

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 928 056**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2016 PCT/EP2016/079276**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.06.2017 WO17093317**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2016 E 16808953 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2022 EP 3384020**

54 Título: **Movilización de elementos transponibles para mejorar variabilidad genética y epigenética en una población**

30 Prioridad:

02.12.2015 EP 15197663

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

15.11.2022

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT BASEL (100.0%)
Vizerektorat Forschung Petersgraben 35
4003 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BUCHER, ETIENNE y
THIEME, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 928 056 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

Movilización de elementos transponibles para mejorar variabilidad genética y epigenética en una población

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a la movilización de elementos transponibles y sus usos relacionados.

10 Antecedentes de la invención

10

[0002] Los elementos transponibles (ET) fueron descubiertos inicialmente a principios de la década de 1950 por Barbara McClintock debido a su actividad mutagénica que podría influir en la pigmentación del grano (variegación) en el maíz (McClintock, PNAS, 1950 36(6):344-55). Desde su descubrimiento inicial, se han atribuido numerosas funciones a los ET. De hecho, los ET ahora tienden a verse como herramientas moleculares naturales que pueden remodelar el genoma (Bire et al., Methods Mol Biol, 2012; 859: 1-28). Se ha identificado que los ET desempeñan funciones importantes (si no principales) en la estructuración de los genomas del huésped; especialmente las regiones centroméricas son ricas en ET. Se ha encontrado que el número de copias de los retrotransposones de repeticiones terminales largas (RTL) se correlaciona fuertemente con el tamaño del genoma del huésped y la movilización de los ET puede tener un impacto en la organización del genoma al inducir la rotura del cromosoma e influir en la recombinación homóloga. A nivel genético, los ET pueden tener múltiples efectos: causar mutaciones al insertarse directamente en los genes, mover genes dentro del genoma, duplicar y/o crear genes nuevos, regular la expresión génica, crear vías reguladoras novedosas y poner los genes bajo control epigenético. Actualmente, los ET se consideran un mutágeno que puede acentuar el resultado positivo de la mutagénesis en el huésped (Bennetzen et al, Annu Rev Plant Biol, 2014, 65:505-30).

15

20

25

[0003] Los ET han demostrado ser herramientas genéticas muy útiles y se han explotado ampliamente para la alteración y transgénesis de genes en una amplia variedad de organismos. Sin embargo, debido a que, naturalmente, los ET rara vez se activan en condiciones normales de crecimiento, actualmente solo se conocen unos pocos ET activos. Por lo tanto, solo un número muy limitado de ET se está utilizando activamente para la modificación genética. Algunos ejemplos incluyen elementos P (*Drosophila*), PiggyBac (insectos, líneas celulares humanas), elementos L1 LINE (ratón), Mariner (vertebrados), SleepingBeauty (animales). Para crear diversidad genética, estos ET se introducen en los organismos de interés a través de la transgénesis. Sin embargo, esto limita el uso de organismos modificados de esta manera porque son considerados como organismos genéticamente modificados (OGM) por la legislación vigente.

30

35

[0004] En plantas, se ha demostrado que la movilidad de los elementos transponibles está limitada por la metilación del ADN y ciertas marcas de histonas (Miura et al., Nature, 2001, 411(6834):212-4; Mirouze et al., Nature, 2009, 461(7262):427-30). Por lo tanto, la supresión de la metilación del ADN en mutantes genéticos puede dar como resultado la movilización de elementos transponibles. También se demostró que los fármacos que reducen la metilación del ADN (p. ej., 5-aza-2'-desoxicitidina) pueden movilizar ciertos ET de ADN (Scortecci et al., Plant Cell Physiol, 1997, 38(3):336-43). Además, se ha informado que el estrés en plantas defectuosas en la metilación del ADN dirigida por ARN (RdDM) activa elementos transponibles (Ito, H. et al., Nature, 2011, 472: 115-19). Sin embargo, el requerimiento de mutantes genéticos en componentes implicados en la defensa frente a ET está limitando la posibilidad de activar ET en organismos no modelo u organismos de difícil transformación. Por lo tanto, la explotación de ET endógenos para obtener diversidad genética y epigenética es actualmente muy limitada.

40

45

[0005] En condiciones normales de crecimiento, los ET se movilizan muy raramente y los diferentes tratamientos para activar los ET han sido hasta ahora muy ineficaces en eucariotas. Se ha demostrado que los tratamientos con fármacos que reducen los niveles de metilación del ADN genómico permiten una activación leve de los ET (Baubec, T. et al., Plant J, 2009 57:542-54), pero sin dar lugar a nuevas inserciones de esos ET. Se ha demostrado en plantas que las mutaciones en factores implicados en la vía de metilación del ADN dirigida por ARN podrían movilizar ET con una frecuencia elevada. Una limitación importante de estos enfoques es que son ineficaces (tratamiento farmacológico mencionado anteriormente) o requieren mutaciones genéticas que son difíciles de obtener, especialmente en organismos que no son modelo. Por tanto, estos problemas técnicos limitan el uso y el estudio de los elementos transponibles en la mayoría de los organismos.

50

55

[0006] Varshney et al. (Nature Communications 2015. vol 6, página 6569) investigan la transcripción de transposones SINE (elementos Alu en células humanas o B1 y B2 en células de roedores). Las células se tratan con α -amanitina, caetocina (un inhibidor de la metilación de histona-H5K9) o 5-azacitidina (un inhibidor de la metilación del ADN).

60

[0007] Baubec et al. (The Plant Journal 2009. vol 57, n° 3, páginas 542-554) muestran una mayor transcripción de elementos transponibles en *Arabidopsis* tras el tratamiento con zebularina.

60

[0008] Cavrak et al. (Plos Genetics 2014. vol 10, n° 1, page e1004115) explotan el mecanismo de transcripción ONSEN en *Arabidopsis*. ONSEN tiene un elemento sensible al calor y, tras el estrés por calor, se observa un aumento de la transcripción. En los mutantes de la metilación del ADN, la transcripción de ONSEN no aumenta en comparación con el tipo salvaje, si no se aplica estrés por calor adicional.

65

[0009] Matsunaga et al. (Plant and Cell Physiology 2011. vol 53, n° 5, páginas 824-833) investigan la activación de ONSEN

tras el estrés por calor. Se observa que la activación de ONSen ante el estrés por calor es mayor en las plantas descendientes, si las plantas parentales también estuvieron sometidas a estrés por calor.

[0010] El problema que subyace a la presente invención es proporcionar los medios para la movilización eficiente de elementos transponibles. Este problema se resuelve mediante el objeto de las reivindicaciones independientes.

Descripción específica de la invención

[0011] Los inventores proporcionan aquí un tratamiento basado en fármacos que puede movilizar elementos transponibles en plantas. Además, la combinación de este tratamiento con estrés conduce a la movilización de ET específicos que responden a este estrés particular. El tratamiento conduce a una alta acumulación de ADN extracromosómico de los ET activados en el organismo tratado. Además, la progenie del organismo tratado muestra una integración estable de un alto número de copias de ET en el genoma y una mayor resistencia al estrés que forma parte del tratamiento. Por lo tanto, el método de la invención supera la necesidad de mutaciones genéticas para inactivar la defensa ET, permitiendo así que los elementos transponibles se activen eficazmente en prácticamente cualquier eucariota. Esta invención permite la inducción de cambios mediados por ET en el tamaño y la estructura del genoma, la modulación de la expresión génica endógena, la transduplicación génica, la heterosis, la recombinación homóloga y la adaptación al estrés. Además, esta invención permite la identificación de nuevos ET funcionales.

[0012] Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para la movilización de un elemento transponible, particularmente dentro del genoma, de una célula vegetal. El método comprende:

- a) proporcionar una célula vegetal que comprende uno o varios elementos transponibles latentes, es decir, inactivos, y
- b) poner en contacto la(s) célula(s) con un inhibidor de la transcripción, y poner en contacto la célula adicionalmente con un inhibidor de la metilación del ADN,
- c) exponer dicha célula vegetal a un estrés abiótico, estrés biótico o estrés químico,
- d) aislar dicha célula vegetal y determinar si un fenotipo de dicha célula ha cambiado

dando así una célula vegetal con uno o varios elementos transponibles movilizados.

[0013] En el contexto de la presente especificación, los términos *elemento transponible* o *transposones* se utilizan en su significado conocido en la técnica de la genética molecular; se refieren a secuencias de ADN en el genoma de un organismo que pueden cambiar su posición dentro del genoma (mecanismo de cortar y pegar) o ser capaces de producir nuevas copias de sí mismas que se integran en el genoma (mecanismo de copiar y pegar). La transposición puede dar como resultado la multiplicación del elemento, lo que influye en el tamaño del genoma. Hay dos clases de transposones, los transposones de clase 1, también denominados retrotransposones, y los transposones de clase 2, también denominados transposones de ADN. Los retrotransposones se transcriben primero en ARN mediante el aparato molecular provisto por la célula huésped y luego se transcriben de manera inversa en una copia de ADN de doble cadena del ARN, denominado ADN complementario (ADNc), antes de que se inserten en una nueva posición en el genoma. Comparten algunas características como la dependencia de una transcriptasa inversa con los retrovirus. Los transposones de ADN no tienen un intermediario de ARN y son transferidos a su nueva posición en el genoma por una transposasa. La mayoría de los transposones en el genoma están inactivos y no se duplicarán ni cambiarán de posición. Por lo tanto, la activación de transposones también se denomina movilización de transposones. En la Tabla 1 se proporcionan ejemplos de transposones que responden a ciertas tensiones. Estos transposones son activados por la tensión indicada hasta cierto grado. Sin embargo, el uso del método de la invención moviliza estos transposones en un grado mucho mayor, como puede verse en los ejemplos proporcionados.

[0014] En ciertas formas de realización de cualquier aspecto de la invención, se moviliza un transposón de clase 1.

[0015] En ciertas formas de realización de cualquier aspecto de la invención, se moviliza un transposón de clase 2.

[0016] En el contexto de la presente especificación, el término *metilación del ADN* se usa en su significado conocido en la técnica de la biología molecular y la genética molecular; se refiere a la adición de grupos metilo al ADN, que en los eucariotas ocurre principalmente en las citosinas. La metilación del ADN es catalizada por ADN metiltransferasas (DNMT) y se puede dividir en metilación de mantenimiento, que es necesaria para transferir patrones de metilación en cadenas de ADN recién sintetizadas, y metilación de novo. La metilación del ADN está asociada con la inactivación de la expresión génica y el silenciamiento de los transposones. La metilación del ADN puede transmitirse a las siguientes generaciones y, por lo tanto, representa una forma común de modificación epigenética.

Tabla 1: Ejemplos de transposones

Elemento transponible	Estrés activador	Organismo	Referencia
ONSEN	calor, flagelina	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ito et al., 2011, Nature; Yu et al., 2012, PNAS
TLC1,1	ácido salicílico, ácido abscísico, jasmonato de metilo, peróxido de hidrógeno y la auxina sintética 2,4-D.	<i>Solanum chilense</i>	Salazar et al., 2007, Plant Cell
Tnt1A	herida, inductores bióticos y ataques de patógenos de extractos fúngicos	<i>Nicotiana tabacum</i>	Melayah et al., 2001, Plant Journal
Erika1 Sabrina	calor, sequía y cultivo celular de herida	<i>Hordeum vulgare</i>	Alzohairy, et al., 2012; Life Science Journal
Tcs1	frío	<i>Citrus sinensis</i>	Butelli et al., 2012; Plant Cell

[0017] En ciertas formas de realización, el inhibidor de la metilación del ADN es un compuesto exógeno.

[0018] En ciertas formas de realización, el inhibidor de la transcripción es un compuesto exógeno.

[0019] En ciertas formas de realización, el compuesto exógeno es un compuesto de molécula pequeña que tiene una masa molecular de $\leq 1000u$, particularmente $\leq 920u$.

[0020] En el contexto de la presente especificación, el término *compuesto exógeno* se refiere a moléculas que no están presentes en la célula en condiciones fisiológicas a menos que se agreguen técnicamente.

[0021] En ciertas formas de realización, el inhibidor de la metilación del ADN podría estar presente en al menos algunas de las células en al menos algunas condiciones fisiológicas particulares en cantidades mínimas, pero se agrega en el método de la invención en concentraciones mucho más altas para ejercer un efecto significativo. impacto en la fisiología celular. Para conseguirlo, el compuesto está presente en el medio celular a una concentración que se selecciona como mínimo 10 veces superior a la concentración del inhibidor de la metilación del ADN que se encuentra en el interior de la célula.

[0022] En determinadas formas de realización, el inhibidor de la transcripción está presente en la célula en condiciones fisiológicas y presente en un medio a una concentración que se selecciona para ser al menos 10 veces, 100 veces, 1000 veces o incluso 10.000 veces mayor que la concentración del inhibidor de la transcripción que se encuentra en el interior de la célula.

[0023] En el contexto de la presente especificación, el término *estrés abiótico* se refiere al impacto negativo de factores no vivos sobre un organismo vivo en un entorno específico. La variable no viva influye en el medio ambiente más allá de su rango normal de variación. Ejemplos no limitantes de estrés abiótico son calor, frío, sequía, sumersión/exceso de agua, viento, radiación ultravioleta, radiación nuclear, salinidad, metales pesados, pH del suelo, cultivo de tejidos y falta de fósforo, nitrógeno, luz, CO₂ etc. En contraste, el término *estrés biótico* se refiere al impacto negativo de hongos, bacterias, virus, insectos, heridas por herbívoros y competencia biológica, etc.

[0024] El término *estrés químico* se refiere al impacto negativo de sustancias químicas ("factores de estrés") en un organismo vivo. Estas sustancias también pueden comprender sustancias que imitan el estrés sustancias que imitan un estrés abiótico o biótico. Ejemplos no limitantes de factores químicos estresantes son herbicidas, protectores de herbicidas, insecticidas, fungicidas, metabolitos secundarios de plantas, compuestos sintéticos o naturales que inducen la defensa de las plantas.

[0025] El término *protector de herbicidas* se refiere a un compuesto que protege selectivamente las plantas monocotiledóneas del daño de los herbicidas mientras que las plantas dicotiledóneas todavía se ven afectadas por los herbicidas. Las plantas de cultivo comunes como el arroz, el trigo, el maíz, etc., pero también la hierba forrajera, la caña de azúcar y el bambú, son plantas monocotiledóneas, mientras que la mayoría de las especies de malas hierbas son plantas dicotiledóneas. Los protectores de herbicidas se pueden aplicar como aderezo para las semillas antes de la siembra, para preparar el suelo de la agricultura o se pueden aplicar a las láminas de las plantas cultivadas. En los dos últimos casos, se pueden aplicar protectores de herbicidas junto con los herbicidas. Ejemplos de protectores de herbicidas comunes son: Benoxacor (CAS 98730-04-2), Cloquintocet-mexilo (CAS 99607-70-2), Ciometrinilo (CAS 63278-33-1), Diclorimida (CAS 37764-25-3), Fenclorazoletilo (CAS 103112-35-2), Fenclorim (CAS 3740-92-9), Flurazol (CAS 72850-64-7), Fluxofenim (CAS 88485-37-4), Furilazol (CAS 121776-33-8), Mefenpir-dietilo (CAS 135590-91-9), MG 191 (CAS 96420-72-3), anhídrido naftálico (CAS 81-84-5), MON-13900 (CAS 121776-33-8), LAB 145138 (CAS 79260-71-2) y Oxabetrinilo (CAS 74782-23-3).

[0026] En ciertas formas de realización, el elemento transponible es un retrotransposón.

[0027] En ciertas formas de realización, la célula vegetal es una célula de *Arabidopsis*, particularmente *Arabidopsis thaliana*.

[0028] En ciertas formas de realización, la célula vegetal es parte de plantas de cultivo, particularmente de la familia *Poaceae* que comprende plantas tales como arroz, caña de azúcar, maíz, trigo, centeno, cebada, avena o mijo.

[0029] En ciertas formas de realización, la célula vegetal es parte de una planta, y después de la exposición de la célula al paso c), la célula se cultiva para producir un organismo multicelular y se determina el fenotipo de la planta.

[0030] En determinadas formas de realización, el fenotipo del organismo comprende determinar la resistencia al factor estresante, en donde el factor estresante provoca el estrés aplicado en el paso c).

[0031] En ciertas formas de realización, la resistencia al estresor que causa el estrés aplicado en el paso c) se incrementa después de la aplicación del método de la invención.

[0032] También se describe un método para aumentar la variación genética y/o epigenética en una población de plantas. El método comprende:

- i. proporcionar una planta,
- ii. poner en contacto la planta con

- o un inhibidor de la metilación del ADN, y/o
- o un inhibidor de la transcripción,

- iii. propagar la planta, dando lugar a la población de plantas con mayor variación genética y/o epigenética.

[0033] El método moviliza elementos transponibles latentes, es decir, inactivos, no transcritos actualmente o transcritos inversamente, dentro del organismo eucariótico. Dado que, según el conocimiento de los inventores, todos los organismos eucariotas comprenden elementos transponibles latentes dentro de su genoma, el elemento "organismo eucariota" es sinónimo de "organismo eucariota que comprende un elemento transponible latente".

[0034] También se describe que el método comprende adicionalmente un paso ii.a, que sigue al paso ii.: ii.a exponer el organismo eucariótico a un estrés abiótico, estrés biótico o estrés químico.

[0035] En ciertas formas de realización, el inhibidor de la metilación del ADN y/o el inhibidor de la transcripción se proporcionan como una solución en un solvente polar, en particular un solvente aprótico polar, más particularmente sulfóxido de dimetilo (DMSO).

[0036] En determinadas formas de realización, el inhibidor de la metilación del ADN y/o el inhibidor de la transcripción se proporcionan como una solución en un disolvente polar, en particular agua.

[0037] También se describe que el método comprende el paso subsiguiente iv. que comprende:

- a. Determinar cualquier cambio genético y/o epigenético o
- b. Determinar cualquier cambio en el fenotipo, particularmente la resistencia a cualesquiera factores estresantes aplicados en el paso ii.a

en donde estos cambios se determinan en las plantas constituyentes individuales o para una muestra representativa de la población de plantas, o para todas las plantas constituyentes de la población.

[0038] En ciertas formas de realización del primer aspecto de la invención, el estrés abiótico se selecciona de calor, frío, sequía, inmersión/exceso de agua, viento, radiación UV, radiación nuclear, salinidad, metales pesados, pH del suelo, cultivo de tejidos cultivo y privación de fósforo, nitrógeno, luz o CO₂.

[0039] En ciertas formas de realización del primer aspecto de la invención, el estrés biótico se selecciona del impacto negativo de hongos, bacterias, virus, insectos, heridas por herbívoros y competencia biológica. Ejemplos no limitativos de hongos que tienen un impacto negativo serían *Phytophthora infestans* (añublo de la patata) y *Magnaporthe grisea* (añublo del arroz). Ejemplos no limitantes de bacterias que tienen un impacto negativo son *Botrytis cinerea* (moho gris), *Xylella fastidiosa* (síndrome de declive rápido de la aceituna) y *Puccinia spp.* (roya del trigo). Ejemplos no limitantes de virus que tienen un impacto negativo son el virus del mosaico del tabaco y el virus del marchitamiento manchado del tomate. Ejemplos no limitantes de insectos que tienen un impacto negativo son *Mamestra brassicae* (polilla de la col), *Helicoverpa zea* (gusano del maíz) y *Ostrinia nubilalis* (barrenador europeo del maíz). Ejemplos no limitativos de otros organismos que pueden tener un impacto negativo debido a la competencia biológica son *Orobancha* y *Ambrosia trifida* (ambrosía gigante).

[0040] En ciertas formas de realización del primer aspecto de la invención, el estrés químico se selecciona de herbicidas,

protectores de herbicidas, insecticidas, fungicidas, metabolitos secundarios de plantas, compuestos sintéticos o naturales que inducen la defensa de las plantas. Ejemplos no limitantes de compuestos que inducen la defensa de las plantas son la flagelina (compuesto natural, inductor bacteriano; Felix et al., 1999, Plant J.), una secuencia de 22 aminoácidos de la parte N-terminal conservada de la flagelina (flg22), ácido salicílico y análogos, por ejemplo, Bion® (compuesto natural con análogos sintéticos; Vlot et al., 2009, Annu. Rev. Phytopathol.; Friedrich et al., 1996, Plant J.), ácido jasmónico y éster metílico jasmónico (natural compuestos; Cohen et al., 1993, Phytopathology), etileno (compuesto natural; van Loon et al., 2006, Trends Plant Sci.), ácido abscísico (compuesto natural; Mauch-Mani y Mauch, 2005, Curr. Opin. Plant Biol.) y volátiles como terpenos y volátiles de hojas verdes (compuestos naturales; revisado por Unsicker et al., 2009, Curr Opin Plant Biol).

[0041] En ciertas formas de realización del primer aspecto de la invención, el inhibidor de la metilación del ADN es un análogo de nucleósido.

[0042] En ciertas formas de realización del primer aspecto de la invención, el inhibidor de la metilación del ADN se selecciona de 5-azacitidina, 5-aza-2'-desoxicitidina, 5-fluoro-2'-desoxicitidina, 5,6-dihidro-5-azacitidina y zebularina.

[0043] En ciertas formas de realización del primer aspecto de la invención, el inhibidor de la transcripción es un inhibidor de la ARN polimerasa, en particular un inhibidor de la ARN polimerasa II, un inhibidor de la ARN polimerasa IV o un inhibidor de la ARN polimerasa V, más particularmente un inhibidor de la ARN polimerasa II.

[0044] En ciertas formas de realización del primer aspecto de la invención, el inhibidor de la ARN polimerasa II se selecciona de

- amatoxinas, en particular alfa-amanitina (CAS 23109-05-9),
- derivados de amatoxinas, en particular oleato de alfa-amanitina,
- análogos de nucleósidos, en particular 5,6-dicloro-1-beta-D-ribofuranosilbencimidazol (DRB; CAS 53-85-0),
- actinomicina D (CAS 50-76-0),
- flavopiridol (CAS 146426-40-6),
- triptolida (CAS 38748-32-2).

[0045] En ciertas formas de realización de cualquier aspecto de la invención descrita en el presente documento, la amatoxina, en particular la alfaamanitina, se usa con una concentración de 0,0005 µg/ml a 50 µg/ml, en particular de 0,001 µg/ml a 25 mg/mL, más particularmente de 0,005 µg/ml a 20 µg/ml, aún más particularmente de 0,005 µg/ml a 5 µg/ml.

[0046] En ciertas formas de realización de cualquier aspecto de la invención descrita en el presente documento, el inhibidor de la metilación del ADN, en particular la zebularina, se usa a una concentración de 5 µM a 100 µM, en particular de 10 µM a 80 µM, más particular de 10 µM a 40 µM, incluso más particularmente de 20 µM a 40 µM. También se describe que la mayor variación genética y/o epigenética en una pluralidad de plantas da como resultado una mayor resistencia de la planta al estrés abiótico o biótico las plantas han estado expuestas. En otras palabras, el aumento de la variación genética y/o epigenética no es aleatorio como, por ejemplo, se esperaría de un mutágeno químico. El aumento está dirigido hacia la resistencia contra el estrés utilizado en el método. Por ejemplo, el uso del calor de estrés abiótico daría como resultado preferentemente organismos resistentes al calor. Sin desear limitarse a la teoría, los inventores asumen que los transposones se integran preferentemente en el genoma en la vecindad de los genes, creando así nuevas rutas reguladoras de genes que pueden responder al estrés aplicado previamente. Esto puede conducir a una variedad genética en los genes activados por el estrés respectivo y, por lo tanto, confiere una mayor resistencia al estrés respectivo.

[0047] También se describe el uso de una composición en un método según el primer aspecto de la invención. La composición comprende un inhibidor de la metilación del ADN y un inhibidor de la transcripción.

[0048] En ciertas formas de realización de cualquiera de los aspectos de la invención descrita en el presente documento, la relación de las concentraciones molares del inhibidor de la transcripción, en particular alfa-amanitina, al inhibidor de la metilación del ADN, en particular zebularina, es de 0,000005 a 11, más particular 0,000125 a 2, aún más particular 0,000125 a 0,125.

[0049] En ciertas formas de realización, la relación de la concentración molar depende de las concentraciones a y b, que son las siguientes:

- a) el inhibidor de la metilación del ADN, en particular la zebularina, se usa a una concentración de 5 µM a 100 µM, en particular de 10 µM a 80 µM, más en particular de 10 µM a 40 µM, aún más en particular de 20 µM a 40 µM
- b) la amatoxina, en particular alfa-amanitina, se usa en una concentración de 0,0005 µg/ml a 50 µg/ml, en particular 0,001 µg/ml a 25 µg/ml, más particularmente 0,005 µg/ml a 20 µg/ml, aún más particularmente 0,005 µg/ml a 5 µg/ml.

[0050] También se describe un juego de piezas para uso en el método según el primer aspecto de la invención. El kit de piezas comprende un inhibidor de la metilación del ADN y un inhibidor de la transcripción.

[0051] Siempre que las alternativas para características individuales separables, como, por ejemplo, un tipo de inhibidor u organismo, se presenten como "formas de realización", debe entenderse que dichas alternativas pueden combinarse libremente para formar formas de realización discretas de la invención descrita aquí.

[0052] La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y figuras, a partir de los cuales se pueden extraer otras formas de realización y ventajas. Estos ejemplos pretenden ilustrar la invención pero no limitar su alcance.

Breve descripción de las figuras

[0053]

La figura 1 muestra la acumulación de ADN extracromosómico de *ONSEN* tras el tratamiento farmacológico y el estrés por calor. (a) Acumulación de ADN *ONSEN* medida por qPCR directamente después del tratamiento con estrés de control (CS) y estrés por calor (HS) en plantas de tipo salvaje (WT) y *nrbp2-3* y tratamientos con alfa-amanitina (A, 5 µg/ml) o cebularina (Z, 10 µM) (media ± s.e.m., n=6 repeticiones biológicas, valores relativos a Actina2). (b) Número de copias *ONSEN* medido por PCR cuantitativa (qPCR) en plántulas de Columbia (Col) WT directamente después del estrés de control (CS; 24h 6°C), estrés por calor (HS; 24h 6°C y 24h 37°C) y un tratamiento con A (5 µg/ml), Z (40 µM) o una combinación de los mismos (A&Z). (Media ± s.e.m., n= 3 repeticiones biológicas). El tratamiento doble (A y Z) conduce a una activación de *ONSEN* dependiente del estrés por calor muy fuerte que da como resultado hasta 700 copias extracromosómicas de ADN de *ONSEN*.

La figura 2 muestra la dependencia del estrés de la movilización *ONSEN*. El gráfico muestra el número de copias de *ONSEN* en plántulas de *A. thaliana* después del tratamiento químico con A (5 µg/ml), Z (40 µM), las combinaciones de A y Z (A&Z) en plantas WT, *nrbp2-3* y *nrbp1* siguiendo el CS. Número de copias de *ONSEN* medido por qPCR (sem medio, n=3 réplicas biológicas, valores relativos a Actina2). Este resultado muestra que la producción de ADN extracromosómico *ONSEN* depende del estrés por calor.

La figura 3 muestra que la inhibición simultánea de metiltransferasas y Pol II imita al mutante *nrbp1*. (a) Análisis de metilación asimétrica de *ONSEN* RTL y *soloLTR* en plántulas no tratadas y A (5 µg/ml), Z (40 µM) o tratadas con A y Z de WT y el mutante *nrbp1* después de CS. Productos de PCR obtenidos a partir de ADN genómico que se utilizó sin digerir (entrada) o después de la digestión con la enzima de restricción Ddel sensible a la metilación de CHH. Actina2 se incluye como control para la digestión completa de Ddel. El tratamiento doble A&Z con A (5 µg/ml) y Z (40 µM) dio como resultado una reducción muy fuerte de la metilación del ADN en *ONSEN* y *soloLTR* comparable con el mutante *nrbp1*. (b) Transferencia Northern que indica la transcripción *ONSEN* directamente después de CS, HS y HS más el tratamiento con A (5 µg/ml), Z (40 µM) o una combinación de A y Z en plantas WT y *nrbp1*. Se muestra un gel de agarosa teñido con Midori como control de carga. El nivel de la transcripción *ONSEN* de longitud completa después del estrés por calor y el doble tratamiento con A (5 µg/ml) y Z (40 µM) es comparable al mutante *nrbp1*. (c) Acumulación de ADN *ONSEN* medido por qPCR en plántulas de plantas WT, *rdr6*, *dcl2/3/4* y *nrbp1* directamente después de CS, HS y HS más tratamiento con A, Z o una combinación de A&Z. Este resultado muestra que la RNA pol II es activa aguas arriba de las enzimas similares a DICER.

La figura 4 muestra la movilización de *ONSEN* inducida por fármacos en plantas de Arabidopsis de tipo salvaje. (a) Visualización de transposones que confirma nuevas inserciones de *ONSEN* en la generación F2 de HS (control HS) y plantas WT tratadas con HS y A (5 µg/ml) y Z (40 µM) (HS+A&Z). Las copias *ONSEN* integradas se midieron mediante qPCR (parte superior) y se detectaron mediante visualización de transposones (parte inferior). Se representan los números de copia de *ONSEN* de siete plantas individuales no relacionadas seleccionadas. Los números de copias superiores a ocho medidos por qPCR (parte superior) y las bandas adicionales observadas en la pantalla de transposones (parte inferior) en las plantas Col WT tratadas con HS+A&Z indican *nuevas* inserciones de copias *ONSEN* adicionales. M es un marcador de tamaño de 1kb. (b), número de copias de *ONSEN* en la generación F1, F2 y F3 medido por qPCR (n=3 repeticiones técnicas, valores relativos a Actina2) números de copias >8 en las líneas 1-7 indican inserciones de copias adicionales de *ONSEN*. c, y d, fotografías de plantas F2 que contienen nuevas inserciones de *ONSEN* que muestran una variabilidad fenotípica tanto homogénea como dependiente del estrés inducida por el tratamiento HS+A&Z cuando se cultivan en condiciones de días largos (c) y días cortos (d). Faltan los datos de qPCR para la generación F3 de la línea 6 en (b), así como las imágenes de los fenotipos en (c) y (d) debido a la infertilidad severa y la extinción de esta línea. Los ejemplos de fenotipos observados en líneas con nuevas inserciones de *ONSEN* (líneas 1 a 7) incluyen mayor biomasa en condiciones de días cortos (línea 3), floración temprana en condiciones de días largos (línea 7) y acumulación reducida de clorofila (línea 1). En resumen, este conjunto de datos muestra que el tratamiento A&Z conduce a una ráfaga eficiente de transposición *ONSEN*. Las nuevas inserciones de *ONSEN* se heredan de forma estable durante varias generaciones y provocan cambios fenotípicos.

La figura 5 muestra el aumento en el número de copias de *ONSEN* en grupos F1 de plantas tratadas y estresadas por calor. Las plantas parentales se trataron y sometieron a estrés térmico en experimentos independientes (caracteres a-c) con una combinación de A (5 µg/ml) y Z (40 µM). Los grupos con números de copias *ONSEN*

significativamente aumentados (>10) se resaltan en gris oscuro. Número de copias *ONSEN* medido por qPCR (media $\pm$ s.e.m., n=3 repeticiones técnicas, valores relativos a Actina2). Aproximadamente el 29,4% de los grupos F1 probados de plantas de tipo salvaje tratadas con A+Z y estresadas por calor mostraron un número de copias *ONSEN* significativamente mayor.

La figura 6 muestra un resumen de inserciones de *ONSEN* novedosas confirmadas. (a) Amplia distribución del genoma y (b) Primer plano de regiones con nuevas inserciones *ONSEN* en la generación F2 de una planta WT seleccionada tratada con HS+A&Z (línea N° 3). La orientación de las inserciones de *ONSEN* se indica mediante flechas centrales.

La figura 7 muestra la activación inducida por fármacos del retrotransposón *Houba* en arroz (*O. sativa*). Análisis de mobiloma de ADN extraído de plántulas después del crecimiento en condiciones de control (C), A (5 μ g/ml), Z (40 μ M) y la combinación de A y Z. (a) Detalle de la profundidad de cobertura normalizada en comparación con la planta de control sin tratar obtenida después de alinear las lecturas secuenciadas en un elemento *Houba*. (b) Esquema de localización de cebadores (*barra negra*. Elemento *Houba*, *flechas*: cebadores de PCR, recuadro: RTL). (c) las formas circulares extracromosómicas de *Houba* se detectan específicamente en plantas tratadas con A y Z usando PCR inversa con los cebadores que se muestran en 4b. (d) La PCR específica en el ADN del cloroplasto circular se muestra como control de carga. El ADN total sometido a una amplificación de círculo rodante se usó como molde. Estos resultados demuestran la eficiente movilización dependiente de A&Z del transposón *Houba* en el arroz.

La figura 8 muestra una mayor tolerancia al calor en la generación F2 de plántulas de *Arabidopsis* tratadas. Tolerancia al estrés por calor repetitivo (42 °C) en la progenie F2 de plantas de tipo salvaje que solo tenían estrés por calor (control) o estrés por calor y se trataron con A (5 μ g/ml) y Z (40 μ M) (n° 1-3). (a) Se representan dos réplicas biológicas (I y II), (b) Porcentaje de plántulas vitales (Media $\pm$ s.e.m., n = 2 repeticiones biológicas). Las plántulas F2 que se originan de plantas estresadas por calor y tratadas con A&Z muestran una tolerancia al calor significativamente mayor (>60 % de plántulas vitales) en comparación con la F2 de una planta que solo sufrió estrés por calor (10 % de plántulas vitales). Esto demuestra que la movilización dependiente de A&Z de un transposón sensible al estrés por calor puede producir plantas que se adaptan mejor al estrés por calor.

La figura 9 muestra la acumulación dependiente de la dosis de ADN extracromosómico de *ONSEN* tras el tratamiento farmacológico y el estrés por calor. El número de copias de *ONSEN* se midió por qPCR en plántulas de Columbia (Col) de tipo salvaje directamente después del estrés de control (CS), el estrés por calor (HS) y un tratamiento con α -amanitina en diferentes concentraciones dadas en mg/ml. (Media $\pm$ s.e.m., n=3 repeticiones técnicas). Esto muestra que el número de transposones movilizados puede regularse por la cantidad de A utilizada para el tratamiento.

La figura 10 muestra los cambios epigenéticos en el nivel de metilación del ADN inducido por el tratamiento de células vegetales y humanas con A. (a) Gel de agarosa teñido con Midori que muestra una reducción de la metilación del ADN en el *ONSEN* RTL tras el tratamiento farmacológico y el estrés por calor en WT (Col) plántulas directamente después del estrés de control (CS; 24h 6°C), estrés por calor (HS; 24h 6°C y 24h 37°C) y un tratamiento con A (20 μ g/ml), Z (10 μ M) o una combinación de los mismos (A&Z). Se utilizó ADN no digerido como plantilla de PCR para el control de carga (entrada). La PCR en ADN digerido con Ddel muestra una reducción en la metilación del ADN después del tratamiento con A, Z o una combinación de A y Z. (b) Estado de metilación de CHH en *ONSEN* RTL evaluado mediante secuenciación de bisulfito realizada en plantas CS cultivadas en medio con o sin A. (c) Niveles de metilación de ADN LINE-1 evaluados en células cancerosas humanas A549 cultivadas en medio de control y medio suplementado con 0,5 μ g/ml A. Esto muestra que A puede usarse como un potente agente de desmetilación del ADN en plantas y células humanas.

La figura 11 muestra la acumulación de ADN extracromosómico de *ONSEN* tras un tratamiento farmacológico y flagelino combinado. Número de copias *ONSEN* medido por PCR cuantitativa (qPCR) en plántulas de Col de tipo salvaje directamente después del estrés de control, 5 h después del tratamiento con flagelina (flg22) sola o en combinación con A (5 μ g/ml), Z (40 μ M) o una combinación de los mismos (A&Z). (Media $\pm$ s.e.m., n=3 repeticiones técnicas).

La figura 12 muestra la activación de *ATCOPIA17* tras un tratamiento combinado farmacológico y con flagelina. El cambio de veces de *ATCOPIA17* se midió mediante PCR cuantitativa (qPCR) en el ADN total en plántulas del tipo salvaje Col directamente después del estrés de control, 5 h después del tratamiento con flagelina (flg22) sola o en combinación con A (5 μ g/ml), Z (40 μ M) o una combinación de los mismos (A&Z). (Media $\pm$ s.e.m., n=3 repeticiones técnicas).

La figura 13 muestra la acumulación de ADN extracromosómico de *ONSEN* tras el tratamiento farmacológico y el estrés por calor. El número de copias *ONSEN* se midió mediante PCR cuantitativa (qPCR) en el ADN total en plántulas de WT directamente después del estrés de control (CS; 24h 6°C), estrés por calor (HS; 24h 6°C y 24h 37°C) y HS más tratamiento con alfa-aminotina (A, 20 μ g/ml), zebularina (Z, 10 μ M) y HS más la combinación de A&Z. Este resultado demuestra la solidez de los tratamientos independientemente de las concentraciones

relativas de A y Z.

Ejemplos

5 **[0054]** Los inventores han descubierto un método muy eficaz para activar y movilizar ET en eucariotas. El tratamiento involucra medicamentos que se dirigen a mecanismos eucariotas altamente conservados: metilación y transcripción del ADN.

Ejemplo 1

10

15

20

25

30

35

[0055] Con el fin de investigar el papel de Pol II en la movilidad de ET, los inventores eligieron el retrotransposón tipo copia *ONSEN* sensible al calor bien caracterizado (Ito, H. et al., *Nature*, 2011, 472: 115-119) de *Arabidopsis*. Los inventores probaron primero si las plantas deficientes en Pol II mostraban una actividad de ET mejorada. Para ello, los inventores aprovecharon el alelo mutante hipomórfico *nrbp2-3* que acumula niveles reducidos de proteína NRPB2 (Zeng, B. et al., *Genes Dev*, 2009, 23: 2850-2860). Usando PCR en tiempo real, se determinó que desafiar las plántulas *nrbp2-3* por estrés por calor (llamado HS aquí) conduce a un aumento leve en *ONSEN* ADNec en comparación con el tipo salvaje (Fig. 1a). Este resultado fue respaldado por el aumento observado en el ADNc de *ONSEN* después de la inactivación farmacológica de Pol II con 5 mg/ml de α -amanitina (llamada A aquí), un potente inhibidor de Pol II que no afecta a Pol IV ni a Pol V (Haag, JR et al., *Mol Cell*, 2012, 48: 811-818) (Fig. 1a,b). La transcripción por la ARN polimerasa II (Pol II) es inhibida por la α -amanitina, sus derivados u otros inhibidores de la Pol II. La inhibición global de la metilación del ADN se logra mediante tratamientos con zebularina o 5-aza-2'-desoxicitidina (y sus derivados). Con el fin de probar la interacción entre la represión mediada por Pol II de la activación de ET y la metilación del ADN, los inventores cultivaron plantas de tipo salvaje y *nrbp2-3* en medios suplementados con cantidades moderadas de zebularina (llamado Z aquí, 40 μ M para plantas de tipo salvaje, 10 μ M para plantas *nrbp2-3* para garantizar la viabilidad de las plántulas *nrbp2-3*), un inhibidor de las ADN metiltransferasas activas en las plantas (Baubec, T. et al., *Plant J*, 2009, 57: 542-554) y las envió a HS. La presencia de Z en el medio durante HS generalmente mejoró la producción de *ONSEN* ADNec. En particular, este aumento inducido en la acumulación de ADNec fue más claro en el fondo *nrbp2-3* (Fig. 1a). Esto indicó que tanto la metilación del ADN como la actividad transcripcional de Pol II contribuyen a la represión de la producción de ADNc de *ONSEN*. Debido a que tanto la metilación del ADN como la Pol II pueden inhibirse específicamente mediante la adición de diferentes fármacos, los inventores probaron si el tratamiento de plantas de tipo salvaje con A y Z al mismo tiempo podría activar fuertemente e incluso movilizar *ONSEN* después de un tratamiento de estrés por calor. Los inventores del documento cultivaron plántulas WT en medio MS suplementado con cada fármaco individualmente y ambos combinados. De acuerdo con la fuerte activación de *ONSEN* en plántulas *nrbp2-3* *estresadas* por calor y tratadas con Z, el tratamiento combinado (A+Z) de WT dio lugar a una muy alta (Fig. 1b) y dependiente de HS (Fig. 2) acumulación de ADNc de *ONSEN* comparable al mutante *nrbp1* (Fig. 3c).

Ejemplo 2

40

45

50

[0056] Con el fin de comprender mejor el efecto que tenían los fármacos a nivel del ADN subyacente al aumento de la activación de *ONSEN* después de la HS, los inventores evaluaron cómo influyeron en la metilación del ADN en la repetición terminal larga (RTL) de un locus endógeno de *ONSEN* *seleccionado*. (*AT1TE12295*) y en un objetivo RdDM bien caracterizado no relacionado (soloLTR). El tratamiento de plantas con A o Z individualmente ya resultó en niveles reducidos de metilación de CHH en *ONSEN* RTL después de CS (Fig. 3a). La combinación de los dos fármacos conduce a una pérdida de metilación del ADN comparable a la del mutante *nrbp1*. La metilación del ADN en el soloLTR mostró una respuesta diferente a los tratamientos farmacológicos, ya que solo se observó una reducción en los niveles de metilación del ADN en plantas sometidas a un tratamiento combinado A y Z. A continuación, los inventores verificaron mediante Northern Blot si el grado de reducción en la metilación de CHH coincidiría con niveles aumentados de transcripción de *ONSEN* directamente después de HS. Los inventores encontraron que el tratamiento con Z solo ya dio como resultado los niveles de transcripción *ONSEN* más altos después de HS (Fig. 3b). A partir de esta observación, los inventores concluyeron que estos transcritos inducidos por Z adicionales no eran plantillas adecuadas para la producción de ADNc de *ONSEN* (compárense la Fig. 1 y la Fig. 3b).

55

60

[0057] En *Drosophila*, se ha demostrado que la transcripción antisentido mediada por Pol II da como resultado la producción de ARNs derivados de ET de una manera dependiente de Dicer-2 (Russo, J. et al. *Genetics*, 2016, 202:107-21). Apoyando esta noción para *Arabidopsis*, una publicación reciente señaló la importancia de DCL3 en la regulación de *ONSEN* en el fondo *ddm1* (Panda, K. et al. *Genome Biol*, 2016, 17:1-19). Para dilucidar si el efecto de la inhibición de Pol II también dependía de dicer, los inventores cultivaron tanto el mutante triple *rdR6* como *dcl2/3/4* (defectuoso en tres de las cuatro enzimas similares a dicer de plantas, DCL) en A, aplicaron HS y midió el ADNec de *ONSEN*. Los inventores descubrieron que A seguía potenciando la acumulación de ADNec en *rdR6* mientras que la inhibición de Pol II no tenía ningún efecto en el mutante triple *dcl2/3/4* (Fig. 3c). Este resultado respalda la noción de que Pol II actúa aguas arriba del paso de procesamiento catalizado por los DCL.

Ejemplo 3

65

[0058] La movilización de ET endógenos en plantas ha sido hasta ahora muy ineficaz, limitando así su uso en investigación básica y cultivo de plantas. No hemos observado previamente la transposición de *ONSEN* en plantas de tipo salvaje

tratadas con HS (Ito, H. et al. Nature, 2011, 472:115-119). Debido a que el tratamiento farmacológico A&Z dio como resultado una mayor acumulación de ADNc de *ONSEN* en un grado similar al de *nrrpd1*, los inventores probaron si el tratamiento farmacológico combinado podría conducir a una movilización eficiente de *ONSEN* en plantas de tipo salvaje. En primer lugar, los inventores evaluaron mediante PCR en tiempo real si, y a qué frecuencias, podían detectarse nuevas copias de *ONSEN* en la progenie de plantas tratadas con A&Z y estresadas por calor. Los inventores encontraron nuevas inserciones de *ONSEN* en el 29,4 % de los grupos F1 probados (n = 51) con un número medio de copias de los grupos que alcanzaba hasta 52 (Fig. 5). A continuación, los inventores confirmaron las nuevas inserciones estables de *ONSEN* en un subconjunto de plantas individuales independientes de alto número de copias mediante visualización de transposones (Fig. 4a), PCR en tiempo real (Fig. 4b) y secuenciación de algunas inserciones en una línea seleccionada de alto número de copias (#3) (figura 6). La combinación de HS, A y Z dio como resultado un número de copias *ONSEN* extracromosómicas similar al observado previamente en plantas deficientes en RdDM. Los inventores detectaron nuevas inserciones de *ONSEN* en la progenie del 27 % de las plantas tratadas. Según las mediciones de qPCR, se detectaron hasta 90 +/-6 copias insertadas en plantas individuales en la F2 y generaciones sucesivas de plantas tratadas con A, Z y HS (Figura 4a). Estas inserciones fueron confirmadas además por visualización de transposones. Los inventores no observaron aumentos adicionales en el número de copias de *ONSEN* durante tres generaciones, lo que indica que las nuevas inserciones eran estables y que *ONSEN* ya no se transponía (Fig. 4b).

[0059] Las inserciones de ET pueden interrumpir genes o alterar su expresión mediante el reclutamiento de marcas epigenéticas o mediante la transcripción de lectura dependiente del estrés desde el 3'RTL en regiones flanqueantes (Lisch, D., Nat Rev Genet, 2013, 14: 49-61). Para probar esto, los inventores hicieron crecer la generación F2 de las líneas de alta copia seleccionadas antes mencionadas en condiciones de día largo y corto. Los inventores observaron que muchas líneas mostraban fenotipos claros y homogéneos en respuesta a las diferentes condiciones de crecimiento (tamaño de la planta, contenido de clorofila y tiempo de floración, Fig. 4c y d).

Ejemplo 4

[0060] Los inventores probaron si Pol II desempeña un papel más general en la represión de los ET en las plantas. Debido a su paisaje epigenético significativamente diferente en comparación con *Arabidopsis*, los inventores eligieron el cultivo de arroz monocotiledóneas genéticamente bien caracterizado *O. sativa* (Kawahara, Y. et al., 2013, Rice, 6: 4-10). Con el fin de capturar ET movilizados inducidos por fármacos, los inventores caracterizaron el mobiloma activo en plántulas de *O. sativa* que se cultivaron en medio MS complementado sin fármacos, solo A, solo Z o la combinación de A y Z, usando un método que permite secuenciar específicamente el ADN circular extracromosómico (eccDNA). ADNec es un subproducto del ciclo de vida del retrotransposón RTL. Usando este enfoque, los inventores identificaron *Houba*, una copia como retrotransposón (Panaud, O. et al., Mol. Genet. Genomics, 2002, 268: 113-121), como altamente activado solo cuando las plantas fueron tratadas con A y Z (Fig. 7a). Los datos de secuenciación se confirmaron mediante una PCR específica de ADNec en los RTL *Houba* (Fig. 7b y c).

Ejemplo 5

[0061] Debido a que el tratamiento con A solo redujo la metilación del ADN (Fig. 3a) en *Arabidopsis*, los inventores querían probar la solidez y generalidad de este tratamiento. Para confirmar la robustez, las plantas se trataron con A (20 µg/ml), Z (10 µg/ml) y A&Z. Una sola metilación del ADN ya fuertemente reducida a esta concentración más alta (Fig. 10a), este resultado fue luego respaldado por la evaluación de la metilación del ADN en el contexto CHH mediante secuenciación con bisulfito (promedio de 10 clones secuenciados para cada muestra). Debido a que A inhibe la enzima RNA Pol II altamente conservada y que A también es activa en células humanas, los inventores probaron el efecto de A sobre la metilación del ADN en la línea celular de cáncer humano A549. Se evaluó el contenido global de metilación del ADN en las células y se comparó con células no tratadas o tratadas con Z. La suplementación del medio de cultivo con A (0,5 µg/ml) dio como resultado una reducción del 40 % de la metilación del ADN. Esta reducción fue comparable a un tratamiento con el agente desmetilante de ADN Z (350 µM) (Fig. 10c). A continuación, los autores también evaluaron los niveles de metilación del ADN en el retrotransposón del *elemento 1 intercalado largo (LINE-1)*. En LINE-1 A tuvo un efecto aún más pronunciado en la reducción de la metilación del ADN que Z (40% versus 20% de reducción, respectivamente). Estos resultados demuestran que un inhibidor de la transcripción puede usarse como un potente agente de desmetilación del ADN en células eucariotas.

Plantas y condiciones de crecimiento

[0062] Después de la estratificación durante dos días a 4 °C, las plantas de *Arabidopsis thaliana* (acceso Col-0) se cultivaron en medio ½ MS estéril con sacarosa al 1 % y un pH de 5,8 (medio de control) en condiciones de día largo. (16 h luz) a 24°C (día) y 22°C (noche), respectivamente. Las plantas de *Oryza sativa* se cultivaron en medio ½ MS estéril con sacarosa al 1% y un pH de 5,8 (medio control) durante 16 h a 28 °C (día) y 27 °C (noche), respectivamente.

[0063] Con el fin de analizar generaciones sucesivas, las plántulas se transfirieron al suelo y se cultivaron en condiciones de día largo (16 h de luz) a 24 °C (día) y 22 °C (noche) (*A. thaliana*) en una cámara de crecimiento Sanyo MLR-350 hasta la madurez de la semilla.

[0064] Para el fenotipado, las plantas de *A. thaliana* se cultivaron en condiciones de día largo (16 h de luz) a 24 °C (día)

y 22 °C (noche) y en condiciones de día corto (10 h de luz) a 21 °C (día y noche.) y 18 °C (noche).

[0065] La inducción de cambios epigenéticos y la activación e integración estable de elementos transponibles en plántulas de *Arabidopsis* se mejoró al germinarlas y cultivarlas en un medio ½ MS que contenía zebularina (concentración final: 10-40 µM), α-amanitina (concentración final: 0,005-20 µg/ml) o una combinación de ambos productos químicos (medios inductivos).

[0066] Con el fin de desencadenar la transposición del retrotransposón sensible al calor *ONSEN*, se expusieron plántulas de siete días a un choque de frío durante 24 horas a 6 °C seguido de estrés por calor durante 24 horas a 37 °C (estrés por calor, HS) en condiciones controladas en cámara de crecimiento (Sanyo). Las plantas de control se transfirieron nuevamente a condiciones de día largo de 24 °C (día) y 22 °C (noche) después del tratamiento con frío a 6 °C durante 24 h (CS, estrés de control, según Ito et al., 2011).

[0067] Para desencadenar una respuesta de estrés biótico, se cultivaron plántulas de *Arabidopsis* de nueve días de edad durante nueve días en 5 µg/ul de alfa-amanitina y 40 µM de zebularina y se rociaron con flg22 (10 mM). Después de 5 h de incubación, se extrajo el ADN total de la parte aérea de las plántulas y se evaluó el número de copias de ET mediante qPCR.

qPCR en el ADN total para medir el número de copias de ONSEN y COPIA17

[0068] El ADN total de plántulas y plantas adultas se aisló usando un DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN).

[0069] En preparación para la medición de copias de ADN extracromosómico de *ONSEN* en CS/HS y plántulas no tratadas/tratadas, las raíces se diseccionaron directamente después del estrés por calor y las plantas se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido hasta la extracción del ADN.

[0070] Para rastrear los números de copias *ONSEN* en las generaciones F1-F3 de control y líneas de copias altas, se extrajo ADN de hojas verdaderas.

[0071] Para la estimación de la frecuencia de transposición de *ONSEN*, se aisló el ADN total de grupos que constaban de al menos ocho plántulas de la progenie de plantas tratadas con HS+A&Z. La concentración de ADN se midió con un fluorómetro Qubit (Thermo Fisher Scientific).

[0072] Los números de copias de *ONSEN* se determinaron con qPCR en el ADN total usando una mezcla maestra TaqMan (Life Technologies) en un volumen final de 10 µl en el Light-Cycler 480 (Roche). El número de copias de *ACTOPIA17* se midió mediante PCR cuantitativa (qPCR) en un Light-Cycler 480 (Roche), usando XYBR 421 Green I Master Mix. Actina 2 (At3g18780) sirvió como gen estándar para la normalización. Las secuencias de los cebadores y sondas para las qPCR se enumeran en la tabla 2.

[0073] Para el análisis de mobiloma-seq, el ADN de las partes aéreas de tres plántulas *O. sativa* se extrajo como antes (Mette, M. et al., EMBOJ, 1999, 18: 241-248).

[0074] Se purificaron 5 µg de ADN genómico de cada muestra utilizando un kit GeneClean (MPBio, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. El ADNec se aisló del producto GeneClean usando PlasmidSafe DNase (Epicentre, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, excepto que la incubación a 37 °C se realizó durante 17 h. Las muestras de ADN se precipitaron añadiendo 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M (pH 5,2), 2,5 volúmenes de etanol y 1 µl de glucógeno (Fisher, EE. UU.) e incubando durante la noche a -20 °C. El ADN circular precipitado se amplificó mediante amplificación de círculo rodante aleatorio utilizando el kit Illustra TempliPhi (GE Healthcare, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, excepto que la incubación se realizó durante 65 horas a 28 °C. La concentración de ADN se determinó utilizando el kit DNA PicoGreen (Invitrogen, EE. UU.) usando un LightCycler480 (Roche, EE. UU.). Se utilizó un nanogramo de ADNec amplificado de cada muestra para preparar las bibliotecas utilizando el kit de bibliotecas Nextera XT (Illumina, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La calidad y la concentración del ADN se determinaron utilizando un chip Bioanalizador de ADN de alta sensibilidad (Agilent Technologies, EE. UU.). Las muestras se agruparon y cargaron en una plataforma MiSeq (Illumina, EE. UU.) y se realizó una secuenciación de extremos emparejados de 2x250 nucleótidos. El control de calidad de los archivos FASTQ se evaluó mediante la herramienta FastQC (versión 0.10.1). Para eliminar cualquier lectura procedente de genomas circulares de orgánulos, las lecturas se mapearon 198 contra los genomas de mitocondrias y cloroplastos usando el programa Bowtie2 versión 2.2.2 71 con mapeo local sensible. Las lecturas no mapeadas se mapearon contra el genoma de referencia IRGSP1.0 (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/E/IRGSP/Build5.html>) utilizando los siguientes parámetros: --sensible local, -k 1. ADN de Se enmascararon los genomas de mitocondrias y cloroplastos integrados en genomas nucleares (1.697.400 pb). Las regiones que contienen ET cubren 194.224.800 pb en *O. sativa*. Finalmente, para cada biblioteca, se consideró un archivo de alineación.bam correspondiente a las regiones genómicas enriquecidas para el análisis estadístico y se visualizó con el software Integrative Genomics Viewer (IGV) (<https://www.broadinstitute.org/igv/home>)

Tabla 2: Secuencias de cebadores y sondas que se usaron para qPCR (TaqMan, Life Technologies) para medir el número total de copias de ADN *ONSEN* extracromosómicas. La actina 2 sirvió como gen de control para la

normalización.

Cebador	Secuencia 5' -> 3'
SEQ ID No 001 (<i>ONSEN</i> _RT_fw)	CCACAAGAGGAACCAACGAA
SEQ ID No 002 (<i>ONSEN</i> _RT_rev)	TTCGATCATGGAAGACCGG
SEQ ID No 003 (sonda <i>ONSEN</i>)	(FAM) AAGTCGGCAATAGCTTTGGCGAAGA (BHQ1)
SEQ ID No 004 (<i>Actina2</i> _RT_fw)	TGCCAATCTACGAGGGTTTC
SEQ ID No 005 (<i>Actin2</i> _RT_rev)	TTACAATTTCCCGCTCTGCT
SEQ ID No 006 (<i>Actin2</i> _sonda)	(JOE)TCCGTCTTGACCTTGCTGGACG(BHQ-1)
SEQ ID No 007 (<i>GenWalkAdaptator1</i>)	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTTCGACGGCCCGGGCTG
<i>GenWalkAdaptor2</i>	GT
SEQ ID No 008 (AP1)	(PHOS)ACCAGCCC(AMINO)
SEQ ID No 009 (<i>Copia78</i> 3' LTR)	GTAATACGACTCACTATAGGGC
SEQ ID NO 010	AACACTTAAACACTTTCTCCA
706_ATCOPIA17 QT R	TTAGTATAAGGCTGAGCTGGAAACTG
SEQ ID NO 011 705 ATCOPIA17 QT F	CAAGCCTAACCCCTCAGCTACATG

Visualización de transposones para confirmar la inserción de nuevas copias de *ONSEN*

[0075] La integración estable de copias adicionales de *ONSEN* ET en el genoma de plantas estresadas por calor y tratadas se comprobó mediante una visualización simplificada de transposones basada en el kit GenomeWalker Universal (Clontech Laboratories), según Ito et al. 2011.

[0076] Se extrajeron 300 ng de ADN total de plantas adultas de la generación F2 de HS +/- A & Z con un DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) y se digirieron con una enzima de restricción de corte romo (Dra I). Después de la purificación con un High Pure PCR Product Purification Kit (Roche), el ADN digerido se ligó a los GenWalkAdapters recocidos 1 y 2. Para la PCR, se utilizó el cebador AP1 específico del adaptador y el cebador *Copia 78* 3' RTL específico de *ONSEN*. Los productos de la PCR se separaron en un gel de agarosa al 2 % que se tiñó con una solución de tinción de ácido nucleico verde Midori. Para obtener información sobre la secuencia, consulte las tablas 2 y 3.

Clonación, secuenciación y genotipado de nuevas inserciones

[0077] Con el fin de identificar la región genómica de las nuevas inserciones *ONSEN*, el producto PCR de la presentación de transposones se purificó usando un kit de purificación de productos de PCR de alta pureza (Roche), ligado en un vector pGEM-T (Promega) y transformado en *E. coli*. Después de una selección azul-blanco, se usaron clones positivos para la amplificación y secuenciación del inserto (StarSEQ). Las secuencias obtenidas se analizaron con Geneious 8.2.1 y se contrastaron con el genoma de referencia de *Arabidopsis thaliana*. Las PCR de genotipado estándar para probar las nuevas inserciones de *ONSEN* se realizaron con combinaciones del cebador específico de *ONSEN* "Copia 78 ET display 3'RTL" y los cebadores enumerados en las tablas 2 y 3.

Tabla 3: Nombres, propósito y secuencias de los cebadores

Nombre/SEQ ID NO	Secuencias 5' --> 3'	Experimento
OnsenFull_F SEQ ID 12	AAGTGGTATCAGAGCTTGAAGATCC	Transferencia Northern
OnsenFull_R SEQ ID 13	CAACACCCCCTCTTAACTTGATTTTGC	
M13F SEQ ID 14	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	Clonación y secuenciación
M13R SEQ ID 15	TCACACAGGAAACAGCTATGAC	
286 OnsenBis F1 SEQ ID 16	GGTTGAAGGGTYAAAGAGTAAAT	Análisis de metilación
287 OnsenBis R1 SEQ ID 17	CCTCCAAACTACAAAATATCTAAAA	
835 chopPCR ACT2 F SEQ ID 18	TGTAGTGTCGTACGTTGAACAGAAAGC	
836 chopPCR ACT2 R SEQ ID 19	TTGGCACAGTGTGAGACACACCA	
houba_F2 SEQ ID 20	ATCCTGGGAAGAACAACCATTA	PCR en arroz circular ET y control de cloroplastos
houba_R2 SEQ ID 21	GAGTTCGAGTACCTTAGCCATGGT	
Cloroplasto cyc F SEQ ID 22	ACAACCACTGATGAAGGATT	
Cloroplasto cyc R SEQ ID 23	AGAAAGAAAAGCAACGACTG	

(Continuación)

5	Probar TED 2_20 R SEQ ID 24	ACCTAGCTCTGAGTGATGAA	Genotipado de nuevas inserciones ONSEN
	Probar TED4_27 F SEQ ID 25	TGGATATACACATTGGTTGCA	
	Probar TED 2_19 F SEQ ID 26	GGAGAAAAGCTGAAAACCTTGG	
10	Probar TED4 30 rev SEQ ID 27	CTAGGTTGGTGACTGATGAG	
	Probar TED 2_17 F SEQ ID 28	AAGAATGGGAGCAGCATTAA	
	Probar 3_2R SEQ ID 29	GCAGTACTATAACCGGGACT	
15	Probar TED3_1 Fw SEQ ID 30	GAACCTTCCGTTGTTACCGG	
	Probar TED3 F SEQ ID 31	ATGAGACAGGGAGCTTATCT	
	Probar TED1 R SEQ ID 32	GGTGTGAACCGAACCTAAAT	
20	Probar TED 4_25 F SEQ ID 33	AAACACCAGAAATCTTTCGC	

PCR en ADN de Houba extracromosómico

[0078] La presencia de copias circulares de Houba se demostró mediante una PCR inversa en 7 ng de la plantilla amplificada de círculo rodante que también se usó para la secuenciación. Una PCR específica para un ADN de cloroplasto sirvió como control de carga. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1 % que se tiñó con una solución de tinción de ácido nucleico verde Midori (Nippon Genetics Europe). Las secuencias de los cebadores se proporcionan en la Tabla 4 complementaria.

Tabla 4: Secuencias de cebadores y sondas que se usaron para las PCR para medir el número total de ADN extracromosómico de *Houba*.

Cebador/SEQ ID NO	Secuencia 5'→3'
286 OnsenLTRchopF SEQ ID 34	GGTTGAAGGGTYAAAAGAGTAAAT
287 OnsenLTRchopR SEQ ID 35	CCTCCAAACTACAAAATATCTAAAA
Houba_F2 SEQ ID 36	ATCCTGGGAAGAACAAACCATTAA
Houba_R2 SEQ ID 37	GAGTTTCGAGTACCTTAGCCATGGT

Análisis de ARN y transferencia Northern

[0079] El ARN total de la parte aérea de las plántulas de *Arabidopsis* se aisló utilizando el reactivo TRI (Sigma) según las recomendaciones del fabricante. Se midió la concentración de ARN (Qubit RNA HS Assay Kit, Thermo Fisher), se separaron 15 mg de ARN en un gel desnaturante de agarosa al 1,5 %, se transfirieron en una membrana Hybond-N+ (GE Healthcare) y se hibridaron con 25 ng de un gel-sonda purificada y marcada con P32 (Megaprime DNA Labeling System, GE Healthcare) específica para el transcrito *ONSEN* de longitud completa (consulte la tabla 3 para conocer las secuencias de los cebadores).

Análisis de metilación del ADN

[0080] Se digirieron 20 ng de ADN genómico total aislado de plántulas de *Arabidopsis* con la enzima de restricción sensible a la metilación, Dde1 (NEB) a 37 °C durante la noche. Después de la inactivación por calor a 60 °C durante 20 min, el ADN digerido se usó como molde para chopPCR. Actina2 sirvió como control para el resumen. Se usó ADN sin digerir como control de carga. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1% y se tiñeron con Midori Green.

[0081] Para la línea celular de cáncer humano A549, las células se cultivaron en medio sin tratamiento o se complementaron con Z (350 µM) o A (0,5 µg/ml), el ADN se extrajo utilizando el kit QiaAmp DNA mini (Qiagen, Francia). A continuación, se estimó la metilación global del ADN mediante la cuantificación de la presencia del kit ELISA de ADN 5-mC de 5-metilcitosina (Zymo Research) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La metilación del ADN en los transposones LINE-1 se evaluó con el kit de ensayo de metilación de ADN Global LINE-1 (Motivo Activo).

LISTADO DE SECUENCIAS

[0082]

<110> Universitaet Basel

<120> Movilización de elementos transponibles para mejorar la variabilidad genética y epigenética en una población

5 <130> uz252ep

<160> 37

10 <170> PatentIn versión 3,5

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de RT PCR para ONSen de Arabidopsis thaliana

20 <400> 1

ccacaagagg aaccaacgaa 20

<210> 2

<211> 19

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador RT PCR para ONSen de Arabidopsis thaliana

30 <400> 2

ttcgatcatg gaagaccgg 19

<210> 3

<211> 25

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Sonda de RT PCR para ONSen de Arabidopsis thaliana

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

45 <223> Tinte FAM en el extremo 3'

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

50 <223> Extintor BHQ1 en el extremo 5'

<400> 3

aagtcggcaa tagcttggc gaaga 25

55 <210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Cebador RT PCR para actina 2 de Arabidopsis thaliana

<400> 4

tgccaatcta cgagggttc 20

65 <210> 5

<211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cebador RT PCR para actina 2 de Arabidopsis thaliana

 <400> 5
 ttacaatttc ccgctctgct 20

 10 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Sonda Actina2 para RT PCR

 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Tinte JOE en el extremo 3'

 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (22)..(2)
 <223> Extintor BHQ-1 en el extremo 5'

 <400> 6
 30 tccgtcttga ccttgctgga cg 22

 <210> 7
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35

 <220>
 <223> GenWalkAdaptorI

 <400> 7
 40 gtaatacgac tcactatagg gcacgcgtgg tcgacggccc gggctggt 48

 <210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador PCR específico para GenWalkAdaptor
 50

 <400> 8
 gtaatacgac tcactatagg gc 22

 <210> 9
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Cebador de PCR específico para ONSN de Arabidopsis thaliana

 <400> 9
 aacacttaaa cactttctcc a 21

 <210> 10
 65 <211> 26
 <212> ADN

5
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de RT PCR para ONSEN de Arabidopsis thaliana
 <400> 10
 ttagtataag gctgagctgg aaactg 26
 10
 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador RT PCR para ONSEN de Arabidopsis thaliana
 <400> 11
 caagcctaac cctcagctac atg 23
 20
 <210> 12
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Sonda transferencia Northern para la detección de ONSEN de Arabidopsis thaliana
 <400> 12
 aagtggatc agagctgaa gatcc 25
 30
 <210> 13
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Sonda de transferencia Northern para la detección de ONSEN de Arabidopsis thaliana
 <400> 13
 caacaccccc tcttaaactt gattttgc 28
 40
 <210> 14
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador de secuenciación M13
 50
 <400> 14
 cgccaggggtt ttccagctca cgac 24
 55
 <210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Cebador de secuenciación M13
 <400> 15
 tcacacagga aacagctatg ac 22
 65
 <210> 16
 <211> 23
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador chopPCR para ONSen de Arabidopsis thaliana
 5
 <400> 16
 ggtgaagg tyaaagagta aat 23
 <210> 17
 10 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> cebador chopPCR para ONSen de Arabidopsis thaliana
 <400> 17
 cctccaaact acaaaatatt taaa 25
 20 <210> 18
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador chopPCR para Actina2 de Arabidopsis thaliana
 <400> 18
 30 ttagtggtg tacgtgaac agaaagc 27
 <210> 19
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador chopPCR para Actina2 de Arabidopsis thaliana
 <400> 19
 40 ttggcacagt gtgagacaca cca 23
 <210> 20
 <211> 24
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR para Houba de arroz
 50 <400> 20
 atcctgggaa gaacaaacca ttaa 24
 <210> 21
 <211> 24
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR para Houba de arroz
 60 <400> 21
 gagttcgagt accttagcca tgg 24
 <210> 22
 65 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR para ADN de cloroplasto de arroz
 5
 <400> 22
 acaaccactg atgaaggatt 20
 <210> 23
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador PCR para ADN de cloroplasto de arroz
 <400> 23
 agaaagaaaa gcaacgactg 20
 20 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador de PCR para ONSEN de Arabidopsis thaliana
 <400> 24
 30 acctagctct gagtgatgaa 20
 <210> 25
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador de PCR para ONSEN de Arabidopsis thaliana
 <400> 25
 40 tggatataca cattggtgc a 21
 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR para ONSEN de Arabidopsis thaliana
 50 <400> 26
 ggagaaagct gaaaacttgg 20
 <210> 27
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR para ONSEN de Arabidopsis thaliana
 60 <400> 27
 ctaggttgt gactgatgag 20
 <210> 28
 65 <211> 20
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de PCR para ONSEN de Arabidopsis thaliana
 <400> 28
 aagaatggga gcagcattaa 20
 10 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador de PCR para ONSEN de Arabidopsis thaliana
 <400> 29
 gcagtactat aaccgggact 20
 20 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador PCR para ONSEN de Arabidopsis thaliana
 <400> 30
 gaactttccg ttgtaccgg 20
 30 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Cebador PCR para ONSEN de Arabidopsis thaliana
 <400> 31
 atgagacagg gagcttatct 20
 40 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador de PCR para ONSEN de Arabidopsis thaliana
 <400> 32
 ggtgtgaacc gaacctaaat 20
 50 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Cebador de PCR para ONSEN de Arabidopsis thaliana
 <400> 33
 aaacaccaga aatctttcgc 20
 60 <210> 34
 <211> 23
 <212> ADN
 65 <213> ADN

5 <213> Secuencia artificial

 <220>

 <223> Cebador de PCR para Houba de arroz

 <400> 34

 ggttgaaggg tyaaagagta aat 23

10 <210> 35

 <211> 25

 <212> ADN

 <213> Secuencia artificial

15 <220>

 <223> Cebador PCR para Houba de arroz

 <400> 35

 cctccaaact acaaaatattc taaaa 25

20 <210> 36

 <211> 24

 <212> ADN

 <213> Secuencia artificial

25 <220>

 <223> Cebador PCR para Houba de arroz

 <400> 36

 atcctgggaa gaacaaacca ttaa 24

30 <210> 37

 <211> 24

 <212> ADN

 <213> Secuencia artificial

35 <220>

 <223> Cebador PCR para Houba de arroz

 <400> 37

40 gagttcgagt accttagcca tggt 24

REIVINDICACIONES

1. Un método para la movilización de un elemento transponible en una célula vegetal, comprendiendo dicho método los pasos de:
 - a) proporcionar una célula vegetal que comprende un elemento transponible
 - b) poner en contacto dicha célula vegetal con un inhibidor de la transcripción y un inhibidor de la metilación del ADN,
 - c) exponer dicha célula vegetal a un estrés abiótico, estrés biótico o estrés químico,
 - d) aislar dicha célula vegetal y determinar si un fenotipo de dicha célula ha cambiado,produciendo así una célula vegetal con un elemento transponible movilizado.
2. El método según la reivindicación 1, en donde dicha célula vegetal es parte de una planta, y en donde después de la exposición de dicha célula a un estrés abiótico, estrés biótico o estrés químico, la célula se cultiva para convertirla en un organismo multicelular, y se determina el fenotipo de dicha planta.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, donde el fenotipo es la resistencia a un estresor que causa el estrés abiótico, el estrés biótico o el estrés químico.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 3, en donde
 - i. dicho estrés abiótico se selecciona de calor, frío, sequía, sumersión/exceso de agua, viento, radiación ultravioleta, radiación nuclear, salinidad, metales pesados, pH del suelo, cultivo de tejidos y falta de fósforo, nitrógeno, luz o CO₂, y/o
 - ii. dicho estrés biótico se selecciona del impacto negativo de hongos, bacterias, virus, insectos, heridas por herbívoros y competencia biológica, y/o
 - iii. dicho estrés químico se selecciona de herbicidas, protectores de herbicidas, insecticidas, fungicidas, metabolitos secundarios de plantas y compuestos sintéticos o naturales que inducen la defensa de las plantas.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha célula vegetal o planta se pone en contacto con un inhibidor de la metilación del ADN seleccionado entre 5-azacitidina, 5-aza-2'-desoxicitidina, 5-fluoro-2'-desoxicitidina, 5,6-dihidro-5-azacitidina y zebularina.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho inhibidor de la transcripción es un inhibidor de la ARN polimerasa II.
7. El método según la reivindicación 6, en donde dicho inhibidor de la ARN polimerasa II es alfa-amanitina utilizada a una concentración de 0,0005 µg/ml a 50 µg/ml.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho inhibidor de la metilación del ADN es zebularina utilizada a una concentración de 5 µmol/L a 100 µmol/L.

Fig. 1a, b

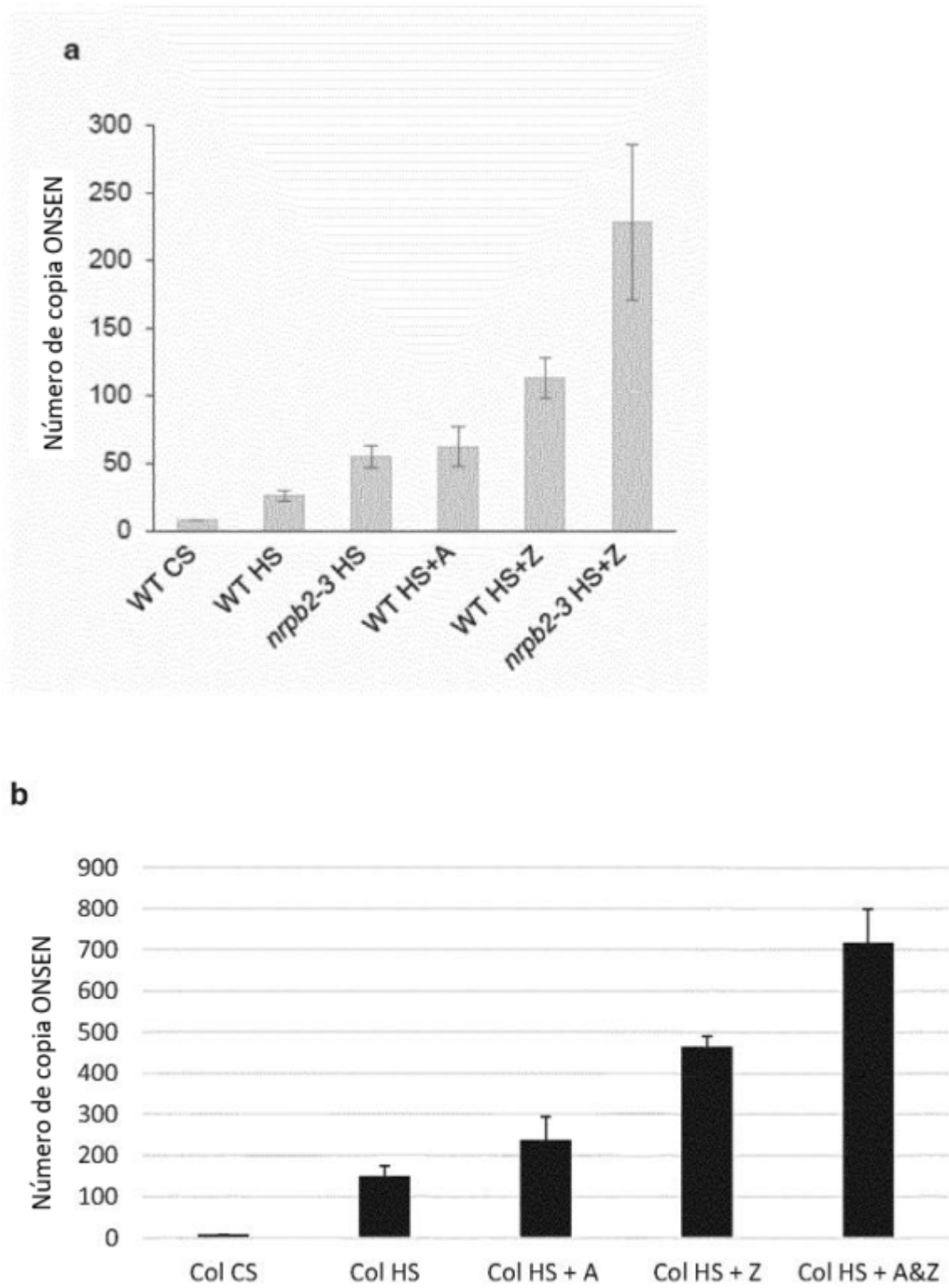


Fig. 2

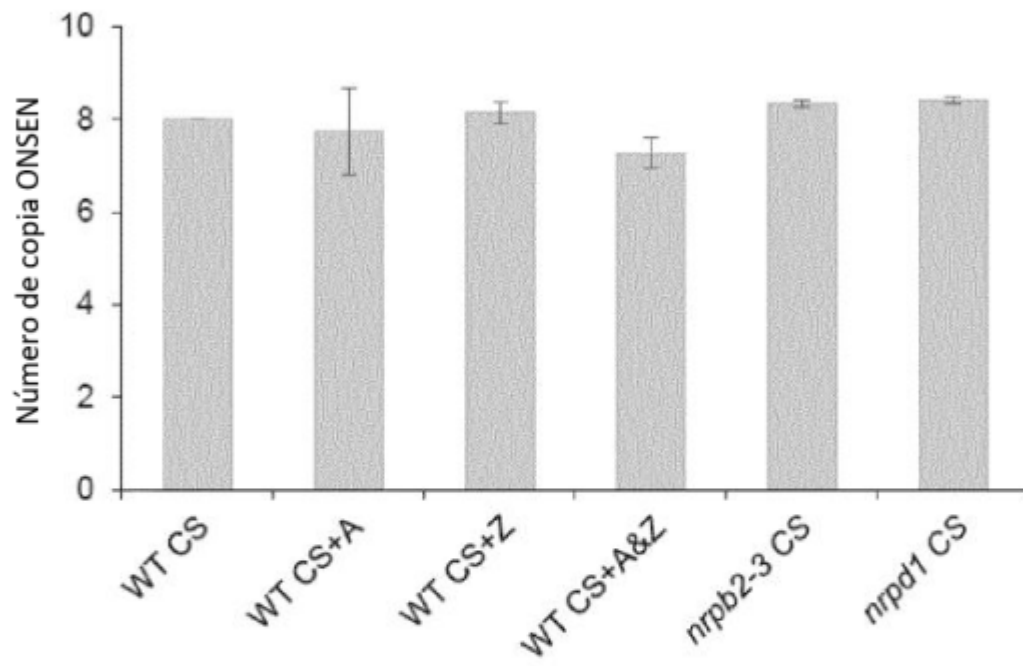
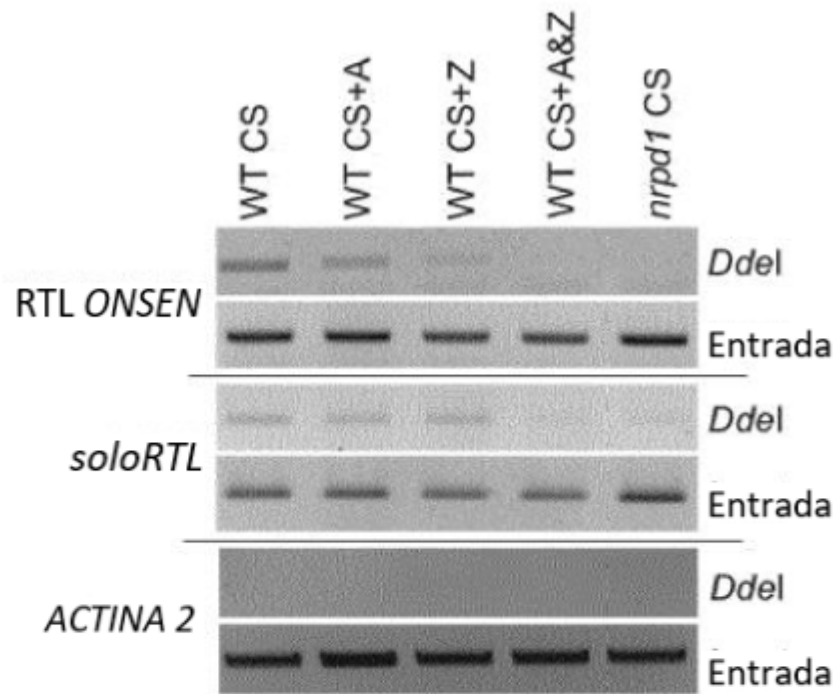


Fig. 3a, b

a



b

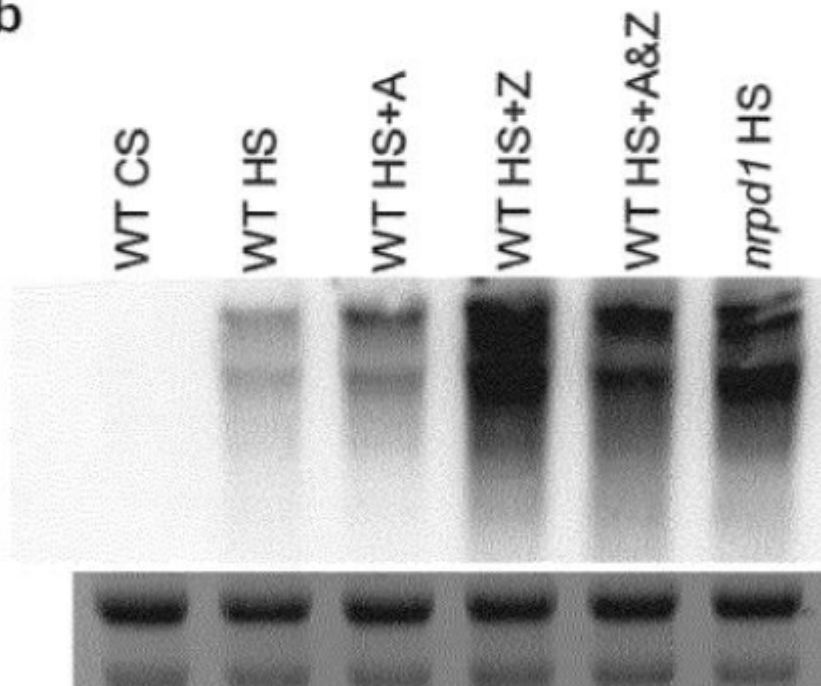


Fig. 3c

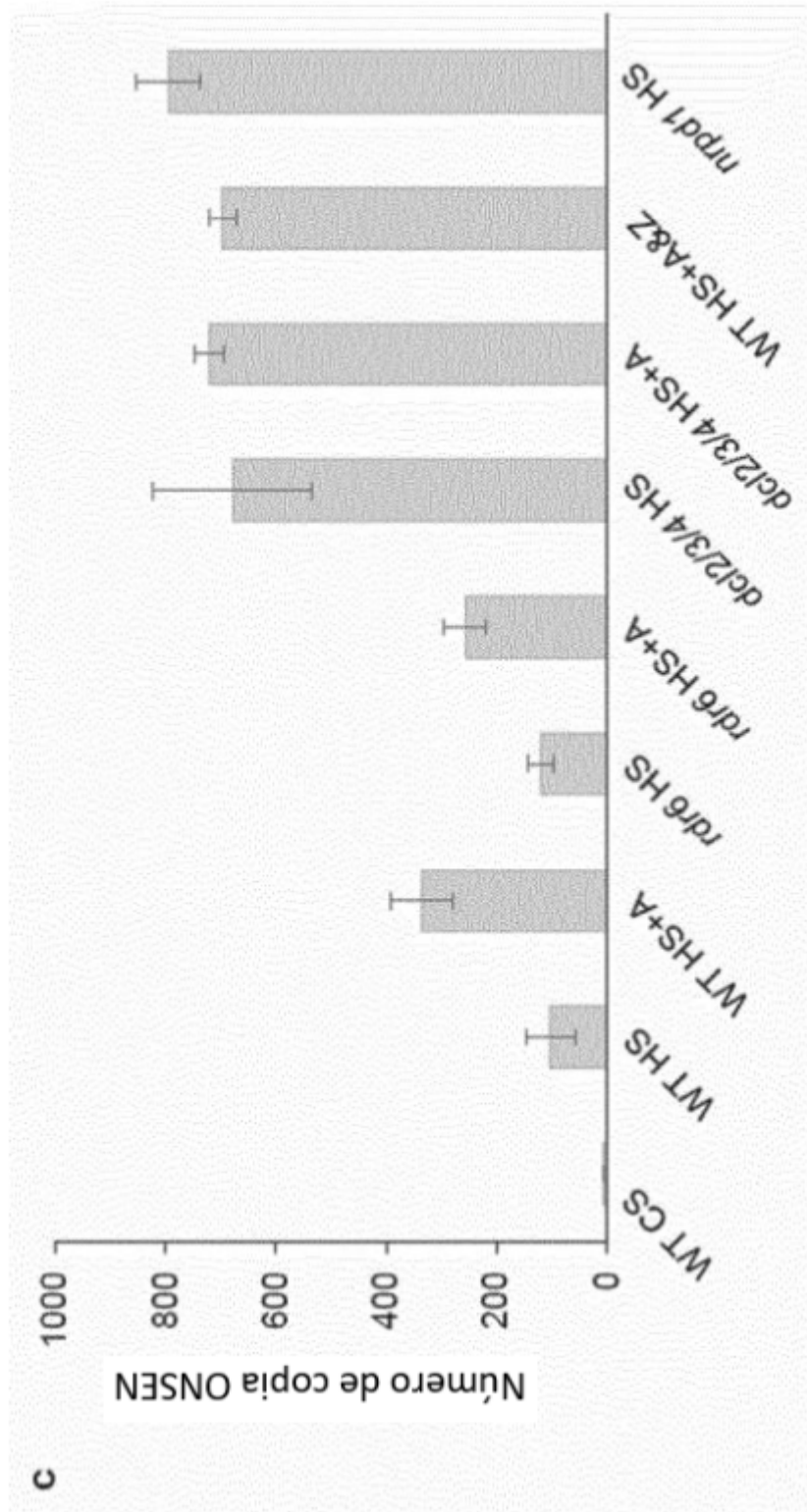


Fig. 4a

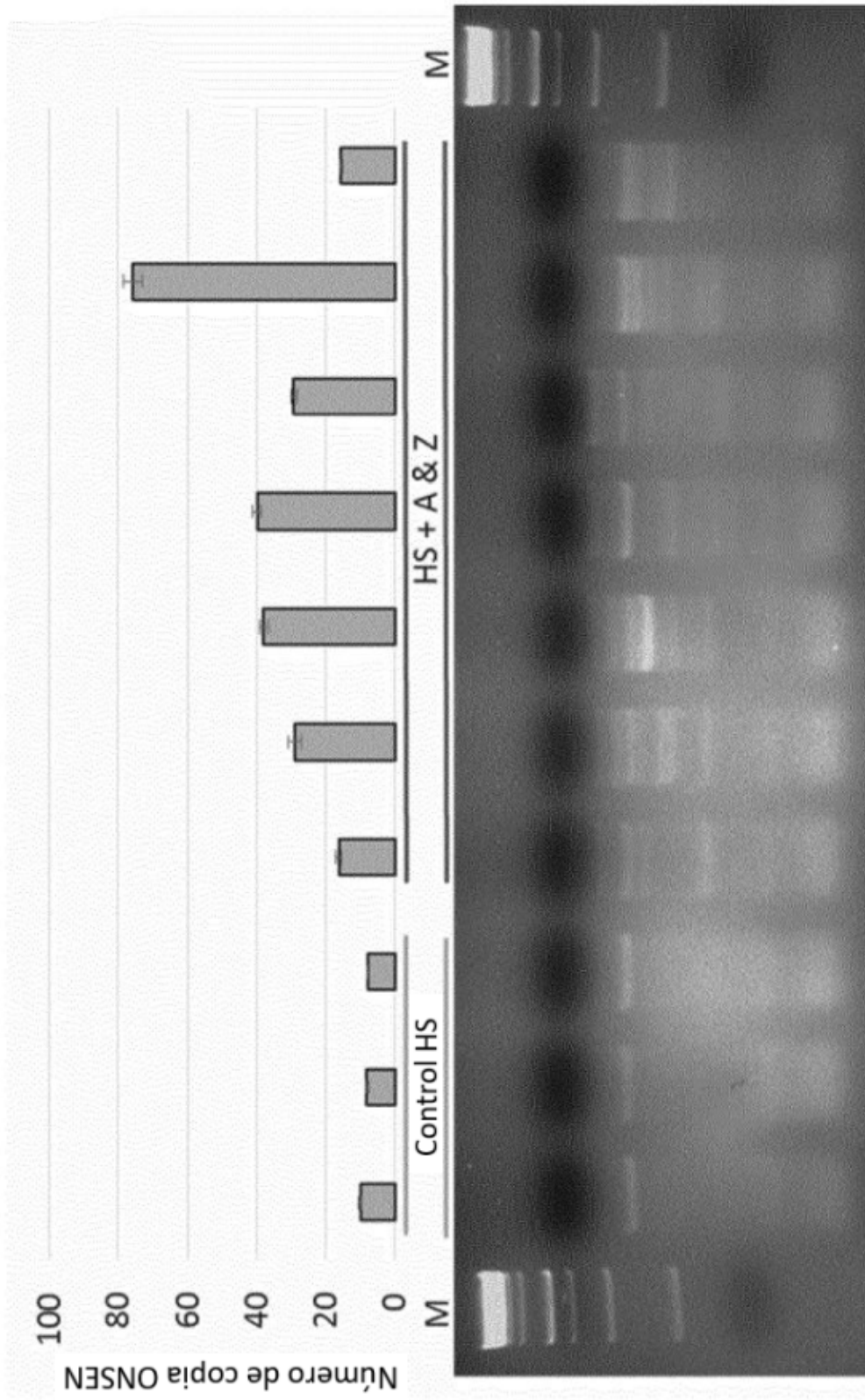


Fig. 4b

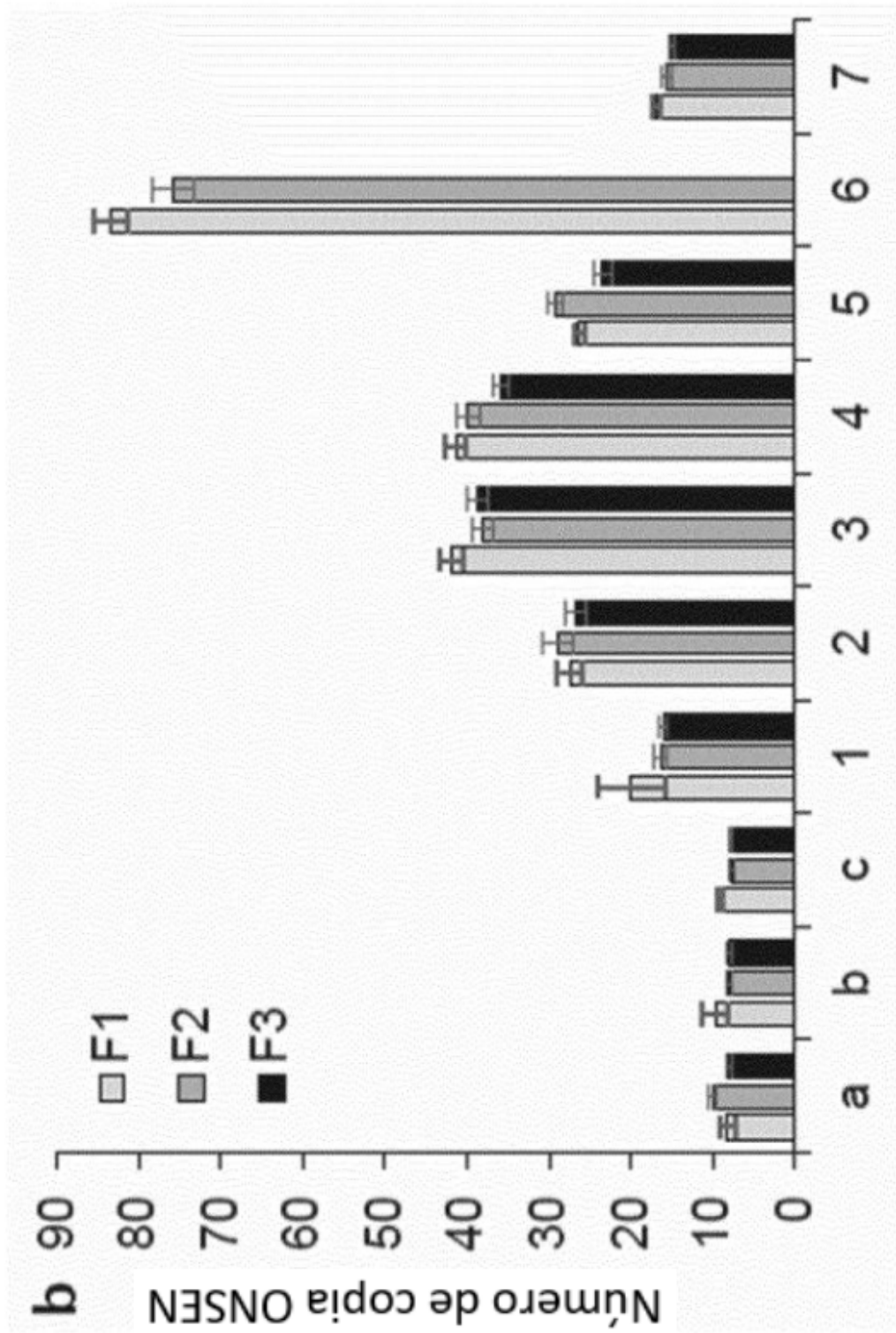


Fig. 4c,d

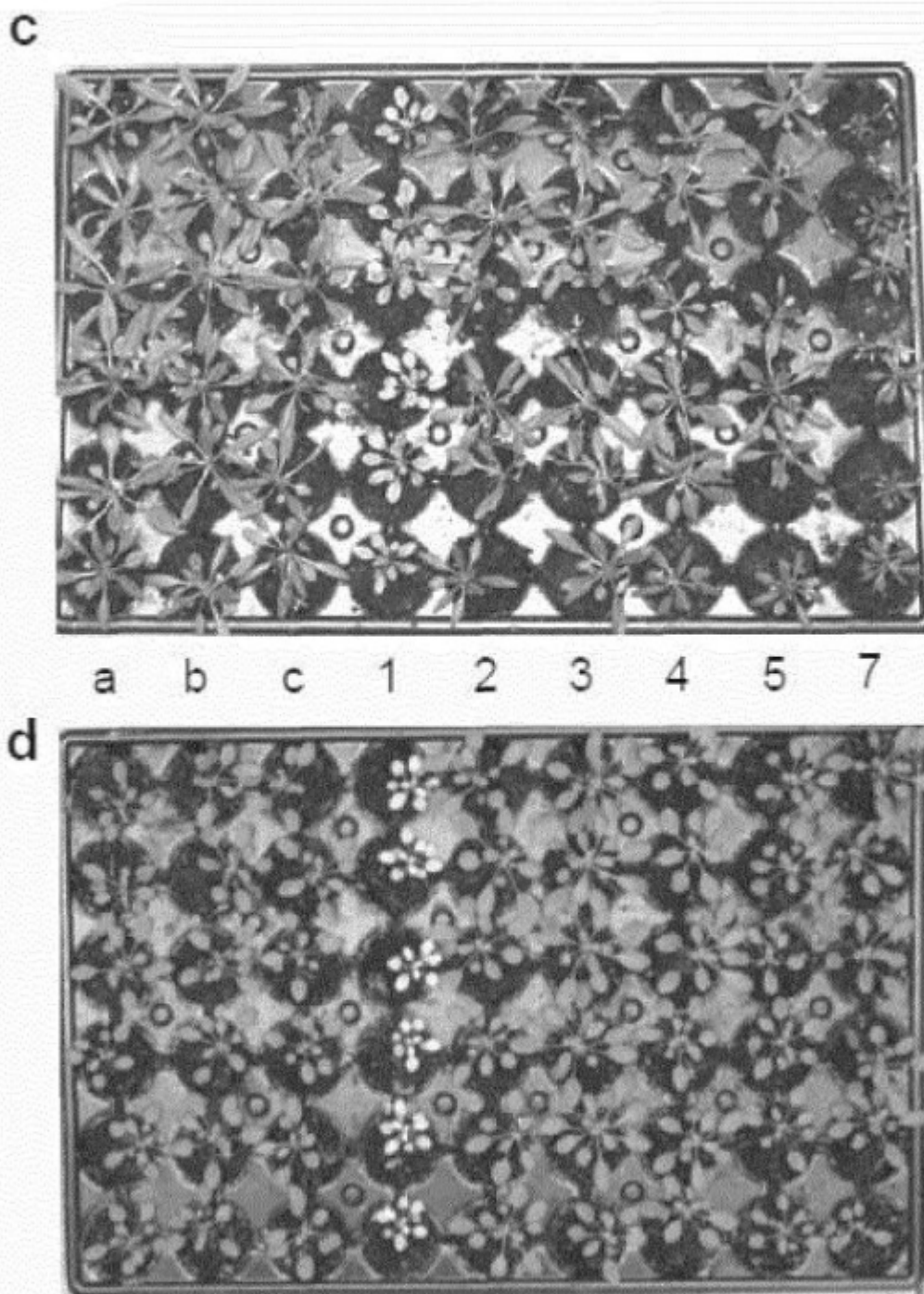


Fig. 5

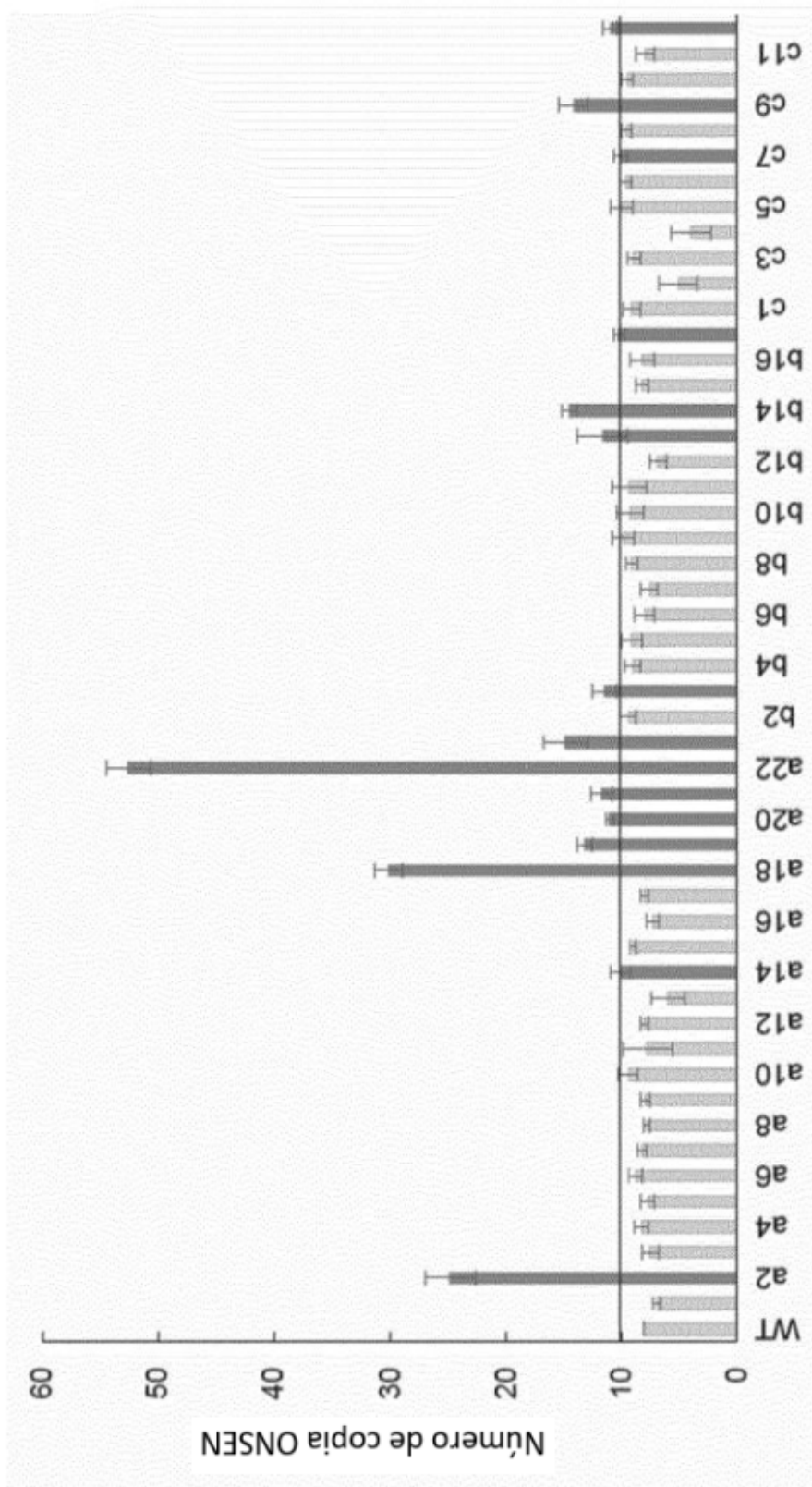


Fig. 6a

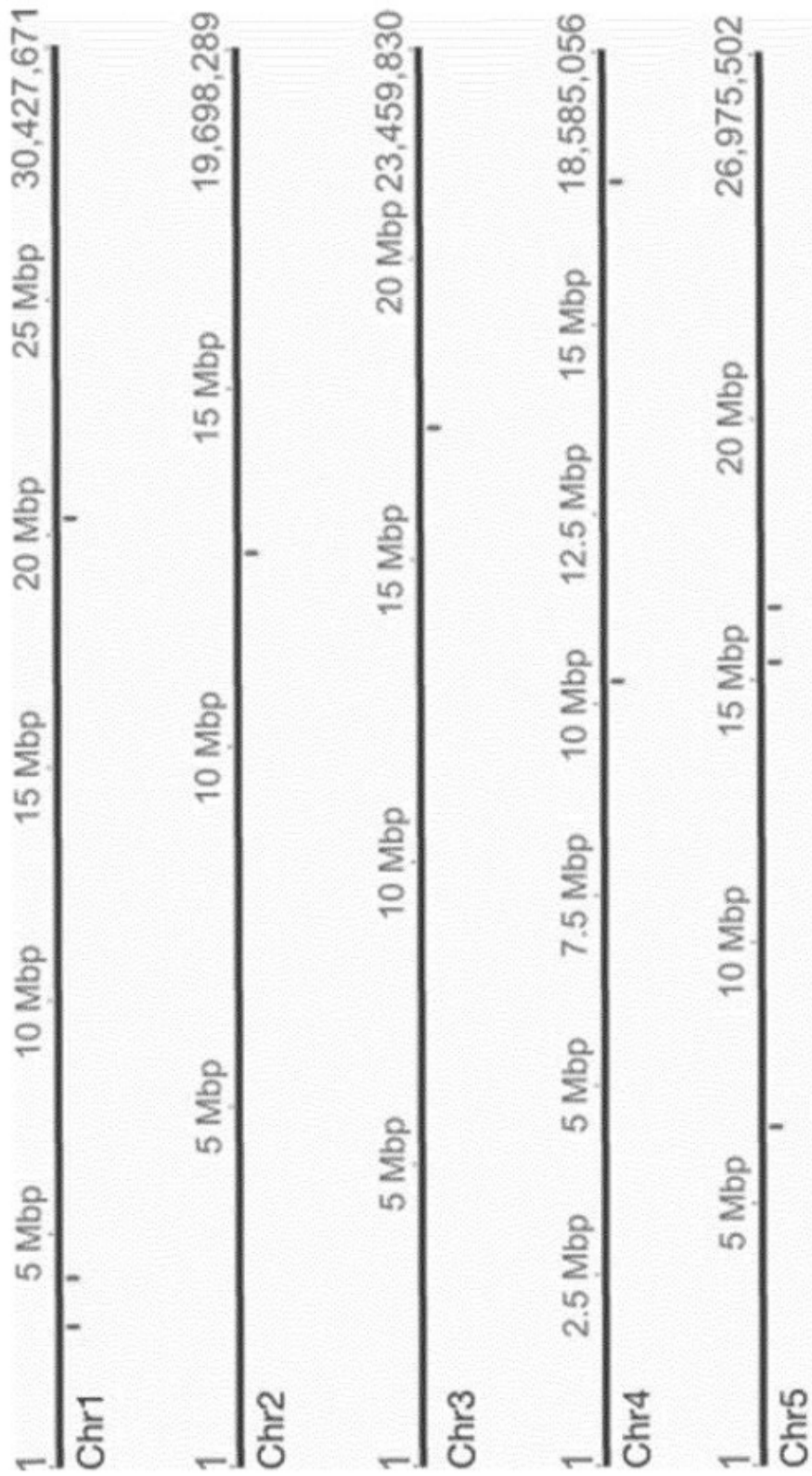


Fig. 6b

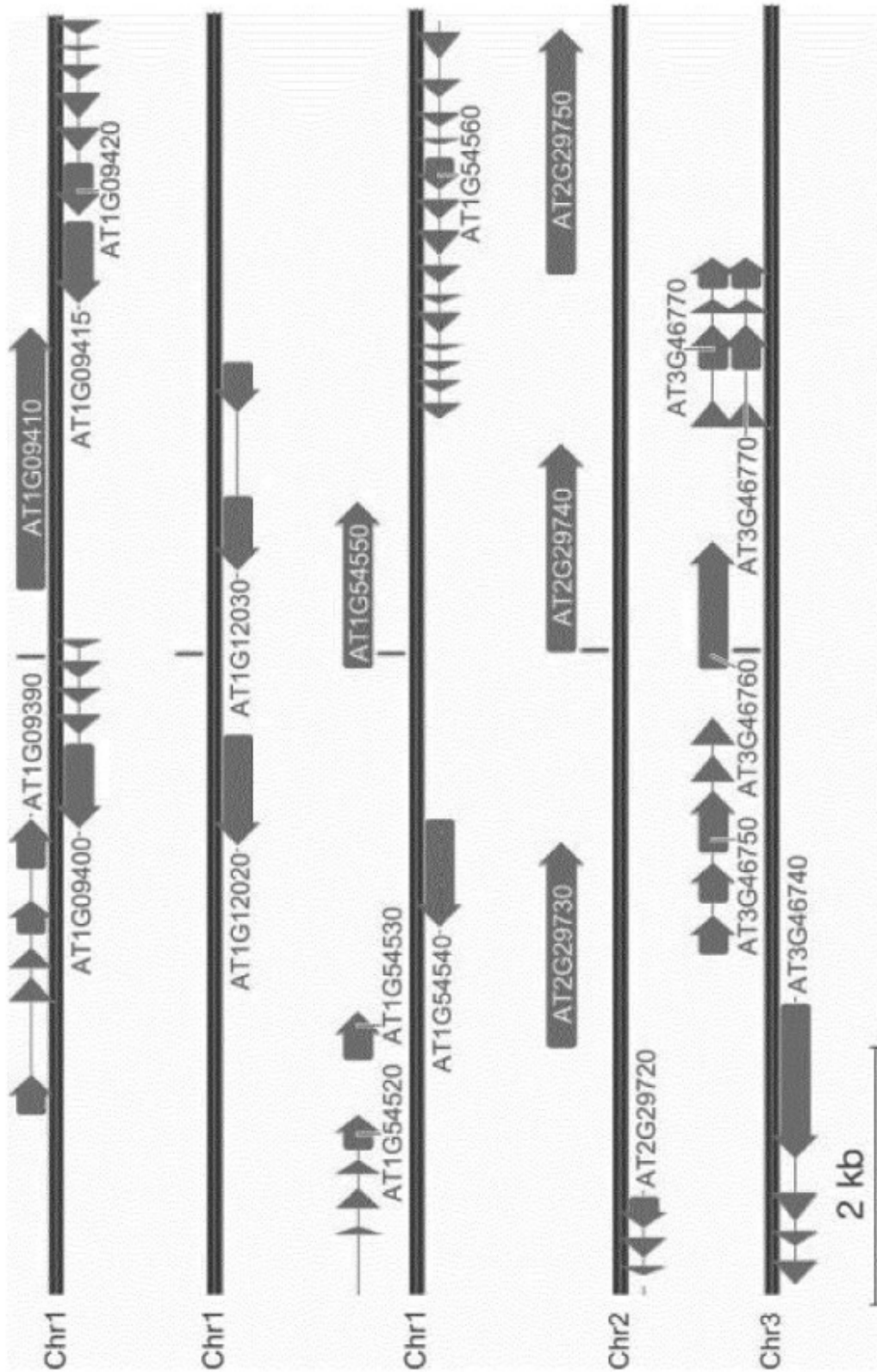


Fig. 6b continuado

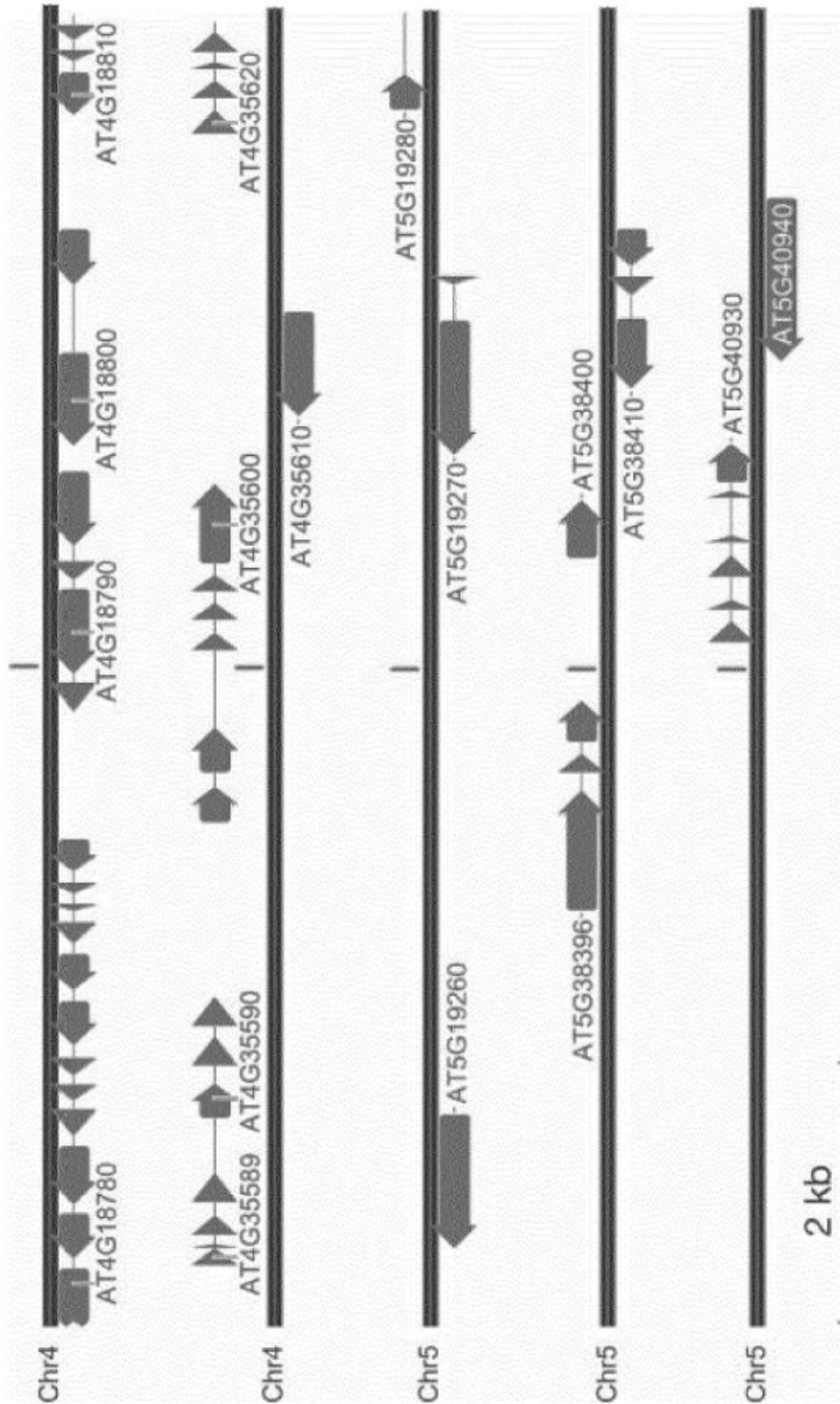


Fig. 7a

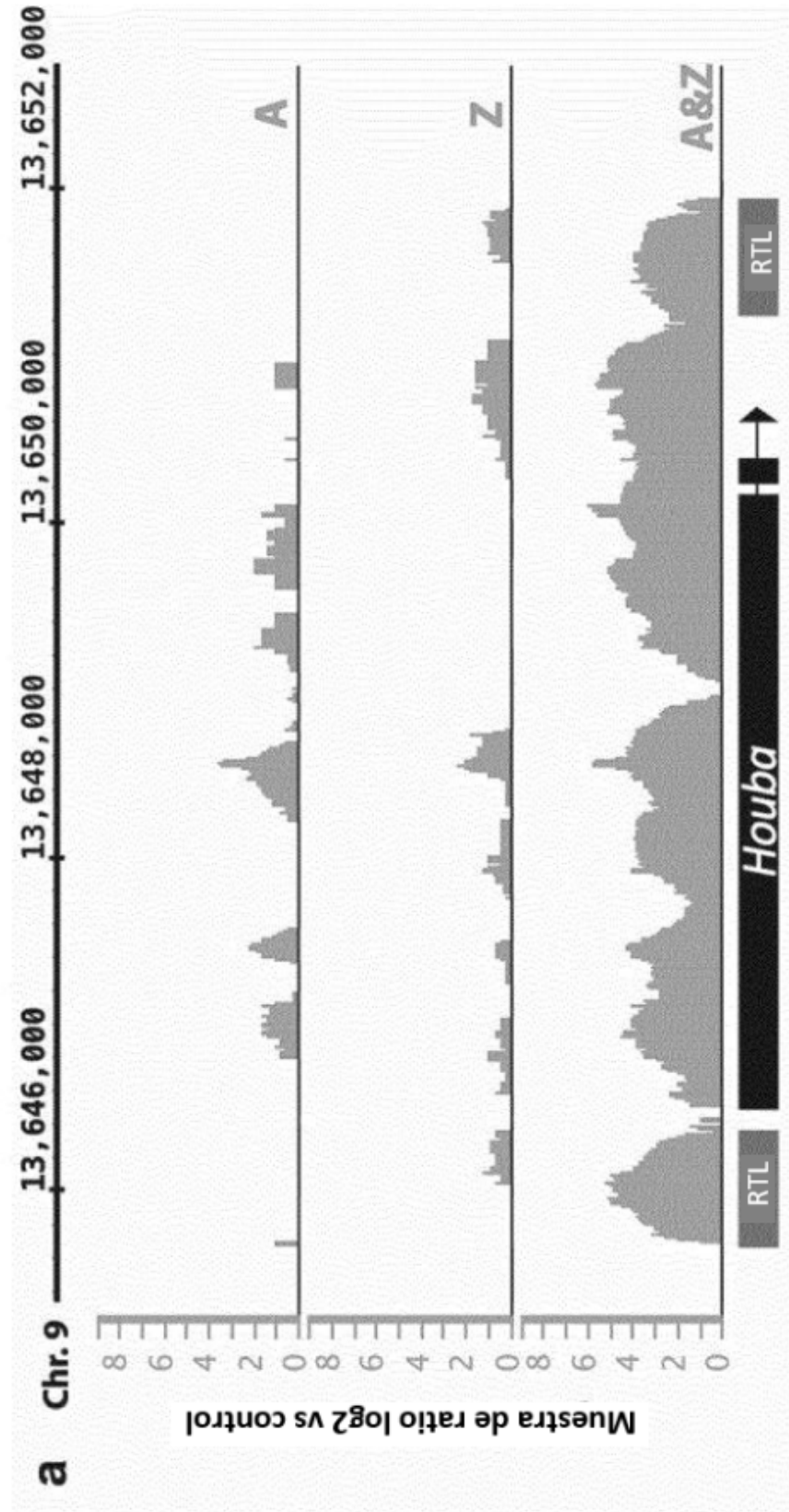


Fig. 7b-d

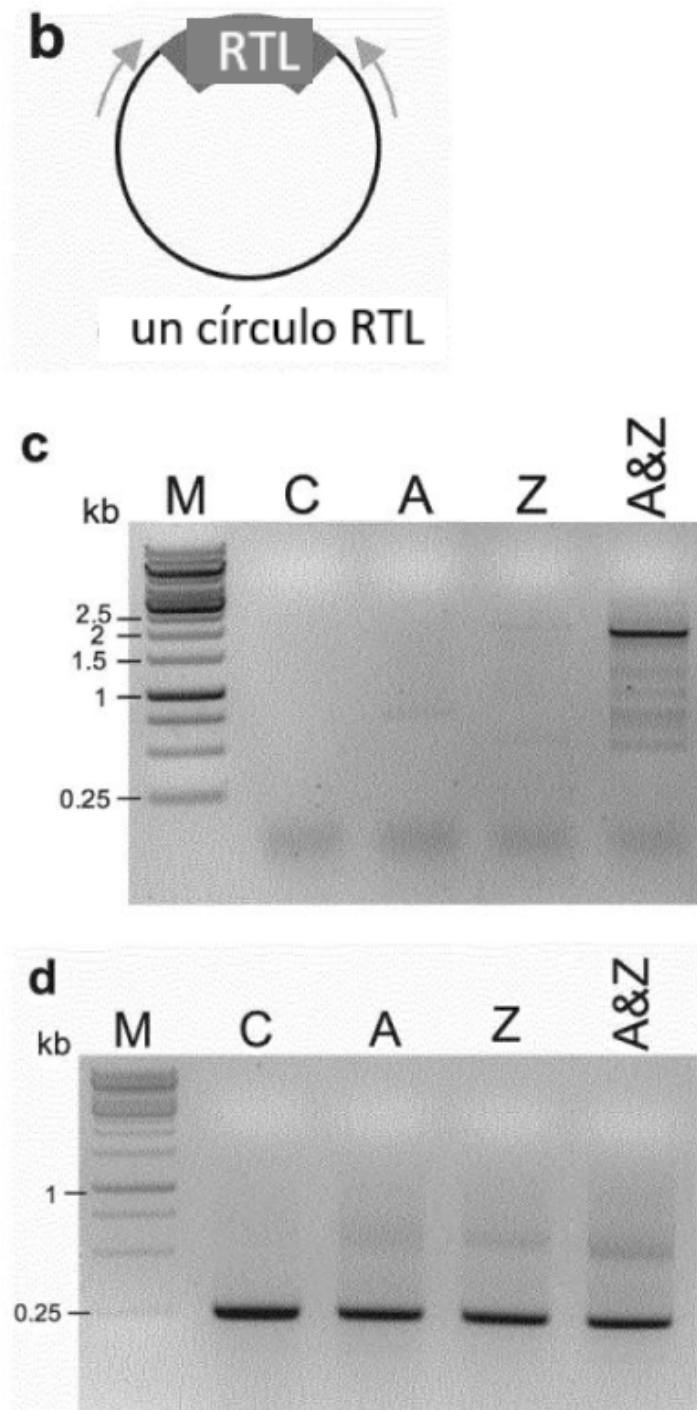


Fig.8

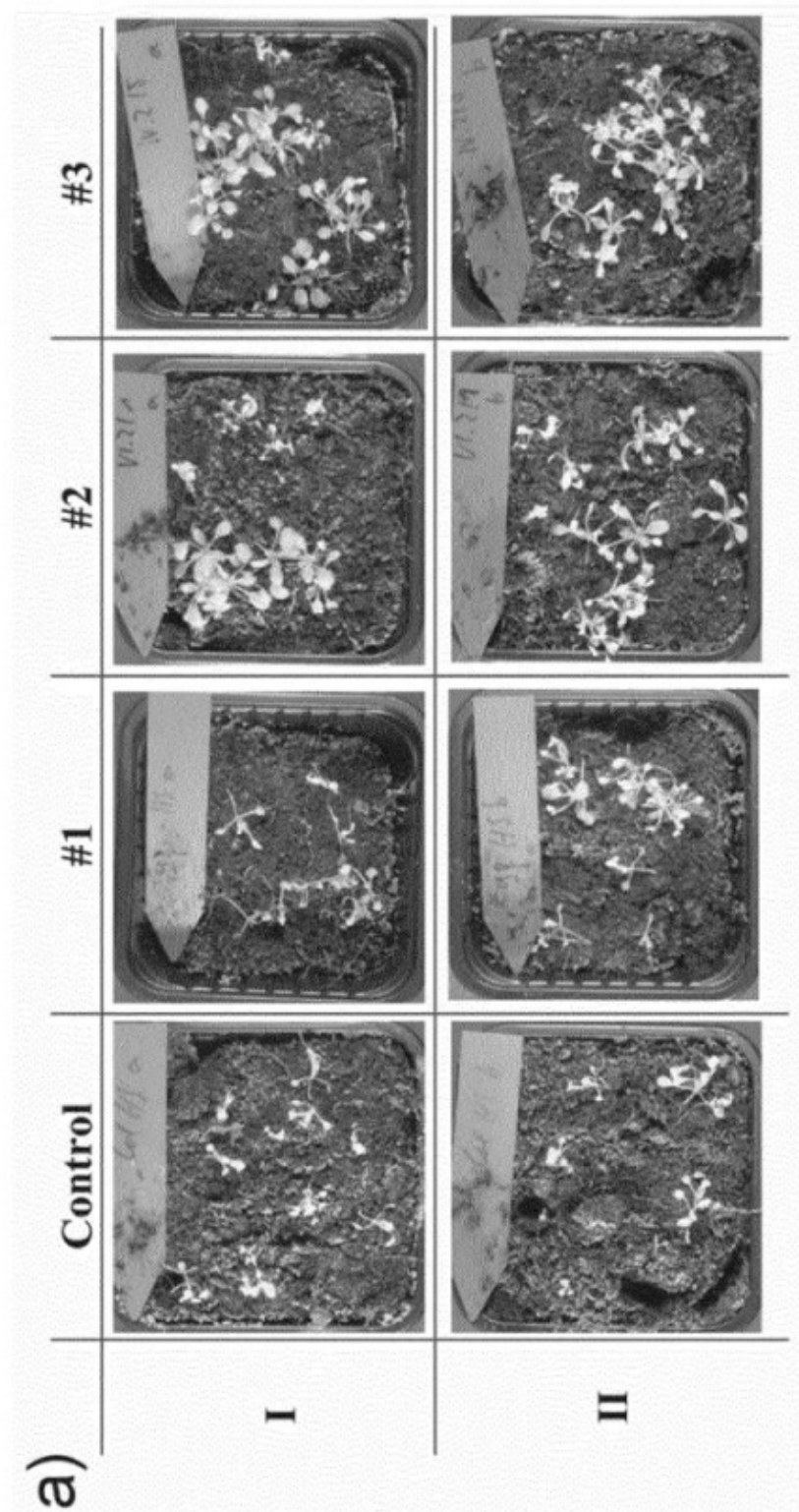


Fig. 8 continuado

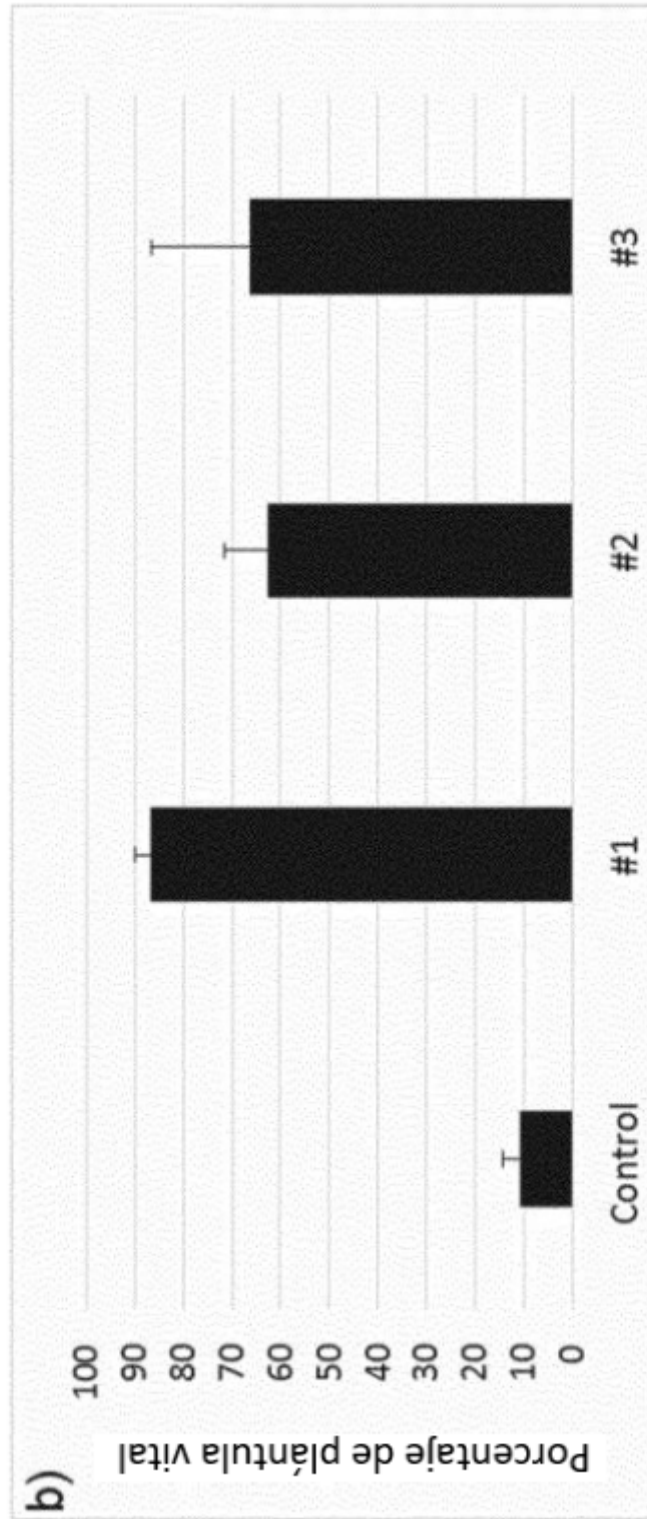


Fig. 9

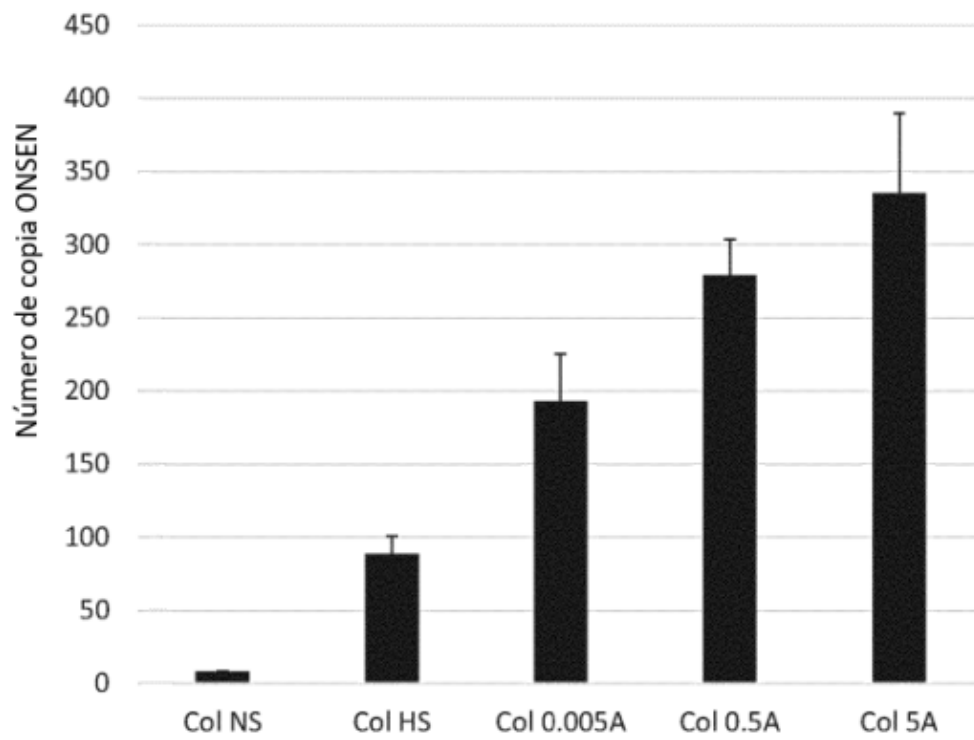


Fig. 10 a,b,c

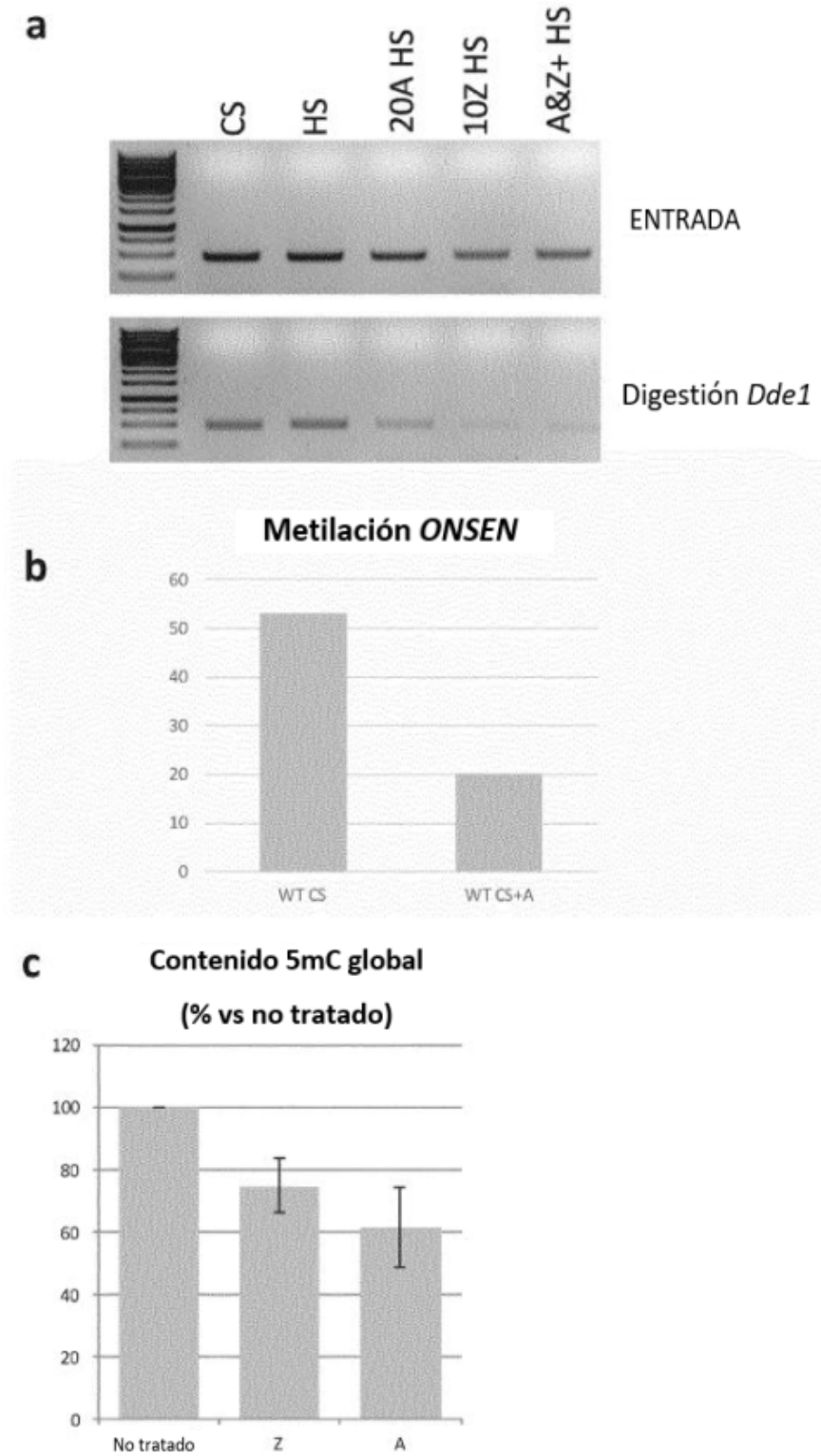


Fig. 10d

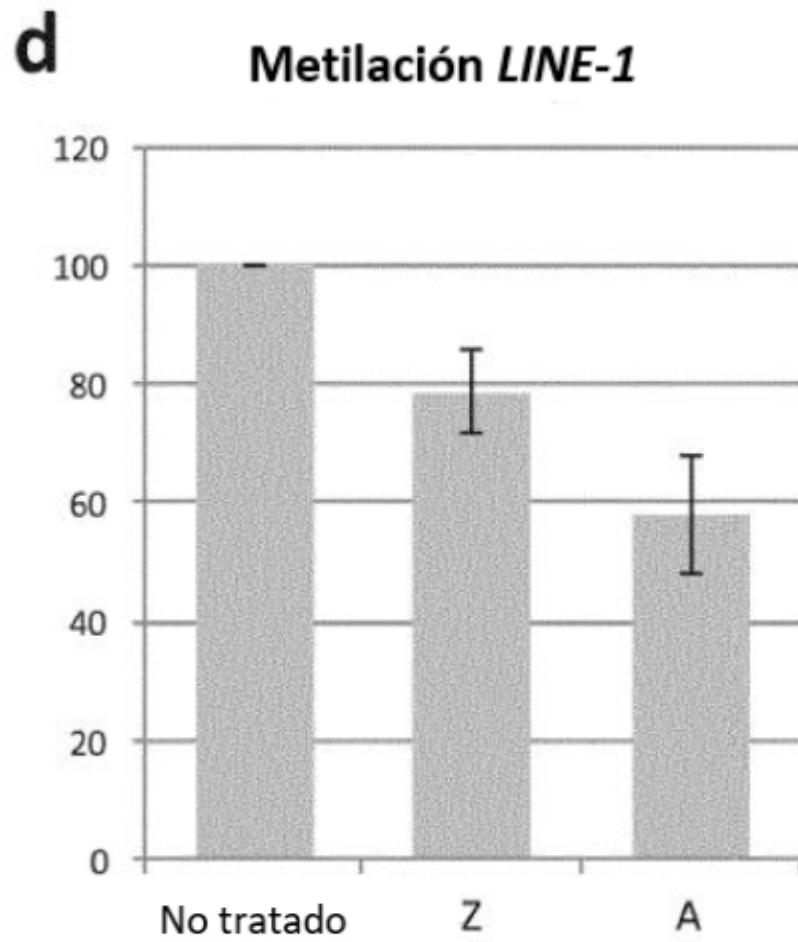


Fig. 11

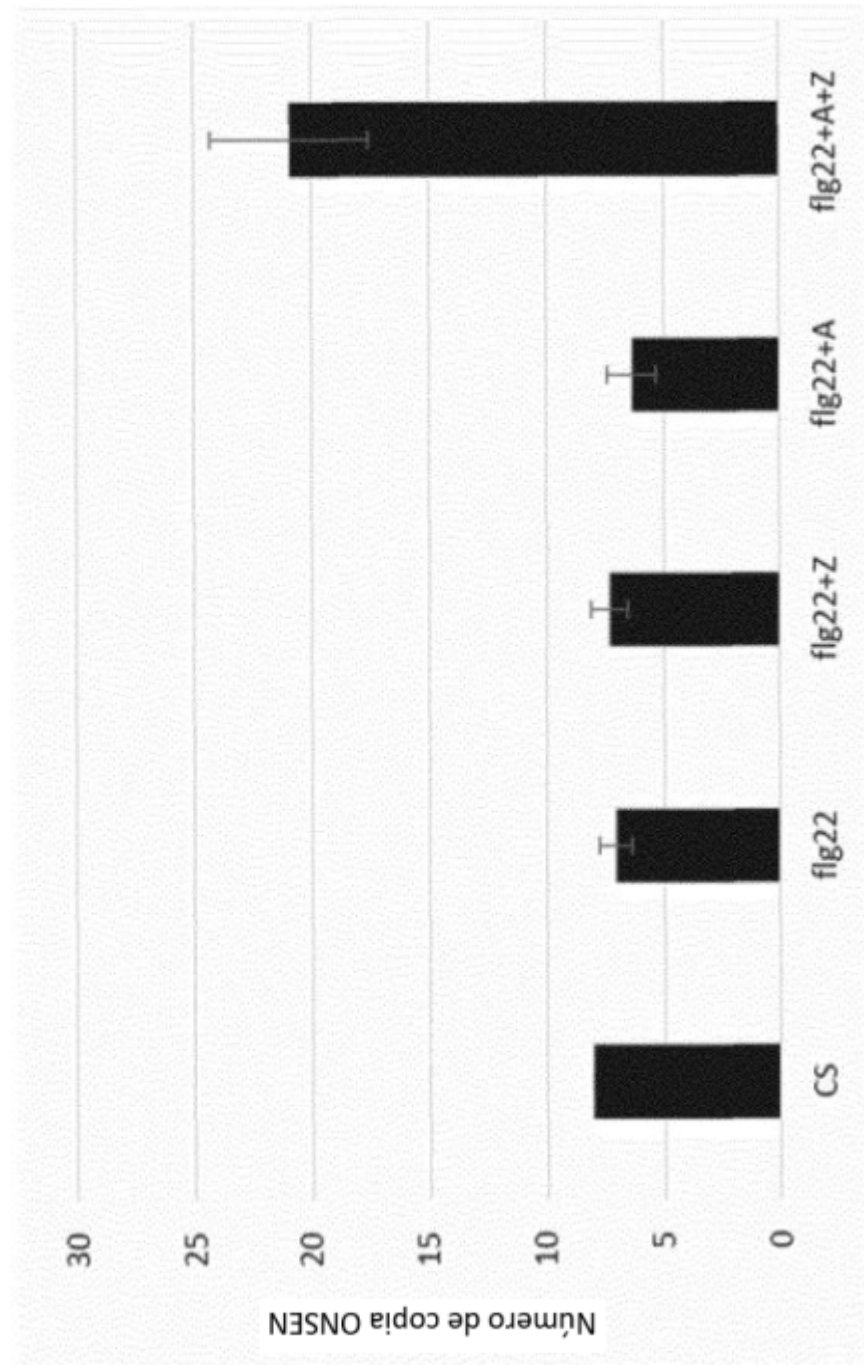


Fig. 12

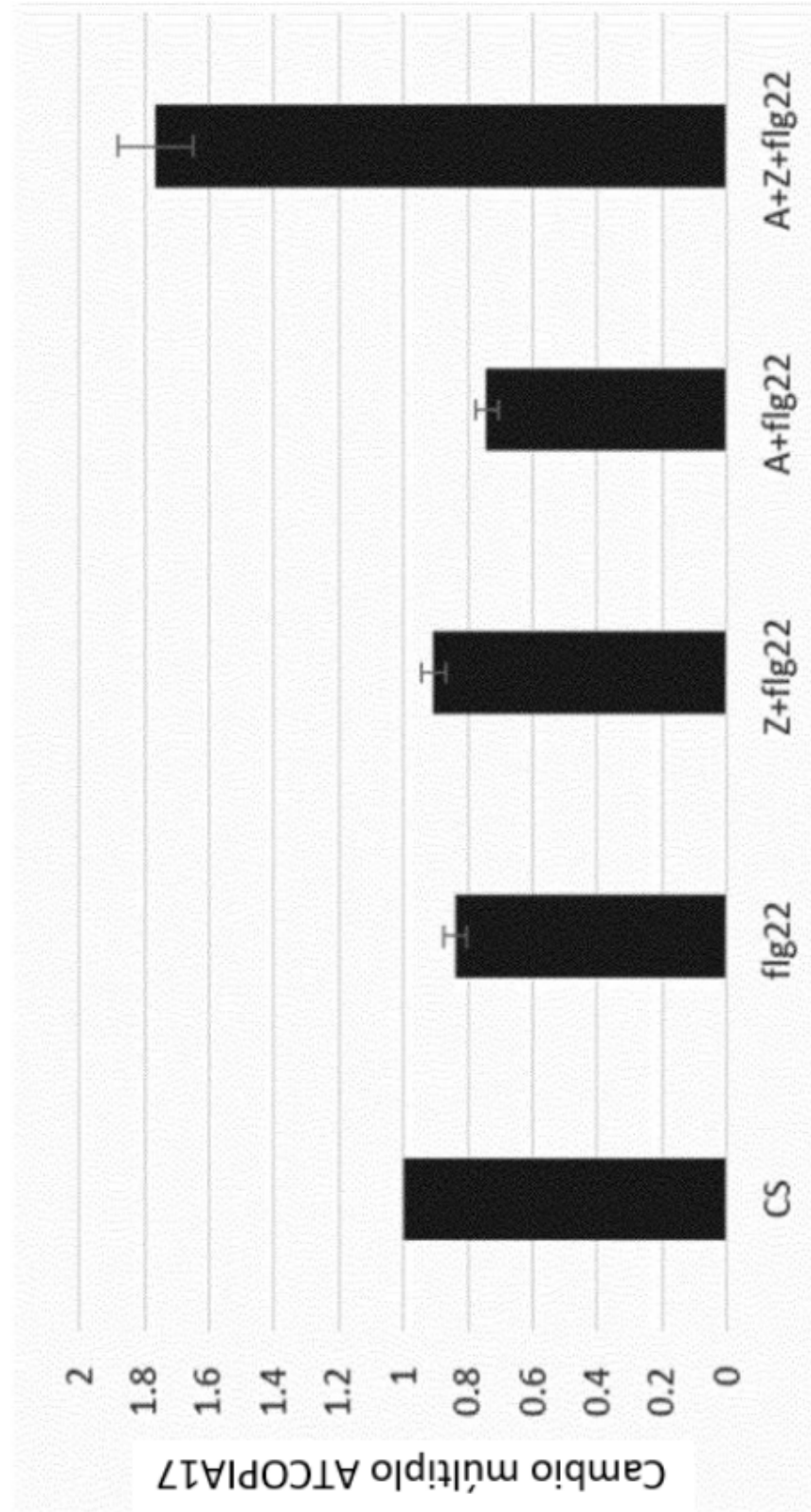


Fig. 13

