgcaaacgc aacgggcugu acgaaaucag agaccguugc gaaugagugu augacgcggg	180	
	auugucgauc uaucccagga accugcgcau ucgugggguu cacuaauccg aguccgucuu	240	
10	accucgccgc guaaaaguag aauggggggc aacggguaua gacgagaggg gc	292	
	<210> 191		
	<211> 237		
	<212> ADN		
15	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
20	<400> 191		
	cugacccgua cauauagaga guugucuggc ccgccacagc cccuagcaaa ucucgucgcg	60	
	gagccacgcg uaguaugguc gcgagccacg cccgaagcua aaccagaagc accgaaggcu	120	
	acgcgucuccu uauacacugu aacggcaccc cgaacacggg aagagggcuc cgaaggccga	180	
	cgagauuucc uaggggcugu ggcggguugg acaacuugg auaugugccg gucaggg	237	
25	<210> 192		
	<211> 64		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 192		
	cgucgcggag cucaagaaga acccucuucg aaauauccag gguucuuuaa gggcuuugcg	60	
	guau	64	
35	<210> 193		
	<211> 110		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 193		
45			

	aaaguuaggg gagcacuagg guugauuggu cgucacaguu agaucuuucu gacccuagag	60
	acgaaaaagc uguggcgggu uggacaacuu cauaccucc aaccuagcg	110
5	<210> 194 <211> 237 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 194	
	cgggacaguu cauugcgggg guuggugac cccacaguu cccaagcagg aguaggcgca	60
	gaguagcuug acgcaaggua ccggcccacg gacgaccuca aacaguagag accuaacgcg	120
	ucaggcuccu auggaaccca uacgaaaccc ccagcagggg aagaguacuc uguagaccgu	180
	cuacuccucc uugggaauuc gugggguuca cuaaucccg cagugagccg ucccggg	237
15	<210> 195 <211> 237 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 195	
	cugaaccgau cgcaacggag uggaucauu cacugccugu cacuuucaua uuguggcgca	60
	ggucugccug uggcaugggc gugcuccaca cagaauucau aaccucuuga uccaaacgcu	120
	gcgggugacg cauugaaaau guuucuggcc cgaacucggg gaaaaggacc uggaggcugu	180
25	cgcaauauca aagugacagg cggugaauga uguuauucgg uugcgauccg uucaggg	237
30	<210> 196 <211> 64 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
35	<400> 196	
	accggaagag guaaaugaau uaccuuuccg aaauaaccag gugguuuaua ugccuuuucc	60
	ggau	64
40	<210> 197 <211> 110 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	

	<400> 197	
	aaggcgggg aagcaucugg acgccggaag agguaaauga agaucuucca cauugguggg	60
	acgaaaucg uuugcuaugu aucaucgucc cauaacuucc aauuaggaca	110
5	<210> 198 <211> 237 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 198	
	cugaucagag cauugcgagg guugguggac cccgcggaua cacucucugu caagggcccu	60
	gagucgcuug gcggaugguu cgagccccg gcguaggaca aacuggaguc accaaacccg	120
15	ccagguccau aagcgacguu uacggaaccc caagcauggg cagaggacuc aggaggcggu	180
	ccuugauaca gaguguauuc gugggguuca cuauuccugg caaugcuccg gucaggg	237
20	<210> 199 <211> 237 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 199	
	cagaacagau ccggacgguu guguugugcu uuugcuggaa cacuagcuu uguaggccca	60
	gcguuccaag gcgcaaggug acacgcucug uacgaaccua aacccaaagg accuaacgcg	120
	ucuuggagac ucuagacuag ggccuuauug caagcaugcg cggacgacgc ugaagacggc	180
	cuauagaacc uaguguucca gcaaaaguac agcacaacgg uccggauccg uucuggg	237
30	<210> 200 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 200	
40	uuugguccca uguuggagcu ggucgcaccc agcuccacau ggaagacuua cc	52
45	<210> 201 <211> 118 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	

	<400> 201		
	aaacaggaaa ugggaagcgg cagaaugcc auucuccguu uacguucuuc gacgcuuccc	60	
	gcuuuccugg gacgugagua gggaaugug uuuuucccac uucucaagac cgacccgc	118	
5	<210> 202 <211> 237 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 202		
	ccgagccgau caugucgagg auuggugagc cccacgggug caccuacguc auuugucgcu	60	
	gaguaacaug cugcaaguga cgcgccugc ggauuuaca aacuagagua uacuaacgag	120	
	gcauguucgg aagcaacgcu ucagaaaccc cgaucacggg cagaguacuc gggagcccg	180	
15	caaaugaucu aggugcauuc gugggguuca cuaauccggg auaugguccg cucgggg	237	
	<210> 203 <211> 193 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
25	<400> 203		
	gguggugugu caaagguucg cugccucugc aucuaccuc uaauugccau augagaccu	60	
	aaacuacca agccacugga auaaaauga ggccgccguu ccaacaaaa cgauaaca	120	
	acaaauguua uuacaaggu gaaaagggc aaggggggug ggugcacggg cgacgcaccg	180	
	gacgcaccgc cac	193	
30	<210> 204 <211> 111 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 204		
	gccgugcacc cacuagcagu uacaguguuc augaaauccu uaacuuccu cccugucggg	60	
	aggauagaua gggguuuug ggugcuguac cuguuguug gaucacgaag a	111	
40	<210> 205 <211> 138 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220>		

	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 205	
	gaacgccgca gcguaaaaag cugccucugc cucugcaucu aucuucgguu agaaggugaa	60
	ggggggcgcc aagaccgagg uucuaacccu agcuaggugu agcccgaggg agccagcucc	120
5	uggcgguug gggcccca	138
	<210> 206	
	<211> 193	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
15	<400> 206	
	gcaggcgucg ccaggggucg uuggaggggu aaugccauug caauggcuaa aagggacuga	60
	auacuaccga gagcgcggaug gccaaaccca agagacagca ucuaagacaa cgaagaacca	120
	auaagguucu uaaaucggu aaaaagagcc aagcgguggu auugccauuc cauuaaccca	180
	guggcgccug cac	193
20	<210> 207	
	<211> 351	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 207	
30	caggggagug aagcgagugc aucuucuuuc aucgaagcau gcaccuucac auucggaaaa	60
	auccccacgg cuggaaccgu ccacccaaca cuaggcagag ucgagcccgc gcgguaccaa	120
	aucugggguug gagaauaagu cccgggggua gccuccaga gggggcccaa ggccacauga	180
	gggaugcgug caagggaggg acacagcaug gaccggccug acuacuauug aaagccgaac	240
	guggaucaga gucggccgaa ggggcagaau cuacggcccg aaucuugauc caaaccccau	300
	agagucaggg cgccaugggu gggugaaauc cacucgcuuc acacccccac a	351
	<210> 208	
	<211> 93	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 208	
40	aaaaccaagc uggugcuaua augcacaaua aggaucuuuc agcaccugga ucugagauuc	60
	gaguugugcg uggcgccacc caguggauc cua	93

5	<210> 209 <211> 351 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 209	
	gcugggaggu cagcguacaa cucaugaaua uuugaaucuc ccaccauucc gaaccucucu	60
	gaccccaugc ccgguaucga ccaccgaucc acgaagacag accaggccgc ccgauuccca	120
	auuugugauc gauaaauggg cucgggguuu ucccuuagca gggggaccca gucccuagga	180
	uggauggggg aauggguggu aaaagccagg gcuaggucug uaaucuauc aaacccaac	240
	ggggcuagua gucagcugag gggggaaaac ucauagccug aaauccuagc cuaacaccau	300
	aguuacaggg cucccugagg uguucauau ugugcguuga ucacccaccc a	351
15	<210> 210 <211> 351 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 210	
	uuugagagggc uuggaggggu aaugccauug cgugaaacau caaccggucc cagcaucgaa	60
	uggcgcaagu cagggcccg cccaccguucc uuugcgauac uccaggccgc ccgauagcca	120
	ggcaaagaac gagaaaugg cacgcgucac gucccaacug ggaguugcca cgacgaagac	180
	cggauuggug uaaggggggc agagaacagg guggugaccu uccaucaucu aaagacuaac	240
	gggguaucga cucagcugag gugguagaaa ccacagccug aaucagauac cuaacgacau	300
	ggggagggug accccugacg ugguggcuuc ucuuuccgag ccacucacgc a	351
25	<210> 211 <211> 351 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
35	<400> 211	

ES 2 915 576 T3

	gaugagaggu augggguuuug agacaaaaau ugagaaccga accccauccc accgauaaaag	60
	ggaccgaagu cggcuacaua gcaccgucuc uacagaauag uccaggccgc ccguagccca	120
	gcuguaagac gagaacauga ugccgguccg cccccaauug gggagaucga aucucuagga	180
	uggagguucg gacgggacgac agagauggcg gugaggacgg gccaccagua aaaauccaac	240
	ggggcguaa guuagcguag ugggcagaa gcaacgccua aguucaaugc cuaacaccuu	300
	gggguuugug cuccgccuca aguuuugcug ggagcccua ccacucacgc a	351
5	<210> 212 <211> 91 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 212	
	caguagcagu uggcgccaug aucaagaaga aaacuuccu aaacaagcca aggaaagauc	60
	uuuucuuguc guggccucac cuguugaugg g	91
15	<210> 213 <211> 351 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 213	
	aucgagagug cagauucuuc uggcgaaau agugaagcua acaccuucuc agccaccaca	60
	gaccccaggc cgggacccgu ccaccgaucc accacaagag cccaggccgc ccgucgcca	120
	cguggugauc gagaauucgg cgcgggguca aaauccgacg aaugguucga agcccaagga	180
	gggauguuag caagggcggu aaauaacaug gugagggucg uuugcauuu uaacucuaac	240
	gugguuaaau uuucgcugag gagguagaau ccacagccga acuacuuaac cgaacuccau	300
25	ugagaugacg uucaugacu aguucgggcu ggggaucugu acacucgcuc a	351
30	<210> 214 <211> 351 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
35	<400> 214	

ES 2 915 576 T3

	aaagagagga auucgugggg uucacuaauc cuuaaaacuu ccaccuaccc gaacaucucu	60
	gucucggcggu cuggauacgu ccacugagcc ugaucgaaag accagaccgc ucgcuuccca	120
	agaucagcuc accacggagg cugcgaggcu agucaaacgu gacggaccca guccacaggu	180
	gggaugggggg uauacguguu auagagauug gaguugccug ucugcgacca aaauccaaac	240
	gcgguuuuuc ggcagcugag ggggaacaac ccuagccug cagacaaacc cgaacgccgu	300
	cgagauaggg aaccaauagg gguuaguagg uccgcgaauu ucacucucgc a	351
5	<210> 215 <211> 351 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 215	
	aacccgaguu cagaaucuca cuugagauuc ugugaacgau gcaccucgcu ccccuauucc	60
	gacccagga cgggacccgu ccaccgucca cggaauaaag gccacuccgc agaacccccca	120
	cuuucgggac gacaaauggu cacgggggucu cuggucauua ccguguaugu ugcaauugug	180
	gggaugcggu gagaauaggc aaauacccug gcgugugugug uuucagauca caaagcgaac	240
	ggguucuga gugugccgag ggggcuaaac ucauggccac agucaagaac cuaaccccau	300
	uuagauacgg acccaggaua gggucucggc gggguuuuga acacgggcgc a	351
15	<210> 216 <211> 100 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 216	
	aacaguugag uggggcucug ucugcgucua gaccacucgc accaaguaca gacauaaucu	60
25	gaugaucua ggcgcagauu ccaccccauc caacucaaca	100
30	<210> 217 <211> 351 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
35	<400> 217	

uauggcaggg cagaauuca cuugagauuc ugugaaaca acaccagcuc auucuguuca 60
 aacccacggu cugguaacga ccaccggacc gugaucacag uucaggccgc ccgauaccca 120
 agucgcgucc gaaaaguagg cccggggguug gcgcuccaaa gcgggaccga guccuaaggu 180
 uggauuuug uaaggguagg auacaucagg gugagggcug ucugcuuuaa aaaacccaac 240
 gcggguuugu cagugcugag ucgggacaag acacagccau uagcaaaacc cgaacgcgaa 300
 agagauagcg uucccugaua gggucuuggc gaugauuggu ucagucacgc a 351

<210> 218
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido monocatenario
 <400> 218

gaugagagcu auucgugggg uucacuaauc ccugaaucac acaccugccc ucccaguccc 60
 gccccuagu cagaugacga ucccggccgc uugaucuag cccaaccgc gugcagccca 120
 cgucgacggu caaaacuugg cacgggggcu ccgcccgaug gcggggguuca acccgaggc 180
 aggaugugug aaauaggagg aagcaccacg gcgagggcug uauucuugau aaaaccaaac 240
 cuggagugca cuuggcggag uuggaagaaa gcauugccca auugccacuc cgaacgcca 300
 agauauagug cuccgugagg gguuaguaag ccugcgagua gcacucacac a 351

<210> 219
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido monocatenario
 <400> 219

cggggacggu caccuguggc uucuaccgca agagaacugc aauccguauc acgccggaau 60
 aaccacaggu uugggagcgc ccaccgucca gcuguuaaag uccaggccgc ccgucgcca 120
 ugcagcggac gaaaauaag cacgugguuc gcccuuacua gggggcucga agccauaaua 180
 cggaauugcg gacggggggc acauauacag gaacggcccu acggcguuga gaacacuaag 240
 gcgguacuug auaagcccag ugggaaaaau gcagggccuu accacgguac cgaaagcaaa 300
 ugcguagggg cgccguguuu ugugguaaac ucacggguga ugaccuccc a 351

<210> 220
 <211> 99
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 220	
	guuuuuagag gugaaugcug gauggcucgu cgcauucaca uaagaagaag aaauauaagu	60
5	gaaggcugcg aaucgcucuu cguuuauuc uauauaaca	99
	<210> 221	
	<211> 351	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
15	<400> 221	
	cacgugaggu ccaagccacc auccaagcca agcgaaacaa acacaagccc auuagccccc	60
	uaccccacgg cuggguccgc ccacaguucc acuacgaaag gacaggcagc cgggacccca	120
	aguagugaac uagaauaagu cccggggguac ccgcguauac gcgugaucua aucagcaggu	180
	uugauguuug uaaggaggu auacaacuug gcgguugagu uccacuguuc uaacacuauc	240
	gggguccuaa uucagccgau ggggaaaaau uaacggccug auuucaggac ccaacgucac	300
	agggaguuug acccagggcu ugguuuuccu guggcuugga ucacgcgcgc a	351
20	<210> 222	
	<211> 351	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 222	
	agugugagga auucgugggg uucacuaauc cgggaaacug ucgccuucac uuacugcccg	60
	uaccccaagu caggaacagu ccacagggcc agugcgaaag accaugccgc cagccuccca	120
30	ggcauugccc uacaacgugg ccagggguua agacuaucga guugggcca gcccuauga	180
	aggauggcag ucaaggcagg aaauacacgg gaggcguccg caccaugucc caauacgaac	240
	gggguucauc auacgcugag ccgguagaag gcauagccgu aggacugaac cuaacaccac	300
	gugugugggg gucccguucg gguugguaag ucugcgaaau ccacacaauc a	351
35	<210> 223	
	<211> 213	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 223	

	ugauugugug gcuugagguc cggggucagc gucccccgc cccacccgaa cuagaaguga	60
	guagaagcua gagugaacgg uaccacacag acccgcaucu cggaccaacc cuccgccugc	120
	aaccccuucc accccgaccc ccucucgag guccgagaca gggcgguggg agacgagggg	180
	gcaagaacuc cguacuuuau uucacguaac caa	213
5	<210> 224 <211> 100 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 224	
	aggauuugcc ugggcuacag uauggcacuc accuagagca acgacagcuu gggagggguu	60
	ccuauaaggu ggaugccgua cuuuauuua cguaaaucuc	100
15	<210> 225 <211> 167 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario <400> 225	
	cggcggccag aaugcgcgca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gggcggccg gacugcaccu	60
	guggacggcc gcccacaaagc gacggagaga cggguuccua accaaggugu aggagcagcc	120
25	gccggcgcuu uuuuuuagua gcuuuucucu ugucagucuc uccucca	167
30	<210> 226 <211> 213 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
35	<400> 226	
	ugaggauucg ugggguucac uauuccaga cgccgccgc cccccugag cagggacauc	60
	gccagaccu gaggcaacgc ggcgccacca accaccacu cguucccgca cugaaacauc	120
	caccacaacg uacguagccc cccccacacg gagcgaguuc uggcggggcg agacgagcgg	180
	cggagaggggu ugaugagccg aguggauccc caa	213
40	<210> 227 <211> 213 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	

	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 227	
	cgauuuuuua ugcuuuuugg uucggucagc cgccgccgcg ccagcccacc ucguaccccc	60
	agaccacacg acgcccacgc agcggcaaca aggcccagcc cgagcccccg caccucguc	120
	uuccacauca accgcagccc cccaccccag gcucggggccc gcccgguccg ugacgagcgg	180
5	cguagaaccg aggcaaagau aauaaaaaaac cga	213
	<210> 228	
	<211> 76	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
15	<400> 228	
	ugguuaugac gagcgugccg uacgagccac ggcugcugcu gcgccgccgc gggcuacggc	60
	acucuuuua uaauua	76
	<210> 229	
20	<211> 155	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 229	
	auggccgccg gcuuagagag ugaaaaaaua uauuucugca aaaggccac cggccguggg	60
	cggcagaaug ccgauuucug cgccugggag agagggggccc gcgcagcgau aaagcuuuug	120
30	ugggugugua uuuuuacaac ccucucuagc cuaca	155
	<210> 230	
	<211> 213	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 230	
40	cgaggauucg uggggguucac uaaucgccgc cgccuccgcg ccgcccggcc gcuuacuccc	60
	uucauccaag cacaugacgc gaaaugaccc acuccaagcc cuaccccacg aaccugcgac	120
	gacugcuaca ccuuccgacc ccccccccg gguagggccc gagagggggg ugacgagagg	180
	ugaacaggau ugaugagccg gaugaguccc cga	213
	<210> 231	
	<211> 213	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 231	
	acauugguuu uacugagucc gcggggcaga gcccgccgcc augaagaucc aguauaacc	60
	aucuagcuac ucgaguaccc ugccuccccg acaccaagcu cgaccccucg cuccaacgua	120
	aacaacagau cccccagccc cccccaccug ggucgagccc gugcuuuggu ggacgagcgg	180
	gcgagaucuc gcagauuuac aaaaacuaac gua	213
10	<210> 232	
	<211> 74	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 232	
20	gugcaggauu gugagggagc auuuccccag cucgaucuu gcaugauuag aagaguuuu	60
	ucauguuccu gc	74
	<210> 233	
	<211> 213	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
30	<400> 233	
	ugagggugcu cgaucacggc ccuggggcaa cgccgccgcu cccgccccu aucgccucuc	60
	cacacaccga ucagcaacac gccgcuaccc acuccuaacg cgagcccacc cguccacuuc	120
	uucuucaacc gccgcgaccc ccccccccg gcucgugucc gagcggucgg agacgagugg	180
35	uggagaucca ggauugugag ggagcauuu caa	213
	<210> 234	
	<211> 213	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
45	<400> 234	

agaggauucg ugggguucac uaaucggcg cuccgccgcu ccaaccaaua gcuacagguc 60
gagaauauag caugcuaacc gccgcaacca acgccc_aucu cgugccagcc ccacaccaug 120
cccuccuaca gccucagaca ccccaacagg guacgagacc gcgcggucgg agacgagcgg 180
agcaaaggau ugaugaguca gauggauccc cua 213

5 <210> 235
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 235
agaaataggc aagtcacct tgg 23

15 <210> 236
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 236
agaagagagt gagcacaca agg 23

25 <210> 237
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 237
agaaataggc aagtcacct tgg 23

35 <210> 238
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Oligonucleótido monocatenario

<400> 238
agaaataggc aagtcacct tgg 23

45 <210> 239
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Oligonucleótido monocatenario

55 <400> 239
agaaataggc aagtcacct tgg 23

<210> 240
<211> 23

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 240 agaagagagt gagcacacaa agg	23
10	<210> 241 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
20	<400> 241 acagaagata gagagcacta agg	23
25	<210> 242 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 242 agaaataggc aagtcacct tgg	23
35	<210> 243 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 243 agaaataggc aagtcacct tgg	23
45	<210> 244 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 244 aagaatctgt aaagtcagg agg	23
55	<210> 245 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 245 acagaagata gagagcacta agg	23
65	<210> 246 <211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 246	
	agaaataggc aagtcacct tgg	23
10	<210> 247	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 247	
20	cgtagatgaa tggttccatc agg	23
	<210> 248	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 248	
30	aaaaatgacg ctgacagaag agg	23
	<210> 249	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 249	
	cgtagatgaa tggttccatc agg	23
	<210> 250	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 250	
	cgtagatgaa tggttccatc agg	23
	<210> 251	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 251	
	aaggtgccgc ggtcatgatg ggg	23
65	<210> 252	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 252	
	aatcttaggg atgggaggtg tgg	23
10	<210> 253	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 253	
20	aggagtgaac ctgagaacag agg	23
	<210> 254	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 254	
30	aaggtgccgc ggtcatgatg ggg	23
	<210> 255	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 255	
	cgtagatgaa tggttccatc agg	23
	<210> 256	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 256	
	agtggcacgt gatattggca cgg	23
	<210> 257	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 257	
	cgtagatgaa tggttccatc agg	23
65	<210> 258	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 258	
	cgtatgtaa tggttccatc agg	23
10	<210> 259	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 259	
20	catcatcaag attctcatcc tgg	23
	<210> 260	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 260	
30	catcatcaag attctcatcc tgg	23
	<210> 261	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 261	
	catcatcaag attctcatcc tgg	23
	<210> 262	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 262	
	catcatcaag attctcatcc tgg	23
	<210> 263	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 263	
	ccgctgcttg tatttcccat tgg	23
65	<210> 264	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 264	
	caaatggcat acagggagcc agg	23
10	<210> 265	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 265	
20	ctgaatgatg atctcggacc agg	23
	<210> 266	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 266	
30	aaggtgtgag ttgagcaaga tgg	23
	<210> 267	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 267	
	ccgctgcttg tatttcccat tgg	23
	<210> 268	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 268	
	ctggcagctt caactattgg agg	23
	<210> 269	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 269	
	ggaggcaggc aagtcacct tgg	23
65	<210> 270	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 270	
	aaggtgtgag ttgagcaaga tgg	23
10	<210> 271	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 271	
20	tgtgatttac cagatcatgc tgg	23
	<210> 272	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 272	
30	cctcaagcac atggtaacc agg	23
	<210> 273	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 273	
	tgtgatttac cagatcatgc tgg	23
	<210> 274	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 274	
	tgtgatttac cagatcatgc tgg	23
	<210> 275	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 275	
	tgtgatttac cagatcatgc tgg	23
65	<210> 276	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 276	
	cctccattcc gcgcgaaaac cgg	23
10	<210> 277	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 277	
20	tgtgatttac cagatcatgc tgg	23
	<210> 278	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 278	
30	tgtgatttac cagatcatgc tgg	23
	<210> 279	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 279	
	tgtgatttac cagatcatgc tgg	23
	<210> 280	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 280	
	gaagctctca aaagagctta tgg	23
	<210> 281	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 281	
	tgtgatttac cagatcatgc tgg	23
65	<210> 282	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 282	
	tgtgatttac cagatcatgc tgg	23
10	<210> 283	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 283	
20	tgtgatttac cagatcatgc tgg	23
	<210> 284	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 284	
30	gaggtttatc gatcgattca tgg	23
	<210> 285	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 285	
	tgtgatttac cagatcatgc tgg	23
	<210> 286	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 286	
	tgtgatttac cagatcatgc tgg	23
	<210> 287	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 287	
	agcaatccga ctctcaatac agg	23
65	<210> 288	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 288	
	gcacgacttg ctgacgtgga agg	23
10	<210> 289	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 289	
20	ggacaactaa gtgaagaaag agg	23
	<210> 290	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 290	
30	ggtctcggat cttcaaacgg tgg	23
	<210> 291	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 291	
	agcaatccga ctctcaatac agg	23
	<210> 292	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 292	
	aagatagaga gcacagatga tgg	23
	<210> 293	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 293	
	accggaccct ctaacagtgg agg	23
65	<210> 294	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 294	
	agcaatccga ctctcaatac agg	23
10	<210> 295	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 295	
20	agcaatccga ctctcaatac agg	23
	<210> 296	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 296	
30	aagatagaga gcacagatga tgg	23
	<210> 297	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 297	
	caacattcta gccctacttc tgg	23
	<210> 298	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 298	
	ggtctcggat cttcaaacgg tgg	23
	<210> 299	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 299	
	aggggaatgt tgtctggctc ggg	23
65	<210> 300	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 300	
	gacagaagag agtgagcaca cgg	23
10	<210> 301	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 301	
20	catggattgg gctacatgag tgg	23
	<210> 302	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 302	
30	aggggaatgt tgtctggctc ggg	23
	<210> 303	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 303	
	aggggaatgt tgtctggctc ggg	23
	<210> 304	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 304	
	agtttgttc tctagatgag tgg	23
	<210> 305	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 305	
	aaagaggagc gagcacgcgg cgg	23
65	<210> 306	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 306	
	aggggaatgt tgtctggctc ggg	23
10	<210> 307	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 307	
20	aggggaatgt tgtctggctc ggg	23
	<210> 308	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 308	
30	tgagagatgc tgacagaaag agg	23
	<210> 309	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 309	
	catggattgg gctacatgag tgg	23
	<210> 310	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 310	
	aggggaatgt tgtctggctc ggg	23
	<210> 311	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 311	
	ttatctgtgc ttggactgaa ggg	23
65	<210> 312	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 312	
	gatagagagc acgaataatg agg	23
10	<210> 313	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 313	
20	aagccttgct gaagtgttg ggg	23
	<210> 314	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 314	
30	ttatctgtgc ttggactgaa ggg	23
	<210> 315	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 315	
	ttatctgtgc ttggactgaa ggg	23
	<210> 316	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 316	
	ctacgcagga gagatgatgc tgg	23
	<210> 317	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 317	
	agctcccttc agtccaagca agg	23
65	<210> 318	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 318	
	ttatctgtgc ttggactgaa ggg	23
10	<210> 319	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 319	
20	ttatctgtgc ttggactgaa ggg	23
	<210> 320	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 320	
30	gatagagagc acgaataatg agg	23
	<210> 321	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 321	
	aagccttgct gaagtgttg ggg	23
	<210> 322	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 322	
	ttatctgtgc ttggactgaa ggg	23
	<210> 323	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 323	
	ggaagggaga atatccagga tgg	23
65	<210> 324	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 324	
	acaccctgga ttattcgaaa agg	23
10	<210> 325	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 325	
20	gatatgggca tggcggtgt agg	23
	<210> 326	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 326	
30	ggaagggaga atatccagga tgg	23
	<210> 327	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 327	
	ggaagggaga atatccagga tgg	23
	<210> 328	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 328	
	acaccctgga ttattcgaaa agg	23
	<210> 329	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 329	
	gatatgggca tggcggtgt agg	23
65	<210> 330	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 330	
	ggaagggaga atatccagga tgg	23
10	<210> 331	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 331	
20	ggaagggaga atatccagga tgg	23
	<210> 332	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 332	
30	cgcaccgggc ttgcctagaa cgg	23
	<210> 333	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 333	
	gagagacgga attgagaaga ggg	23
	<210> 334	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 334	
	ggaagggaga atatccagga tgg	23
	<210> 335	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 335	
	gaggctatgt gctgcagcca agg	23
65	<210> 336	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 336	
	gaaggaagtt tagatcatgc tgg	23
10	<210> 337	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 337	
20	ctgccagcat gatctatctt tgg	23
	<210> 338	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 338	
30	gaggctatgt gctgcagcca agg	23
	<210> 339	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 339	
	ttgaagctgc cagcatgac tgg	23
	<210> 340	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 340	
	taaaccatgc tggagaagca ggg	23
	<210> 341	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 341	
	ttgaagctgc cagcatgac tgg	23
65	<210> 342	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 342	
	ttgaagctgc cagcatgac tgg	23
10	<210> 343	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 343	
20	ttgaagctgc cagcatgac tgg	23
	<210> 344	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 344	
30	tagggaagt gagatcatgc tgg	23
	<210> 345	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 345	
	ttgaagctgc cagcatgac tgg	23
	<210> 346	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 346	
	ttgaagctgc cagcatgac tgg	23
	<210> 347	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 347	
	ttgaagctgc cagcatgac tgg	23
65	<210> 348	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 348	
	aatctgaatg atctcggacc agg	23
10	<210> 349	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 349	
20	ttgaagctgc cagcatgac tgg	23
	<210> 350	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 350	
30	ttgaagctgc cagcatgac tgg	23
	<210> 351	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 351	
	ttgaagctgc cagcatgac tgg	23
	<210> 352	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 352	
	ataagtgaag gtgtcggacc agg	23
	<210> 353	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 353	
	ttgaagctgc cagcatgac tgg	23
65	<210> 354	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 354	
	ttgaagctgc cagcatgac tgg	23
10	<210> 355	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 355	
20	aggggaatgt tgtctggctc ggg	23
	<210> 356	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 356	
30	agggtgcct ataagatgga tgg	23
	<210> 357	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 357	
	agaagagagt gagcacgcat cgg	23
	<210> 358	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 358	
	aggggaatgt tgtctggctc ggg	23
	<210> 359	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 359	
	aggggaatgt tgtctggctc ggg	23
65	<210> 360	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 360	
	cagccgtggc tcgttcggac cgg	23
10	<210> 361	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 361	
20	agaaggtgt gatattggca cgg	23
	<210> 362	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 362	
30	aggggaatgt tgtctggctc ggg	23
	<210> 363	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 363	
	aggggaatgt tgtctggctc ggg	23
	<210> 364	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 364	
	gctggggatg tgaatcttga tgg	23
	<210> 365	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 365	
	aggggaatgt tgtctggctc ggg	23
65	<210> 366	
	<211> 23	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 366	
	aggggaatgt tgtctggctc ggg	23
10	<210> 367	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 367	
20	gttgagagtg ttggagaagg ag	22
	<210> 368	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 368	
30	ctcgggtgtg atcctgagaa g	21
	<210> 369	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
40	<400> 369	
	gtactgctgg tcctttgcag	20
	<210> 370	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido monocatenario	
50	<400> 370	
	aggagcacta cggaaggatg	20
	<210> 371	
55	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 371	
	acaccctggg aattggtt	19
65	<210> 372	
	<211> 20	

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 372		
	gtatgcgcca ataagaccac	20	
10	<210> 373		
	<211> 95		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 373		
	accagaagcg aacatctctt tttagtgttg ttttgttacg acaaagtaga gctttttag	60	
20	gcattggggtt gcttttagttt cttctcctgc ccttc	95	
	<210> 374		
	<211> 22		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
30	<400> 374		
	ttcgcttgca gagagaaac ac	22	
	<210> 375		
	<211> 95		
35	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
40	<400> 375		
	aactttcttca gcacgacgaa gtacaccagc cccatcgccg acttcgtgac gtgcggcatc	60	
	cagtcccacc agtgctccca cccggtcccg tgccc	95	
45	<210> 376		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 376		
55	aagtcgtgct gctcatgtg g	21	
	<210> 377		
	<211> 95		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		

	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 377		
	acaacatcaa catgaggtcg aacacggggt cctacaacgg caggaggaac ttcagctacg		60
5	ggaagtcgag ctacgccaaag tgggtcccaca gcggg		95
	<210> 378		
	<211> 21		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
15	<400> 378		
	agttgtactc cagcttgtgc c	21	
	<210> 379		
	<211> 95		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
25	<400> 379		
	aaccttatag gtgtgtttga tggacgtttc ctggtcgtca tgaggaggag gaacaagaac		60
	agaattcgcg aactcttcac ccttgggatt tcgat		95
30	<210> 380		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 380		
40	tatccacaca aactacgtgc a	21	
	<210> 381		
	<211> 95		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 381		
50	acgtcaactg ttaggtcggg taggtcgtgg tcgttaatgt tgaaagtttc cgaatcgtcc		60
	tgctcctcgt gatgccttcc tacgtctatt tgatc		95
	<210> 382		
	<211> 21		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		

	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 382		
5	tgacaatcca gccaatccag c	21	
	<210> 383		
	<211> 94		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 383		
15	gaggccattt ctagccgttg tgtactagag gaccgacttc tagtcagtga ggaagagggt		60
	gtgagagttg ttagggagggt cgaagtaccg gctt		94
	<210> 384		
20	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 384		
	taaagatcgg caacacatga t	21	
	<210> 385		
30	<211> 94		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 385		
	tgtgaaactg gaaagaaccc aaatcgggtgt aagtttcaac gaggattggg tcatctgttt		60
	ggtgttgact gttatgtctg gaacagttct cctc		94
40	<210> 386		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 386		
50	tgaccttct tgggttagc c	21	
	<210> 387		
	<211> 87		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
60	<400> 387		

	ctgattttcg agtctatcct attgtggcga aatagtaact ttgaccttac ggcttctttt	60
	tgagttacag agtcgtgtcg cctaggt	87
5	<210> 388 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 388 aagctcagga gggatagcgc c	21
15	<210> 389 <211> 87 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 389 aactttcttca gcacgacgaa gtacaccagc cccatcgccg acttcgtgac gtgcggcatc	60
25	cagtcccacc agtgctccca cccggtc	87
30	<210> 390 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
35	<400> 390 aagtcgtgct gctcatgtg g	21
40	<210> 391 <211> 87 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
45	<400> 391 acaacatcaa catgagggtcg aacacggggt cctacaacgg caggaggaac ttcagctacg	60
	ggaagtcgag ctacgccaaag tggtccc	87
50	<210> 392 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 392 agttgtactc cagctgtgc c	21

5	<210> 393 <211> 87 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 393		
	aaccttatag gtgtgtttga tggacgtttc ctggtcgtca tgaggaggag gaacaagaac		60
	agaattcgcg aactcttcac ccttggg		87
15	<210> 394 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 394		
	tatccacaca aactacctgc a	21	
25	<210> 395 <211> 87 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 395		
	acgtcaactg ttaggtcggg taggtcgtgg tcgttaatgt tgaaagtttc cgaatcgtcc		60
35	tgctcctcgt gatgccttcc tacgtct		87
40	<210> 396 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
45	<400> 396		
	tgacaatcca gccaatccag c	21	
50	<210> 397 <211> 87 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
55	<400> 397		

	gaggccattt ctagccgttg tgtactagag gaccgacttc tagtcagtga ggaagaggtt	60
	gtgagagttg ttagggaggt cgaagta	87
5	<210> 398 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 398 taaagatcgg caacacatga t	21
15	<210> 399 <211> 89 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 399	
	tgtgaaactg gaaagaaccc aaatcgggtg aagtttcaac gaggattggg tcatctgttt	60
25	ggtgttgact gttatgtctg gaacagttc	89
30	<210> 400 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
35	<400> 400 tgaccttct tgggttagc c	21
40	<210> 401 <211> 416 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario	
	<400> 401	
	aaaacgtaat aagttctttt tgtgtgtgtc tgcaggcaat atcaaaaaca taaccatcat	60
	gatgtataga gactgtcggg tccattgtga ggagacattc agtttctctt taaaactcct	120
	tcatcgaaat agtccggtgt tatccctacc tgagcttagt tttttttttt taattttttt	180
	tctgtcctat tgaattattc tattctcttg tccatgttcg acccatccct ttcaaagtat	240
	ctcaaccttc tatcgtttta aagactctct cctatctctt tttggtgttg agtatgtgtg	300
	tatctctact cctagttcat ttgaatcagt ttttctacct tgtctatccc tctgagcta	360
	atgtttgcat cttcttggtg gtcattgatg tatggttgat ataaattcca aataaa	416

5	<210> 402		
	<211> 416		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 402		
	aaaacgtaat aagttctttt tgtgtgtgtc tgcaggcaat atcaaaaaca taaccatcat	60	
	gatgtataga gactgtcggg tccattgtga ggagacattc agtttctctt taaaactcct	120	
	tcattgaaat agtccggtgt tatccctacc tgagcttagt tttttttttt taattttttt	180	
15	tctgtcctat tgaattattc tattgggtcac ttgaccgcca tgacatccct ttcaaagtat	240	
	ctcaaccttc tatcgtttta aagactctct cctatctctt tttggtgttg agtatgtgtg	300	
	tatctctact cctagttcat ttgaatcagt ttttctacct tgtctatccc tcctgagcta	360	
	atgtttgcat cttcttggtg gtcattgatg tatggttgat ataaattcca aataaa	416	
	<210> 403		
20	<211> 416		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
25	<400> 403		
	aaaacgtaat aagttctttt tgtgtgtgtc tgcaggcaat atcaaaaaca taaccatcat	60	
	gatgtataga gactgtcggg tccattgtga ggagacattc agtttctctt taaaactcct	120	
	tcattgaaat agtccggtgt tatccctacc tgagcttagt tttttttttt taattttttt	180	
	tctgtcctat tgaattattc ttttttcttg accttgtaag acccatccct ttcaaagtat	240	
30	ctcaaccttc tatcgtttta aagactctct cctatctctt tttggtgttg agtatgtgtg	300	
	tatctctact cctagttcat ttgaatcagt ttttctacct tgtctatccc tcctgagcta	360	
	atgtttgcat cttcttggtg gtcattgatg tatggttgat ataaattcca aataaa	416	
	<210> 404		
	<211> 107		
35	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
35	<400> 404		
	gtagagaaga atctgtaaag ctcaggaggg atagcgccat gatgatcaca ttcgttatct	60	
	atTTTTTggc gctatccatc ctgagtttca ttggctcttc ttactac	107	

5	<210> 405		
	<211> 107		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 405		
	gtagagaaga atctgtaaag tcgtgctgct tcatgtggat gatgatacaca ttcgttatct	60	
	atTTTTTcca catgaagaag cagcacttga ttggctcttc ttactac	107	
	<210> 406		
15	<211> 107		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
20	<400> 406		
	gtagagaaga atctgtaatg tgtactccag cttgtgccat gatgatacaca ttcgttatct	60	
	atTTTTTggc acaagcttga gtacaactga ttggctcttc ttactac	107	
	<210> 407		
	<211> 107		
25	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 407		
30	gtagagaaga atctgtatat ccacacaaac tacctgcaat gatgatacaca ttcgttatct	60	
	atTTTTTttgc aggtagtgtg tgtggataga ttggctcttc ttactac	107	
	<210> 408		
	<211> 107		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 408		
	gtagagaaga atctgtatga caatccagcc aatccagcat gatgatacaca ttcgttatct	60	
45	atTTTTTgct ggattggatg gattgtcaga ttggctcttc ttactac	107	
	<210> 409		
	<211> 107		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
50	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 409		
	<210> 410		
	<211> 107		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 410		

	<400> 409		
	gtagagaaga atctgtataa agatcggcaa cacatgatat gatgatcaca ttcgttatct	60	
	atTTTTtattc atgtgttacc gatctttaca ttggctcttc ttactac	107	
5	<210> 410 <211> 107 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 410		
	gtagagaaga atctgtatga cttttcttgg gtttagccat gatgatcaca ttcgttatct	60	
15	atTTTTtggc taaacccag aaaggtcaca ttggctcttc ttactac	107	
	<210> 411 <211> 102 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
25	<400> 411		
	taagtacttt cgcttgcaga gagaaatcac agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa	60	
	gtctcttttcc tctgtgattc tctgtgtaag cgaaagagct tg	102	
30	<210> 412 <211> 102 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 412		
	taagtactta agtcgtgctg cttcatgtgg agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa	60	
	gtctcttttcc tctccacata agcaggacga gttaagagct tg	102	
40	<210> 413 <211> 102 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> Oligonucleótido monocatenario		
50	<400> 413		
	taagtactta gttgtactcc agcttgtgcc agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa	60	
	gtctcttttcc tctggcaaag ctgcagtaca actaagagct tg	102	
	<210> 414 <211> 102		

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 414		
	taagtacttt atccacacaa actacctgca agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa	60	
	gtctctttcc tcttgagta gttagtgtgg ataaagagct tg	102	
10	<210> 415		
	<211> 102		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 415		
20	taagtacttt gacaatccag ccaatccagc agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa	60	
	gtctctttcc tctgctgatt ggcaggattg tcaaagagct tg	102	
	<210> 416		
	<211> 102		
25	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
30	<400> 416		
	taagtacttt aaagatcggc aacacatgat agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa	60	
	gtctctttcc tctgatcagt gttggcgatc ttttaagagct tg	102	
35	<210> 417		
	<211> 102		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Oligonucleótido monocatenario		
	<400> 417		
	taagtacttt gacctttctt gggtttagcc agtgggtcaaa aaagttgtag ttttcttaaa	60	
45	gtctctttcc tctgggctaa cccatgaaag gtcaagagct tg	102	

REIVINDICACIONES

1. Un método para modificar un gen que codifica o se procesa en una molécula silenciadora de ARN para un ARN diana en una célula vegetal, comprendiendo el método introducir en la célula vegetal un agente de edición de ADN que redirige una especificidad silenciadora de dicha molécula silenciadora de ARN hacia un segundo ARN diana, siendo dicho ARN diana y dicho segundo ARN diana distintos e introducir en la célula vegetal un oligonucleótido donante para generar un cambio preciso en el genoma, modificando así el gen que codifica la molécula silenciadora de ARN de manera que se suprime la especificidad original de la molécula silenciadora de ARN y se gana una nueva especificidad hacia el segundo ARN diana.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el gen que codifica la molécula silenciadora de ARN es endógeno a la célula vegetal.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha modificación de dicho gen que codifica dicha molécula silenciadora de ARN comprende impartir dicha molécula silenciadora de ARN con al menos un 45 % de complementariedad hacia dicho segundo ARN diana.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha especificidad de silenciamiento de dicha molécula silenciadora de ARN se determina midiendo un nivel de ARN de dicho segundo ARN diana y/o se determina fenotípicamente y/o se determina genotípicamente.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha molécula silenciadora de ARN se procesa a partir de un precursor,
 - opcionalmente, en el que dicha molécula silenciadora de ARN es una molécula de ARN de interferencia (ARNi) seleccionada entre el grupo que consiste en un pequeño ARN de interferencia (ARNpi), un ARN en horquilla corta (ARNhc), un microARN (miARN), un ARN que interacciona con Piwi (ARNip) y un ARNpi que actúa en trans (ARNtasi),
 - opcionalmente, en el que dicha molécula de ARNi se diseña de manera que una secuencia de dicha molécula de ARNi se modifica para conservar la estructura del ARN secundario y para ser reconocida por factores de ARNi celulares.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicha modificación de dicho gen se efectúa mediante una modificación seleccionada entre el grupo que consiste en una delección, una inserción, una mutación puntual y una combinación de las mismas,
 - opcionalmente en el que dicha modificación está en una región de tallo; en una región de bucle; en una región lineal y una región de bucle; en una región no estructurada; o en una región de tallo, una región de bucle y una región no estructurada de dicha molécula silenciadora de ARN,
 - opcionalmente en el que dicha modificación comprende una modificación de como máximo 200 nucleótidos.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho agente de edición de ADN comprende una endonucleasa,
 - opcionalmente en el que el agente de edición de ADN comprende una endonucleasa y una molécula dirigida a ADN,
 - opcionalmente en el que la molécula dirigida al ADN es ARNg,
 - opcionalmente en el que dicha endonucleasa comprende Cas9.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho agente de edición de ADN se aplica a la célula como ADN, ARN o RNP, en el que el agente de edición de ADN se introduce en la célula vegetal utilizando métodos de administración de ADN o métodos sin ADN,
 - opcionalmente en el que el agente de edición de ADN se introduce en la célula vegetal utilizando vectores de expresión,
 - opcionalmente, en el que dicho agente de edición de ADN comprende al menos un ARNg unido operativamente a un promotor expresable en plantas.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho agente de edición de ADN es un sistema de edición de ADN seleccionado del grupo que consiste en una meganucleasa, una nucleasa de dedos de cinc (ZFN), una nucleasa efectora similar al activador de la transcripción (TALEN) y CRISPR.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicho segundo ARN diana es exógeno a la célula vegetal.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, comprendiendo dicho método además generar una

planta que comprende dicha célula vegetal, produciendo así una planta con expresión reducida de dicho segundo ARN diana.

- 5 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que dicho segundo ARN diana es un gen de la planta que confiere sensibilidad a un patógeno o una plaga, o en el que el segundo ARN diana es un gen de un patógeno o una plaga, generando así una planta tolerante o resistente a patógenos o plagas.

FIG. 1

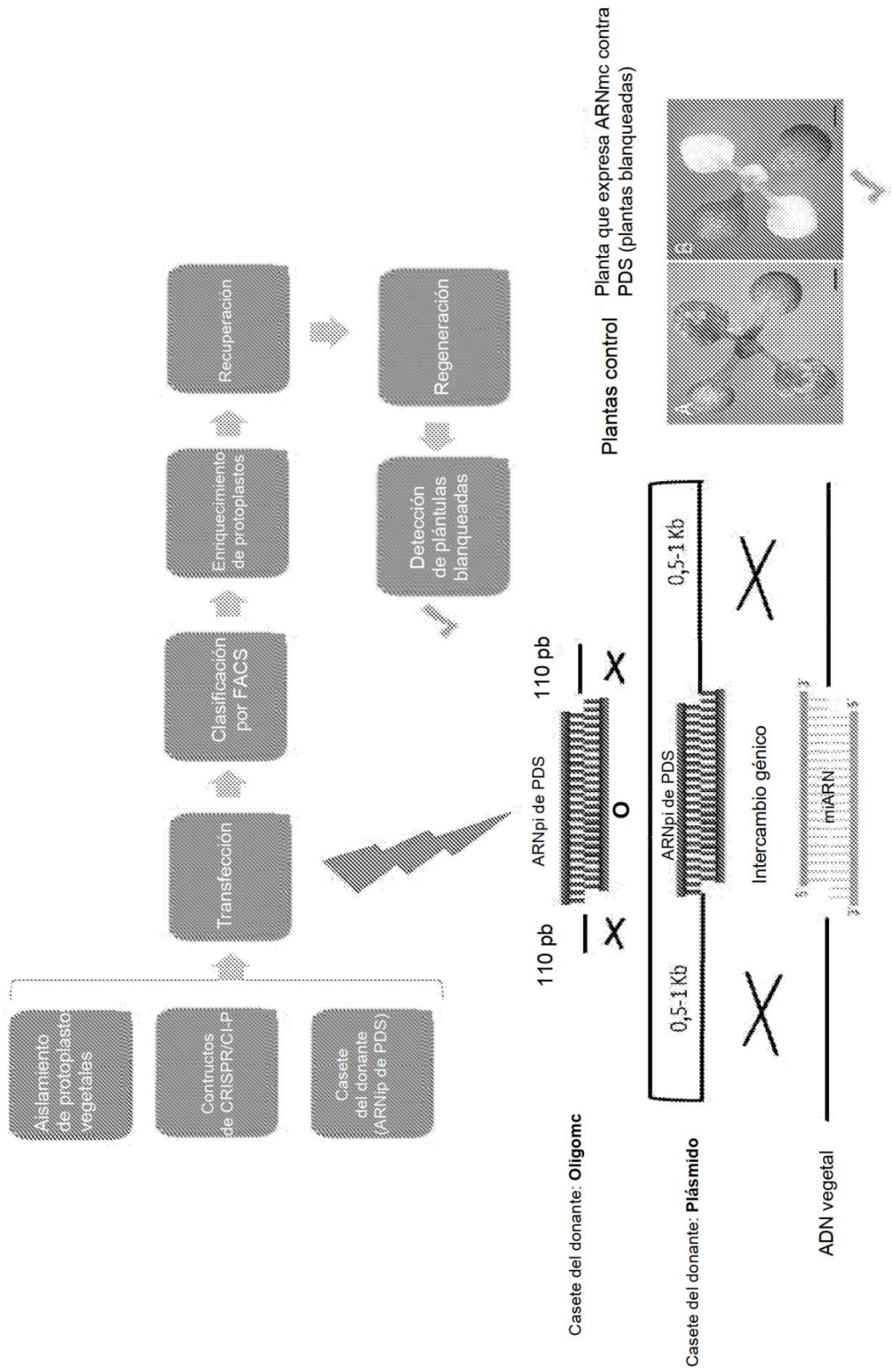


FIG. 2A

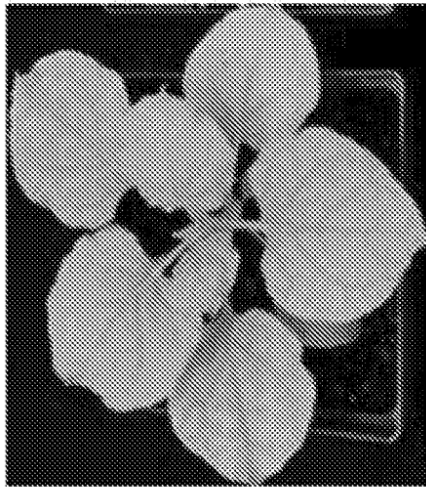


FIG. 2B



FIG. 2C

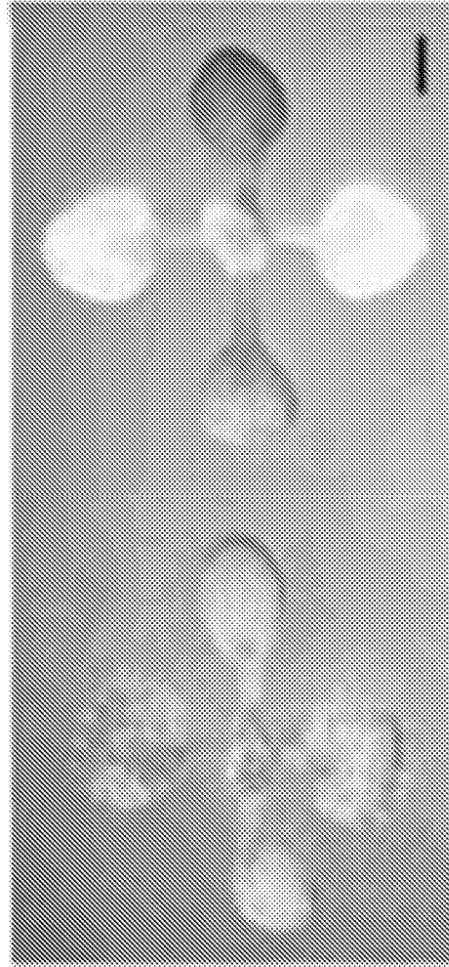
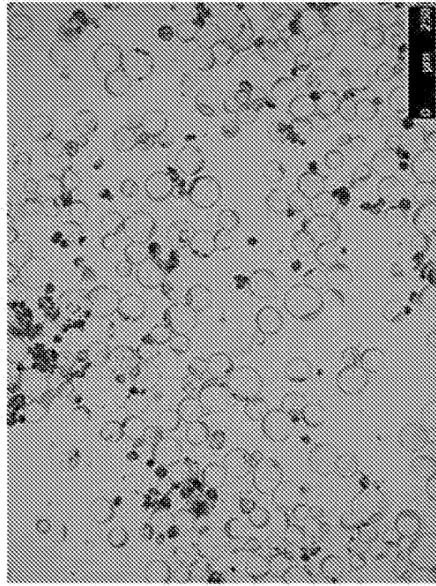


FIG. 3A

Luz



B. GEIGS

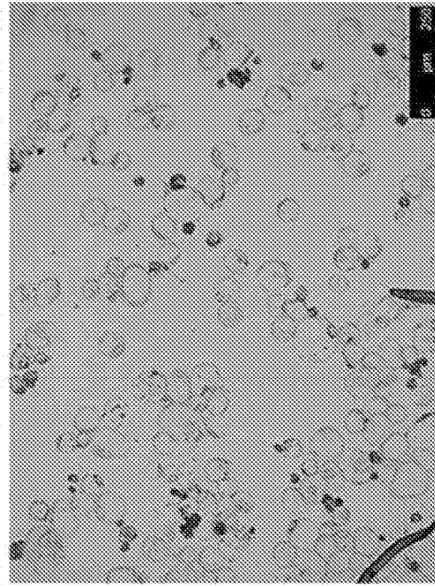


FIG. 3C

FIG. 3B

GFP

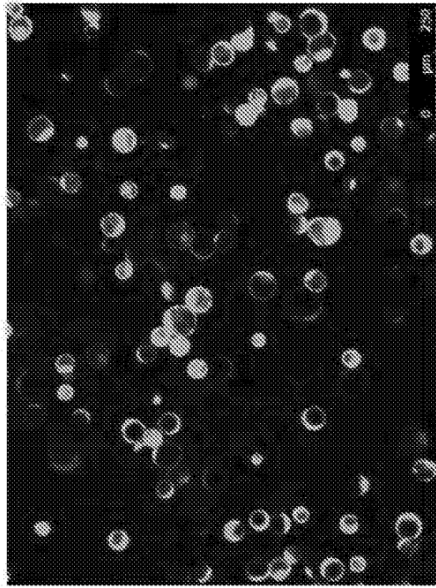


FIG. 3D

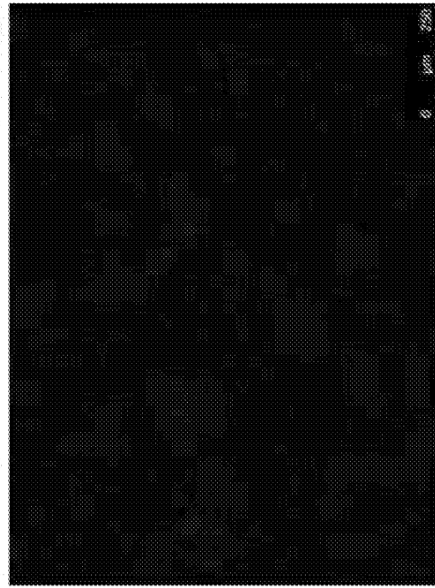


FIG. 4

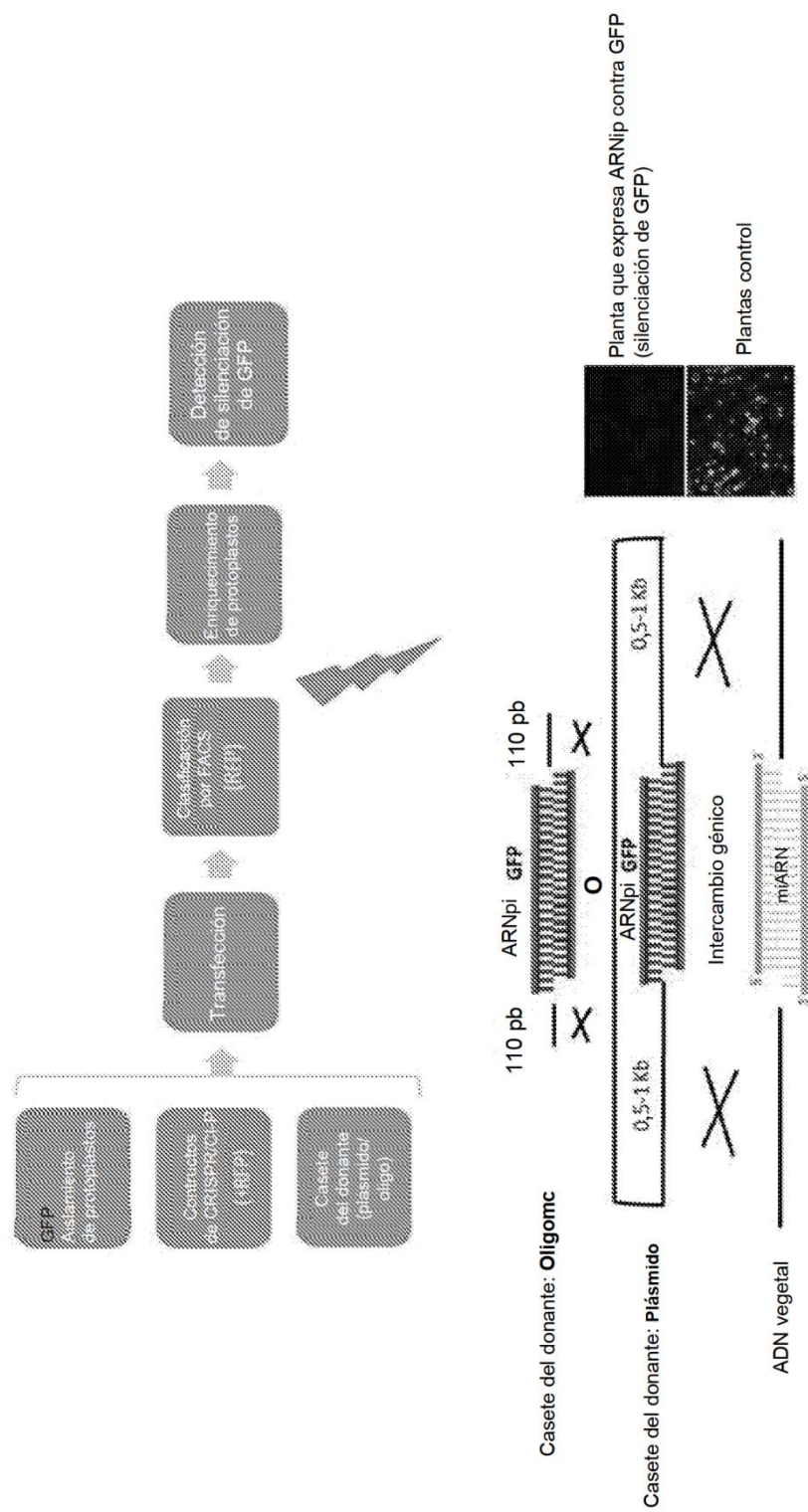


FIG. 5

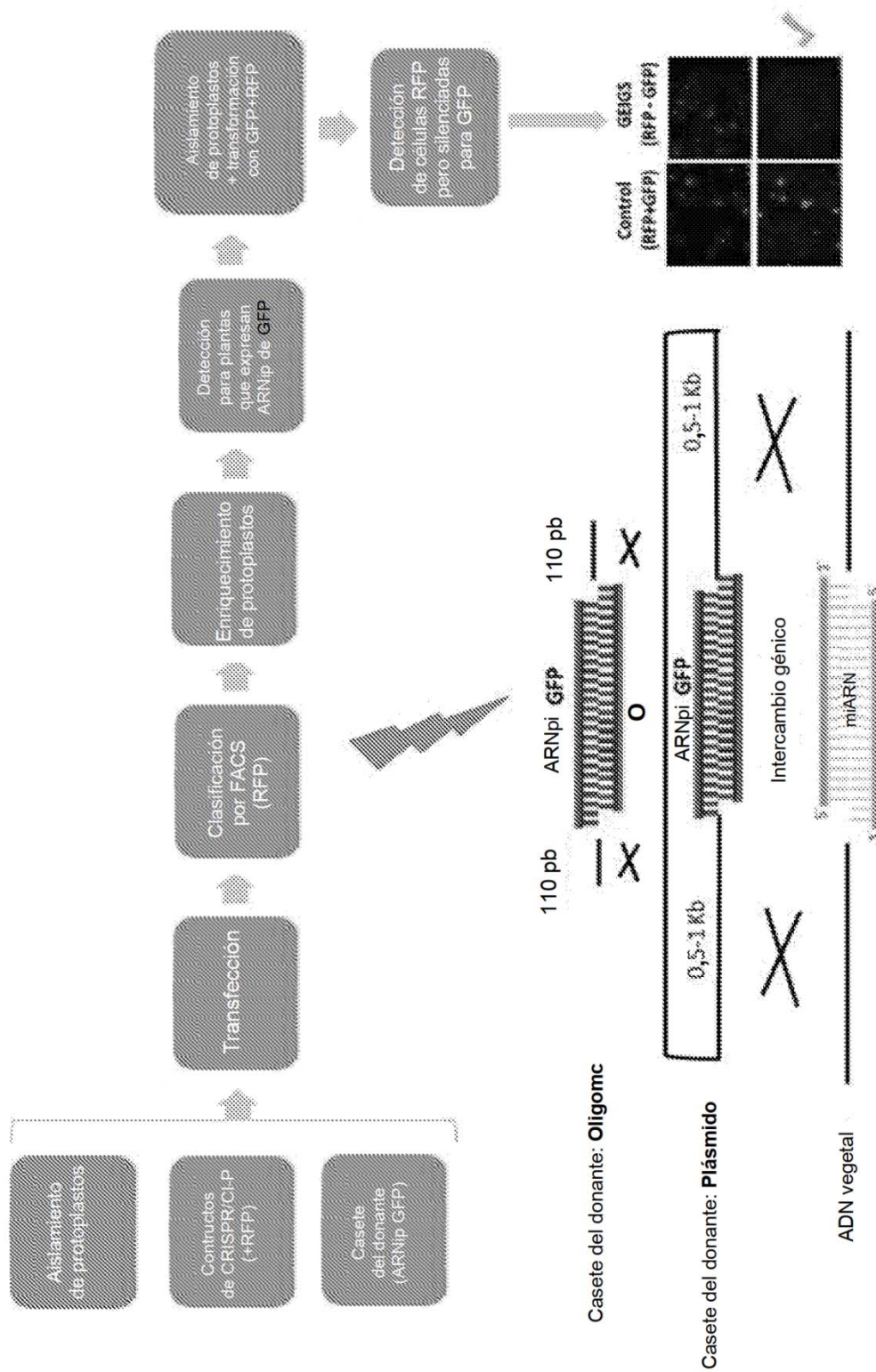


FIG. 6

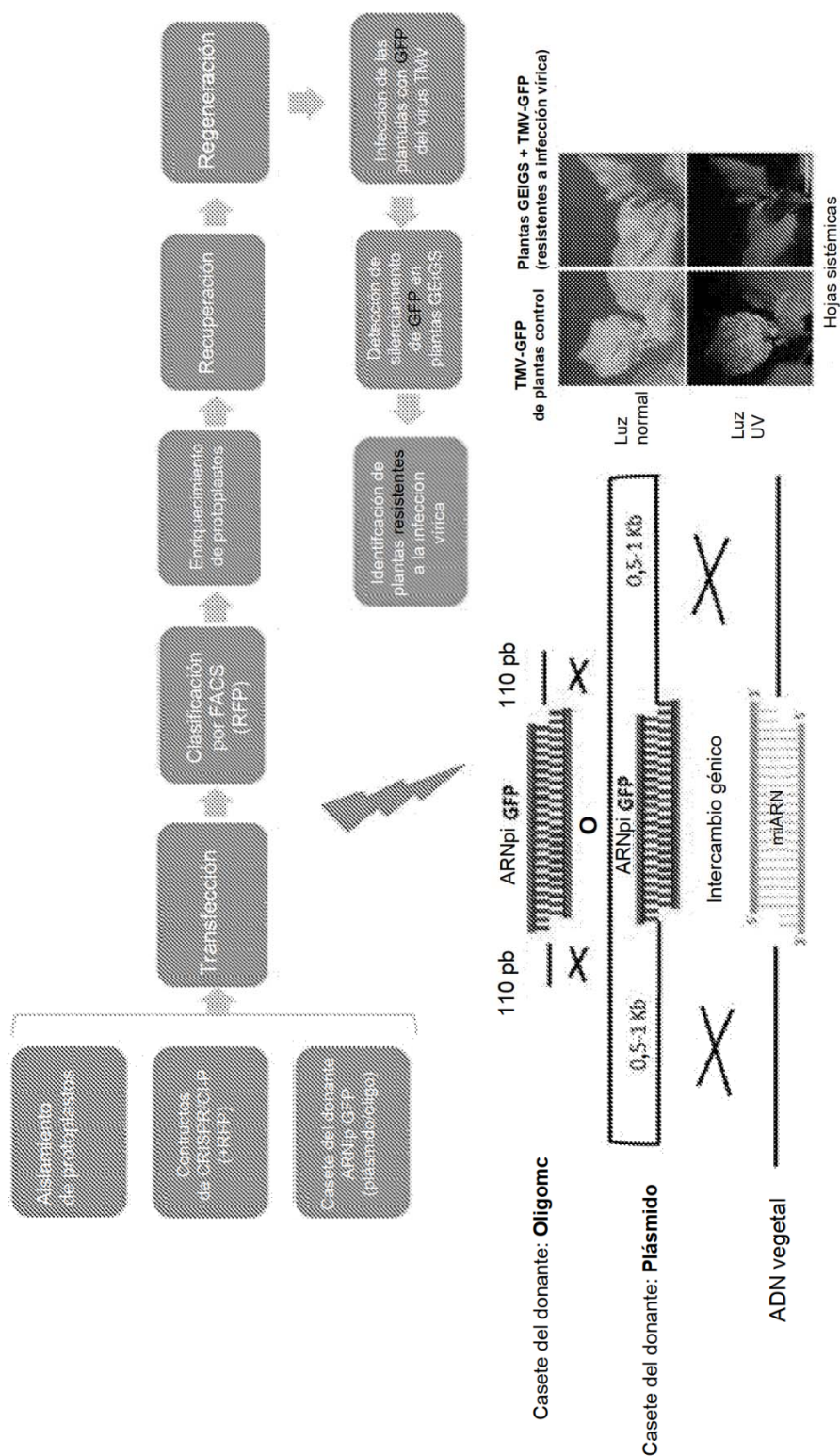


FIG. 7



FIG. 8

Cultivos	Dak Lak		Gia Lai		Kon Tum	
	<i>R. similis</i>	<i>P. coffeae</i>	<i>R. similis</i>	<i>P. coffeae</i>	<i>R. similis</i>	<i>P. coffeae</i>
Plátano	0	+	0	+	0	+
Café	+	+	+	+	0	0
Pimiento	0	0	0	0	0	0
Durio	0	0	0	0	0	+
Cítrico	0	0	0	0	0	+
Piña	0	0	0	+	0	0
Jengibre	0	0	0	-	0	0
Longan	0	+	0	-	0	0
Mango	0	0	0	0	0	0

✖ Se encontraron nematodos 0 No se encontraron nematodos ✖ No se obtuvieron muestras

FIG. 9

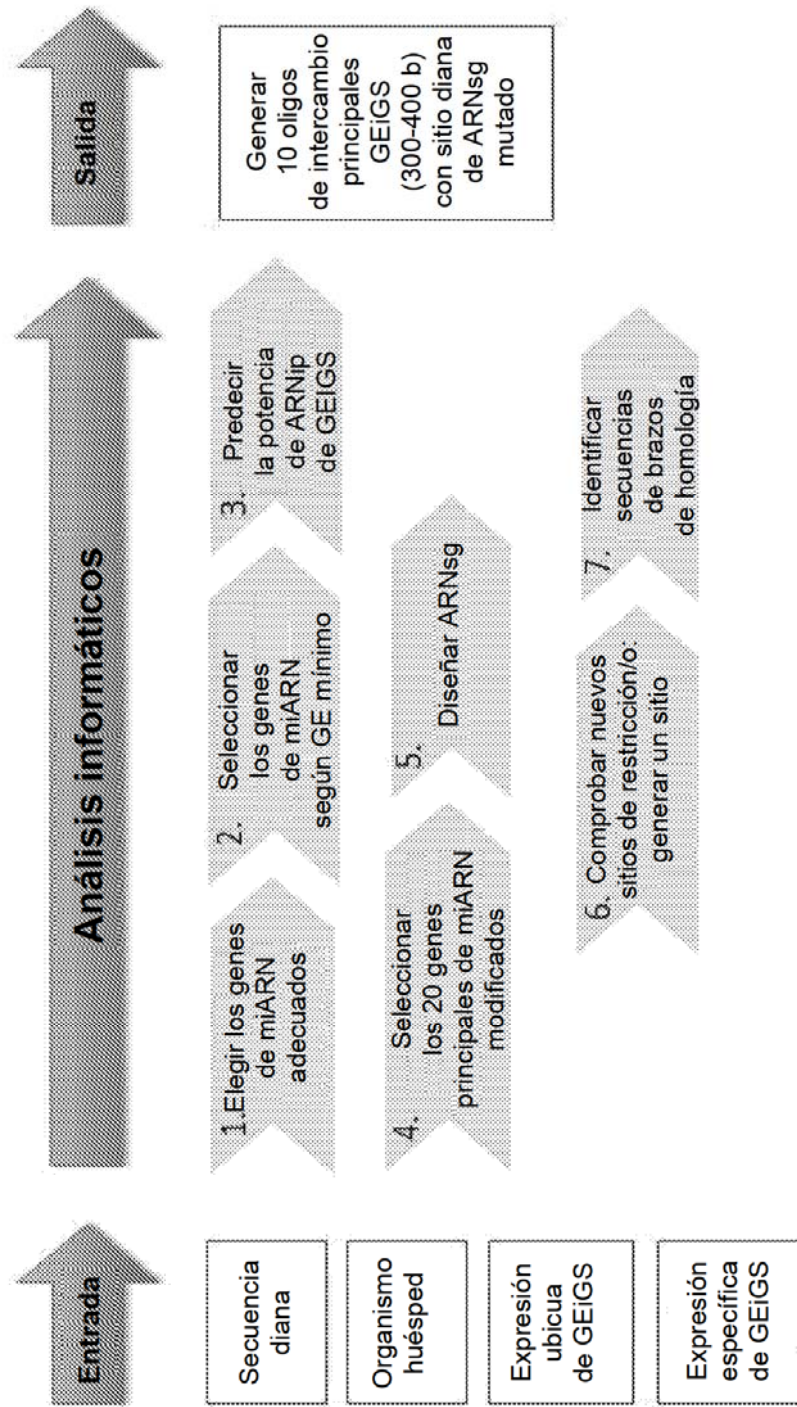


FIG. 10

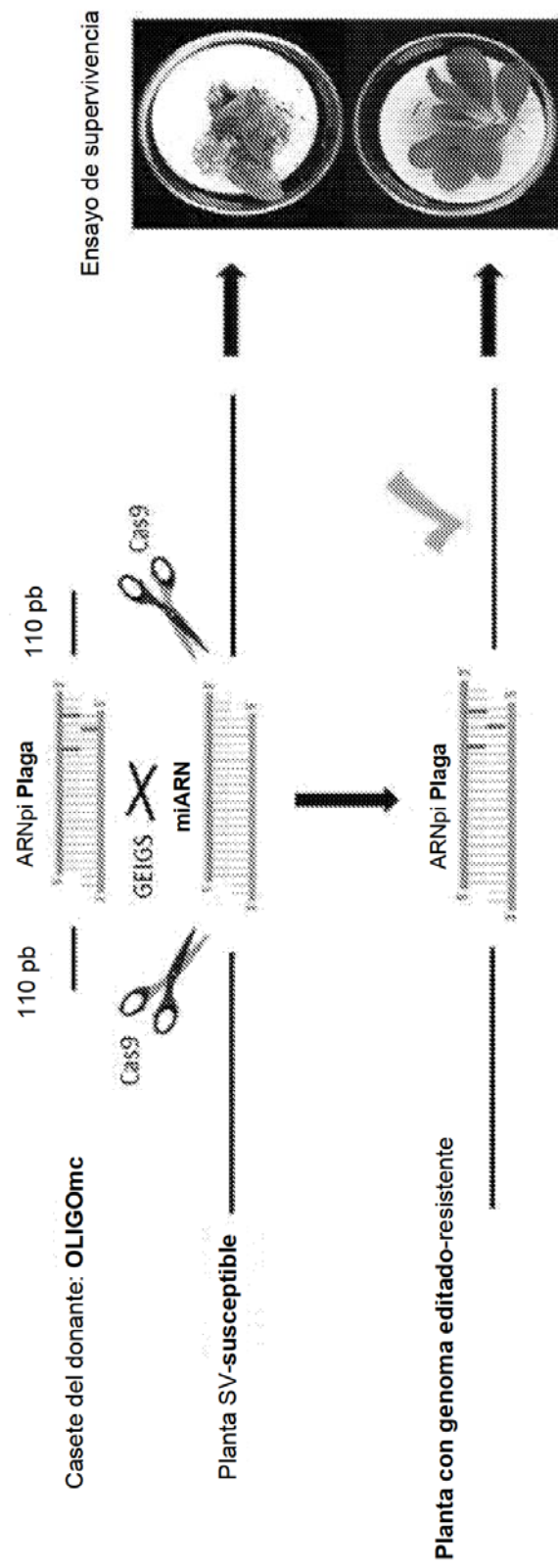
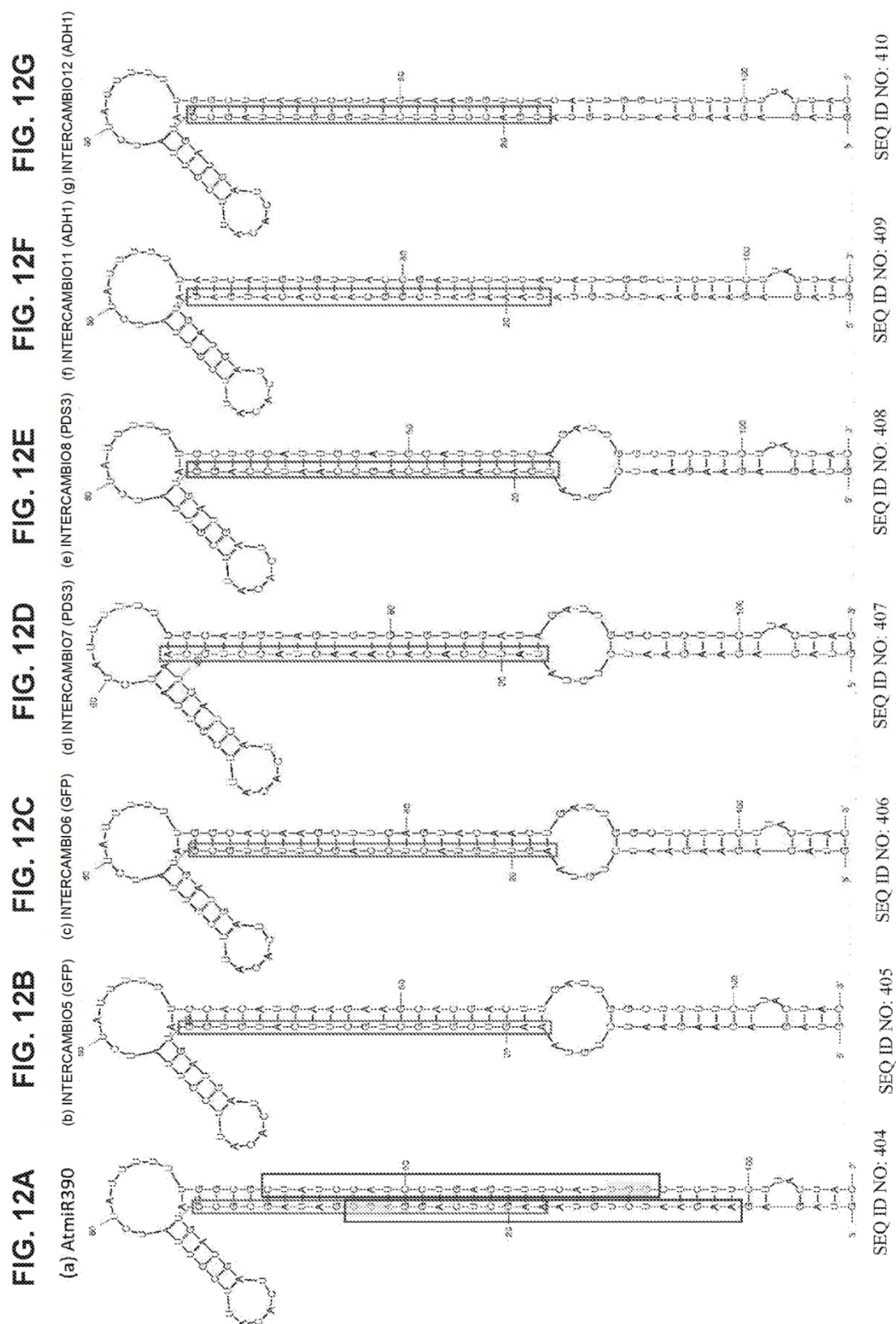


FIG. 11





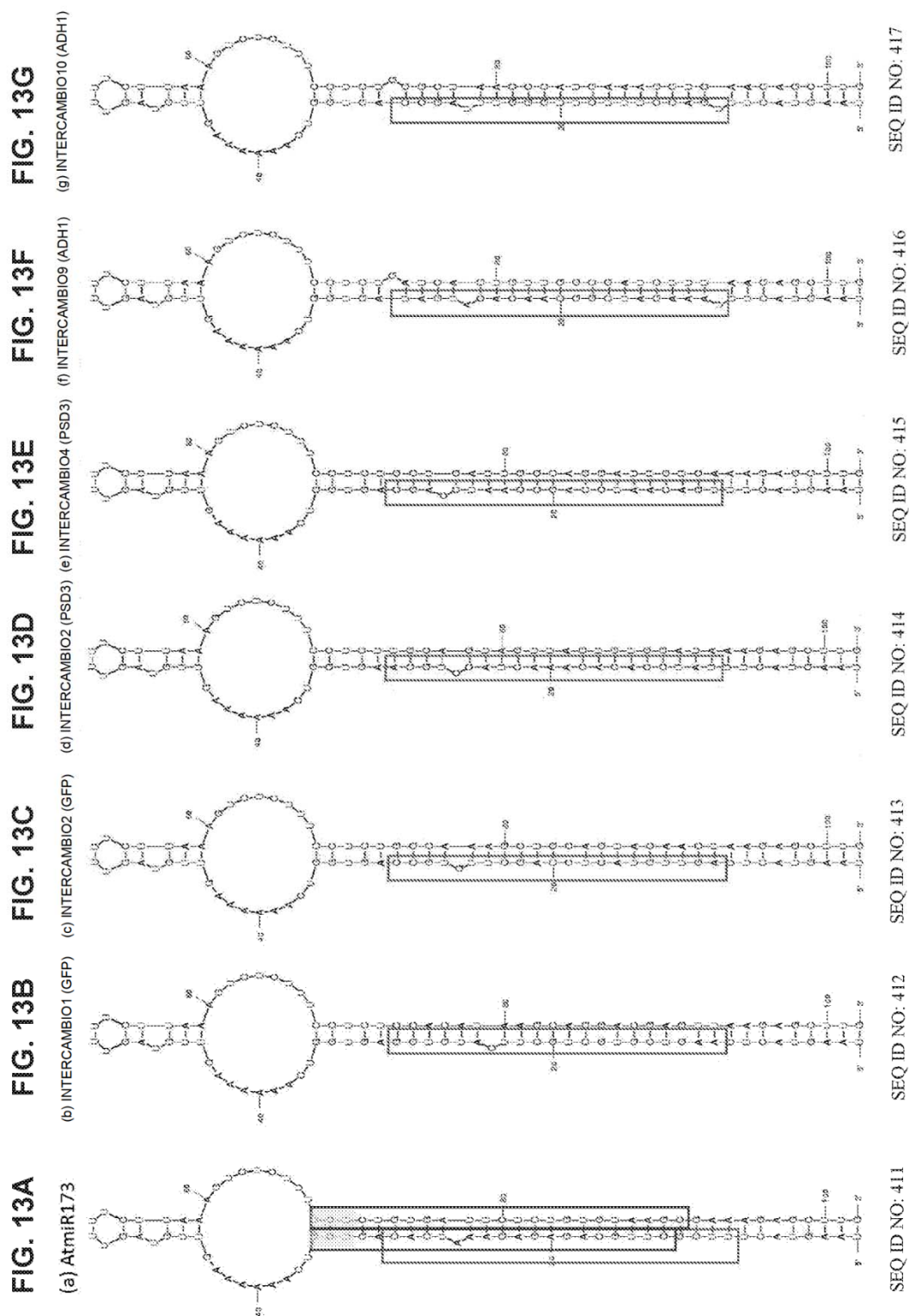


FIG. 13H

SEQ ID NO: 403

T A T T G A A T T A T T G T A T T G T T G A A T T G G G

Precursor
de ARNtasi salvaje

SEQ ID NO: 401

T A T T G A A T T A T T G T A T T G T T G A A T T G G G

Precursor de ARNtasi
salvaje basado en GEiGS
(cambio pequeño de nt)

SEQ ID NO: 402

T A T T G A A T T A T T G T A T T G T T G A A T T G G G

Precursor de ARNtasi
salvaje basado en GEiGS
(cambio grande de nt)

SEQ ID NO: 373

3'-----ACGAGAGCGAACATCTCTTTTATGTGTTGTTGTTACGACAAAGTAGAGCTTTGTAGGCATTGGGTTGCTTTAGTTCTTCTCCTGCCCTTC-----5'

5' - TTGGCTTCAGAGAGCAATCAC - 3' SEQ ID NO: 374

SEQ ID NO: 374

SEQ ID NO: 375

3' ... AAC TTC TTC CAG CAC GAC GAG TAC ACC AGC CCC CAT CGC CGA CTT CGT GAG GTG GGG CAT C CAG TCC CAC CCG GTT CCG GTGCC ... 5'

TCGCCGACTTCGT

SEQ ID NO: 376

3' -----ACAACATCAACATGAGGTCGAACACGGGGTCTCTACAACGGCAGGAGCACTTCAGCTACGGGAAGTCGAGCTACGCCAAGTGGTCCACACAGCGGG-----5'

CAACGGCAGGAGG

5' ... acttgTactcagccttTacc- 3' SEQ ID NO: 378

5'- agtggTactcagcttggTacc- 3'

SEQ ID NO: 378

CEO ID NO. 370

3'-----AACCTTATAGGTGTGTTGATGGACGTTTTCCCTGGTCTGTCATGAGGAGGAGGAACAAGAACAGAATTCCGGAACCTCTTCACCCCTTGGGATTTTCGAT-----5'

TCGTCATGAGGAG

5' - TATCGACAGAGTACCTTgc - 3'

SEO ID NO: 381

3' ACGTCAACTGTTAGGTCGGTTCGGTTCGGTAATGTTGAAGAATTCCGAATCGTCTGCTCCTCGTGATGCCCTCCACGCTAATTGATC.....5'

SEO ID NO: 381

5' - TgacaatccAgcccaAtccagc - 3' SEQ ID NO: 382

5' - "Tgcaatccagccattccagc" - 3'

SEQ ID NO: 383

3'-----GAGGCCATTCTAGCCGTTGTGTACTAGAGGACCGACTTCTAGTCAGTGAGGAAGAGGTTGTGAGAGTTGTTAGGGAGGTCGAAGTACCGGCTT-----5'

GACTTCTAGTCAG

5' -- Taaagatcggcaacacatgac -- 3' SEQ ID NO: 384

5'---TaaagatcggcAcAcAagat-3'

3'-----TG TGAAACTGGAPAGAACCCAAATCGGTGTAAGTTTCAACGAGGATTGGGTCACTCTGTTGGTGTGACGTGTATGTCTGGACAGTTCTCTTC-----5'

SEQ ID NO: 385

5' - TgaCctTctttCgtGcttttagC- 3' SEQ ID NO: 386

5' - TgaCttctcttgggttgaac-3'

SEQ ID NO: 386

SEQ ID NO: 387

SEQ ID NO: 387

SEQ ID NO: 389

SEQ ID NO: 391

SEQ ID NO: 393

SEQ ID NO: 395

SEQ ID NO: 397

SEQ ID NO: 399

FIG. 16

SELECCIÓN DE PDS3 GEIGS

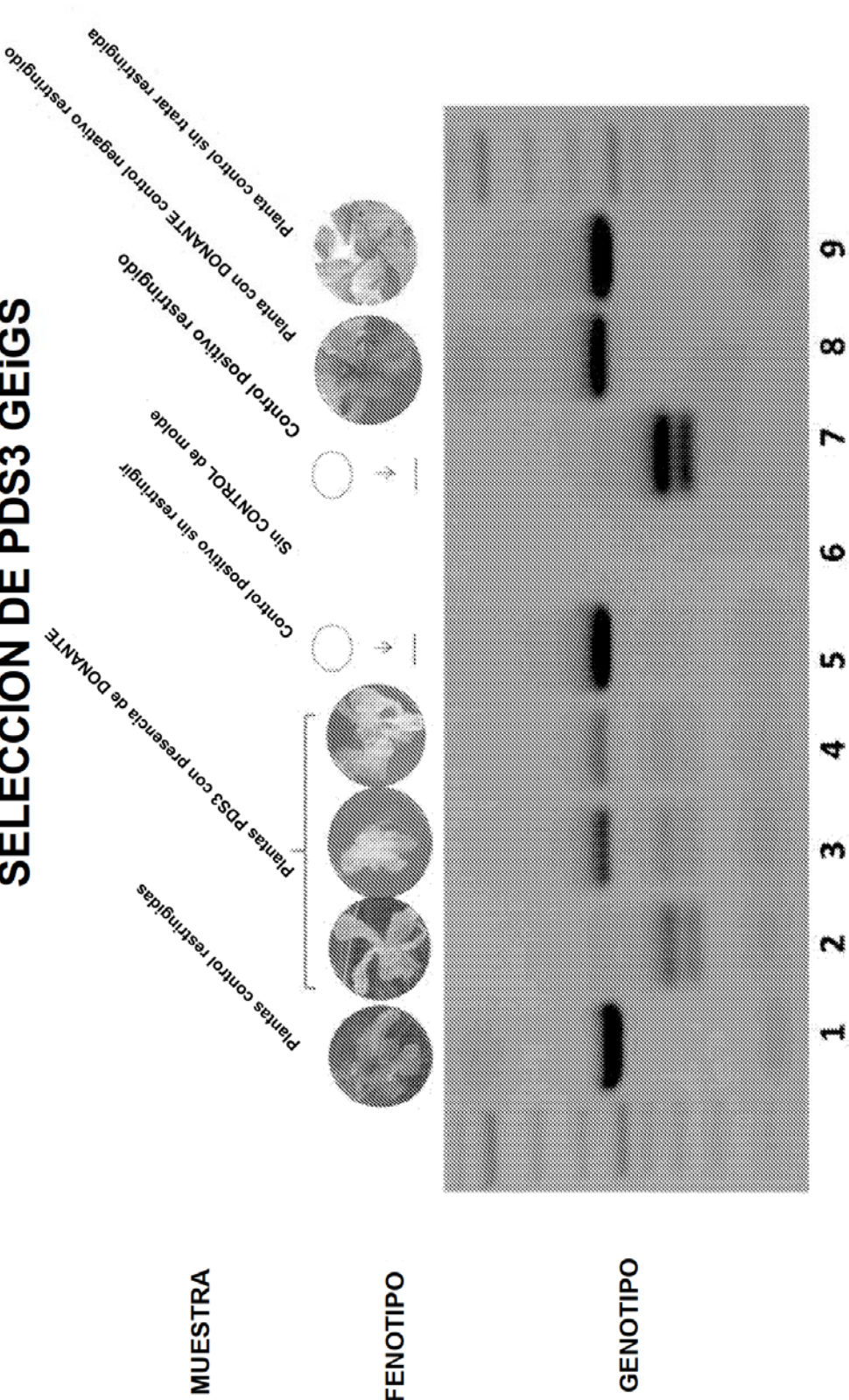


FIG. 17

SELECCIÓN DE ADH1 GEIGS

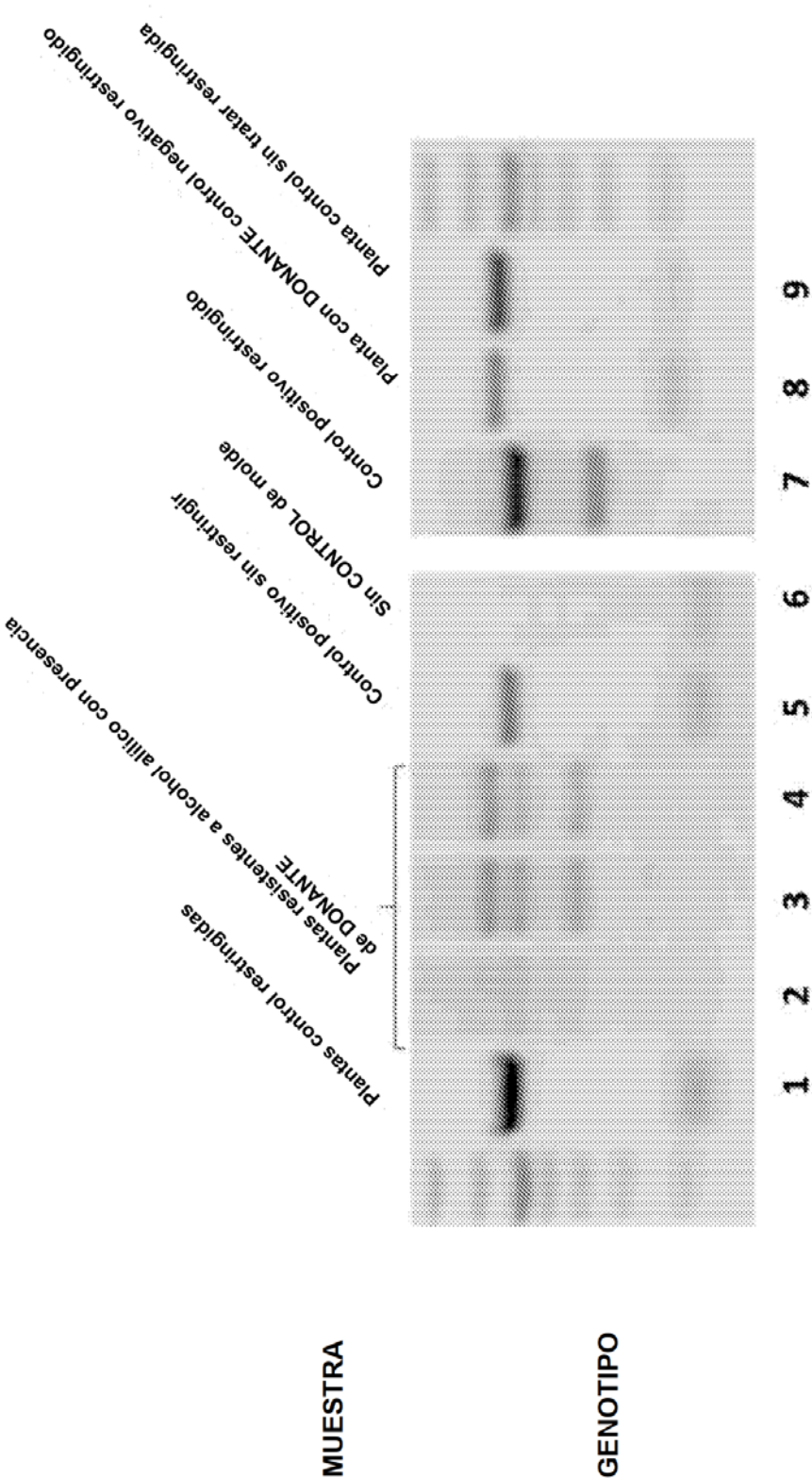


FIG. 18

Expresión de AtPADS3 en planta modificada con GEiGSN.º4 INTERCAMBIO3

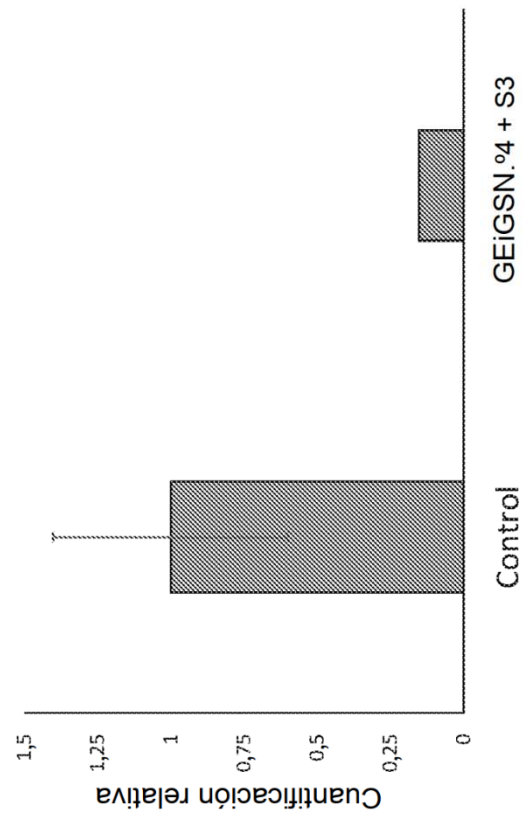


FIG. 19

Expresión de AtPADS3 en planta modificada con GEiGSN.º4 INTERCAMBIO11

