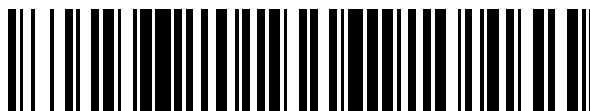


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 318**

51 Int. Cl.:

**A01H 5/00** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 9/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2009 E 09734624 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2268129**

54 Título: **Vectores de expresión virales de plantas y uso de los mismos para generar variaciones genotípicas en genomas de plantas**

30 Prioridad:

**21.04.2008 US 71288 P**

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

**18.11.2015**

73 Titular/es:

**DANZIGER INNOVATIONS LTD. (50.0%)**

**Moshav Mishmar HaShiva P.O. Box 24**

**50297 Beit-Dagan, IL y**

**YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY**

**OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM**

**LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VAINSTEIN, ALEXANDER y**

**ZUKER, AMIR**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 551 318 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

Vectores de expresión virales de plantas y uso de los mismos para generar variaciones genotípicas en genomas de plantas

**Campo y antecedentes de la invención**

5 La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a vectores de expresión virales de plantas y, más particularmente, pero no exclusivamente, al uso de los mismos para generar variaciones genotípicas en genomas de plantas.

10 La modificación y la mejora genéticas de plantas de cultivo así como la protección de nuevas variedades son fundamentales para la agricultura moderna. Durante los últimos años se ha generado una enorme cantidad de datos de los diversos grandes proyectos de secuenciación de genoma, permitiendo un progreso significativo en las tecnologías transgénicas en agricultura. Tales tecnologías, incluyendo expresión génica, modificación génica, mutagénesis génica específica del sitio y direccionamiento génico de secuencias de genomas de plantas, permiten el desarrollo de modelos de investigación de plantas básicos y pueden usarse directamente para la mejora genética y la protección de especies vegetales importantes desde el punto de vista agronómico.

15 Las moléculas de ADN foráneo (por ejemplo ADN-T) suministradas por *Agrobacterium* se integran en el genoma de la planta en roturas bicatenarias (DSB) naturales que pueden generarse por enzimas de restricción de corte poco frecuente. Estas DSB se reconocen y se reparan por proteínas de unión de extremos no homólogos (NHEJ) de la planta y da como resultado la integración frecuente del ADN foráneo en estos sitios al azar [Salomon *et al.* EMBO J (1998) 17: 6086-6095; Tzfira *et al.* Plant Physiol (2003) 133: 1011-1023, Tzfira *et al.* Trends Genet (2004) 20: 375-383]. Las DSB también pueden dar como resultado un direccionamiento génico basado en recombinación homóloga (HR) potenciado en células vegetales [Puchta *et al.* Proc Natl Acad Sci USA (1996) 93: 5055-5060].

25 Desarrollos recientes en el campo de las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) como herramientas novedosas para modificaciones del genoma ofrecen nuevas posibilidades para la inducción específica del sitio de DSB en genomas de plantas y para el desarrollo de métodos basados en NHEJ para el direccionamiento génico en especies vegetales y la protección de plantas. Las ZFN son enzimas de restricción sintéticas que pueden diseñarse específicamente para unirse a y escindir prácticamente cualquier tramo largo de secuencias de ADNbc (véase la figura 1). Se mostró que las ZFN son adecuadas para la inducción de DSB genómica específica del sitio en especies vegetales usando vectores no virales [Lloyd *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2005) 102: 2232-2237; Tovkach *et al.* The Plant Journal (2009) 57, 747-757]. Se mostraron efectos similares en genomas humano [Moehle *et al.* Proc Natl Acad Sci USA (2007) 104: 3055-3060] y de insecto [Beumer *et al.* Genetics (2006) 172: 2391-2403].

35 El uso de virus de plantas como vehículos para introducir y expresar genes no virales en plantas está bien documentado [por ejemplo Donson *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. (1991) 88: 7204-8; Chapman *et al.* Plant J. (1992) 2: 549-57; Dolja *et al.*, Virology (1998) 252: 269-74]. La infección de plantas con virus modificados es más simple y más rápida que la regeneración de plantas transformadas de manera estable (tal como se comentó anteriormente) dado que los virus de plantas tienen una menuda un tamaño pequeño (entre 3000 y 10.000 nucleótidos), son fáciles de manipular, tienen una capacidad inherente para entrar en la célula vegetal, conducen a la expresión inmediata del gen heterólogo y se multiplicarán para producir un elevado número de copias del gen de interés. Se han modificado mediante ingeniería vectores virales para el suministro de material genético y la expresión de proteínas recombinantes en plantas [por ejemplo, Pogue, Annu. Rev. Phytopathol. (2002) 40: 45-74; Gleba, *et al.*, Curr. Opin. Plant Biol. (2004) 7: 182-188; Dolja *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 10208-10212; patente estadounidense n.º 5316931 y patente estadounidense n.º 5811653 para vectores de virus de ARN]. Se considera que los sistemas de expresión virales son sistemas de expresión transitoria ya que los vectores virales no están integrados en el genoma del huésped, sin embargo, dependiendo de qué virus se use, la multiplicación de virus y la expresión génica pueden persistir durante periodos largos (hasta varias semanas o meses).

45 Hasta la fecha no se ha demostrado ni sugerido el uso de vectores virales para introducir DSB en genomas de plantas.

**Técnica relacionada:**

50 La patente estadounidense n.º 7.229.829 da a conocer vectores de TRV (TRV-RNA1 y TRV-RNA2) que portan secuencias de ácido nucleico heterólogas para su suministro al interior de plantas para transformar plantas y células vegetales. Específicamente, la patente estadounidense n.º 7.229.829 enseña vectores para silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) incluyendo vectores diseñados para la supresión de expresión génica en plantas huésped (por ejemplo transcritos antisentido para desactivar la expresión de genes sin la necesidad de transformar genéticamente la planta) o vectores diseñados para la expresión de ácidos nucleicos heterólogos (por ejemplo ácidos nucleicos que median en el silenciamiento génico o la supresión de genes).

55 Las publicaciones estadounidenses n.ºs 20050026157 y 20070134796 dan a conocer composiciones y métodos para la escisión dirigida de cromatina celular y para alteraciones dirigidas (por ejemplo inserciones) de secuencias de nucleótidos celulares. Para seleccionar como diana sitios genómicos específicos, se construyen proteínas de fusión

que comprenden un dominio de dedo de zinc y un dominio de escisión [es decir proteínas de dedos de zinc (ZFP)]. Además, la publicación estadounidense n.º 20070134796 enseña vectores (por ejemplo vectores bacterianos tales como vectores de plásmido y vectores virales tales como vectores adenovirales y retrovirales) que comprenden las ZFP.

- 5 La publicación PCT n.º WO07139982 da a conocer métodos y composiciones para inactivar genes humanos (por ejemplo el gen CCR5) usando nucleasas de dedos de zinc (ZFN). Las ZFN comprenden una proteína de dedos de zinc (puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más dedos de zinc) y un dominio de escisión o semidominio de escisión (es decir, un dominio de nucleasa). Además, la publicación PCT n.º WO07139982 enseña vectores que comprenden ZFN y/o una secuencia donadora para la integración dirigida en un gen diana.
- 10 Las patentes estadounidenses n.ºs 7.309.605 y 6.610.545 dan a conocer secuencias de nucleótidos que codifican para la enzima I-SceI (una endonucleasa bicatenaria que escinde ADN dentro de su sitio de reconocimiento). Estas secuencias pueden incorporarse en vectores de clonación y expresión (tal como vectores de plásmido, bacteriófago o cósmido) y pueden usarse para transformar líneas celulares y organismos transgénicos (por ejemplo mamíferos, plantas). Los vectores dados a conocer son útiles en el mapeo génico, en la recombinación génica dirigida al sitio y
- 15 en la inserción de genes dirigida al sitio *in vivo*.

### Sumario de la invención

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método de generación de variación genotípica en un genoma de una planta, comprendiendo el método introducir en la planta al menos un vector de expresión viral que codifica para al menos una nucleasa quimérica que comprende un dominio de unión a ADN, una nucleasa y una señal de localización para un orgánulo que contiene ADN, en el que el dominio de unión a ADN media en el direccionamiento específico de la nucleasa al genoma de la planta, generando de ese modo variación genotípica en el genoma de la planta.

20

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método de tratamiento de una infección de una planta por un patógeno, comprendiendo el método introducir en la planta al menos un vector de expresión viral que codifica para al menos una nucleasa quimérica que comprende un dominio de unión a ADN y una nucleasa, en el que el dominio de unión a ADN media en el direccionamiento de la nucleasa al genoma del patógeno, previendo o tratando de ese modo una infección de una planta por un patógeno.

25

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método de marcaje de un genoma de una planta, comprendiendo el método introducir en la planta al menos un vector de expresión viral que codifica para al menos una nucleasa quimérica que comprende un dominio de unión a ADN, una nucleasa y una señal de localización para un orgánulo que contiene ADN, en el que el dominio de unión a ADN media en el direccionamiento específico de la nucleasa al genoma de la planta, marcando de ese modo el genoma de la planta.

30

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método de generación de esterilidad masculina en una planta, comprendiendo el método regular por incremento en la planta un gen estructural o funcional de una mitocondria o un cloroplasto asociado con esterilidad masculina introduciendo en la planta al menos un vector de expresión viral que codifica para al menos una nucleasa quimérica que comprende un dominio de unión a ADN, una nucleasa y una señal de localización de mitocondria o cloroplasto y un constructo de expresión de ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga que puede regular por incremento el gen estructural o funcional de una mitocondria o un cloroplasto cuando se direcciona al interior del genoma de la mitocondria o el cloroplasto, en el que el dominio de unión a ADN media en el direccionamiento de la secuencia de ácido nucleico heteróloga al genoma de la mitocondria o el cloroplasto, generando de ese modo esterilidad masculina en la planta.

35

40

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método de generación de una planta resistente a herbicidas, comprendiendo el método introducir en la planta al menos un vector de expresión viral que codifica para al menos una nucleasa quimérica que comprende un dominio de unión a ADN, una nucleasa y una señal de localización de cloroplasto, en el que el dominio de unión a ADN media en el direccionamiento de la nucleasa a un gen que confiere sensibilidad a herbicidas, generando de ese modo la planta resistente a herbicidas.

45

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un vector de expresión viral de plantas basado en TRV (virus del cascabeleo del tabaco) que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para al menos una nucleasa quimérica que comprende un dominio de unión a ADN, una nucleasa y una señal de localización para un orgánulo que contiene ADN.

50

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un vector de expresión basado en pTRV que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para al menos dos secuencias de polipéptidos heterólogas.

55 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una célula vegetal que comprende al menos una nucleasa quimérica, en la que la nucleasa quimérica comprende un dominio de unión a ADN, una nucleasa y una señal de localización para un orgánulo que contiene ADN, y en la que la nucleasa

quimérica induce la escisión de una secuencia diana.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una planta transgénica que comprende el vector de expresión viral de plantas tal como se define en las reivindicaciones.

5 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método de generación de una planta transgénica, comprendiendo el método: introducir en una o más células de la planta al menos un vector de expresión viral basado en TRV que codifica para al menos una nucleasa quimérica que comprende un dominio de unión a ADN, una nucleasa y una señal de localización para un orgánulo que contiene ADN.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en las SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 70, 72, 74, 76, 84, 86 u 88.

10 Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 71, 73, 75, 77, 85, 87 u 89.

Según algunas realizaciones de la invención, la generación de variación genotípica es transitoria.

Según algunas realizaciones de la invención, la variación genotípica comprende una inserción de nucleótidos, una delección de nucleótidos o una combinación de los mismos.

15 Según algunas realizaciones de la invención, el marcaje comprende una inserción de nucleótidos, una delección de nucleótidos o una combinación de los mismos.

Según algunas realizaciones de la invención, el vector de expresión viral comprende un vector de expresión de virus del cascabeleo del tabaco (TRV).

20 Según algunas realizaciones de la invención, el vector de expresión de TRV comprende un vector de expresión basado en pTRV2.

Según algunas realizaciones de la invención, al menos un vector de expresión viral codifica para dos nucleasas quiméricas.

Según algunas realizaciones de la invención, el al menos un vector de expresión viral comprende dos vectores de expresión virales.

25 Según algunas realizaciones de la invención, los dos vectores de expresión virales se introducen en la planta de manera concomitante.

Según algunas realizaciones de la invención, la introducción en la planta se efectúa mediante una *Agrobacterium*.

Según algunas realizaciones de la invención, la introducción de la *Agrobacterium* se efectúa mediante inyección.

30 Según algunas realizaciones de la invención, la introducción de la *Agrobacterium* se efectúa mediante infiltración en hojas.

Según algunas realizaciones de la invención, la introducción en la planta se efectúa mediante infección por viriones.

Según algunas realizaciones de la invención, la al menos una nucleasa quimérica comprende dos nucleasas quiméricas.

35 Según algunas realizaciones de la invención, el vector de expresión viral de plantas o la planta transgénica comprende además una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido heterólogo.

Según algunas realizaciones de la invención, el vector de expresión viral de plantas o la planta transgénica comprende una estructura principal de pTRV.

Según algunas realizaciones de la invención, el pTRV es un pTRV1 (n.º de registro de GenBank: AF406990).

Según algunas realizaciones de la invención, el pTRV es un pTRV2 (n.º de registro de GenBank: AF406991).

40 Según algunas realizaciones de la invención, la secuencia de ácido nucleico carece de una secuencia 2b (SEQ ID NO: 43).

Según algunas realizaciones de la invención, la secuencia de ácido nucleico comprende un potenciador  $\Omega$  (SEQ ID NO: 44).

45 Según algunas realizaciones de la invención, la secuencia de ácido nucleico comprende dos promotores subgenómicos (sgP) separados para regular la transcripción de los al menos dos polipéptidos heterólogos.

Según algunas realizaciones de la invención, las al menos dos secuencias de polipéptidos heterólogas están separadas por una secuencia de ácido nucleico que codifica para un dominio de escisión.

Según algunas realizaciones de la invención, el dominio de escisión comprende una secuencia de proteína de tipo T2A (SEQ ID NO: 40).

- 5 Según algunas realizaciones de la invención, la secuencia de ácido nucleico de las al menos dos secuencias de polipéptidos heterólogos es tal como se expone en las SEQ ID NO: 84, 86 u 88.

Según algunas realizaciones de la invención, la secuencia de aminoácidos de al menos dos secuencias de polipéptidos heterólogos es tal como se expone en las SEQ ID NO: 85, 87 u 89.

- 10 Según algunas realizaciones de la invención, las al menos dos secuencias de polipéptidos heterólogos codifican para un gen de una planta.

Según algunas realizaciones de la invención, las al menos dos secuencias de polipéptidos heterólogos comprenden proteínas quiméricas, en las que cada una de las proteínas quiméricas comprende un dominio de unión a ADN, una nucleasa y una señal de localización para un orgánulo que contiene ADN.

- 15 Según algunas realizaciones de la invención, la señal de localización comprende una secuencia de subunidad pequeña de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (RSSU) (SEQ ID NO: 138).

Según algunas realizaciones de la invención, la señal de localización comprende una secuencia de subunidad de ATPasa beta (ATP-β) (SEQ ID NO: 139).

Según algunas realizaciones de la invención, el dominio de unión a ADN se une a una secuencia de 9 nucleótidos.

- 20 Según algunas realizaciones de la invención, el dominio de unión a ADN comprende al menos un dominio de dedo de zinc.

Según algunas realizaciones de la invención, el dominio de dedo de zinc comprende tres dominios de dedo de zinc.

Según algunas realizaciones de la invención, la nucleasa comprende un dominio de escisión de una endonucleasa de restricción de tipo II.

- 25 Según algunas realizaciones de la invención, la endonucleasa de restricción de tipo II es una endonucleasa de restricción FokI.

Según algunas realizaciones de la invención, la planta comprende una *Petunia hybrida*.

Según algunas realizaciones de la invención, la planta comprende una *Nicotiana tabacum*.

- 30 Según algunas realizaciones de la invención, la planta se selecciona del grupo que consiste en una *Arabidopsis thaliana*, una *Artemisia* sp., una *Artemisia annua*, una *Beta vulgaris*, una *Solanum tuberosum*, una *Solanum pimpinellifolium*, una *Solanum lycopersicum*, una *Solanum melongena*, una *Spinacia oleracea*, una *Pisum sativum*, una *Capsicum annuum*, una *Cucumis sativus*, una *Nicotiana benthamiana*, una *Nicotiana tabacum*, una *Zea mays*, una *Brassica napus*, una *Gossypium hirsutum* cv. *Siv'on*, una *Oryza sativa* y una *Oryza glaberrima*.

Según algunas realizaciones de la invención, la célula es una célula meristemática.

- 35 Según algunas realizaciones de la invención, el orgánulo que contiene ADN se selecciona del grupo que consiste en un núcleo, un cloroplasto y una mitocondria.

Según algunas realizaciones de la invención, el direccionamiento específico de la nucleasa al genoma de la *Petunia hybrida* es a una fitoeno desaturasa (PDS) o una flavanona 3 beta-hidroxilasa (FHT) de la *Petunia hybrida*.

Según algunas realizaciones de la invención, la señal de localización de mitocondria comprende una subunidad de ATPasa beta (ATP-β) (SEQ ID NO: 139).

- 40 Según algunas realizaciones de la invención, la señal de localización de cloroplasto comprende una subunidad pequeña de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (Rssu) (SEQ ID NO: 138).

- 45 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque en la práctica o pruebas de realizaciones de la invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen métodos y/o materiales a modo de ejemplo. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones, será predominante. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitativos.

**Breve descripción de los dibujos**

En el presente documento se describen algunas realizaciones de la invención, sólo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que las particularidades mostradas son a modo de ejemplo y con fines de comentar de manera ilustrativa realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica cómo pueden ponerse en práctica realizaciones de la invención.

En los dibujos:

La figura 1 es una ilustración esquemática de nucleasas de dedos de zinc (ZFN) como herramienta para la inducción de roturas bicatenarias (DSB) genómicas. La figura 1A representa la estructura de genes quiméricos de ZFN compuestos por un dominio de reconocimiento de ADN sintético que consiste en tres dedos de zinc C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> fusionados a una enzima de restricción de ADN no específica (habitualmente la endonucleasa FokI); la figura 1B representa genes de ZFN personalizados, en los que cada dedo reconoce una secuencia de tres nucleótidos y puede diseñarse potencialmente para reconocer cualquier combinación de nueve nucleótidos (mostrados a modo de ejemplo en este caso mediante la secuencia diana GGGGAAGAA, SEQ ID NO: 42). Dado que FokI funciona como dímero, se usan dos conjuntos de ZFN para unirse al ADN diana, lo que da como resultado una combinación única de 18 nucleótidos; la figura 1C representa la unión de las ZFN al ADN diana; la figura 1D representa la digestión del ADN mediante el dominio de endonucleasa FokI y la creación de una rotura bicatenaria (DSB). La figura 1E representa la reparación de las DSB mediante proteínas de unión de extremos no homólogos (NHEJ) que conduce a mutaciones de delección o inserción en el sitio de reparación.

La figura 2A muestra el alineamiento de secuencias entre la secuencia de virus de *Thosea asigna* para el péptido de autoescisión (Tav-T2A, SEQ ID NO: 51) y la secuencia modificada según el uso de codones de *Petunia* (pTRV-T2A, SEQ ID NO: 52).

La figura 2B muestra el fragmento de ADN al azar de *Petunia* RB P1-25 (SEQ ID NO: 8).

La figura 3 muestra el fragmento de ADN al azar de *Petunia* RB P1-36 (SEQ ID NO: 9).

La figura 4 es una ilustración esquemática de una estructura de ZFN construida según las presentes enseñanzas. El constructo de ZFN comprende una señal de localización nuclear (NLS), un dominio de unión a ADN de dedo de zinc y un dominio de ADN nucleasa de FokI.

Las figuras 5A-D muestran las secuencias de NLS-P1-25-ZFN1, NLS-P1-25-ZFN2, NLS-P1-36-ZFN1 y NLS-P1-36-ZFN2. La secuencia es de la quimera completa: NLS, ZFN y FokI (dominio d). Las secuencias de señal de localización nuclear (NLS) se representan en minúscula; el codón de terminación y el primer condón de nucleasa (dominio d de FokI) se representan en negrita. La figura 5A muestra la secuencia de NLS-P1-25-ZFN1 (SEQ ID NO: 31); la figura 5B muestra la secuencia de NLS-P1-25-ZFN2 (SEQ ID NO: 32); la figura 5C muestra la secuencia de NLS-P1-36-ZFN1 (SEQ ID NO: 33); y la figura 5D muestra la secuencia de NLS-P1-36-ZFN2 (SEQ ID NO: 34).

La figura 5E es un esquema que muestra el vector pET28 original (SEQ ID NO: 39, disponible comercialmente de Novagen) y el vector pET28 modificado (SEQ ID NO: 49), pET28c.SX, que comprende una modificación de MCS. Para construir pET28c-SX, se delecionaron los nucleótidos 179 a 158 (indicados en negrita) de MSC de pET28c mediante digestión con Sall y XhoI.

Las figuras 6A-D son mapas esquemáticos de pTRV2 (n.º de registro de GenBank AF406991) y sus modificaciones. La figura 6A es una ilustración esquemática del vector de expresión pTRV2 completo; la figura 6B representa la eliminación del fragmento 5' CDS de 2b; la figura 6C representa la adición de 5'UTR de TMV ( $\Omega$ ); y la figura 6D representa la adición de sgP-CP de PEBV.

La figura 6E son mapas esquemáticos de parte de pTRV1 que muestra ARN1 (n.º de registro de GenBank AF406990).

Las figuras 7A-E son imágenes que ilustran la expresión de GUS en meristemos de plantas de petunia inoculadas con pTRV2-GUS y pTRV2- $\Delta$ 2b-GUS. Las figuras 7A-B representan meristemos de plantas de petunia 7 días tras la inoculación del tallo con los vectores; y las figuras 7C-D representan meristemos de plantas de petunia 37 días tras la inoculación del tallo con los vectores. Las plantas inoculadas con pTRV2-GUS se muestran en las figuras 7A y 7C. Las plantas inoculadas con pTRV2- $\Delta$ 2b-GUS se muestran en las figuras 7B y 7D. La figura 7E muestra tinción con GUS en plantas de petunia propagadas *in vitro* 6 meses tras la inoculación con pTRV2- $\Delta$ 2b-GUS.

Las figuras 8A-G son imágenes que ilustran la expresión de genes marcadores en diversas plantas tras la inoculación con vectores basados en pTRV2. La figura 8A representa tinción con GUS (24 días tras la inoculación) de plantas de pimiento (*Capsicum annuum*, Endra-1750) inoculadas con pTRV2- $\Delta$ 2b-GUS; la figura 8B representa tinción con GFP (41 días tras la inoculación) de plantas de pimiento (*Capsicum annuum*, Endra-1750) inoculadas con pTRV2- $\Delta$ 2b-GFP; la figura 8C representa tinción con GUS (13 y 30 días tras la inoculación) de plantas de *Arabidopsis* inoculadas con pTRV2-GUS; la figura 8D representa tinción con GUS (14 días tras la inoculación) de

plantas de tomate (*Solanum pimpinellifolium La121*) inoculadas con pTRV2- $\Delta$ 2b- $\Omega$ Gus; la figura 8E representa tinción con GFP (31 días tras la inoculación) de plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas con pTRV2- $\Delta$ 2b-GFP, la figura 8F representa tinción con GUS (44 días tras la inoculación) de plantas de *Nicotiana benthamiana* inoculadas con pTRV2-35S $\Omega$ GUS; y la figura 8G representa pigmentación de *Nicotiana benthamiana* inoculada con pTRV2- $\Delta$ 2b-PAP (76 días tras la inoculación).

Las figuras 9A-B son imágenes que ilustran la tinción con GUS 51 días tras la inoculación de plantas de petunia con pTRV2- $\Delta$ 2b- $\Omega$ GUS (figura 9A) en comparación con pTRV2- $\Delta$ 2b-GUS (figura 9B). Obsérvese que las flechas apuntan a regiones meristemáticas.

Las figuras 10A-C son imágenes que ilustran la coexpresión de dos genes en meristemas de plantas de *N. benthamiana*. La figura 10A representa plantas inoculadas con pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-GFP. Se evaluó la tinción con GFP 17 días tras la inoculación con pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-GFP; las figuras 10B-C representan plantas inoculadas conjuntamente con pTRV2- $\Delta$ 2b-GUS y pTRV2- $\Delta$ 2b-GFP. Se evaluó la tinción con GFP 17 días tras la inoculación (figura 10B) seguida por tinción con GUS en la misma muestra de tejido (figura 10C).

Las figuras 11A-F son imágenes que ilustran la expresión génica medida por virus (DsRed) en células de diferentes plantas. Se inocularon plantas con pTRV1 y pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-DsRed y se evaluó la fluorescencia usando microscopía de barrido láser confocal. El panel superior (figuras 11A, C, E) muestra la autofluorescencia de la clorofila de las células y el panel inferior (figuras 11B, D, F) muestra la fluorescencia de DsRed en las mismas células. Se evaluó la autofluorescencia a una excitación (ex) de 488 nm y emisión (em) a más de 650 nm, se evaluó DsRed a una ex de 545 nm y una em de entre 585-615 nm.

Las figuras 12A-H son imágenes que ilustran la expresión génica a largo plazo (DsRed) en diferentes plantas tras la inoculación con pTRV1 y pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-DsRed. Se obtuvieron imágenes usando un estereomicroscopio de fluorescencia. La fluorescencia de DsRed (figuras 12A, C, D, G) era visible en diferentes partes de las plantas, incluyendo las raíces (figuras 12D, F). El panel inferior (figuras 12B, E, F, H) muestra (las mismas) imágenes tomadas bajo un campo brillante. Obsérvese que se inoculó *N. Benthamiana* con viriones de TRV y se inocularon *N. tobaccum* y *Petunia hybrida* por medio de agroinfiltración.

Las figuras 13A-K son imágenes que ilustran la aplicabilidad del vector TRV2 para la expresión de genes foráneos en diversas plantas. Se demostró la expresión de los genes marcadores GUS, GFP y DsRed en diversas plantas que pertenecen a diferentes familias tras la inoculación con vectores de TRV: se inoculó *Beta vulgaris* (figura 13E) con pTRV- $\Delta$ 2b-GUS (muestra teñida con GUS 20 días tras la inoculación); se inoculó *Solanum melongena* (figuras 13F-G) con pTRV- $\Delta$ 2b-sgP-Rssu-EGFP (evaluada 5 días tras la inoculación); se inocularon *Cucumis sativus* (figuras 13A-B), *Gossypium hirsutum* cv. *Siv'on* (figuras 13H-I) y *Brassica napus* (figuras 13J-K) con pTRV- $\Delta$ 2b-sgP-DsRed (evaluadas 5, 7 y 16 días tras la inoculación, respectivamente). También se demostraron imágenes de campo brillante. Se inoculó *Spinacia oleracea* (figuras 13C-D) con pTRV- $\Delta$ 2b-GUS (figura 13C, muestra teñida con GUS 20 días tras la inoculación) y pTRV- $\Delta$ 2b-sgP-DsRed (figura 13D, evaluada 12 días tras la inoculación). Todas las imágenes se tomaron usando un estereomicroscopio de fluorescencia.

Las figuras 14A-C son imágenes que ilustran la expresión de DsRed2 en *Zea mays* Var. Royalty coleoptile mediante vectores virales de TRV. Se inocularon semillas con savia que contenía viriones diluidos, extraídos de *Petunia* sometida a agroinfiltración con pTRV1 y pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-DsRed. Se evaluó DsRed a los 16 días tras la inoculación (dpi). Visible (figura 14A), DsRed (figura 14B) y fusionada (figura 14C).

Las figuras 15A-G son imágenes que ilustran la expresión dirigida a cloroplasto de EGFP en petunia y tabaco tras la infección con pTRV2-sgP-Rssu-EGFP. Se inocularon *N. Tabacum* cv Samsung y *Petunia hybrida* CV. RB con pTRV2-sgP-Rssu-EGFP y se sometió a ensayo la expresión de EGFP en cloroplastos aproximadamente 9 días tras la inoculación. Se evaluó la autofluorescencia (figuras 15A, E) de la clorofila a una excitación (ex) de 488 nm y se evaluó a una emisión (em) de más de 650 nm. Se detectó la EGFP (figuras 15B, F) mediante una ex de 488 y una em de entre 505-530 nm. Señal fusionada (figuras 15D y G, superposición de rosa y verde dando amarillo). El recuadro (figura 15C) muestra tejido que expresa EGFP visualizado mediante un estereomicroscopio de fluorescencia.

Las figuras 16A-K son imágenes que ilustran la expresión dirigida a mitocondria de EGFP en petunia tras la infección con pTRV2-sgP-ATP $\beta$ -EGFP. Se inoculó *Petunia hybrida* CV. RB con pTRV2-sgP-ATP $\beta$ -EGFP y se sometió a ensayo la expresión de EGFP en mitocondrias aproximadamente 5 días tras la inoculación. Se evaluó la autofluorescencia (figura 16A) a una ex de 488 y a una em de más de 650 nm. Se evaluó la EGFP (figura 16B) a una ex. de 488 y una em de entre 505-530 nm. Se prepararon protoplastos (figuras 16E-K) a partir de *Petunia* RB que expresa EGFP dirigida a mitocondria, se tiñeron con MitoTracker y se evaluaron a una ex de 545 nm y una em de entre 585-615 nm. El recuadro (figura 16G) muestra tejido que expresa EGFP visualizado mediante un estereomicroscopio de fluorescencia.

Las figuras 17A-D son imágenes que ilustran la coexpresión de genes marcadores en diferentes compartimentos celulares. Se expresó DsRed en el citosol y GFP en los cloroplastos de células de hojas de *N. tabacum* cv. Xanthi.

Se coinfectaron plantas con pTRV1 y pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-DsRed y pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-Rssu-EGFP. Se evaluó la autofluorescencia (figura 17A) usando una ex de 488 nm y una em de más de 650 nm, se evaluó la GFP (figura 17B) usando una ex de 488 nm y una em de entre 505-530 nm, se evaluó DsRed (figura 17C) usando una ex de 545 nm y una em de entre 585-615 nm, fusión (figura 17D) representa una fusión de los tres filtros (señales fusionadas).

5 Las figuras 18A-L son imágenes que ilustran la coexpresión de DsRed y EGFP en diferentes plantas usando pTRV2 construido con los dos genes indicadores en tándem separados por T2A. Se inocularon plantas (*Petunia hybrida*, *N. tobaccum* y *N. benthamiana*) con pTRV1 y pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-DsRed-T2A-NLS-EGFP. Se evaluó la fluorescencia usando microscopía de barrido láser confocal. Se muestran la autofluorescencia de la clorofila de las células (figuras 18A, E, I), EGFP (figuras 18B, F, J) y DsRed (figuras 18C, G, K) y la señal fusionada (figuras 18D, H, L). Se autoevaluó la fluorescencia a una ex de 488 nm y una em a más de 650 nm, se evaluó la EGFP a una ex de 488 nm y una em de entre 505-530 nm, se evaluó DsRed2 a una ex de 545 nm y una em de entre 585-615 nm.

15 Las figuras 19A-J son imágenes que ilustran la coexpresión de DsRed y GFP en diferentes plantas usando pTRV2 construido con los dos genes indicadores en tándem accionados por promotores subgenómicos dobles separados. Se inocularon plantas (*N. tobaccum* y *N. benthamiana*) con pTRV1 y pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-GFP-sgP-DsRed. Se evaluó la fluorescencia usando microscopía de barrido láser confocal. Se muestran la autofluorescencia de la clorofila de las células (figuras 19A, E), GFP (figuras 19B, F) y DsRed (figuras 19C, G). La figura 19D representa una imagen en campo brillante (para *N. tobaccum*) y la figura 19H representa una imagen de señal fusionada (para *N. benthamiana*). Las figuras 19I-J son imágenes, tomadas mediante estereomicroscopio, de tejidos de *N. benthamiana* inoculados (3 dpi). Se evaluó la ex de autofluorescencia a 488 nm y la em a más de 650 nm, se evaluó la GFP a una ex de 488 nm y una em de entre 505-530 nm, se evaluó DsRed2 a una ex de 545 nm y una em de entre 585-615 nm.

25 La figura 20 es una imagen que ilustra la digestión de fragmentos de PCR que portan sitios diana artificiales de P1-25-1, P1-25-2, P1-36-1 y P1-36-2 (P25-TS1, P25-TS2, P36-TS1, P36-TS2 respectivamente, mediante ZFN específicas. Se incubaron fragmentos de PCR (aproximadamente 900 pb) que portaban secuencias diana de tipo palíndromo con 25-ZFN-1, 25-ZFN-2 ó 36-ZFN-1, 36-ZFN-2 y se separaron los productos de digestión mediante gel de agarosa. Obsérvese que el TS (sitio diana) es de tipo palíndromo.

La figura 21 es una imagen que ilustra la digestión de un fragmento NcoI/BamHI (740 pb) de pBS-P1-36, que porta una secuencia P1-36 diana, con 36-ZFN1 y 36-ZFN2.

30 La figura 22 es una imagen que ilustra la digestión de plásmido pBS que porta P1-36 (pBS-P1-36) mediante una mezcla de ZFN (36-ZFN 1 y 2). Se indica el fragmento de tamaño esperado (515 pb) mediante una flecha.

35 La figura 23 es una imagen que ilustra la digestión de un plásmido que porta sitios palindrómicos PDS1 o PDS2 diana. Los sitios palindrómicos sometidos a prueba se cortaron con ZFN específicas (PDS-ZFN1 y PDS-ZFN2) y Agel lo que dio un fragmento de aproximadamente 950 pb, tal como se esperaba. Los volúmenes indicados encima de las columnas hacen referencia a la cantidad de enzima que contiene extracto bruto usada. Obsérvese que el TS (sitio diana) es de tipo palíndromo.

Las figuras 24A-B son imágenes que ilustran la expresión de DsRFP (figura 24B) y GFP (figura 24A) en plantas de petunia inoculadas con pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-CP-PEBV que porta DsRFP y GFP separadas por T2A. Las figuras representan tejidos de hoja de plantas de petunia 10 días tras la inoculación del tallo con el vector.

40 Las figuras 25A-B muestran los extremos N-terminales de la secuencia del gen uidA mutado. La figura 25A representa la secuencia del gen uidA que contiene el inserto de sitios diana de QEQ-ZFN (negrita) y el espaciador con codón de parada (rojo). La figura 25B representa cómo la reparación errónea de las roturas bicatenarias formadas por la QEQ-ZFN puede conducir a la eliminación del codón de parada y la reconstrucción del gen uidA.

45 Las figuras 26A-J son imágenes que ilustran la reparación basada en TRV de uidA en plantas. Se inocularon plantas de petunia y tabaco transgénicas que portaban uidA mutado *in vitro* o *in vivo* con pTRV1 y pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-QEQ-ZFN. En diferentes momentos tras la agroinfiltración o inoculación con viriones, se evaluó la actividad de GUS en diversas partes de la planta incluyendo en tejidos que se desarrollaron tras la inoculación. La figura 26A representa una línea 65 de *Petunia hybrida* transgénica para uidA mutado evaluada para determinar la expresión de GUS 12 días tras la agroinoculación *in vitro*. La figura 26B representa una línea 3 de *Nicotiana tobaccum* transgénica para uidA mutado evaluada para determinar la expresión de GUS 22 días tras la agroinoculación *in vitro*. La figura 26C representa una línea I de *Petunia hybrida* transgénica para uidA mutado evaluada para determinar la expresión de GUS 11 días tras la agroinoculación *in vitro*. La figura 26D representa una línea 3 de *Nicotiana tobaccum* transgénica para uidA mutado evaluada para determinar la expresión de GUS 50 días tras la inoculación. La figura 26E representa una línea N de *Petunia hybrida* transgénica para uidA mutado evaluada para determinar la expresión de GUS 17 días tras la agroinoculación *in vitro*. La figura 26F representa una inoculación con viriones *in vitro* de la línea I de *Petunia hybrida* transgénica para uidA mutado evaluada para determinar la expresión de GUS que se llevó a cabo 15 días tras la inoculación. La figura 26G representa una agroinoculación *in vitro* de la línea I de *Petunia hybrida* transgénica para uidA mutado con DO de 0,08, evaluada 29 días tras la inoculación. La figura 26H representa una agroinoculación *in vitro* de la línea I de *Petunia hybrida* transgénica para uidA mutado con DO de 0,8,



evaluada 29 días tras la inoculación. La figura 26I representa una línea 11 de *Nicotiana tabaccum* transgénica para uidA mutado, no tratada con TRV, sometida a prueba para GUS, y la figura 26J representa una regeneración de primordios de la línea I de *Petunia hybrida* transgénica para uidA mutado evaluada para determinar la expresión de GUS, tras agroinoculación *in vitro*.

5 La figura 27 muestra el alineamiento de 20 secuencias mutantes (SEQ ID NO: 96-116) en uidA mutado (GUS) identificado por la interrupción del sitio *Ddel* en el codón de parada GUS de plantas de *N. tabacum* CV Samsung (Nt) así como *Petunia hybrida* (Pet) transgénicas. Obsérvese que los resultados representaban inserciones (1 ó 2 nucleótidos) y deleciones (menores o iguales a 49 nucleótidos). La restauración de la actividad GUS puede atribuirse a una mutación en Pet30.

10 La figura 28A muestra la secuencia de exón de fitoeno desaturasa (PDS) de *Petunia hybrida* RB (n.º de registro de GenBank AY593974.1, SEQ ID NO: 131). Se confirmó esta secuencia mediante resecuenciación (indicado mediante letras en mayúscula). Las secuencias resaltadas son los sitios diana (sitio diana PDS-ZFN1 - SEQ ID NO 140 y sitio diana PDS-ZFN2 - SEQ ID NO: 141) de las PDS-ZFN (SEQ ID NO: 71 y 73) generadas por la presente invención (SEQ ID NO: 70 y 72). SEQ ID NO: 132 representa un fragmento corto de una secuencia de la cadena complementaria a la que se une PDS-ZFN2. El sitio de reconocimiento para *MfeI* está subrayado.

15 La figura 28B muestra los cambios en las secuencias de ácido nucleico de PDS (SEQ ID NO: 119-128) en plantas de *Petunia hybrida* inoculadas con vectores pTRV1 y pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-PDS-ZFN1-T2A-PDS-ZFN2. Se compararon los mutantes con las secuencias de PDS nativas en las plantas de *Petunia hybrida* sometidas a prueba (PDS-WT, Y10 y G35). TS1 (GGAGATGCA, SEQ ID NO: 135) y TS2 (CACTTCAAT, SEQ ID NO: 136) indican los sitios de unión para las ZFN en el gen PDS. El sitio *MfeI* (CAATTG, SEQ ID NO: 137) sirvió como herramienta de selección para aislar mutantes de PDS mediados por las ZFN.

20 La figura 29 muestra la secuencia de exón de flavanona 3 beta-hidroxilasa (FHT) de *Petunia hybrida* cv. RB (n.º de registro de GenBank AF022142.1, SEQ ID NO: 133). Se confirmó la secuencia mediante resecuenciación. Las secuencias resaltadas (sitio diana FHT-ZFN1 - SEQ ID NO 142 y sitio diana FHT-ZFN2 - SEQ ID NO: 143) se usaron como sitios diana para las FHT-ZFN generadas por la presente invención (SEQ ID NO: 74 y 76). El sitio de reconocimiento para *EcoNI* está subrayado. SEQ ID NO: 134 representa un fragmento corto de una secuencia de la cadena complementaria a la que se une FHT-ZFN2.

25 La figura 30 muestra la secuencia de pTRV2 que contiene 2b y la región de promotores subgenómicos (sgP) PEBV-CP (SEQ ID NO: 79). Para su comparación, se muestra la secuencia que carece de 40 nucleótidos de 2b-sgP (pTRV2- $\Delta$ 2b- $\Delta$ 2b-sgP) en la línea superior (SEQ ID NO: 78). Nucleótidos 1 a 72 - 3' del gen CP, nucleótidos 73 a 237 - sgP de 2b, nucleótidos 238 a 282 - MCS, nucleótidos 283 a 466 - sgP de CP de PEBV. Nucleótidos 206 a 237 - deleción de 3' de sgP de 2b.

30 La figura 31A muestra la secuencia de NLS-PDS-ZFN1 (SEQ ID NO 70). La secuencia es de la quimera completa: NLS, ZFN y FokI (dominio d). Las secuencias de señal de localización nuclear (NLS) se representan en minúscula; el codón de terminación y el primer codón de nucleasa (dominio d de FokI) se representan en negrita.

35 La figura 31B muestra la secuencia de NLS-PDS-ZFN2 (SEQ ID NO 72). La secuencia es de la quimera completa: NLS, ZFN y FokI (dominio d). Las secuencias de señal de localización nuclear (NLS) se representan en minúscula; el codón de terminación y el primer condón de nucleasa (dominio d de FokI) se representan en negrita.

40 La figura 32A muestra la secuencia de NLS-FHT-ZFN1 (SEQ ID NO 74). La secuencia es de la quimera completa: NLS, ZFN y FokI (dominio d). Las secuencias de señal de localización nuclear (NLS) se representan en minúscula; el codón de terminación y el primer codón de nucleasa (dominio d de FokI) se representan en negrita.

45 La figura 32B muestra la secuencia de NLS-FHT-ZFN2 (SEQ ID NO 76). La secuencia es de la quimera completa: NLS, ZFN y FokI (dominio d). Las secuencias de señal de localización nuclear (NLS) se representan en minúscula; el codón de terminación y el primer codón de nucleasa (dominio d de FokI) se representan en negrita.

La figura 33 muestra una representación esquemática de pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-QEQ-ZFN (SEQ ID NO: 82).

La figura 34 muestra una representación esquemática de parte del vector pTRV2 que porta ZFN específicas de un gen (se muestra PDS con fines de ilustración) fusionada a través de la secuencia T2A, en el sentido de 3' a dos promotores subgenómicos (2b-sgP y PEBV-CP-sgP).

#### Descripción de realizaciones específicas de la invención

50 La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a vectores de expresión virales de plantas y, más particularmente, pero no exclusivamente, al uso de los mismos para generar variaciones genotípicas en genomas de plantas.

Los principios y el funcionamiento de la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a los dibujos y las descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está limitada necesariamente en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o mostrados a modo de ejemplo mediante los ejemplos. La invención es susceptible de otras realizaciones o de ponerse en práctica o llevarse a cabo de diversas maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y terminología empleadas en el presente documento son con fines de descripción y no deben considerarse limitativas.

Al poner en práctica algunas realizaciones de la presente invención, los presentes inventores han concebido una herramienta eficaz para generar variación genotípica en plantas usando vectores virales que codifican para polipéptidos quiméricos diseñados para generar roturas bicatenarias específicas de secuencia en el genoma de la planta. Como se indicó en la sección de antecedentes, la formación de DSB puede usarse para generar de manera pasiva (mediante el sistema de reparación de las plantas) o de manera activa (es decir, inserción dirigida de secuencias de ácido nucleico heterólogas) variación genotípica. Lo mencionado anteriormente corrobora más allá de cualquier duda el valor de las presentes herramientas en la generación de variaciones genómicas.

Como se ilustra en la sección de ejemplos a continuación, los presentes inventores han construido vectores de expresión de virus del cascabeleo del tabaco (TRV) modificados. Estos vectores se usaron satisfactoriamente para introducir y expresar genes foráneos de tamaños equivalentes a los genes quiméricos de la presente invención (por ejemplo GUS) en tejidos meristemáticos de diferentes plantas (por ejemplo *Petunia*, *N. benthamiana* y *N. tabacum*, por ejemplo figuras 8A-G, figuras 9A-B y figuras 11A-F). Los presentes inventores tuvieron éxito a la hora de expresar genes heterólogos en plastidios de cloroplasto y mitocondria (figuras 15A-G y figuras 16A-K, respectivamente). Además, los presentes inventores tuvieron éxito a la hora de coexpresar en plantas dos genes heterólogos (por ejemplo DsRed y GFP) y específicamente en diferentes compartimentos vegetales (por ejemplo citosol, cloroplastos o núcleo) usando vectores virales de algunas realizaciones de la invención (véanse por ejemplo las figuras 17A-D y 18A-L). De manera importante, los presentes inventores han generado nucleasas de dedos de zinc (ZFN) que se unen a y escinden específicamente secuencias diana no codificantes de petunia (figuras 20-22), secuencias genómicas de fitoeno desaturasa (PDS) de petunia (figuras 23 y 28B) o secuencias genómicas de flavanona 3 beta-hidroxilasa (FHT) de petunia. Por consiguiente, estas nucleasas quiméricas y estos vectores virales pueden servir como herramientas potentes en el campo de las tecnologías transgénicas de agricultura.

Por tanto, según un aspecto de la presente invención se proporciona un método de generación de variación genotípica en un genoma de una planta. El método comprende introducir en la planta al menos un vector de expresión viral que codifica para al menos una nucleasa quimérica que comprende un dominio de unión a ADN, una nucleasa y una señal de localización nuclear, en el que el dominio de unión a ADN media en el direccionamiento específico de la nucleasa al genoma de la planta, generando de ese modo variación genotípica en el genoma de la planta.

Tal como se usa en el presente documento, el término “planta” se refiere a plantas completas, partes de las mismas (por ejemplo, hoja, raíz, fruto, semilla) o células aisladas de las mismas (poblaciones homogéneas o heterogéneas de células).

Tal como se usa en el presente documento, la frase “células vegetales aisladas” se refiere a células vegetales que se derivan de tejidos de células vegetales disgregados o cultivos de células vegetales.

Tal como se usa en el presente documento, la frase “cultivo de células vegetales” se refiere a cualquier tipo de células vegetales nativas (que se producen de manera natural), líneas celulares vegetales y células vegetales modificadas genéticamente, que no están ensambladas para formar una planta completa, de modo que al menos una estructura biológica de una planta no está presente. Opcionalmente, el cultivo de células vegetales de este aspecto de la presente invención puede comprender un tipo particular de una célula vegetal o una pluralidad de diferentes tipos de células vegetales. Debe indicarse que opcionalmente los cultivos vegetales que presentan un tipo particular de célula vegetal pueden derivarse originalmente de una pluralidad de diferentes tipos de tales células vegetales.

Según estas realizaciones de la invención se concibe cualquier planta comercial o científicamente valiosa. Una planta adecuada para su uso con el método de la invención puede ser cualquier planta monocotiledónea o dicotiledónea incluyendo, pero sin limitarse a, maíz, trigo, cebada, centeno, avena, arroz, soja, cacahuete, guisante, lenteja y alfalfa, algodón, colza, canola, pimiento, girasol, patata, tabaco, tomate, lechuga, crisantemos, arábidopsis, brócoli, repollo, remolacha, quinua, espinaca, pepino, calabaza, sandía, judías, hibisco, oca, manzana, rosa, fresa, chile, ajo, cebollas, sorgo, berenjena, eucalipto, pino, un árbol, una planta ornamental, una hierba perenne y un cultivo de forraje, plantas coníferas, musgo, algas, así como otras plantas enumeradas en [www.nationmaster.com/encyclopedia/Plantae](http://www.nationmaster.com/encyclopedia/Plantae).

Por consiguiente, las familias de plantas pueden comprender *Alliaceae*, *Amaranthaceae*, *Amarillidaceae*, *Apocynaceae*, *Asteraceae*, *Boraginaceae*, *Brassicaceae*, *Campanulaceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Cruciferae*, *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Gramineae*, *Hyacinthaceae*, *Labiatae*, *Leguminosae-Papilionoideae*, *Liliaceae*, *Linaceae*, *Malvaceae*, *Phytolaccaceae*, *Poaceae*, *Pinaceae*, *Rosaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*, *Tropaeolaceae*, *Umbelliferae* y *Violaceae*.

Tales plantas incluyen, pero no se limitan a, *Allium cepa*, *Amaranthus caudatus*, *Amaranthus retroflexus*, *Antirrhinum majus*, *Arabidopsis thaliana*, *Arachis hypogaea*, *Artemisia sp.*, *Avena sativa*, *Bellis perennis*, *Beta vulgaris*, *Brassica campestris*, *Brassica campestris ssp. Napus*, *Brassica campestris ssp. Pekinensis*, *Brassica juncea*, *Calendula officinalis*, *Capsella bursa-pastoris*, *Capsicum annuum*, *Catharanthus roseus*, *Cheiranthus cheiri*, *Chenopodium album*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium foetidum*, *Chenopodium quinoa*, *Coriandrum sativum*, *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Glicina max*, *Gomphrena globosa*, *Gossypium hirsutum cv. Siv'on*, *Gypsophila elegans*, *Helianthus annuus*, *Hyacinthus*, *Hyoscyamus niger*, *Lactuca sativa*, *Lathyrus odoratus*, *Linum usitatissimum*, *Lobelia erinus*, *Lupinus mutabilis*, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon pimpinellifolium*, *Melilotus albus*, *Momordica balsamina*, *Myosotis silvatica*, *Narcissus pseudonarcissus*, *Nicandra physalodes*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana silvestris*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana edwardsonii*, *Ocimum basilicum*, *Petunia hybrida*, *Phaseolus vulgaris*, *Phytolacca americana*, *Pisum sativum*, *Raphanus sativus*, *Ricinus communis*, *Rosa sericea*, *Salvia splendens*, *Senecio vulgaris*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum melongena*, *Solanum nigrum*, *Solanum tuberosum*, *Solanum pimpinellifolium*, *Spinacia oleracea*, *Stellaria media*, ajenjo dulce, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*, *Tropaeolum majus*, *Tulipa*, *Vicia faba*, *Vicia villosa* y *Viola arvensis*. Otras plantas que pueden infectarse incluyen *Zea maize*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa* y *Oryza glaberrima*.

Según una realización específica de la presente invención, la planta comprende una *Petunia hybrida*.

Según otra realización específica de la presente invención, la planta comprende una *Nicotiana tabacum*.

Tal como se usa en el presente documento, la frase "variación genotípica" se refiere a un proceso en el que un nucleótido o una secuencia de nucleótidos (al menos 2 nucleótidos) se altera o se muta de manera selectiva en un sitio genómico predeterminado, también denominado mutagénesis. El sitio genómico puede ser un sitio genómico codificante o no codificante (por ejemplo, promotor, terminador, sitio de corte y empalme, poliA). Esta alteración puede ser el resultado de una delección de ácido(s) nucleico(s), una inserción aleatorizada de ácido(s) nucleico(s), introducción de un ácido nucleico heterólogo que porta una secuencia deseada, o recombinación homóloga tras la formación de una rotura bicatenaria (DSB) de ADN en el gen diana. La variación genotípica según las presentes enseñanzas puede ser transitoria tal como se explica más detalladamente a continuación en el presente documento. La variación genotípica según las presentes enseñanzas se efectúa normalmente mediante la formación de DSB, aunque la presente invención también contempla la variación de una única cadena. La variación genotípica puede estar asociada con variación fenotípica. Por tanto, la naturaleza dirigida al sitio o específica de secuencia de las presentes enseñanzas puede usarse para diseñar específicamente una variación fenotípica.

Como se mencionó anteriormente en el presente documento, el método según este aspecto de la presente invención se efectúa introduciendo en la planta al menos un vector de expresión viral que codifica para al menos una nucleasa quimérica que comprende un dominio de unión a ADN, una nucleasa y una señal de localización nuclear.

Tal como se usa en el presente documento, la frase "nucleasa quimérica" se refiere a un polipéptido quimérico sintético que forma un único marco de lectura abierto y media en la escisión de ADN de una manera específica de secuencia.

Tal como se usa en el presente documento, la frase "dominio de unión a ADN" se refiere a una secuencia de aminoácidos nativa o sintética tal como de un motivo de proteína que se une a ADN bi o monocatenario con afinidad por una secuencia específica o un conjunto de las mismas (es decir sitio diana).

En la generación de nucleasas quiméricas puede emplearse cualquier dominio de unión a ADN que reconozca la secuencia de unión a ADN deseada con suficiente especificidad.

Los ejemplos de dominios de unión a ADN incluyen, pero no se limitan a, hélice-vuelta-hélice (pfam 01381), dominio de cremallera de leucina (ZIP), dominio de hélice alada (WH), dominio de hélice-vuelta-hélice alada (wHTH), hélice-bucle-hélice y dominio de dedo de zinc.

Por tanto, en la técnica se conocen una variedad de tales dominios de unión a ADN. En una realización a modo de ejemplo de la presente invención, el dominio de unión a ADN es un dominio de unión de dedo de zinc (por ejemplo, pfam00096).

El dominio de dedo de zinc tiene una longitud de 30 aminoácidos y consiste en una hélice de reconocimiento y una lámina beta bicatenaria. El dominio también contiene cuatro ligandos separados de manera regular para zinc (o bien histidinas o bien cisteínas). El ión Zn estabiliza la estructura tridimensional del dominio. Cada dedo contiene un ión Zn y reconoce un triplete específico de pares de bases de ADN.

Los dominios de dedo de zinc pueden modificarse mediante ingeniería para unirse a una secuencia de nucleótidos predeterminada. Cada dedo de zinc individual (por ejemplo Cys2/His2) entra en contacto principalmente con tres pares de bases consecutivos de ADN de manera modular [Pavletich *et al.*, Science (1991) 252:809-817; Berg *et al.*, Science (1996) 271:1081-1085]. Manipulando el número de dedos de zinc y la naturaleza de los residuos de aminoácido críticos que entran en contacto directamente con ADN, pueden desarrollarse y seleccionarse dominios de unión a ADN con especificidades novedosas [véase, por ejemplo, Desjarlais *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA

(1992) 89:7345-7349; Rebar *et al.*, Science (1994) 263:671-673; Greisman *et al.*, Science (1997) 275:657-661; Segal *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96:2758-2763]. Por tanto, una gama muy amplia de secuencias de ADN pueden servir como dianas de reconocimiento específicas para proteínas de dedos de zinc. Se han dado a conocer previamente nucleasas quiméricas con varias especificidades diferentes basadas en el reconocimiento de dedos de zinc [véase por ejemplo, Huang *et al.*, J. Protein Chem. (1996) 15:481-489; Kim *et al.*, Biol. Chem. (1998) 379:489-495].

En la técnica se conocen diversos métodos para diseñar nucleasas quiméricas con dominios de unión a ADN variados. En una realización, el dominio de unión a ADN comprende al menos un, al menos dos, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6 dominios de dedo de zinc, que se unen a 3, 6, 9, 12, 15 ó 18 secuencias de nucleótidos, respectivamente. El experto en la técnica apreciará que cuanto más larga sea la secuencia de reconocimiento, mayor será la especificidad que se obtendrá.

Pueden seleccionarse dedos de zinc de unión a ADN específicos usando bibliotecas de presentación de polipéptidos. El sitio diana se usa con la biblioteca de presentación de polipéptidos en una etapa de selección por afinidad para seleccionar dedos de zinc variantes que se unen al sitio diana. Normalmente se preparan dedos de zinc constantes y dedos de zinc que van a aleatorizarse a partir de cualquier proteína de dedos de zinc C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> adecuada, tal como SP-1, SP-1C, TFIIIA, GLI, Tramtrack, YY1 o ZIF268 [véase, por ejemplo, Jacobs, EMBO J. 11:4507 (1992); Desjarlais y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:2256-2260 (1993)]. La biblioteca de presentación de polipéptidos que codifica para variantes de una proteína de dedos de zinc que comprende el dedo de zinc aleatorizado, de las que se seleccionará una o más variantes, y, dependiendo de la etapa de selección, uno o dos dedos de zinc constantes, se construye según los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Opcionalmente, la biblioteca contiene sitios de restricción diseñados para la facilidad de eliminar dedos de zinc constantes, y para añadir dedos de zinc aleatorizados. Los dedos de zinc se aleatorizan, por ejemplo, usando oligonucleótidos degenerados, casetes mutagénicos o PCR propensa a error. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.<sup>os</sup> 6.326.166, 6.410.248 y 6479626.

También pueden seleccionarse dedos de zinc mediante diseño. Una proteína de dedos de zinc diseñada es una proteína que no se produce en la naturaleza, cuyo diseño/cuya composición resulta principalmente de criterios racionales. Los criterios racionales para el diseño incluyen la aplicación de reglas de sustitución y algoritmos computarizados para procesar información en una base de datos que almacena información de diseños de ZFP existentes y datos de unión. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.<sup>os</sup> 6.140.081; 6.453.242; y 6.534.261; véanse también los documentos WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 y WO 03/016496.

Tal como se ilustra en el ejemplo 1 a continuación en el presente documento, se diseñaron dos conjuntos de nucleasas quiméricas según las presentes enseñanzas, pudiendo cada conjunto formar DSB en secuencias diana específicas de ADN de *Petunia*. Inicialmente, se identificaron secuencias de unión a ADN en plantas de *Petunia* que eran adecuadas para el reconocimiento y la escisión mediante nucleasas quiméricas. Estas secuencias de unión a ADN eran secuencias no codificantes, no repetitivas: P25-TS1 (SEQ ID NO: 10), P25-TS2 (SEQ ID NO: 11), P36-TS1 (SEQ ID NO: 12) y P36-TS2 (SEQ ID NO: 13). A continuación, se diseñaron nucleasas quiméricas, cada una de las cuales comprende 3 dedos de zinc. Tal como se ilustra en las figuras 21-22, estos dedos de zinc designados P1-25-ZFN1, P1-25-ZFN2, P1-36-ZFN1 y P1-36-ZFN2 (SEQ ID NO: 35, 36, 37 ó 38, respectivamente) se unían a y escindían específicamente los sitios diana de *Petunia* mencionados anteriormente.

Además, tal como se ilustra en el ejemplo 1 a continuación en el presente documento, según las presentes enseñanzas, se diseñaron nucleasas quiméricas que podían formar DSB específicas en secuencias genómicas de fitoeno desaturasa (PDS) de *Petunia* o en secuencias genómicas de flavanona 3 beta-hidroxilasa (FHT) de *Petunia*. Inicialmente, se identificaron secuencias de unión a ADN para PDS y FHT en plantas de *Petunia* que eran adecuadas para el reconocimiento y la escisión mediante tales nucleasas quiméricas (véanse las figuras 28A y 29, respectivamente). Se identificaron las secuencias de unión a ADN para dedos de zinc específicos de PDS: PDS-ZFN1 (SEQ ID NO: 140) y PDS-ZFN2 (SEQ ID NO: 141) y se diseñaron las nucleasas quiméricas (SEQ ID NO: 71 y 73, respectivamente) que se unían a y escindían específicamente los sitios diana de PDS de *Petunia*. Del mismo modo, se identificaron las secuencias de unión a ADN para dedos de zinc específicos de FHT: FHT-ZFN1 (SEQ ID NO: 142) y FHT-ZFN2 (SEQ ID NO: 143) y se diseñaron las nucleasas quiméricas (SEQ ID NO: 75 y 77, respectivamente) que se unían a y escindían específicamente los sitios diana de FHT de *Petunia*.

Según una realización de la presente invención, el dominio de unión de dedo de zinc comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en las SEQ ID NO. 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30.

Preferiblemente, las nucleasas quiméricas de este aspecto de la presente invención comprenden dominios separados para la unión a ADN y para la escisión de ADN, de modo que la escisión de ADN es específica de secuencia.

Tal como se usa en el presente documento, la frase "específica de secuencia" se refiere a una ubicación cromosómica diferenciada en la que se introduce una rotura bicatenaria (escisión). Sin querer limitarse a la teoría, se cree que la formación de DSB induce un mecanismo de reparación celular que conduce normalmente a eventos

recombinatorios altamente eficaces en ese locus.

Tal como se usa en el presente documento, el término “nucleasa” se refiere a cualquier polipéptido, o complejo que comprende un polipéptido, que puede generar una rotura de cadena en ADN genómico (es decir comprende actividad de escisión de ADN). Los ejemplos de nucleasas que pueden usarse según las presentes enseñanzas incluyen enzimas de restricción, topoisomerasas, recombinasas, integrasas y ADNasas.

Se apreciará que la nucleasa utilizada por la presente invención puede comprender cualquier dominio de escisión de ADN no específico, por ejemplo, una endonucleasa de restricción de tipo II tal como el dominio de escisión de la enzima de restricción FokI (número de registro de GenBank J04623). Las enzimas de restricción FokI que generalmente tiene dominios de escisión de ADN y de unión a ADN separados son adecuadas para la construcción de las nucleasas quiméricas. Por tanto, según una realización de este aspecto, las nucleasas quiméricas son proteínas quiméricas que comprenden dominios de unión de dedo de zinc específicos y el dominio de escisión de ADN de la enzima de restricción FokI (también denominado en el presente documento el dominio de escisión FokI).

Según las realizaciones de la presente invención, la nucleasa quimérica es un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 70, 72, 74, 76, 84, 86 u 88.

Según las realizaciones de la presente invención, la nucleasa quimérica es un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 71, 73, 75, 77, 85, 87 u 89.

Dado que determinadas nucleasas (por ejemplo FokI) funcionan como dímeros, con el fin de crear roturas bicatenarias en el gen diana deben emplearse al menos dos nucleasas quiméricas. Por tanto, según una realización a modo de ejemplo, las nucleasas quiméricas de la presente invención forman dímeros (por ejemplo, por medio de unión a ambas cadenas de una secuencia diana). Por ejemplo, las nucleasas quiméricas pueden formar un homodímero entre dos nucleasas quiméricas idénticas (por ejemplo, por medio de unión a dos secuencias de unión a ADN idénticas dentro de una secuencia diana). Alternativamente, las nucleasas quiméricas pueden formar un heterodímero entre dos nucleasas quiméricas diferentes (por ejemplo, por medio de unión a dos secuencias de unión a ADN diferentes dentro de una secuencia diana, véase por ejemplo la figura 1). Por consiguiente, pueden emplearse dos nucleasas quiméricas para crear una rotura bicatenaria en una secuencia diana. En consecuencia, el dominio de unión a ADN de la nucleasa quimérica, o dos o más nucleasas quiméricas que actúan conjuntamente pueden unirse a una secuencia de ADN.

Los ejemplos de nucleasas que pueden usarse según las presentes enseñanzas incluyen, pero no se limitan a, enzimas de restricción incluyendo *FokI*, *Scel*, *I-CeuI*, meganucleasas artificiales, meganucleasas modificadas, nucleasas de domiciliación (*homing*); topoisomerasas incluyendo ADN girasa, topoisomerasa II eucariota, topoisomerasa IV bacteriana y topoisomerasa VI; recombinasas incluyendo *Cre* recombinasa, *Hin* recombinasa, *Rad51/RecA*; ADNasas incluyendo desoxirribonucleasa I, desoxirribonucleasa II y nucleasa de micrococos; e integrasas.

La frase “órgánulo que contiene ADN” se refiere a una estructura subcelular, encapsulada por membrana, presente en todas las células vegetales.

Los orgánulos que contienen ADN incluyen la mitocondria, el núcleo, el cloroplasto, el proplastidio, el etioplasto, el cromoplasto y el leucoplasto, y cualquier estructura subcelular que incluye moléculas de ADN. Normalmente, el ADN es endógeno pero en algunos casos puede hacer referencia a ADN exógeno tal como de un patógeno de plantas tal como un virus. En el último caso, por ejemplo, el orgánulo que contiene ADN es el citoplasma, en cuyo caso la nucleasa quimérica puede no comprender ninguna señal de localización.

Se apreciará que generar variación genotípica en orgánulos vegetales distintos del núcleo es de particular interés según algunas realizaciones de la presente invención, tal como se detallará más adelante. Los orgánulos vegetales (por ejemplo cloroplasto y mitocondria) contienen ADN que es un participante vital en las rutas bioquímicas de la planta. Estos orgánulos tienen una amplia diversidad estructural y funcional. Como tales, pueden transcribir y traducir la información presente en su propio genoma pero son enormemente dependientes de proteínas importadas que se codifican en el genoma nuclear y se traducen en el citoplasma.

Por ejemplo, el cloroplasto realiza funciones metabólicas y biosintéticas esenciales de importancia global, incluyendo fotosíntesis, biosíntesis de carotenoides y aminoácidos. Los carotenoides son constituyentes integrales de las plantas, son pigmentos isoprenoides que están implicados en una variedad de procesos incluyendo la protección frente al estrés fotooxidativo (a través de la disipación de energía de la luz en exceso absorbida por los pigmentos de antena); agentes de coloración en flores y frutos para atraer a los polinizadores, y precursores para la hormona de crecimiento vegetal ácido abscísico y vitamina A [Cunningham y Gantt (1998) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:557-583]. Los pigmentos carotenoides se sintetizan en los plastidios de plantas en los que se derivan de las rutas de biosíntesis de isoprenoides (Cunningham y Gantt, citados anteriormente). En las plantas están presentes dos rutas biosintéticas para la biosíntesis de isoprenoides, la ruta del mevalonato que se encuentra en el citoplasma y la ruta de metileritrol 4-fosfato (MEP) que se encuentra sólo en los plastidios. Esta última ruta biosintética está vinculada muy intensamente a la fotosíntesis [Seemann *et al.* (2006) *FEBS Lett.* 580: 1547-1552].

Además, el aminoácido aromático fenilalanina puede sintetizarse en cloroplastos a partir del producto intermedio prefenato: por medio de arogenato mediante la actividad de prefenato aminotransferasa o por medio de fenilpiruvato mediante la actividad de prefenato deshidratasa [Jung *et al.* (1986). Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 7231-7235; Rippert *et al.* (2009) Plant Physiol. 149(3): 1251-1260].

5 Además, la actividad nitrato reductasa y acetolactato sintetasa de la célula también está ubicada en los plastidios. Se encontró que los plastidios contienen sólo parte de la actividad glutamina sintetasa, aspartato aminotransferasa y triosafosfato dehidrogenasa total en la célula [Mifflin B (1974) Plant Physiol. 54(4): 550-555]. El cloroplasto también está implicado en el metabolismo de metionina en plantas, los cloroplastos son autónomos para la síntesis de metionina *de novo* y pueden importar S-adenosilmetionina del citosol [Ravanel *et al.* (2004). J. Biol. Chem. 279 (21): 22548-22557].

10 De manera similar, las mitocondrias comprenden papeles clave en las rutas metabólicas celulares, catalizando una o varias etapas en estas rutas (por ejemplo la síntesis de las vitaminas folato y biotina, de la coenzima distinta de vitamina lipoato, de la cardiolipina difosfatidilglicerol. Aunque las mitocondrias carecen de acetil-CoA carboxilasa, contienen el equipamiento enzimático necesario para transformar el malonato en las dos unidades constructivas principales para la síntesis de ácidos grasos: proteína portadora de malonil-acilo y acetil-acilo (ACP).

15 La esterilidad masculina citoplásmica (CMS) en plantas, caracterizada por la supresión de la producción de polen viable y por la herencia no mendeliana de este rasgo, está asociada con una disfunción mitocondrial. Los factores determinantes genéticos para la esterilidad masculina citoplásmica residen en el genoma mitocondrial. El fenotipo CMS afecta esencialmente a los órganos productores de polen debido a la alta demanda de energía por parte de este tejido. Por tanto, una disfunción mitocondrial afectará drásticamente a la producción de polen, mientras que otros órganos vegetales pueden superar las consecuencias de la disfunción mitocondrial.

Tal como se usa en el presente documento, la frase “dominio de localización” se refiere a una señal de localización que facilita el transporte de las nucleasas químéricas al orgánulo que contiene ADN.

25 La señal de localización puede ser, por ejemplo, una señal de localización nuclear (NLS), tal como una secuencia de aminoácidos predominantemente básicos corta, que se reconoce por receptores específicos en los poros nucleares. En otras realizaciones a modo de ejemplo, la señal de localización para un orgánulo que contiene ADN puede ser una señal de localización mitocondrial (MLS) o una señal de localización de cloroplasto (CLS).

Puede emplearse esencialmente cualquier NLS, ya sea una NLS sintética o que se produce de manera natural, siempre que la NLS sea una que sea compatible con la célula diana (es decir, célula vegetal).

30 Aunque con el presente documento se comentan las señales de localización nuclear, las presentes enseñanzas no pretenden restringirse a estas señales de localización, ya que cualquier señal dirigida a un orgánulo que contiene ADN está abarcada por las presentes enseñanzas. Tales señales se conocen bien en la técnica y pueden recuperarse por el experto en la técnica.

35 Las señales de localización nuclear que pueden usarse según las presentes enseñanzas incluyen, pero no se limitan a, NLS de antígeno T grande de SV40, el dominio M9 ácido de hnRNP A1, la secuencia KIPK en el represor de la transcripción de levadura *Mat $\alpha$ 2* y las señales complejas de U snRNP, NLS de tabaco y NLS de arroz.

40 Las señales de localización de mitocondria que pueden usarse según las presentes enseñanzas incluyen, pero no se limitan a, la señales de transición de la subunidad de ATPasa beta [ADNc que codifican para las presecuencias mitocondriales de  $\beta$ -ATPasa de *Nicotiana glauca* (nucleótidos 387-666)], la chaperonina mitocondrial CPN-60 [ADNc que codifican para las presecuencias mitocondriales de CPN-60 de *Arabidopsis thaliana* (nucleótidos 74-186)] y COX4 [los primeros 25 codones de COX4 de *Saccharomyces cerevisiae* que codifican para la secuencia de direccionamiento mitocondrial].

Según una realización específica de la presente invención, la señal de localización puede comprender una señal de localización de mitocondria, tal como el péptido señal de la subunidad de ATPasa beta (ATP- $\beta$ ) (SEQ ID NO: 139).

45 Las señales de localización de cloroplasto que pueden usarse según las presentes enseñanzas incluyen, pero no se limitan a, las señales de transición del péptido de tránsito asociado a la subunidad pequeña de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (Rubisco) (*ats1A*), la señal de transición de LHC II, así como las regiones N-terminales de los ORF de SIG2 y SIG3 de *A. thaliana*. Véase también <http://www.dotspringerlink.com/content/p65013h263617795/>.

50 Alternativamente, la secuencia de localización de cloroplasto (CLS) puede derivarse de un viroide [Evans y Pradhan (2004) documento US 2004/0142476 A1]. El viroide puede ser un viroide *Avsunviroiae*, por ejemplo, un viroide de la mancha de sol del aguacate (ASBVd), un virus del mosaico latente del melocotonero (PLMVd), un viroide de la mota clorótica de *Chrysanthemum* (CChMVd) o un viroide latente de la berenjena (ELVd).

55 Según una realización específica de la presente invención, la señal de localización puede comprender una señal de localización de cloroplasto, tal como la subunidad pequeña de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa del péptido de tránsito (Rssu) (SEQ ID NO: 138).

Para el direccionamiento génico eficaz, es necesario acoplar el dominio de unión a ADN de la presente invención a la nucleasa para permitir la escisión del ADN dentro de una proximidad viable de la secuencia diana. Una proximidad viable es cualquier distancia que facilite todavía el direccionamiento a la secuencia. Opcionalmente, el dominio de unión a ADN se solapa con la secuencia diana o puede unirse dentro de la secuencia diana.

- 5 Se usa normalmente tecnología de ADN recombinante para generar las nucleasas quiméricas de la presente invención [véase el ejemplo 1 de la sección de ejemplos que sigue y Sambrook *et al.*, Eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor University Press, Nueva York (1989); Ausubel *et al.*, Eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York (1998); y Maeder, *et al.* (2008) *Mol Cell* 31:294-301, así como otras referencias que se proporcionan a continuación en el presente documento].
- 10 La cualificación de nucleasas quiméricas así generadas para el reconocimiento de dianas específicas puede efectuarse usando métodos que se conocen bien en la técnica.

15 Un método para diseñar una nucleasa quimérica para su uso en direccionamiento génico puede incluir un proceso para someter a prueba la toxicidad de la nucleasa quimérica sobre una célula. Un proceso de este tipo puede comprender expresar en la célula, o introducir de otro modo en una célula, la nucleasa quimérica y evaluar las tasas de crecimiento o muerte celulares mediante comparación frente a un control. La tendencia de una nucleasa quimérica a escindir en más de una posición en el genoma puede evaluarse mediante ensayos de escisión *in vitro*, seguido por electroforesis (por ejemplo puede usarse electroforesis de campo pulsado para resolver fragmentos muy grandes) y, opcionalmente, estudio con sondas o transferencia de tipo Southern (véase el ejemplo 5 en la sección de ejemplos que sigue). En vista de la presente divulgación, un experto habitual en la técnica puede idear otras pruebas para la especificidad de escisión.

20 En una realización específica, la presente invención proporciona dos conjuntos de nucleasas quiméricas: P1-25-ZFN1 y P1-25-ZFN2 (mostradas en SEQ ID NO: 35 y 36, respectivamente) para el direccionamiento génico al sitio 1 de P1-25 (SEQ ID NO: 10) y el sitio 2 de P1-25 (SEQ ID NO: 11) de *Petunia*, respectivamente; y P1-36-ZFN1 y P1-36-ZFN2 (mostradas en SEQ ID NO: 37 y 38, respectivamente) para el direccionamiento génico al sitio 1 de P1-36 (SEQ ID NO: 12) y el sitio 2 de P1-36 (SEQ ID NO: 13) de *Petunia*. En particular, P1-25-ZFN1 y P1-25-ZFN2 pueden formar un dímero y P1-36-ZFN1 y P1-36-ZFN2 pueden formar un dímero para generar roturas bicatenarias específicas en dianas génicas de *Petunia*.

25 En otra realización de la presente invención se proporciona un conjunto de PDS nucleasas quiméricas: PDS-ZFN1 y PDS-ZFN2 (mostradas en SEQ ID NO: 71 y 73, respectivamente) para el direccionamiento génico al sitio 1 de PDS (SEQ ID NO: 140) y el sitio 2 de PDS (SEQ ID NO: 141) de *Petunia*, respectivamente. Estas nucleasas quiméricas pueden formar un dímero para generar roturas bicatenarias específicas en el gen PDS de *Petunia*.

30 En otra realización de la presente invención se proporciona un conjunto de nucleasas quiméricas FHT: FHT-ZFN1 y FHT-ZFN2 (mostradas en SEQ ID NO: 75 y 77, respectivamente) para el direccionamiento génico al sitio 1 de FHT (SEQ ID NO: 142) y el sitio 2 de FHT (SEQ ID NO: 143) de *Petunia*; respectivamente. Estas nucleasas quiméricas pueden formar un dímero para generar roturas bicatenarias específicas en el gen FHT de *Petunia*.

35 Como se mencionó anteriormente en el presente documento, la nucleasa quimérica se introduce en la diana de planta usando un vector de expresión viral, que se usa normalmente para mediar en la transformación transitoria, diseminándose sistémicamente dentro de la planta tal como a través de infección del meristemo.

40 Por tanto, según otro aspecto de la presente invención se proporciona un vector de expresión viral de plantas que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para al menos una nucleasa quimérica que comprende un dominio de unión a ADN, una nucleasa y opcionalmente una señal de localización.

Tal como se usa en el presente documento, un vector de expresión viral de plantas se refiere a un vector de ácido nucleico que incluye un vector de ADN (por ejemplo, un plásmido), un vector de ARN, virus u otro replicón adecuado (por ejemplo, vector viral) que codifica para genes virales o partes de genes virales.

45 Los virus que se ha mostrado que son útiles para la transformación de huéspedes vegetales incluyen CaMV, TMV y BV. La transformación de plantas usando virus de plantas se describe en la patente estadounidense n.º 4.855.237 (BGV), el documento EP-A 67.553 (TMV), la solicitud japonesa publicada n.º 63-14693 (TMV), el documento EPA 194.809 (BV), el documento EPA 278.667 (BV); y Gluzman, Y. *et al.*, *Communications in Molecular Biology: Viral Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, págs. 172-189 (1988). En el documento WO 87/06261 se describen partículas de pseudovirus para su uso en la expresión de ADN foráneo en muchos huéspedes, incluyendo plantas.

50 Otros virus que pueden ser útiles en la transformación de huéspedes vegetales incluyen virus del cascabeleo del tabaco (TRV) y sus virus relacionados. Se conoce TRV por su capacidad para infectar tejidos meristemáticos, comprende un espectro de huéspedes amplio y diferentes aislados de cepas. Por ejemplo, N5, obtenida de narciso, provoca necrosis grave en *Nicotiana clevelandii* [Harrison *et al.* (1983) *Ann. appl. Biol.*, 102:331-338]. El virus del mosaico de *Hypochoeris* (HMV), que está relacionado serológicamente con TRV [Uhde *et al.* (1998) *Archives of Virology* 143:1041-1053], infecta la familia *Asteraceae* de plantas [Brunt y Stace-Smith (1978) *Ann. appl.*

Biol. 90:205-214]. La cepa de virus del cascabeleo del tabaco TCM, obtenida originalmente del tulipán, está estrechamente relacionada serológicamente con el serotipo holandés del virus del oscurecimiento precoz del guisante [Robinson *et al.*, J. Gen. Virol. (1987) 68:2551-2561]. Además, hay también especies monocotiledóneas susceptibles a TRV, como por ejemplo *Avena sativa* (familia *Poaceae*) [Cadman y Harrison, Ann. appl. Biol. (1959) 47:542-556].

Cuando el virus es un virus de ADN, pueden hacerse modificaciones adecuadas al propio virus. Alternativamente, el virus puede clonarse en primer lugar en un plásmido bacteriano para facilitar la construcción del vector viral deseado con el ADN foráneo. Entonces puede cortarse el virus del plásmido. Si el virus es un virus de ADN, puede unirse un origen de replicación bacteriano al ADN viral, que entonces se replica por la bacteria. La transcripción y traducción de este ADN producirá la proteína de la cubierta que encapsidará el ADN viral. Si el virus es un virus de ARN, el virus se clona generalmente como ADNc y se inserta en un plásmido. El plásmido se usa entonces para producir todas las construcciones. El virus de ARN se produce entonces replicando la secuencia viral del plásmido y traduciendo los genes virales para producir la(s) proteína(s) de cubierta que encapsidan el ARN viral.

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 el constructo de la presente invención se demuestra mediante las referencias anteriores así como en la patente estadounidense n.º 5.316.931, Dawson, W. O. *et al.* (1989). A tobacco mosaic virus-hybrid expresses an added gene. Virology 172, 285-292; French, R. *et al.* (1986) Science 231, 1294-1297; y Takamatsu, N. *et al.* (1990). Production of enkephalin in tobacco protoplasts using tobacco mosaic virus RNA vector. FEBS Lett 269, 73-76.

En una realización, se proporciona un ácido nucleico viral de plantas en el que la secuencia codificante de proteína de la cubierta nativa se ha delecionado de un ácido nucleico viral, una secuencia codificante de proteína de la cubierta viral de plantas no nativa y un promotor no nativo, preferiblemente el promotor subgenómico de la secuencia codificante de proteína de la cubierta no nativa, que puede expresarse en el huésped vegetal, empaquetar el ácido nucleico viral de plantas recombinante, y garantizar una infección sistémica del huésped mediante el ácido nucleico viral de plantas recombinante se ha insertado. Alternativamente, el gen de proteína de la cubierta puede inactivarse mediante inserción de la secuencia de ácido nucleico no nativa dentro del mismo, de modo que se produce una proteína. El ácido nucleico viral de plantas recombinante puede contener uno o más promotores subgenómicos no nativos adicionales. Cada promotor subgenómico no nativo puede replicar o expresar genes o secuencias de ácido nucleico adyacentes en el huésped vegetal y no pueden recombinarse entre sí y con promotores subgenómicos nativos. Pueden insertarse secuencias de ácido nucleico no nativas (foráneas, heterólogas) adyacentes al promotor subgenómico viral de plantas nativo o a los promotores subgenómicos virales de plantas nativo y no nativo si se incluye más de una secuencia de ácido nucleico. Las secuencias de ácido nucleico no nativas se replican o se expresan en la planta huésped bajo el control del promotor subgenómico para producir los productos deseados.

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

En una tercera realización, se proporciona un ácido nucleico viral de plantas recombinante en el que el gen de proteína de la cubierta nativa está adyacente a su promotor subgenómico y uno o más promotores subgenómicos no nativos se han insertado en el ácido nucleico viral. Los promotores subgenómicos no nativos insertados pueden replicar o expresar genes adyacentes en un huésped vegetal y no pueden recombinarse entre sí y con promotores subgenómicos nativos. Pueden insertarse secuencias de ácido nucleico no nativas adyacentes a los promotores virales de plantas subgenómicos no nativos de modo que dichas secuencias se replican o se expresan en la planta huésped bajo el control de los promotores subgenómicos para producir el producto deseado.

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

Los vectores virales se encapsidan por las proteínas de la cubierta codificadas por el ácido nucleico viral de plantas recombinante para producir un virus vegetal recombinante. El ácido nucleico viral de plantas recombinante o virus vegetal recombinante se usa para infectar plantas huésped apropiadas. El ácido nucleico viral de plantas recombinante puede replicarse en el huésped, diseminarse de manera sistémica en el huésped, y transcribir o expresar gen(es) foráneo(s) (ácido nucleico aislado) en el huésped para producir la proteína deseada, es decir, la nucleasa quimérica y opcionalmente otras secuencias de ácido nucleico codificantes o no codificantes heterólogas.

Un vector de expresión viral que comprende un ácido nucleico que codifica para una nucleasa quimérica está unido operativamente a una o más secuencias reguladoras transcripcionales mediante lo cual la secuencia codificante está bajo el control de señales de transcripción para permitir la producción o síntesis de la nucleasa quimérica. Tales secuencias reguladoras transcripcionales incluyen secuencias promotoras, potenciadores y sitios de unión de transcripción.



Pueden usarse en la presente invención promotores que se sabe o se encuentra que provocan la transcripción de un gen foráneo en células vegetales. Tales promotores pueden obtenerse de plantas o virus e incluyen, pero no se limitan a, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (incluye variaciones del promotor 35S de CaMV, por ejemplo promotores derivados por medio de ligaciones con regiones operadoras, mutagénesis al azar o controlada, etc.), promotores de genes de proteínas de almacenamiento de semillas tales como Zma10 Kz o Zmag12 (genes de glutelina y zeína de maíz, respectivamente), genes inducibles por la luz tales como subunidad pequeña de ribulosa bisfosfato carboxilasa (rbcS), genes inducidos por estrés tales como alcohol deshidrogenasa (Adh1), o “genes de mantenimiento” que se expresan en todas las células (tales como Zmaact, un gen de actina de maíz). Para un control añadido, la nucleasa quimérica puede estar bajo el control de un promotor inducible.

En una realización, el vector de expresión viral de plantas es un vector de expresión de virus del cascabeleo del tabaco (TRV).

Se han descrito vectores de expresión basados en TRV, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 7.229.829.

TRV es un virus de ARN de cadena positiva con un genoma bipartito, por tanto el genoma se divide en dos ARN monocatenarios de sentido positivo que pueden encapsidarse por separado en partículas virales. Los dos vectores de ARN genómico de TRV usados por la presente invención se denominan en el presente documento pTRV1 (n.º de registro de GenBank: AF406990) y pTRV2 (n.º de registro de GenBank: AF406991), en los que pTRV1 codifica para polipéptidos que median en la replicación y el movimiento en la planta huésped mientras que pTRV2 codifica para proteínas de la cubierta.

En determinadas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico de pTRV2 carece de la secuencia 2b (SEQ ID NO: 43). La generación de un vector pTRV2 que carece de los 300 pb del gen 2b de ARN2 se llevó a cabo mediante eliminación del vector original por digestión con *PvuII* y *EcoRI* (véanse las figuras 6A-B). El plásmido resultante (pTRV2Δ2b) era idéntico al pTRV2 original pero carecía de la secuencia 2b (véase el ejemplo 1, a continuación en el presente documento). Según las presentes enseñanzas, los vectores pTRV2 sin la región 2b son mucho más eficaces en la expresión génica en tejidos meristemáticos (véase el ejemplo 2, a continuación en el presente documento).

En determinadas realizaciones, la modificación en el vector pTRV2 comprende la adición de un potenciador. Puede insertarse cualquier potenciador en el vector de expresión viral para potenciar los niveles de transcripción de genes. Por ejemplo, puede clonarse un potenciador  $\Omega$  (SEQ ID NO: 44 ó 47) en los vectores pTRV2 de la presente invención.

Alternativamente, el vector viral de la presente invención puede basarse en virus relacionados con TRV (por ejemplo virus de cascabeleo del tabaco cepa N5, HMV, o virus de cascabeleo del tabaco cepa TCM).

La selección del vector puede depender de la planta objetivo, tal como monocotiledóneas. Anteriormente se ha mostrado que el virus del mosaico estriado del trigo (WSMV) modificado expresa NPT II y  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) en monocotiledóneas (por ejemplo trigo, cebada, avena y maíz) [Choi *et al.*, Plant J. (2000) 23:547-555; Choi *et al.*, J Gen Virol (2002) 83:443-450; Choi *et al.*, J. Gen. Virol. (2005) 86:2605-2614]. El trabajo de Choi *et al.* demostró la colocación de los genes foráneos entre la inclusión nuclear b (Nlb) y la proteína de la cubierta (CP). Para una mejor expresión y actividad en trigo infectado, se insertó GUS inmediatamente en el sentido de 3' del sitio de escisión de P1 y en el sentido de 5' de HC-Pro del ORF de poliproteína del virus del mosaico estriado del trigo (WSMV). Se demostró la infección sistémica y expresión de GUS tras la inoculación de plantas con WSMV *in vitro*.

La presente invención contempla un vector de expresión viral que comprende al menos dos secuencias de polipéptidos heterólogas.

Tal como se usa en el presente documento el término “secuencia heteróloga” se refiere a una secuencia que no forma normalmente parte de un ARN2 de un TRV que se produce de manera natural. En determinadas realizaciones, una secuencia heteróloga es una nucleasa quimérica tal como se describió en detalle anteriormente en el presente documento. En determinadas realizaciones, una secuencia heteróloga es una secuencia de interés, tal como un gen de una planta para la expresión en una célula vegetal de un polipéptido heterólogo. Tales genes de plantas pueden incluir, pero no se limitan a, genes que codifican para un polipéptido indicador, un polipéptido antiviral, un resto viral, un polipéptido antifúngico, un polipéptido antibacteriano, un polipéptido de resistencia a insectos, un polipéptido de resistencia a herbicidas, un polipéptido de tolerancia a estrés biótico o abiótico, un polipéptido farmacéutico, un polipéptido de inducción de crecimiento y un polipéptido de inhibición de crecimiento. En determinadas realizaciones, el vector viral comprende tanto nucleasas quiméricas como una secuencia de interés.

Como parte del vector pTRV, las secuencias heterólogas pueden comprender promotores subgenómicos (sgP) separados, por tanto pueden comprender dos sgP separados (por ejemplo SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 48) para la replicación de las secuencias heterólogas.

En determinadas realizaciones, las al menos dos secuencias de polipéptidos heterólogas dentro del vector viral están separadas por una secuencia de ácido nucleico que codifica para un dominio de escisión. Un dominio de

escisión de este tipo puede comprender cualquier dominio de escisión conocido en la técnica, tal como por ejemplo una secuencia de proteína de tipo T2A (SEQ ID NO: 40 y 52).

Se apreciará que la secuencia de ácido nucleico de las dos secuencias de polipéptidos heterólogas separadas por un dominio de escisión puede ser tal como se expone en las SEQ ID NO: 84, 86 u 88.

- 5 Se apreciará que la secuencia de aminoácidos de las dos secuencias de polipéptidos heterólogas separadas por un dominio de escisión puede ser tal como se expone en las SEQ ID NO: 85, 87 u 89.

Generalmente, cuando se introduce en una célula vegetal huésped, un vector pTRV proporciona expresión de la(s) secuencia(s) heteróloga(s) y también puede proporcionar expresión de otras secuencias de TRV, tales como una proteína de la cubierta viral.

- 10 Los vectores pTRV de la presente invención pueden expresar un gen indicador de modo que pueden identificarse las células transformadas. Los genes indicadores a modo de ejemplo que pueden expresarse incluyen, pero no se limitan a, GUS y GFP.

- 15 Se apreciará que pueden introducirse dos vectores de expresión virales en la misma célula vegetal. Estos vectores virales pueden introducirse en la célula vegetal de manera concomitante o en momentos separados. Tales vectores de expresión virales pueden comprender el mismo tipo de vector que codifica para diferentes secuencias heterólogas, o alternativamente pueden comprender dos tipos diferentes de vectores (por ejemplo vector de BV y vector de TRV, vector de mitovirus y vector de TRV, vectores de TRV1 y TRV2). Por ejemplo, pueden introducirse vectores pTRV1 y pTRV2 de manera concomitante, tal como por ejemplo a una razón de 1:1, para permitir la expresión de genes virales en células vegetales. Asimismo, un vector puede comprender la(s) nucleasa(s) 20 quimérica(s) y otro vector puede comprender un gen heterólogo de interés (tal como se describió en detalle anteriormente en el presente documento).

Se apreciará que con el fin de introducir el gen heterólogo de interés (es decir ADN foráneo) en diferentes orgánulos que contienen ADN (por ejemplo núcleo, cloroplasto y mitocondria), pueden implementarse diferentes tipos de vectores.

- 25 Por tanto, vectores para el suministro de ADN foráneo pueden basarse en el *Geminivirus* virus del mosaico de *Abutilon* (AbMV), un miembro del género *Begomovirus*. El ADN del virus AbMV se ha detectado en plastidios [Gröning *et al.*, (1987) PNAS USA 84: 8996; Gröning *et al.* (1990) Mol. Gen. Gene. 220: 485; Horns y Jeske, (1991) Virol. 181: 580].

- 30 El vector viral de la presente invención también puede basarse en el género *Mitovirus*, de la familia *Narnaviridae* tal como mitovirus de *H. mompa* 1-18 (HmMV1-18) o mitovirus de *O. novo-ulmi* 6 (OnuMV6). El ARNbc del virus HmMV1-18 se ha detectado en mitocondrias [Osaki *et al* (2005) Virus res. 107, 39-46; Cole *et al* (2000) Virol. 268, 239-243].

Otros vectores basados en virus de ADN que se consideran por la presente invención incluyen, por ejemplo, *Geminiviridae*, *Caulimoviridae* y *Badnaviridae*.

- 35 Por ejemplo, *Geminiviridae* contienen genomas de ADN monocatenario (mc) circular, covalentemente cerrado (~2,8 Kpb), empaquetados dentro de partículas gemelas (denominadas germinadas). Las secuencias que regulan la actividad de replicación y transcripción del ADN están ubicadas en las regiones intergénicas (IR). La secuencia TAATATT\_AC invariable está ubicada en el LIR (en mastrevirus), IR (en curtovirus) y CR (en begomovirus) y contiene el sitio de iniciación de replicación de ADN en círculo rodante. El ciclo de replicación de geminivirus puede subdividirse en varias etapas funcionalmente diferenciadas. Al principio durante el proceso de infección, se inyectan 40 partículas virales mediante el vector de insecto, supuestamente sin recubrimiento, y se transporta el genoma viral al interior del núcleo de la célula huésped en el que se producen todas las etapas posteriores: conversión de ADNmc circular en productos intermedios de ADNbc circular, covalentemente cerrado, replicación en círculo rodante (RCR), producción de genomas de ADNmc circulares para encapsidación [Gutierrez (1999) Cell. Mol. Life Sci. 56 313-329].

- 45 Los geminivirus se dividen en cuatro géneros basándose en sus organizaciones genómicas y propiedades biológicas [Fauquet *et al* (2003) Arch Virol 148: 405-421]. Los mastrevirus (por ejemplo virus estriado del maíz, virus estriado del mijo, virus estriado de la caña de azúcar, virus de Egipto estriado de la caña de azúcar, virus de la Reunión estriado de la caña de azúcar, virus estriado de *Digitaria*, etc.) tienen genomas monopartitos y se transmiten mediante la chicharra a plantas monocotiledóneas. Los curtovirus (por ejemplo virus del abarquillado de las hojas de la remolacha) tienen genomas monopartitos distintos de los de los mastrevirus y se transmiten mediante vectores de chicharra a plantas dicotiledóneas. Los topocovirus (por ejemplo el virus del pseudoabarquillado de las hojas del tomate) tienen genomas monopartitos que se transmiten mediante un vector de saltaárboles a plantas dicotiledóneas. Los begomovirus (por ejemplo virus del mosaico amarillo dorado del frijol, virus del rizado de las hojas amarillas del tomate, virus del mosaico de *Abutilon*, virus del rizado de las hojas del tabaco, virus del mosaico 55 de la yuca africana, virus del mosaico amarillo de la judía mungo) tienen genomas bipartitos (aunque también se producen muchos begomovirus con un genoma monopartito) y se transmiten mediante la mosca blanca *Bemisia tabaci* a plantas dicotiledóneas.

Las partículas de caulimovirus contienen una única molécula de ADNbc (~8 kpb). Los caulimovirus habitualmente infectan a huéspedes de manera sistémica; se encuentran en la mayoría de las células de mesófilo, parénquima y epidérmicas y algunas veces en tubos cribosos de floema y traqueidas. Los miembros del género incluyen, por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor (CaMV), moteado clorótico de la soja (SoyCMV), mosaico de la vena de la yuca (CVMV), aclaramiento de la vena de la petunia (PVCV), virus baciliforme del tungro del arroz (RTBV).

Se apreciará que el vector universal IL-60 y los constructos auxiliares, que se han descrito recientemente [documento WO 2007/141790] también pueden usarse por la presente invención. Este vector, que de hecho es una forma desarmada del virus del rizado de la hoja amarilla del tomate (begomovirus), se aplica como ADN bicatenario [Peretz *et al* (2007) *Plant Physiology* 145:1251-1263]. Con IL-60 como "virus" cooperador desarmado, se produce la transactivación, dando como resultado un sistema de expresión/silenciamiento inducible.

Con el fin de dirigir los vectores que contienen el ADN foráneo dentro de orgánulos que contienen ADN específicos, puede introducirse una señal de localización nuclear (NLS), señal de localización de cloroplasto (CLS) o señal de localización de mitocondria (MLS) en marco con la secuencia heteróloga (tal como se describió con más detalle anteriormente en el presente documento).

Para lograr la transformación de células vegetales o de toda la planta, los vectores de expresión virales de la presente invención pueden introducirse en la célula huésped mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede lograrse la transformación transitoria mediante transferencia génica mediada por agrobacteria, mediante métodos de transferencia de ADN directa, mediante infección viral (es decir, usando el virus de plantas modificado) o mediante nematodos, mediante infiltración, mediante vacío, mediante electroporación o mediante bombardeo.

La transferencia génica mediada por agrobacteria tal como se da a conocer en el presente documento (véase, por ejemplo, el ejemplo 1 a continuación en el presente documento) incluye el uso de vectores de plásmido que contienen segmentos de ADN definidos. Por ejemplo, la presente invención enseña el uso de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa AGLO y EHA-105) transformada con pTRV1, pTRV2 y derivados de pTRV2 que contienen plásmidos tal como se describió anteriormente [véase por ejemplo Liu *et al.*, *Plant J* (2002) 30: 415-429]. Los métodos de inoculación del tejido de la planta varían dependiendo de la especie de planta y el sistema de suministro de agrobacteria. Un enfoque ampliamente usado es el procedimiento de disco foliar, que puede realizarse con cualquier explante tisular que proporciona una buena fuente para el inicio de diferenciación por toda la planta [Horsch, R. B. *et al.* (1988). "Leaf disc transformation". *Plant Molecular Biology Manual* A5, 1-9, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht]. Un enfoque complementario emplea el sistema de suministro de agrobacteria en combinación con una infiltración a vacío. El sistema de agrobacteria es especialmente útil para la creación de plantas dicotiledóneas transgénicas. Véanse: Klee, H. J. *et al.* (1987). *Annu Rev Plant Physiol* 38, 467-486; Klee, H. J. y Rogers, S. G. (1989). *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, vol. 6, *Molecular Biology of Plant Nuclear Genes*, págs. 2-25, J. Schell y L. K. Vasil, eds., Academic Publishers, San Diego, Cal.; y Gatenby, A. A. (1989). *Regulation and Expression of Plant Genes in Microorganisms*, págs. 93-112, *Plant Biotechnology*, S. Kung y C. J. Arntzen, eds., Butterworth Publishers, Boston, Mass. Las presentes enseñanzas también dan a conocer la transferencia génica mediada por agrobacteria mediante inyección de agrobacterias en la planta (por ejemplo en la superficie del brote expuesta tras la retirada de los meristemos apicales) y mediante infiltración en hojas tal como por ejemplo usando una jeringa sin aguja (por ejemplo, el contenido en agrobacterias de la jeringa se descarga en la superficie raspada de la hoja, véase el ejemplo 1 de la siguiente sección de ejemplos).

Los métodos de transferencia de ADN directa incluyen por ejemplo electroporación, microinyección y bombardeo de micropartículas. Véanse, por ejemplo: Paszkowski, J. *et al.* (1989). *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, vol. 6, *Molecular Biology of Plant Nuclear Genes*, págs. 52-68, J. Schell y L. K. Vasil, eds., Academic Publishers, San Diego, Cal.; y Toriyama, K. *et al.* (1988). *Bio/Technol* 6, 1072-1074 (methods for direct uptake of DNA into protoplasts). Estos métodos pueden usarse además para dirigir los vectores que contienen ADN foráneo (tal como se representó en detalle anteriormente en el presente documento) al interior de orgánulos que contienen ADN específicos. Por ejemplo, se cotransformaron mediante electroporación protoplastos de tabaco tanto con ADN que codifica para la nucleasa como con ADN donador [Wright *et al.* (2005) *Plant J* 44:693-705].

Las infecciones de vectores virales (por ejemplo pTRV) en plantas también puede llevarse a cabo mediante el uso de nematodos, incluyendo, sin limitación, *N. benthamiana* o *N. clevelandii* (el huésped natural para TRV). Por consiguiente, se inoculan *N. benthamiana* o *N. clevelandii* con pTRV1, pTRV2 o sus derivados antes de someterlos a las plantas.

La infección de vectores virales en plantas también puede realizarse mediante infección por viriones (tal como se representa en detalle en el ejemplo 1, a continuación en el presente documento). La infección por viriones puede llevarse a cabo, por ejemplo, inoculando en primer lugar los huéspedes habituales del virus (por ejemplo infección por TRV de *Petunia*) con el vector viral (pTRV1, pTRV2, o sus derivados). Aproximadamente de 5 a 21 días tras la infección (dpi) se recogen hojas de plantas y se extrae la savia en tampón fosfato 20 mM, pH=6,8 y un tensioactivo (por ejemplo Silwet L-77 al 0-0,03%) mediante mortero y mano de mortero. Entonces se deja gotear la savia que contiene TRV sobre estameña o se centrifuga para eliminar residuo celular y tras la adición de polvo fino de carborundo (para mejorar la infección) se raspan suavemente los tallos y las hojas de plantas jóvenes (de

aproximadamente 1 mes de edad). La infección de savia de plantas que se hacen crecer *in vitro* también puede llevarse a cabo haciendo pasar en primer lugar la savia a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  y después se lesionan los tallos de plantas que se propagan mediante cultivo tisular y se infectan usando jeringa y aguja o mediante vacío. Para la infección de semillas (por ejemplo monocotiledóneas), pueden incubarse semillas con la savia durante el hinchamiento y la formación de brotes (durante aproximadamente de 1 a 2 semanas).

Una planta completa transgénica, callos, tejido o célula vegetal pueden identificarse y aislarse seleccionando o examinando el material vegetal modificado por ingeniería para detectar rasgos codificados por los genes marcadores presentes en los vectores de expresión virales. Por ejemplo, la selección puede realizarse haciendo crecer el material vegetal modificado por ingeniería en medios que contienen una cantidad inhibitoria del antibiótico o herbicida frente al cual el constructo génico transformante confiere resistencia. Además, también pueden identificarse plantas transgénicas y células vegetales examinando para detectar las actividades de cualquier gen marcador visible (por ejemplo, GFP o GUS) que puede estar presente en los vectores de expresión virales. Tales metodologías de selección y examen las conocen bien los expertos en la técnica.

También pueden emplearse métodos físicos y bioquímicos para identificar plantas transgénicas o células vegetales que contienen constructos génicos insertados. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, análisis por transferencia de tipo Southern o amplificación por PCR, transferencia de tipo Northern, ensayos enzimáticos, electroforesis en gel de proteínas, técnicas de inmunotransferencia de tipo Western, inmunoprecipitación, o inmunoensayos ligados a enzimas. También pueden usarse técnicas adicionales, tales como hibridación *in situ*, tinción enzimática e inmunotinción, para detectar la presencia o expresión de los genes heterólogos en órganos y tejidos específicos de plantas. Los métodos para realizar todos estos ensayos los conocen bien los expertos en la técnica.

A continuación se proporcionan otras referencias que pueden usarse para implementar las enseñanzas de la presente invención: *Agrobacterium* delivery of a Ti plasmid harboring both the ZFNs and a donor DNA construct [Cai *et al.* (2009) Plant Mol Biol. Aceptado: 14 de diciembre de 2008].

Los métodos, nucleasas quiméricas y vectores mencionados anteriormente pueden usarse para generar variación genotípica en plantas.

La siguiente sección proporciona aplicaciones no limitativas para generar una variación de este tipo.

Por tanto, pueden usarse nucleasas quiméricas de la presente invención para generar una firma de ácidos nucleicos insertados al azar de una manera específica de la secuencia, también denominado en el presente documento marcaje. Esta firma puede usarse como "marca genética". Este término se usa en el presente documento de manera distinta del término común "marcador genético". Mientras que este último término se refiere a variaciones genéticas que se producen de manera natural entre individuos en una población, el término marca genética tal como se usa en el presente documento se refiere específicamente a variabilidad genética artificial (generada por el ser humano), detectable, que puede heredarse.

La DSB se dirige normalmente a regiones no codificantes (secuencia distinta de marco de lectura abierto) para no afectar al fenotipo de la planta (por ejemplo para el marcaje). Sin embargo, el marcaje también puede dirigirse a una región codificante. Una marca genética de alta calidad se selecciona de manera única para el genoma de la planta y resiste la variación de secuencia que puede introducirse a lo largo de las generaciones.

Para algunos fines, por ejemplo, reguladores, puede ser deseable marcar plantas distribuidas comercialmente con marcas públicamente conocidas, para permitir a las autoridades reguladoras identificar fácilmente la marca, para identificar al fabricante, distribuidor, dueño o usuario del organismo marcado. Para otros fines puede ser ventajoso el secretismo. Esto último es cierto, por ejemplo, para evitar un intento de modificar genéticamente la marca genética de un acontecimiento de gran importancia protegido por leyes de propiedad intelectual.

Por tanto, un organismo protegido por propiedad intelectual que también está sujeto a regulación se marcará genéticamente, según una realización útil de la presente invención, mediante (a) al menos una secuencia de ADN única que se conoce por el público; y (b) al menos una secuencia de ADN única que no se conoce, al menos no como marca genética, por el público.

Para introducir una secuencia heteróloga (por ejemplo, codificante o no codificante), en primer lugar se generarán DSB en ADN vegetal tal como se describe en el presente documento. Los expertos en la técnica conocen bien que la integración de ADN foráneo se produce con alta frecuencia en estos sitios de rotura del ADN [Salomon *et al.*, EMBO J (1998) 17: 6086-6095; Tzfira *et al.*, Plant Physiol (2003) 133: 1011-1023; Tzfira *et al.*, Trends Genet (2004) 20: 375-383, Cai *et al.* (2009) Plant Mol Biol. Aceptado: 14 de diciembre de 2008]. Una vez presente en la célula diana, por ejemplo en plásmidos episomales, el ADN foráneo puede separarse del plásmido mediante corte usando la misma ZFN usada para generar DSB en el ADN vegetal. El ADN foráneo liberado del plásmido episomal se incorporará entonces en el ADN celular mediante proteínas de unión de extremos no homólogos (NHEJ) vegetales. Las DSB también pueden conducir a un direccionamiento génico basado en recombinación homóloga (HR) potenciada en células vegetales (Puchta *et al.* Proc Natl Acad Sci USA (1996) 93: 5055-5060).

Tal como se menciona, las presentes enseñanzas pueden usarse para generar variación genotípica. Por tanto, las nucleasas quiméricas de las presentes enseñanzas pueden diseñarse para generar DSB en regiones codificantes o no codificantes de un locus de interés para introducir el gen heterólogo de interés. Tales alteraciones en el genoma de la planta pueden conducir por consiguiente a adiciones o alteraciones en la expresión génica de la planta (descrito en detalle anteriormente en el presente documento) y en características fenotípicas de la planta (por ejemplo color, aroma, etc.).

Adicionalmente pueden usarse nucleasas quiméricas para generar variación genotípica mediante desactivación de la expresión génica. Por tanto pueden diseñarse nucleasas quiméricas para generar DSB en regiones codificantes o no codificantes de un locus de interés para generar una mutación sin sentido o de cambio de sentido. Alternativamente, pueden usarse dos pares de nucleasas quiméricas para escindir una secuencia entera del genoma, desactivando de ese modo la expresión génica.

También pueden usarse nucleasas quiméricas de la presente invención para generar variabilidad introduciendo mutaciones no específicas en el genoma de la planta. Esto puede lograrse mediante el uso de ADN restrictasas no específicas o Fok1 no riguroso.

Como alternativa, las nucleasas quiméricas de la presente invención pueden usarse para combatir infecciones por patógenos de plantas.

Por tanto, la presente invención considera un método de tratamiento de una infección de una planta por un patógeno. El método comprende introducir en la planta al menos un vector de expresión que codifica para al menos una nucleasa quimérica que comprende un dominio de unión a ADN y una nucleasa, en el que el dominio de unión a ADN media en el direccionamiento de la nucleasa al genoma del patógeno, previniendo o tratando de ese modo una infección de una planta por un patógeno.

Tal como se usa en el presente documento un "patógeno de plantas" se refiere a un organismo que provoca una enfermedad en la planta infectada. Los organismos que provocan enfermedad infecciosa incluyen hongos, oomicetos, bacterias, virus, viroides, organismos similares a virus, fitoplasmas, protozoos, nematodos y plantas parásitas.

Dado que se desea la completa destrucción del ADN del patógeno, la nucleasa quimérica se diseña para escindir tantos sitios de secuencia en el ADN del patógeno como sea posible. Por tanto, pueden seleccionarse como diana secuencias de repetición. Adicional o alternativamente se seleccionan como diana varias secuencias distintas suficientes para inducir degradación del ADN del patógeno.

Según algunas realizaciones de este aspecto de la presente invención, la nucleasa quimérica se diseña para escindir el ADN del patógeno pero no el de la planta. Con este fin, la nucleasa quimérica se diseña carente de una señal de localización, de tal manera que la nucleasa quimérica es activa en el citoplasma que comprende el ADN del patógeno (por ejemplo, virus) pero no en el de la planta.

Alternativamente, la nucleasa puede diseñarse para escindir secuencias que son específicas para el patógeno pero están ausentes en el genoma de la planta. Esto puede lograrse usando análisis mediante bioinformática de rutina tal como mediante el uso de software de alineación, por ejemplo, Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Una lista no limitativa de patógenos virales para plantas que pueden seleccionarse como diana usando las enseñanzas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a especie: virus del oscurecimiento precoz del guisante (PEBV), género: *Tobravirus*. Especie: virus de la mancha anular de la pimienta (PepRSV), género: *Tobravirus*. Especie: virus del mosaico de la sandía (WMV), género: *Potyvirus* y otros virus del género *Potyvirus*. Especie: virus del mosaico del tabaco (TMV), género *Tobamovirus* y otros virus del género *Tobamovirus*. Especie: virus X de la patata (PVX), género *Potexvirus* y otros virus del género *Potexvirus*. Por tanto las presentes enseñanzas consideran la selección como diana de virus de ARN así como de ADN (por ejemplo *Geminivirus* o *Bigeminivirus*). Los virus *Geminiviridae* que pueden seleccionarse como diana incluyen, pero no se limitan a, bigeminivirus del mosaico de *Abutilon*, bigeminivirus de la vena amarilla de *Ageratum*, bigeminivirus del mosaico de calico 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 de la hoja corrugada de algodón, bigeminivirus del rizado de la hoja de algodón, bigeminivirus del mosaico de la vena amarilla de crotón, bigeminivirus del mosaico amarillo de dólico, bigeminivirus del mosaico de euforbia, bigeminivirus del mosaico amarillo de la judía espárrago, bigeminivirus del mosaico de *Jatropha*, bigeminivirus del mosaico dorado de la judía de Lima, bigeminivirus del rizado de la hoja del melón, bigeminivirus del mosaico amarillo de la judía mungo, bigeminivirus del rizado de la hoja de la oca, bigeminivirus de huasteco del pimiento, bigeminivirus de Tejas del pimiento, bigeminivirus del mosaico amarillo de la patata, bigeminivirus del mosaico de *Rhynchosia*, bigeminivirus del mosaico dorado de Serrano, bigeminivirus de rizado de la hoja de la calabaza, bigeminivirus de rizado de la hoja del tabaco, bigeminivirus de rizado de la hoja del tomate australiano, bigeminivirus del mosaico dorado del tomate, bigeminivirus de rizado de la hoja indio del tomate, bigeminivirus de la hoja corrugada del tomate, bigeminivirus de moteado del tomate, bigeminivirus de rizado de la

hoja amarillo del tomate, bigeminivirus del mosaico amarillo del tomate, bigeminivirus de la atrofia clorótica de la sandía y bigeminivirus de moteado rizado de la sandía.

La presente invención también considera un método para generar esterilidad masculina en una planta. El método comprende regular por incremento en la planta un gen estructural o funcional de una mitocondria o un cloroplasto asociado con esterilidad masculina introduciendo en la planta al menos un vector de expresión viral que codifica para al menos una nucleasa quimérica que comprende un dominio de unión a ADN, una nucleasa y una señal de localización de mitocondria o cloroplasto y un constructo de expresión de ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga que puede regular por incremento el gen estructural o funcional de una mitocondria o un cloroplasto cuando se direcciona al interior del genoma de la mitocondria o el cloroplasto, en el que el dominio de unión a ADN media en el direccionamiento de la secuencia de ácido nucleico heteróloga al genoma de la mitocondria o el cloroplasto, generando de ese modo esterilidad masculina en la planta.

Por tanto, por ejemplo, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga codificante (por ejemplo, para un gen asociado con CMS) o no codificante (por ejemplo, potente promotor para potenciar la expresión de un gen asociado con CMS) así como un sitio de unión para la nucleasa quimérica (idéntico al del genoma de la mitocondria o el cloroplasto). Tras la escisión mediante la nucleasa quimérica, la secuencia de ácido nucleico heteróloga se inserta en el sitio predeterminado en el genoma del cloroplasto o la mitocondria.

Tal como se mencionó anteriormente en el presente documento, la esterilidad masculina citoplasmática (CMS) está asociada con disfunción mitocondrial. Para ello, las nucleasas quiméricas se diseñan para comprender una señal de localización de mitocondria (tal como se describió en detalle anteriormente en el presente documento) y sitios de escisión que son específicos para el genoma de la mitocondria. Los genes específicos que pueden regularse por incremento incluyen, pero no se limitan a, la quimera pcf de petunia que está ubicada en estrecha proximidad a *nad3* y *rps12*, la secuencia del arroz (*Oryza sativa*) secuencia que está en el sentido de 3' del gen *B-atp6* (es decir *orf79*), *T-urf13* y *orf221* del maíz, *orf239* de *Helianthus sp.* en el sentido con respecto a 3' de *atpA*, los orf de *Brassica sp.* que están en el sentido de 5' con respecto a *atp6* (por ejemplo *orf139*, *orf224* u *orf138* y *orf158*). Se apreciará que con el fin de inducir CMS, normalmente se transcriben estas secuencias genómicas en la planta, por tanto las enseñanzas de la presente invención consideran la selección como diana de estas secuencias (por ejemplo añadiendo secuencias codificantes) o la sobreexpresión de las mismas usando los métodos descritos anteriormente para lograr CMS.

Se apreciará que el fenotipo de CMS, generado mediante la incompatibilidad entre los genomas nuclear y mitocondrial, se usa como un importante rasgo agronómico que impide la endogamia y favorece la producción híbrida.

Tal como se mencionó anteriormente en el presente documento, la inducción de CMS también puede lograrse mediante sobreexpresión de un gen de cloroplasto tal como  $\beta$ -cetotilasa. Anteriormente se ha mostrado que la sobreexpresión de  $\beta$ -cetotilasa mediante el genoma de cloroplasto induce CMS [Ruiz *et al* (2005) Plant Physiol. 138 1232-1246]. Por tanto, las presentes enseñanzas también consideran seleccionar como diana genes de cloroplasto o la sobreexpresión de los mismos (por ejemplo  $\beta$ -cetotilasa) usando los métodos descritos anteriormente con el fin de lograr CMS.

La presente invención considera además un método de generación de una planta resistente a herbicidas. El método comprende introducir en la planta al menos un vector de expresión viral que codifica para al menos una nucleasa quimérica que comprende un dominio de unión a ADN, una nucleasa y una señal de localización de cloroplasto, en el que el dominio de unión a ADN media en el direccionamiento de la nucleasa a un gen que confiere sensibilidad a herbicidas, generando de ese modo la planta resistente a herbicidas.

Se apreciará que en el campo de plantas genéticamente modificadas, se desea modificar mediante ingeniería plantas que sean resistentes a herbicidas. Además, la mayoría de los herbicidas seleccionan como diana rutas que se encuentran dentro de los plastidios (por ejemplo dentro del cloroplasto). Por tanto, para generar plantas resistentes a herbicidas, las nucleasas quiméricas se diseñan para comprender una señal de localización de cloroplasto (tal como se describió en detalle anteriormente en el presente documento) y sitios de escisión que son específicos para el genoma de cloroplasto. Los genes específicos que pueden seleccionarse como diana en el genoma de cloroplasto incluyen, pero no se limitan a, el gen *psbA* de cloroplasto (que codifica para la proteína de membrana de unión a quinona fotosintética  $Q_B$ , la diana del herbicida atrazina) y el gen para la EPSP sintasa (un gen nuclear, sin embargo, su sobreexpresión o acumulación en el cloroplasto le proporciona a la planta resistencia al herbicida glifosato ya que aumenta la tasa de transcripción de EPSP así como mediante una renovación reducida de la enzima).

Si se desea, las nucleasas quiméricas y los constructos de expresión de las presentes enseñanzas pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador o kit. El envase puede comprender, por ejemplo, lámina de metal o plástico, tal como un envase de tipo blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado por instrucciones de uso.

Se espera que durante la vida de una patente que surja de esta solicitud se desarrollarán muchos vectores virales y

nucleasas quiméricas relevantes y se pretende que el alcance de estos términos incluya en principio todas estas nuevas tecnologías.

Tal como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” se refiere a  $\pm 10\%$ .

5 Los términos “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “que tiene” y sus conjugados significan “que incluye, pero no se limita a”. Este término abarca los términos “que consiste en” y “que consiste esencialmente en”.

La frase “que consiste esencialmente en” significa que la composición o el método pueden incluir componentes y/o etapas adicionales, pero sólo si los componentes y/o etapas adicionales no alteran sustancialmente las características básicas y novedosas de la composición o el método reivindicados.

10 Tal como se usa en el presente documento, la forma singular “un”, “una” y “el/la” incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término “un compuesto” o “al menos un compuesto” puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

15 A lo largo de esta solicitud, diversas realizaciones de esta invención pueden presentarse en formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es simplemente por motivos de conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible sobre el alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha dado a conocer específicamente todos los posibles subintervalos así como valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como desde 1 hasta 6 debe considerarse que ha dado a conocer específicamente subintervalos tales como desde 1 hasta 3, desde 1 hasta 4, desde 1 hasta 5, desde 2 hasta 4, desde 2 hasta 6, desde 3 hasta 6 etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente del alcance del intervalo.

20 Siempre que se indique un intervalo numérico en el presente documento, se pretende que incluya cualquier número mencionado (fraccionado o entero) dentro del intervalo indicado. Las frases “que oscila/oscila entre” un primer número indicado y un segundo número indicado “que oscila/oscila desde” un primer número indicado “hasta” un segundo número indicado se usan en el presente documento de manera intercambiable y se pretende que incluyan los números indicados primero y segundo y todos los números fraccionados y enteros entre los mismos.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “método” se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para lograr una tarea dada incluyendo, pero sin limitarse a, las maneras, medios, técnicas y procedimientos o bien conocidos, o bien fácilmente desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por profesionales de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “tratar” incluye eliminar, sustancialmente inhibir, ralentizar o invertir la progresión de un estado, sustancialmente mejorar síntomas clínicos o estéticos de un estado o sustancialmente prevenir la aparición de síntomas clínicos o estéticos de un estado.

35 Se aprecia que determinadas características de la invención que, por motivos de claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. A la inversa, diversas características de la invención que, por motivos de brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como resulte adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Determinadas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse como características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización no pueda funcionar sin esos elementos.

40 Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se explicaron de manera resumida anteriormente en el presente documento y tal como se reivindican en la sección de reivindicaciones a continuación encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

45 Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de manera no limitativa.

50 Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio usados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véanse, 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 estadounidenses n.ºs 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 & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds.), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 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 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); incorporándose todos ellos como referencia tal como si se expusieran en su totalidad en el presente documento. A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales. Se cree que los procedimientos en ellas se conocen bien en la técnica y se proporcionan por conveniencia del lector. Toda la información contenida en ellas se incorpora en el presente documento como referencia.

### EJEMPLO 1

#### Generación de vectores virales y nucleasas de dedos de zinc

##### Material vegetal

Se usaron de manera rutinaria plántulas con raíz de las líneas B1, P720, Burgundy y Royal Blue de *Petunia hybrida* (Danziger-"Dan" Flower Farm, Mishmar Hashiva, Israel) para la infección por *Agrobacterium tumefaciens* para la expresión transitoria de genes foráneos.

Otras plantas usadas para experimentos de inoculación incluyeron *Solanum pimpinellifolium* La121 (Davis University Gene bank), *Capsicum annuum* indra1750 (S&G Syngeta global LTD.), *Arabidopsis thaliana* [Greenboim-Wainberg *et al.* (2005) Plant Cell, 17: 92-102], *Artemisia* sp. (Danziger-"Dan" Flower Farm, Mishmar Hashiva, Israel), *Nicotiana benthamiana* [Radian-Sade *et al.*, Phytoparasitica (2000) 28:79-86], *Spinacia oleracea* y *Beta vulgaris* (Eden Seeds, Reut, Israel), *Nicotiana tabacum* CV SAMSUNG [Levy *et al.* (2004) Plant Physiol 135:1-6], *Nicotiana tabacum* CV XANTHI [Ovadis *et al.* (1999) en "Plant Biotechnology and *In vitro* Biology", Kluwer Academic Press, Países Bajos, págs. 189-192], *Cucumis sativus* (Eden Seeds, Reut, Israel), *Solanum melongena* (M. Ben-Sachar LTD, Tel-Aviv, Israel), *Gossypium hirsutum* cv. *Siv'on* [Saranga *et al.* (2004) Plant, Cell and Environment 27, 263-277] *Brassica napus* [Nesi *et al.*, C. R. Biologies 331 (2008) 763-771], *Zea mays* Var. Royalty F1 (M. Ben-Sachar LTD, Tel-Aviv, Israel). Se hicieron crecer todas las plantas en un invernadero a temperaturas diurnas/nocturnas de 25°C/20°C y bajo un fotoperiodo natural.

##### Construcción de plásmidos

Se usaron los vectores pTRV1, un vector de ADN-t de pYL44 binario que porta la secuencia completa del ADNc correspondiente al ARN1 de la cepa Ppk20 de TRV (n.º de registro de GenBank AF406990) y pTRV2 (n.º de registro de GenBank AF406991) [Liu *et al.* Plant J (2002) 30: 415-429]. Se generaron pTRV2 que contenían GUS (pTRV2-Gus) mediante la clonación de GUS de pB1101 (Clontech Laboratories) en MCS (sitios *Xba*I-*Sac*I) de pTRV2. Se generaron pTRV2 que contenían PAP1 (pTRV2-Δ2b-Pap) mediante la clonación de PAP1 de pCHFS-PAP1 [Borevitz *et al.*, The Plant Cell (2000) 12:2383-2393] en MSC (sitios *Eco*RI-*Bam*HI) de pTRV2-Δ2b.

Se llevó a cabo la generación de pTRV2 para la expresión transitoria de genes diana mediante la eliminación de las 300 pb del gen 2b de ARN2 del vector original. Para esto, se digirió el ADN de pTRV2 con *Pvu*II y *Eco*RI y se reemplazó el fragmento deleciónado que contenía parte de 2b por un fragmento de PCR. Este fragmento se generó mediante PCR usando ADN de pTRV2 como molde y los cebadores A y B (véase la tabla 1, más adelante). Se digirió con *Pvu*II y *Eco*RI antes de volver a clonar. El plásmido resultante (pTRV2Δ2b) era idéntico al pTRV2 original, pero carecía de la secuencia de 2b. Se generó el plásmido pTRV2 sin 2b pero con GUS (pTRV2Δ2b-Gus) de la misma forma, excepto porque se usó pTRV2-Gus como plásmido receptor en lugar de pTRV2.

Para la generación de pTRV2 que contenía la longitud completa de 2b de TRV (pTRV2-2b) se generó un fragmento de PCR de 1,5 Kpb con los cebadores A y C (véase la tabla 1, más adelante) usando como molde pK202b-GFP [Vellios *et al.*, Virology (2002) 300:118-124]. El fragmento amplificado incluía el gen 2b (de la cepa Ppk20, n.º de registro de GenBank Z36974) con UTR en 5' y 3' más el promotor subgenómico (sg-P) de la proteína de la cubierta (CP) del virus de oscurecimiento precoz del guisante (PEBV) (n.º de registro de GenBank X78455). Este sg-P estaba ubicado en el sentido de 3' con respecto a 2b. Para la generación de pTRV2-2b que contenía GFP (n.º de registro de GenBank U62637) en el sentido de 3' con respecto a sg-P (pTRV2-2b-Gfp), se transfirió el fragmento *Pvu*II-*Eco*RI de pK202b-GFP a pTRV2 digerido con las mismas enzimas.

Para la generación de pTRV2Δ2b que contenía sg-P con GFP en el sentido de 3' (pTRV2Δ2b-Gfp), se preparó un fragmento de PCR usando los cebadores F y G\* (véase la tabla 1, más adelante) y pK202b-GFP como molde. Este fragmento se digirió entonces con *Sac*I y *Sma*I y se clonó en el pTRV2Δ2b digerido con las mismas enzimas. \*



Obsérvese que el cebador G añade una mutación silenciosa a Gfp con el fin de eliminar un sitio ScaI en el sentido de 5' con respecto al codón de terminación.

5 Se clonó un gen Gus con y sin  $\Omega$  [Broido *et al.*, *Physiologia Plantarum* (1993) 88: 259-266] en el MCS de pTRV2 $\Delta$ 2b-Gfp, en el sentido de 5' con respecto a sg-P de PEBV para generar pTRV2 $\Delta$ 2b- $\Omega$ Gus-Gfp y pTRV2 $\Delta$ 2b-Gus-Gfp, respectivamente. El fragmento de GUS se generó tras la digestión de pTRV2-Gus mediante EcoRI y ScaI. Se generó el fragmento  $\Omega$ Gus mediante la clonación de GUS en sitios Sall-BamHI en el sentido de 3' con respecto a la secuencia de  $\Omega$  de TMV (Broido *et al.*, citado anteriormente) en pDrive (Qiagen) y luego digiriendo el plásmido resultante con XbaI-KpnI para liberar  $\Omega$ Gus y reconstruirlo para dar pTRV2 $\Delta$ 2b-Gfp.

10 Se generó pTRV2 $\Delta$ 2b que contenía  $\Omega$ Gus (pTRV2 $\Delta$ 2b- $\Omega$ Gus) mediante la clonación de GUS en sitios Sall-BamHI en el sentido de 3' con respecto a la secuencia de  $\Omega$  de TMV (Broido *et al.*, citado anteriormente) en un pBluescript SK+ (Stratagen) y luego dirigiendo el plásmido resultante con KpnI-ScaI para liberar  $\Omega$ Gus y reconstruirlo para dar pTRV2 $\Delta$ 2b.

15 Se construyó un pTRV2 $\Delta$ 2b que portaba el p19 supresor de silenciamiento del virus del enanismo arbustivo del tomate (pTRV2 $\Delta$ 2b-p19) transfiriendo un fragmento de PCR de 519 pb que codifica para p19 (usando los cebadores D y E, véase la tabla 1, más adelante) de pCB301-p19 [Voinnet *et al.*, *Plant J.* (2003) 33: 949-956] en pTRV2 $\Delta$ 2b (Obermeier *et al.*, *Phytopathology* (2001) 91:797-806].

20 En primer lugar se transformaron todos los constructos de pTRV2 recién formados a *E. coli* y a *Agrobacterium tumefaciens* AGLO [Zuker *et al.* *Mol. Breeding* (1999) 5:367-375]. Se evaluó cualitativamente la actividad de Gus en *Agrobacterium* con disolución de X-gluc tal como se describió anteriormente [Zuker *et al.*, citado anteriormente]. Se analizó cualitativamente la expresión de GFP en *Agrobacterium* usando un estereomicroscopio de fluorescencia (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

25 Se generó pTRV2 $\Delta$ 2b que contenía sg-P con DsRed2 en el sentido de 3' (DsRed, n.º de registro de GenBank AY818373, nucleótidos 1395-2074 de DsRed, SEQ ID NO: 129, pTRV- $\Delta$ 2b-sgP-DsRed) preparando un fragmento de PCR usando como molde pSAT6-DsRed2-N1 y los cebadores H y I (véase la tabla 1, más adelante). Entonces se digirió el producto de PCR con HpaI y ScaI, se obtuvieron extremos romos con ADN polimerasa de T4 y se clonó (en lugar de GFP) en el pTRV-2 $\Delta$ 2b-GFP digerido con HpaI y SmaI.

Se construyeron dos combinaciones diferentes de dos genes de fluorescencia en pTRV2:

30 Se utilizó una secuencia de 54 nucleótidos similar a 2A (n.º de registro de GenBank AF062037, nucleótidos 502-555, SEQ ID NO: 81), un virus *Thosea asigna* (TaV-T2A) [Donnelly *et al.* (2001) *J. Gen. Virol.* 82, 1027-1041; Osborn *et al.* (2005) *Mol. Therapy*, 12, 569-574], para crear un vector de plásmido bicistrónico que codifica para un solo ORF largo que consiste en el gen DsRed2 y los genes NLS-EGFP. La secuencia (que codifica para un péptido de 18 aminoácidos), cuando se insertó en una sola molécula de ARN que contenía dos ORF, permitió la traducción separada de los dos ORF [Donnelly *et al.* (2001) citado anteriormente; Osborn *et al.* (2005), citado anteriormente].

35 Se modificó la secuencia de T2A a nivel de nucleótidos, basándose en el uso del codón de petunia (<http://worldwidewebdotkazusadotordotjpcodon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4102>) y la secuencia modificada se denominó pTRV-T2A (véase la figura 2A).

40 Se generó un plásmido que contenía la secuencia de pTRV-T2A insertada entre DsRed2 y NLS-EGFP generando en primer lugar un fragmento de PCR usando pSAT6-NLS-P1-36-ZFN1 como molde tras la reacción de PCR triple con dos cebadores directos J y K (tabla 1, más adelante) y el cebador inverso S (tabla 1, más adelante) para FoKI. Se clonó el producto resultante en los sitios BamHI y ScaI de pBluescript SK (pBS) que carecía del sitio XhoI, para generar pBS-T2A-P36-ZFN2. Se amplificó EGFP (n.º de registro de GenBank AY818363, SEQ ID NO: 130) por PCR usando los cebadores N y O (tabla 1, más adelante) y se clonó en el sentido de 3' con respecto a NLS en pBS-T2A-P36-ZFN1 digerido con XhoI y ScaI, en lugar de ZFN. El plásmido resultante se denominó pBS-T2A-NLS-EGFP. Se amplificó DsRed2 usando los cebadores H y M (tabla 1, más adelante). Se ligó DsRed2 que carecía del codón de parada resultante al fragmento de Sall-BamHI en pBS T2A-NLS-EGFP en el sentido de 5' con respecto a T2A, dando pBS-DsRed-T2A-NLS-EGFP con el ORF bicistrónico. Entonces se ligó el fragmento DsRed-T2A-NLS-EGFP del plásmido a los sitios HpaI-ScaI de pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP para generar pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-DsRed-T2A-NLS-EGFP.

50 Se generó un pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP que contenía dos genes marcadores fluorescentes con promotores subgenómicos separados en los que pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-GFP se digirió en primer lugar con SmaI. Se clonó el fragmento de PCR generado usando pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-DsRed como molde y los cebadores P y Q (véase la tabla 1, más adelante) en este SmaI, para producir pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-GFP-sgP-DsRed.

Tabla 1: Cebadores

Cebador	Secuencia
A	TGGAGTTGAAGAGTTATTACCGAACG (SEQ ID NO: 1)
B	AAGAAATTCGAAACTCAAATGCTACCAA (SEQ ID NO: 2)

C (PEBV-sgP R)	TAGAATTCTCGTTAACTCGGGTAAGTGA (SEQ ID NO: 3)
D (P19-F)	AAACTCGAGATGGAACGAGCFATACAAGGAA (SEQ ID NO: 4)
E (P19-R)	AAACCCGGGAGAGTCTGTCTTACTCGCCTTCT (SEQ ID NO: 5)
F (5'-PEBV-sgP-F)	AAGAGCTCGAGCATCTTGTCTGGGGTT (SEQ ID NO: 6)
G (GFPuv-3'-SmaI)	ACCCGGGTATTTGTAGAGTTCATCCATGCCA (SEQ ID NO: 7)
H (DsRFP-F-HpaI)	AGTTAACGAGATGGCCTCCTCCGAGA (SEQ ID NO: 53)
I (DsRed2-R-SacI)	TAGAGCTCTCACAGGAACAGGTGGTGGC (SEQ ID NO: 54)
J (T2A-F-BamHI)	<b><u>TTTGGATCCGAAGGAAGAGGATCTCTTCTTACTTGTGGTGATGTTGA</u></b> <b><u>AGAG (SEQ ID NO: 55)</u></b>
K (T2A-NLS-F-primer)	<b><u>TTACTTGTGGTGATGTTGAAGAGAATCCTGGACCAAAAAAGAAGAG</u></b> <b><u>AAAG (SEQ ID NO: 56)</u></b>
L (R-FokI SacI)	AAGAGCTCTTAGGATCCAAAGTTTATCTC (SEQ ID NO: 57)
M (DsRFP-R-BamHI)	AGGATCCCAGGAACAGGTGGTGGC (SEQ ID NO: 58)
N (EGFP-F-XhoI)	A TCT CGA GTG AGC AAG GGC GA (SEQ ID NO: 59)
O (EGFP-R-SacI)	AGAGCTCTACTTGTACAGCTCGTCCATG (SEQ ID NO: 60)
NLS (mayúsculas)	atggtgCCEAAAAAAGAAGAGAAAGGTAGAAGACCCctctcgag (SEQ ID NO: 61)
P (2sg F1 Sma)	CCCGGGATTTAAGGACGTGAACGTGT (SEQ ID NO: 62)
Q (dsRed R678 Sma)	CCCGGGTCACAGGAACAGGTGGT (SEQ ID NO: 63)
R (gen de unión de NLS)	AGTTAACGAGATGCCAAAAAAGAAGAGAAAGGT (SEQ ID NO: 64)
S (FokI-m-R-SacI)	AAGAGGTCTTAaGATCCAAAGTTTATCTC (SEQ ID NO: 65)
T (FokI-m-R-SmaI)	ACCCGGGTATCCAAAGTTTATCTCGCCGT (SEQ ID NO: 66)
U (F-QEQ-ZFN)	AACTCGAGAAAACTGCGGAACGGA (SEQ ID NO: 67)
V (Rssu tp-F-HpaI)	AGTTAACGAGATGGCTTCTATGATATCCTCT (SEQ ID NO: 68)
W (ATP-β-tp-F-HpaI)	AGTTAACGAGATGGCTTCTCGGAGG (SEQ ID NO: 69)

*Clonación de vectores virales de pTRV2 que permiten el direccionamiento de productos génicos a plastidios*

5 Para generar EGFP dirigida a cloroplasto, los inventores amplificaron un fragmento de PCR que contenía el péptido de tránsito de la subunidad pequeña de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (Rssu) de guisante (n.º de registro de GenBank X00806, nucleótidos 1086-1259, SEQ ID NO: 138) fusionado a EGFP con los cebadores V y O (véase la tabla 1, anteriormente) usando el plásmido pTEX-Rssu-GFP descrito anteriormente por Bezawork [Tesis M.Sc de Bezawork (2007), presentada ante Agricultural Research Organization, Volcani center y la Facultad de Agricultura] como molde. Se clonó el producto de PCR, tras obtener extremos romos con HpaI, en el sentido de 3' con respecto a sgP en pTRV2-Δ2b-sgP para producir pTRV2-Δ2b-sgP-Rssu-EGFP.

10 Para generar EGFP dirigida a mitocondria, los inventores amplificaron un fragmento de PCR que contenía un péptido señal de la subunidad beta de ATPasa de *Nicotiana sylvestris* (ATP-β) (n.º de registro de GenBank U96496, nsatp2.1.1, nucleótidos 12 a 167, SEQ ID NO: 139) fusionado a EGFP con los cebadores W y O (véase la tabla 1, anteriormente) usando el plásmido pTEX-ATPβ-GFP descrito anteriormente por Bezawork [Bezawork (2007), citado anteriormente] como molde. Se clonó el producto de PCR, tras obtener extremos cormos con HpaI, en el sentido de 3' con respecto a sgP en pTRV2-Δ2b-sgP para producir pTRV2-Δ2b-sgP-ATPβ-EGFP.

15 *Inoculación de plantas con vectores de TRV*

20 Se prepararon *Agrobacterium tumefaciens* (cepa AGLO) transformada con pTRV1, pTRV2 y derivados de pTRV2 tal como se describió anteriormente [Liu *et al.*, Plant J (2002) 30: 415-429]. Se hizo crecer el cultivo de *Agrobacterium* durante la noche a 28°C en medio LB complementado con kanamicina 50 mg/l y acetosiringona (A.S.) 200 μM. Se recogieron las células y se resuspendieron en tampón de inoculación que contenía MES 10 mM, A.S. 200 μM y MgCl<sub>2</sub> 10 mM a una DO<sub>600</sub> de 10. Tras 3 horas adicionales de incubación a 28°C, se mezclaron las bacterias con el pTRV1 con las bacterias que contenían los derivados de pTRV2 a una razón de 1:1. Cuando estuvo implicada una coinfección de más de un pTRV2, las agrobacterias con pTRV1 eran siempre el 50% en la mezcla. Se usaron 200-400 μl de la mezcla de agrobacterias para la inyección en el tallo. También se inyectaron agrobacterias en la superficie del brote expuesta tras la retirada de los meristemos apicales.

25 Otra opción para infección fue infiltración en hojas usando una jeringa sin aguja: se descargó el contenido de agrobacterias de la jeringa en la superficie raspada de la hoja. Para la infección de plantas con TRV, sin el uso de agrobacterias, en primer lugar se inoculó *N. benthamiana* o *N. clevelandii* (el huésped habitual para TRV) con pTRV1 y pTRV2 o sus derivados. Aproximadamente de 15 a 21 días tras la infección (dpi), se recogieron las hojas de plantas (como fuente de infección de savia preparada recientemente) y se extrajo la savia en tampón fosfato  
30 20 mM (pH-6,8) mediante mortero y mano de mortero.

Para la infección por viriones de plantas (infección por TRV sin el uso de agrobacterias), los inventores inocularon en primer lugar *Petunia hybrida*, *Nicotiana tabacum* cv Samsung o *N. benthamiana*, (los huéspedes habituales para TRV) con pTRV1 y pTRV2 (o sus derivados). Aproximadamente de 5 a 21 días tras la infección (dpi) los inventores recogieron las hojas de plantas y extrajeron la savia en tampón fosfato 20 mM pH=6,8 y un tensioactivo (por ejemplo Silwet L-77 al 0-0,03%) mediante mortero y mano de mortero. Entonces se dejó gotear la savia que contenía TRV sobre estameña o se centrifugó y tras la adición de polvo fino de carborundo (para mejorar la infección) se rasparon suavemente los tallos y las hojas de plantas jóvenes (de aproximadamente 1 mes de edad).

Infección de savia de plantas que se hacen crecer *in vitro*: se hizo pasar en primer lugar la savia a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  y después se lesionaron los tallos de plantas que se propagan mediante cultivo tisular y se infectaron usando jeringa y aguja.

Para la infección de *Zea mays* (monocotiledóneas), se incubaron las semillas con la savia durante el hinchamiento y la formación de brotes (durante aproximadamente 1-2 semanas).

Además de la cepa AGLO de *Agrobacterium*, los inventores también usaron satisfactoriamente la cepa EHA-105 [Tovkach *et al.*, Plant J. (2009) 57, 747-757] para el suministro de diversos constructos de pTRV.

Para la inoculación de plantas que se hicieron crecer *in vitro* usando bacterias *A. tumefaciens* AGLO o EHA-105, se usó una disolución de MS [Murashige y Skoog, Physiol Plant (1962) 15:473-497] sin glucosa pero con  $\text{MgSO}_4$  10 mM y acetosiringona (A.S.) 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se redujo la concentración de las bacterias hasta 0,08-0,8 de DO a 600 nm para cada TRV. La infección se realizó esencialmente igual que anteriormente con savia o a través de infiltración a vacío.

#### *Análisis de expresión*

Cada experimento de expresión se repitió tres veces y cada experimento incluyó al menos cuatro plantas por tratamiento. Se recogieron los meristemas de planta sometidos a prueba (al menos 2 por planta) varias veces durante el transcurso del experimento. Se completó la obtención de imágenes de GFP usando iluminación UV y se tomaron fotografías usando un estereomicroscopio de fluorescencia (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) equipado con una cámara digital y un filtro fijado para excitación a 455-490 nm y emisión a más de 515. Se evaluó la actividad de Gus usando el sustrato ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucorónico 1 mM (X-gluc., Duchefa Biochemie B.V. Haarlem, Países Bajos) en un tampón apropiado (Zuker *et al.*, citado anteriormente). Antes de una incubación durante la noche con la mezcla de sustrato a 37°C, se infiltró a vacío el tejido de la planta con el sustrato durante 30 minutos. Entonces se intercambió la disolución de sustrato por etanol al 75-95% durante algunos días para el blanqueamiento de clorofila y se observó el tejido usando un estereomicroscopio.

Se completó la obtención de imágenes de DsRed2 usando iluminación UV y se tomaron fotografías usando un estereomicroscopio de fluorescencia (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) equipado con una cámara digital y un filtro fijado para excitación a 530-560 nm y emisión a 590-650.

También se generó obtención de imágenes de EGFP y DsRed2 usando un microscopio de barrido láser confocal (CLSM510, Zeiss Jena, Alemania). Para EGFP, se fijó la excitación a 488 nm y la emisión a 505-530 nm, para DsRED2, se fijó la excitación a 545 nm y la emisión a 585-615 nm. Para la autofluorescencia de clorofila, se fijó la excitación a 488 nm y la emisión a más de 650 nm.

#### *Preparación de protoplastos*

Se usaron hojas de petunia para generar protoplastos tal como se describió anteriormente por Locatelli [Locatelli *et al.*, Plant Cell Reports (2003) 21: 865-871].

#### *Plantas transgénicas*

Se transfirió el vector binario pRCS2[QQR-TS\*::GUS] descrito anteriormente por Tovkach [Tovkach *et al.* (2009), citado anteriormente] a *Agrobacterium tumefaciens* que se usó entonces para transformar *Petunia hybrida* cv Burgundy y *Nicotiana tobaccum* cv. Samsung usando el método de transformación de disco foliar convencional [Guterman *et al.*, Plant Mol. Biol. (2006) 60:555-563].

#### *Identificación de secuencias genómicas no codificantes de petunia*

Se preparó un ADN genómico de *Petunia* cv. Royal Blue usando un protocolo convencional. Se llevó a cabo la digestión inicial del ADN genómico con EcoRI y HindIII seguido por electroforesis en gel de agarosa (al 1%). A continuación, se extrajeron fragmentos de 1-1,5 Kpb del gel mediante un kit de extracción de gel (iNtRON Biotechnology, INC. LTD, Corea). Se ligaron estos fragmentos a pBS-SK (IRA Company) para formar una biblioteca semigenómica en *E. coli*. Se generaron secuencias de 110 fragmentos genómicos por MacroGen Inc. (Seúl, Corea). Se realizaron dos análisis de BLAST (blast y tblastx de nucleótidos) con las secuencias genómicas de petunia generadas contra la colección de nucleótidos y bibliotecas de EST no humanas, no de ratón, para permitir la eliminación de todos los ADN supuestamente transcritos/traducidos. Se evaluaron adicionalmente todas las secuencias con un valor E de BLAST superior a 5 para identificar aquellas con el ORF más corto, para los seis

marcos de lectura, y con regiones de AAAA y TTTT repetitivas mínimas. Finalmente, se seleccionaron dos fragmentos de ADN genómicos de petunia como secuencias no codificantes, no repetitivas, P1-25 (1,2 Kpb, figura 2B) y P1-36 (1,175 Kpb, figura 3).

- 5 Dentro de estas secuencias, se diseñó un sitio diana para nucleasa de dedos de zinc (ZFN). Las proteínas de dedos de zinc pueden reconocer prácticamente cualquier secuencia diana de 18 pb de longitud, suficiente para especificar una dirección única dentro del genoma de la planta. Los sitios diana (dianas de secuencia de tipo palíndromo artificiales, marcadas en azul en las figuras 2-3) usados fueron:

P1-25 sitio 1: TCC-TCC-TGC (SEQ ID NO: 10).

sitio 2: GAG-GGG-GAA (SEQ ID NO: 11)

- 10 P1-36 sitio 1: ACC-ACC-ATC (SEQ ID NO: 12)

sitio 2: GGT-TGA-GAG (SEQ ID NO: 13)

#### Identificación de secuencias de PDS y FHT como sitios diana de ZFN en petunia

- 15 Se confirmó la secuencia del exón de fitoeno desaturasa (PDS) de *Petunia hybrida* RB mediante resecuenciación (basado en el n.º de registro de GenBank AY593974.1, SEQ ID NO: 131) y se usó como sitios diana para ZFN. Se usaron las secuencias subrayadas (figura 28A) como los sitios diana de proteínas PDS-ZFN (SEQ ID NO: 71 y 73).

Se identificó la secuencia del exón de flavanona 3-beta-hidroxilasa (FHT) de *Petunia hybrida* RB (n.º de registro de GenBank AF022142.1, SEQ ID NO: 133) y se usó como los sitios diana para ZFN. Se confirmó la secuencia mediante resecuenciación. Se usaron las secuencias subrayadas (figura 29) como los sitios diana de proteínas FHT-ZFN (SEQ ID NO: 75 y 77).

- 20 *Diseño de nucleasas de dedos de zinc (ZFN)*

- Se diseñaron las regiones codificantes de proteínas de dedos de zinc basándose en una secuencia consenso de región de marco de dedos de zinc desarrollada inicialmente por Desjarlais y Berg [Desjarlais y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 2256-2260]. Por ejemplo, se ensambló la expresión de la endonucleasa de dedos de zinc con la afinidad esperada por la secuencia gagggggaa en el fragmento de ADN al azar de petunia P1-25 (sitio 2, SEQ ID NO: 11), el dominio de 262 pb de dedos de zinc, mediante PFU polimerasa (Invitrogen) en una reacción de PCR del conjunto de los siguientes oligos solapantes: BBO1 (5'GAAAAACCTTACAAGTGTCTGAAATGTGGAAAGTCTTTTTCT, SEQ ID NO: 14), BBO2M (5'CAGCGAACACACACAGGTGAGAAGCCATATAAATGCCAGAATGTGGTA AATCATTGAG, SEQ ID NO: 15), BBO3M (5'CAACGGACCCACACACCGGGGAGAAGCCATTTAAATGCCCTGAGTGC GGGA AGAGTTTTT, SEQ ID NO: 16), FtsH2-Z1.1-GAA (SEQ ID NO: 17), P1-25-ZFN2.2 GGG (SEQ ID NO: 18) y P1-25-ZFN2.3 GAG (SEQ ID NO: 19) seguido por amplificación por PCR usando los cebadores BBO1-XhoI-F (SEQ ID NO: 20) y SDO3-SpeI-R (SEQ ID NO: 21) produciendo el dominio de unión a ADN P1-25-ZFN2bd.

- En cada reacción de PCR, se mezclaron BBO y SDO a una concentración de 0,005 pM y se amplificaron durante 35 ciclos con PFU polimerasa (Invitrogen). Se han empleado estrategias similares, usando sólo diferentes oligos (véase la tabla 2, más adelante) para el ensamblaje de los dominios de unión a ADN P1-25-ZFN1bd, P1-36-ZFN1bd y P1-36-ZFN2bd. En la figura 4 se ilustra un resumen del procedimiento de PCR para el ensamblaje de los dominios de unión a ZF usados en este trabajo.

Tabla 2: Secuencias de oligos solapantes usados para la generación de los dominios de unión a ADN P1-25-ZFN1bd, P1-36-ZFN1bd y P1-36-ZFN2bd

P1-25-  
ZFN1bd

41 P1-25-ZFN1.1  
GGA

**ACCTGTGTGTGTTTCGCTGGTGACGTTCAAGATGAG  
CACGCTGAGAAAAAGACTTTCCACA  
(SEQ ID NO: 22)**

42 P1-25-ZFN1.2  
GGA

**CCCGGTGTGGGTCCGTTGGTGACGTTCAAGAT  
GAGCACGCTGACTGAATGATTTACCACA  
(SEQ ID NO: 23)**

24 ZFN-IV-Mod  
SDO3 GCA

**TCCAGTATGAGTACGTTGATGACGACGCAAA  
TCTCCAGACTGTGAAAACTCTTCCCGCAC  
(SEQ ID NO: 24)**

P1-25-  
ZFN2bd

25 FtsH2-Z1.1-  
GAA **ACCTGTGTGTGTTTCGCTGGTGCTTCTGA  
AGGTTGCTAGACTGAGAAAAAGACTTTCCACA  
(SEQ ID NO: 17)**

43 P1-25-ZFN2.2  
GGG **CCCGGTGTGGGTCCGTTGGTGACGA  
ACCAACTTATCAGAACGACTGAATGATTTACCACA  
(SEQ ID NO: 18)**

44 P1-25-ZFN2.3  
GAG **TCCAGTATGAGTACGTTGATGACGAACCAA  
ATTATCAGAACGTGAAAACTCTTCCCGCAC  
(SEQ ID NO: 19)**

P1-36-  
ZFN1bd

45 P1-36-ZFN1.1  
GGT **ACCTGTGTGTGTTTCGCTGGTGACGAA  
CAAGATGTCCAGAAGTAGAAAAAGACTTTCCACA  
(SEQ ID NO: 25)**

29 FtsH2-Z3.2-  
GGT **CCCGGTGTGGGTCCGTTGGTGACGAACAAG  
ATGTCCAGAAGTACTGAATGATTTACCACA  
(SEQ ID NO: 26)**

35 FtsH2-Z1a3  
GAT **TCCAGTATGAGTACGTTGATGACGAACCAAA  
TTCCAGAAGTTGAAAACTCTTCCCGCAC  
(SEQ ID NO: 27)**

P1-36-  
ZFN2bd

46 P1-36-ZFN2.1  
GAG **ACCTGTGTGTGTTTCGCTGGTGACGAACCAAATT  
ATCAGAACGAGAAAAAGACTTTCCACA  
(SEQ ID NO: 28)**

47 P1-36-ZFN2.2  
TGA **CCCGGTGTGGGTCCGTTGGTGAGAAGCCAAAT  
GTCCAGCCTGACTGAATGATTTACCACA  
(SEQ ID NO: 29)**

48 P1-36-ZFN2.3  
GGT **TCCAGTATGAGTACGTTGATGACGAACAAGATG  
TCCAGAAGTTGAAAACTCTTCCCGCAC  
(SEQ ID NO: 30)**

5 Se clonaron los dominios de unión a ADN amplificados como un fragmento de XhoI-SpeI en los mismos sitios de pSAT6-NLS-FokI, produciendo los vectores de expresión pSAT6-NLS-P1-25-ZFN1 (SEQ ID NO: 31), pSAT6-NLS-P1-25-ZFN2 (SEQ ID NO: 32), pSAT6-NLS-P1-36-ZFN1 (SEQ ID NO: 33) y pSAT6-NLS-P1-36-ZFN2 (SEQ ID NO: 34) (figuras 5A-D). pSAT6-NLS-FokI consiste en el vector pSAT [GenBank AY818383, Tzifira *et al.*, Plant Mol Biol (2005) 57: 503-516], 30 pb de la NLS (señal de localización nuclear, SEQ ID NO: 46) clonadas en sitios NcoI-XhoI y un fragmento de 584 pb de la endonucleasa FokI (nucleótidos 1164 a 1748; GenBank J04623) clonado en sitios SpeI-BamHI de pSAT6.

10 Para la expresión de endonucleasas de dedos de zinc con cola de His en células de *E. coli*, se clonaron los fragmentos NLS-P1-25-ZFN1, NLS-P1-25-ZFN2, NLS-P1-36-ZFN1 y NLS-P1-36-ZFN2 como insertos de NcoI-BamHI a partir de sus plásmidos correspondientes en los mismos sitios de un pET28 modificado (pET28.SX, figura 5E), produciendo pET28.SX-NLS-P1-36-ZFN1, pET28.SX-NLS-P1-36-ZFN2, pET28.SX-NLS-P1-25-ZFN1 y pET28.SX-NLS-P1-25-ZFN2. En pET28.SX, se clonaron las ZFN ensambladas en el sentido de 3' del promotor de T7 del vector pET28 (Novagen). Los constructos de ZFN completos también contenían una secuencia que codificaba para la cola de 6xHis en el extremo C-terminal de la proteína.

Se realizó la expresión de pET28.SX-NLS-P1-36-ZFN1, pET28.SX-NLS-P1-36-ZFN2, pET28.SX-NLS-P1-25-ZFN1 y pET28.SX-NLS-P1-25-ZFN2 en células BL21 GOLD (DE3) PlyS (Stratagene). Se hicieron crecer cultivos celulares en 100 ml de medio LB complementado con Kan (50 ug/ml) y ZnCl<sub>2</sub> 100 μM a 22°C hasta que la DO<sub>600</sub> fue de 0,6 y entonces se indujeron las células con IPTG 0,7 mM durante 3 horas. Se recogieron las células mediante centrifugación, se resuspendieron 35 ml de mezcla que contenía Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), NaCl 300 mM, glicerol al 5% y ZnCl<sub>2</sub> 100 μM, y se lisaron dos veces a través de una prensa francesa. Se cargó la proteína en 0,5 ml de perlas de Ni-NTA agarosa (Qiagen) y se eluyeron con 1 ml de tampón que contenía imidazol 500 mM. Se almacenó la proteína eluida a -20°C en glicerol al 50%.

Se mezclaron diversas cantidades de ZFN purificadas por Ni-NTA y *E. coli* con 0,5 μg de ADN diana para digestión *in vitro* usando también tampón NEB4 y se separaron los sustratos de ADN digeridos mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### Clonación de vectores virales pTRV2 que permiten la expresión de ZFN

Los insertos de ZFN en constructos de pSAT (pSAT6-P1-36-ZFN1, pSAT6-P1-36-ZFN2, pSAT6-PDS-ZFN1, pSAT6-PDS-ZFN2, pSAT6-FHT-ZFN1, pSAT6-FHT-ZFN2) comienzan y terminan con los dominios no específicos, NLS y FokI, respectivamente. Para generar pTRV2 adecuado para el suministro y la expresión de diferentes ZFN en células vegetales, los inventores amplificaron ZFN usando el cebador directo R y los cebadores inversos L (para pSAT6-P1-36-ZFN2, pSAT6-PDS-ZFN1, pSAT6-FHT-ZFN1) o T (para pSAT6-P1-36-ZFN1, pSAT6-PDS-ZFN2, pSAT6-FHT-ZFN2) (véase la tabla 1, anteriormente). Los productos de amplificación resultantes se digirieron con *HpaI* y *SacI* (para el cebador L) o *SmaI* (para el cebador T), se obtuvieron extremos romos (en el caso de *SacI*) y se insertaron en los sitios *HpaI-SmaI* de pTRV2-Δ2b-sgP. Esto conduce a la generación de pTRV2-Δ2b-sgP-PDS-ZFN1 (figura 31A, SEQ ID NO: 70), pTRV2-Δ2b-sgP-PDS-ZFN2 (figura 31B, SEQ ID NO: 72); pTRV2-Δ2b-sgP-FHT-ZFN1 (figura 32A, SEQ ID NO: 74), pTRV2-Δ2b-sgP-FHT-ZFN2 (figura 32B, SEQ ID NO: 76); pTRV2-Δ2b-sgP-P36-ZFN1 (SEQ ID NO: 33) y pTRV2-Δ2b-sgP-P36-ZFN2 (SEQ ID NO: 34).

Para generar pTRV2-Δ2b-sgP-QEQ-ZFN (SEQ ID NO: 82), los inventores generaron en primer lugar un producto de PCR usando los cebadores U y S (véase la tabla 1, anteriormente) y pSAT4.hspP.QQR [Tovkach *et al* (2009), citado anteriormente] como molde. Se digirió el producto con *XhoI* y *SpeI* y se insertó en el plásmido pTRV2-Δ2b-sgP-P36-ZFN2 que carecía de ZF, digerido con *XhoI* y *SpeI* (figura 33).

Para generar un constructo que contuviera dos ZFN ligadas con T2A (pTRV2-Δ2b-sgP-P36-ZFN2-T2A-P36-ZFN1, SEQ ID NO: 84), se clonó el fragmento de *BamHI* a partir de pTRV2-Δ2b-sgP-P36-ZFN2 que contenía el sgP-NLS-P1-36-ZFN2 en el sitio de *BamHI* único en pBS-T2A-NLS-36-ZFN1. Esto generó pBS-sgP-P36-ZFN2-T2A-P36-ZFN1. Se digirió este plásmido con *SacI* y se clonó el fragmento liberado que contenía sgP-P36-ZFN2-T2A-P36-ZFN1 en pTRV2-Δ2b linealizado con *SacI* para generar pTRV2-Δ2b-sgP-P36-ZFN2-T2A-P36-ZFN1.

Para generar pTRV2-Δ2b-sgP-PDS-ZFN1-T2A-PDS-ZFN2 (SEQ ID NO: 86) y pTRV2-Δ2b-sgP-FHT-ZFN1-T2A-FHT-ZFN2 (SEQ ID NO: 88), los inventores digirieron en primer lugar pBS-T2A-NLS-36-ZFN1, pSAT6-FHT-ZFN2 y pSAT6-PDS-ZFN2 con *XhoI* y *SpeI* (secuencias de ZF flanqueantes). Los inventores ligaron entonces los fragmentos liberados de estos últimos dos plásmidos en pBS-T2A-NLS-36-ZFN1 digerido para crear pBS-T2A-NLS-PDS-ZFN2 y pBS-T2A-NLS-FHT-ZFN2. Se digirieron los plásmidos pTRV2-Δ2b-sgP-PDS-ZFN1 y pTRV2-Δ2b-sgP-FHT-ZFN1 con *BamHI* para liberar sgP-PDS-ZFN1 y sgP-FHT-ZFN1, que entonces se ligaron a pBS-T2A-NLS-PDS-ZFN2 y pBS-T2A-NLS-FHT-ZFN2 digeridos con *BamHI*, respectivamente. Se digirieron estos plásmidos con *SacI* y se clonaron los fragmentos liberados en el sitio *SacI* único de MCS en pTRV2-Δ2b produciendo pTRV2-Δ2b-sgP-PDS-ZFN1-T2A-PDS-ZFN2 y pTRV2-Δ2b-sgP-FHT-ZFN1-T2A-FHT-ZFN2, respectivamente.

#### EJEMPLO 2

##### Expresión de genes foráneos mediante vectores pTRV2-Δ2b

Se eliminó por completo el fragmento 2b de ARN2 (300 pb de SEQ ID NO: 43 representado en SEQ ID NO: 50) de pTRV2 (n.º de registro de GenBank AF406991) para generar pTRV2-Δ2b (véase el ejemplo 1 anteriormente en el presente documento y las figuras 6A-B). Los inventores se interesaron por la expresión de los genes indicadores en los tejidos meristemáticos y, de ese modo, se evaluó expresión de genes indicadores en estos tejidos. Se inocularon plantas de petunia con pTRV2-Δ2b-GUS y pTRV2-GUS y se comparó la eficacia de expresión génica foránea (es decir, GUS) mediante estos vectores. Se evaluó la expresión de GUS de una semana a dos meses tras la infección y se presentó el porcentaje de meristemas que expresan GUS del número total de meristemas analizados (véase la tabla 3, a continuación). Tal como queda claro a partir de los resultados, pTRV2 sin la región 2b fue mucho más eficaz en la expresión de GUS en tejidos meristemáticos. Además, no fue perceptible tinción con GUS en plantas de petunia inoculadas con TRV que carece de GUS. Se ilustra la expresión de GUS típica en los meristemas de plantas inoculadas en las figuras 7A-E. Tal como queda claro a partir de la figura 7E, fue perceptible tinción con GUS en plantas de petunia tras la inoculación con pTRV2-Δ2b-GUS incluso tras numerosas tandas de propagación (a través de meristemas axilares) en cultivo tisular. Genes marcadores adicionales usados para someter a ensayo la aplicabilidad del vector basado en pTRV2 para la expresión de genes foráneos fueron GFP y PAP1. La inoculación

de petunia y otras plantas (*Capsicum annuum*, *Solanum pimpinellifolium*, *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*, *Artemisia annua*, *Spinacia oleracea* y *Beta vulgaris*) con estos vectores condujo a la expresión de los genes indicadores en meristemos de todas las plantas analizadas (figuras 8A-G).

Tabla 3: Expresión de GUS en plantas de petunia inoculadas con pTRV2- $\Delta$ 2b-GUS y pTRV2-GUS

	Días tras la inoculación				
	7	13	21	37	48
pTRV2-GUS	50%	40%	11%	7%	0%
TRV2- $\Delta$ 2b-GUS	45%	60%	54%	40%	60%

### 5 EJEMPLO 3

#### *Potenciación de expresión génica foránea mediante potenciador traduccional $\Omega$*

Las 70 pb en la 5'UTR de TMV ( $\Omega$ ) es una secuencia no codificante que se ha mostrado que es un potenciador traduccional (SEQ ID NO: 44) [Gallie *et al.*, Nucl. Acid. Res. (1987) 15:8693-8710]. Se clonó  $\Omega$  en el sentido de 5' con respecto al gen indicador en los vectores virales pTRV2 con el fin de evaluar si puede promover los niveles de expresión de genes foráneos (véanse las figuras 6A, C). Tal como se ilustra en las figuras 9A-B, la inoculación de plantas de petunia con los vectores pTRV2- $\Delta$ 2b- $\Omega$ GUS dio como resultado mayores niveles de actividad de GUS en comparación con el obtenido usando vectores pTRV2- $\Delta$ 2b-GUS (que carecen del potenciador  $\Omega$ ). Debe observarse que el fragmento  $\Omega$  no afectó al porcentaje de meristemos que expresan GUS del número total de meristemos analizados.

### 15 EJEMPLO 4

#### *Coexpresión de dos genes foráneos mediante vectores pTRV2*

Se desarrollaron dos enfoques para permitir la coexpresión de dos secuencias codificantes. En primer lugar, se generó un vector pTRV2 que porta una secuencia adicional de promotor subgenómico (sgP), de modo que permite la coexpresión de dos secuencias codificantes (véanse las figuras 6A, D). Se usó para ello el promotor subgenómico de proteína de la cubierta de PEBV. Para someter a prueba la actividad del vector, se clonó el gen indicador de GFP en el sentido de 3' a este promotor subgenómico para crear pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-GFP. La inoculación de plantas de *N. benthamiana* con este vector, condujo a la expresión de GFP en tejidos meristemáticos (figura 10A).

En un enfoque alternativo que tiene como objetivo coexpresar dos genes foráneos, se inocularon conjuntamente plantas de *N. benthamiana* con pTRV2- $\Delta$ 2b-GUS y pTRV2- $\Delta$ 2b-GFP (figuras 10B-C). Se reveló la coexpresión de ambos genes indicadores basándose en los análisis de la expresión de GFP en el tejido seguido por tinción con GUS de los mismos tejidos.

### EJEMPLO 5

#### *Expresión de genes foráneos mediante vectores pTRV en una amplia variedad de plantas*

La inoculación de diferentes plantas (por ejemplo *N. benthamiana*, *N. tabacum* y *Petunia hybrida*) con pTRV1 y pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-DsRed condujo a un alto nivel de expresión del gen marcador en células de estas plantas (figuras 11A-F). Se detectó fácilmente la fuerte expresión continua (varios meses), debido a infección sistémica, en diferentes partes de estas plantas (figuras 12A-H). La inoculación de diversas plantas (por ejemplo *Cucumis sativus*, *Solanum melongena*, *Gossypium hirsutum* cv. *Siv'on* (algodón), *Brassica napus* (canola), *Beta vulgaris* (remolacha), *Spinacia oleracea*) con este vector conduce a la expresión de los genes indicadores en todas las plantas analizadas (figuras 13A-K).

### EJEMPLO 6

#### *Expresión de genes foráneos mediante vectores de TRV en monocotiledóneas*

Para someter a ensayo la aplicabilidad de vectores basados en pTRV2 para la expresión de genes foráneos en monocotiledóneas (por ejemplo maíz), se incubaron semillas con savia generada a partir de plantas de petunia infectadas con pTRV1 y pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-DsRed (tal como se representa en detalle en el ejemplo 1, anteriormente en el presente documento). Las figuras 14A-C muestran la clara expresión de DsRed en coleóptilo.

### EJEMPLO 7

#### *Plastidios mitocondriales y de cloroplastos: expresión dirigida por plastidio mediada por vector de TRV*

Tal como se describe en el ejemplo 1, anteriormente en el presente documento, los inventores han construido dos vectores pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-Rssu-EGFP y pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-ATP $\beta$ -EGFP que contienen un péptido de tránsito al cloroplasto y un péptido señal mitocondrial, respectivamente. Los inventores sometieron a agroinfiltración pTRV2-

5  $\Delta 2b$ -2sgP-tp-EGFP (tp en este caso significa péptido de tránsito y péptido señal) en *Petunia hybrida* cv RB y *N. benthamiana*. Se analizó en primer lugar la expresión de EGFP mediante un estereomicroscopio de fluorescencia, luego se analizaron las zonas de las hojas fluorescentes mediante un microscopio de barrido láser confocal. El tamaño de cloroplasto y la autofluorescencia (excitación a 488 nm, emisión a más de 650 nm) permitieron localizar la expresión de EGFP (excitación a 488 nm, emisión a 505-530 nm) en el cloroplasto (figuras 15A-G).

Para la identificación mitocondrial, se prepararon protoplastos y se empleó un reactivo específico mitocondrial fluorescente rojo (MitoTracker® Invitrogen Inc. EE.UU.). El uso de excitación a 545 nm y emisión a 585-615 nm permitió distinguir la fluorescencia de cloroplastos de la de MitoTracker. Según el tamaño y la ubicación y la señal de Mitotracker, los inventores revelaron que la expresión de EGFP se localizaba en las mitocondrias (figuras 16A-K).

10 **EJEMPLO 8**

*Coexpresión de dos genes indicadores en diversas plantas*

Se usaron varios enfoques para expresar simultáneamente dos genes en células de plantas (*Petunia hybrida*, *N. benthamiana* o *N. tabacum*). En un enfoque, se inocularon plantas simultáneamente con dos vectores de TRV, uno que porta un gen marcador y otro que porta otro gen marcador. Específicamente, se coinfectaron plantas con vectores pTRV1 y dos pTRV2, pTRV2- $\Delta 2b$ -sgP-DsRed y pTRV2- $\Delta 2b$ -sgP-Rssu-EGFP. Los resultados de la microscopía de barrido confocal con fluorescencia de plantas *Nicotiana tabacum* cv Xanthi sometidas a agroinfiltración *in vitro* mostraron la coexpresión tanto de EGFP como de DsRed (figuras 17A-D).

Se demostraron los enfoques segundo y tercero para la coexpresión de dos genes usando pTRV2 construido con dos genes indicadores en tándem. Los genes o bien se separaron mediante T2A (figuras 18A-L) o bien se dirigieron mediante promotores subgenómicos dobles independientes (figuras 19A-J). Tal como se representa en las figuras 18A-L, la coexpresión de GFP y DsRed fue clara tras la inoculación de plantas con pTRV2- $\Delta 2b$ -sgP-DsRed-T2A-NLS-EGFP. De manera similar, tal como se representa en las figuras 19A-J, la coexpresión de GFP y DsRed fue clara tras la inoculación de plantas con pTRV2- $\Delta 2b$ -sgP-GFP-sgPDsRed.

**EJEMPLO 9**

25 *Generación de nucleasas de dedos de zinc (ZFN) específicas*

Se identificaron secuencias genómicas no repetitivas supuestamente no codificantes de petunia tras la secuenciación de 110 fragmentos genómicos (véase el ejemplo 1, anteriormente en el presente documento). Se sintetizaron dos conjuntos de ZFN, 25-ZFN-1, 25-ZFN-2 y 36-ZFN-1, 36-ZFN-2, con el fin de formar un doble corte en las secuencias de ADN específicas de petunia, P1-25 y P1-36, respectivamente. Para someter a prueba la actividad nucleasa de las ZFN generadas, se generaron fragmentos de PCR que contenían secuencias diana en una forma de tipo palíndromo y se incubaron estos fragmentos con las ZFN específicas. Tal como se ilustra en la figura 20, se digirieron fragmentos de PCR mediante cada ZFN a los tamaños esperados.

Para verificar adicionalmente las actividades ZFN, se generaron vectores pBS que portaban secuencias de P1-36. La incubación de un fragmento de 740 pb de secuencias diana que portaban P1-36 (generadas mediante digestión de pBS-P1-36 con NcoI/BamHI\*) con ZFN purificadas, 36-ZFN1 y 36-ZFN2, produjo fragmentos de tamaños esperados (figura 21, representado mediante las flechas). Obsérvese que BamHI así como SmaI forman parte de los sitios de clonación múltiple (MCS) de pBS, justo en el sentido de 5' con respecto al sitio de clonación EcoRI. El sitio NcoI forma parte de la secuencia de P1-36 y 200 pb en el sentido de 3' con respecto al sitio 2 de P1-36. Además, tal como se esperaba, 36-ZFN1 y 36-ZFN2 no produjeron individualmente productos de digestión. Además, tal como se ilustra en la figura 22, la combinación de 36-ZFN-1 y 36-ZFN-2 digiere de manera satisfactoria la secuencia diana P1-36 portada por pBS-P1-36.

Además, se identificaron secuencias genómicas de fitoeno desaturasa de petunia (PDS) tras la secuenciación de fragmentos genómicos (véase la figura 28A). Se sintetizaron conjuntos de ZFN, PDS-ZFN1 y PDS-ZFN2, (tal como se representa en detalle en el ejemplo 1, anteriormente en el presente documento) con el fin de formar un doble corte en las secuencias de ADN de PDS específicas de petunia. Para someter a prueba la actividad nucleasa de las ZFN generadas, se construyeron plásmidos para portar secuencias diana semipalindrómicas y se incubaron estos plásmidos con las ZFN específicas. Tal como se ilustra en la figura 23, se llevó a cabo la digestión de plásmidos que portan sitios diana artificiales PDS1 y PDS2 (PDS-TS1 y PDS-TS2, respectivamente) mediante ZFN específicas. Se digirieron los plásmidos mediante AgeI y PDS-ZFN1 o PDS-ZFN2 a los tamaños esperados.

En conclusión, los resultados muestran de manera concluyente que pueden expresarse genes foráneos en meristemos de plantas, incluyendo meristemos de petunia. Adicionalmente, estos resultados muestran la digestión específica *in vitro* de ADN de petunia mediante ZFN.

**EJEMPLO 10**

*Generación de vectores de expresión virales que comprenden ZFN*



La expresión de ZFN mediante vectores de expresión pTRV está en marcha para determinar el mejor enfoque para coexpresar ZFN en petunia. Tres enfoques están sometiéndose a prueba, cada uno de los cuales se somete a prueba en primer lugar con dos genes indicadores fluorescentes (GFP y DsRFP) tal como se representó en detalle anteriormente. Estos genes indicadores fluorescentes se suministran a plantas de petunia y se examina su coexpresión dentro de células meristemáticas usando microscopía de fluorescencia. Basándose en estos resultados, se generarán vectores de expresión de ZFN.

En el primer enfoque, se clona cada gen por separado en pTRV2- $\Delta$ 2b- $\Omega$  en el sitio Sall-Sacl. Entonces se coinfectan plantas con los dos plásmidos de pTRV2 (uno que porta GFP y el otro que porta DsRFP) simultáneamente.

En el segundo enfoque, se introducen ambos genes en el mismo pTRV2 (pTRV2- $\Delta$ 2b- $\Omega$ ), cada gen con un promotor subgenómico (sg-P) diferente. Entonces se infectan plantas con el plásmido pTRV2.

El tercer enfoque se basa en una proteína “de tipo 2A” que puede autoescindir en los extremo C-terminales [(Donnelly *et al.*, J. Gen. Virol. (2001) 82: 1027-1041; Osborn *et al.*, Molecu. Therapy (2005) 12: 569-574]. La secuencia de la proteína “de tipo 2A”, EGRGSLTTCG DVEENPGP (SEQ ID NO: 41, T2A) de virus de insecto *Thosea asigna* media en un acontecimiento de escisión cotraduccional eficaz que da como resultado la liberación de cada producto proteico individual. La Pro de los extremos C-terminales es el único aminoácido que permanece con la proteína en el sentido de 3' tras la autoescisión. Se sintetizó un oligómero que codifica para estos 18 aminoácidos de la proteína “de tipo 2A” (T2A). Se diseñó la secuencia de nucleótidos basándose en el uso de codones de petunia (base de datos de uso de codones <http://www.ddotkazusadotordotjp/codon>). Para expresar de manera cotraduccional GFP y DsRFP, se clonan en marco en pTRV2- $\Delta$ 2b- $\Omega$  separados por los 18 aminoácidos de T2A. Para suministrar proteínas ZFN al núcleo mediante este enfoque, se fusionan secuencias señal de localización nuclear (NLS) que comienzan con Pro, a sus extremos 5'. De ese modo, se comparten Pro por NLS y T2A, es decir la última Pro en 3' de T2A representa el primer aminoácido de la NLS. Esto eliminó la necesidad de introducir secuencias foráneas adicionales en 5' a NLS. El inserto final es KpnI- $\Omega$ -NLS-ZFN2-T2A-NLS-ZFN1-Sacl. Por ejemplo, usando pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-CP-PEBV (figuras 24A-B) que porta DsRFP y GFP, separados por T2A, se generaron tejidos de petunia que coexpresan ambos genes indicadores.

Una modificación opcional del tercer enfoque es clonar una de las ZFN con T2A en los extremos N-terminales (fragmento T2ANLS-ZFN1) en el sentido de 3' y en marco con el gen TRV1 16 K (figura 6E). En este caso, se realiza la agroinfección de plantas de petunia con pTRV1 y pTRV2 modificados, que portan cada uno sólo un gen de ZFN foráneo.

#### EJEMPLO 11

##### *Activación mediada por vector pTRV de la expresión de GUS en plantas*

Los inventores han usado la herramienta de reparación transgénica basada en dedos de zinc que se describió anteriormente por Tovkach *et al.* [Tovkach *et al.* (2009), citado anteriormente] con el fin de generar plantas transgénicas de petunia y tabaco que portan un gen uidA mutado (GUS). Se modificó mediante ingeniería genética el gen uidA mutado para que portase el codón (de parada) TGA dentro del espaciador de 6 pb del sitio diana QEQZFN (véase la figura 25A), lo que condujo a la terminación prematura de la traducción de uidA en células vegetales. Por tanto, no pudo detectarse expresión de GUS en las plantas transgénicas (figura 26I). La digestión del ADN en el espaciador entre el sitio diana de ZFN (mediante el uso de ZFN específicas) y su reparación sucesiva conducen normalmente a delección y/o mutación del codón de parada y a la consiguiente activación del gen indicador uidA (figura 25B). Para ello, se clonó QEQ-ZFN específico para el gen uidA mutado en el vector viral pTRV2- $\Delta$ 2b-2sgP (tal como se representa en detalle en el ejemplo 1, anteriormente en el presente documento) y el pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-QEQ-ZFN resultante se usó para la inoculación de plantas transgénicas para el gen uidA mutado. Tal como queda claro a partir de los resultados (figuras 26A-J), la expresión dirigida por TRV de QEQ-ZFN en tejidos somáticos y meristemáticos conduce a la activación de la expresión de GUS.

#### EJEMPLO 12

##### *Análisis molecular de plantas transgénicas de tabaco y petunia con expresión de GUS activada tras la inoculación con pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-QEQ-ZFN*

Se extrajo el ADN de planta total de las hojas de plantas de petunia y tabaco transgénicas para GUS (que portan un gen uidA (GUS) mutado) antes o a los 7-30 días tras la inoculación con pTRV1 y pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-QEQ-ZFN usando el método de fenol-cloroformo. Se digirió el ADN total con *Ddel* durante 3 horas y se amplificó por PCR la región que rodea el sitio diana de ZFN usando los cebadores 5'-CTATCCTTCGCAAGACCCTTCC-3' (35S-F, SEQ ID NO: 90) y 5'-GTCTGCCAGTTCAGTTCGTTGTTTC-3' (GUS-R-401, SEQ ID NO: 91). Se volvió a digerir el fragmento de PCR resultante con *Ddel*, y se volvió a amplificar su fracción no digerida y se clonó TA en pGEM-T-easy (Promega inc., WI, EE.UU.). Se seleccionaron entonces colonias seleccionadas al azar y se secuenciaron los fragmentos de ADN.

La figura 27 muestra los cambios en la secuencia de GUS tras la activación mediante QEQ-ZFN, en comparación con la secuencia de GUS original en las plantas de *N. tabacum* o *petunia* transgénicas.

EJEMPLO 13*Análisis molecular de PDS modificado en plantas de petunia tras la inoculación con ZFN específicas*

Tal como se representa en detalle en el ejemplo 1, anteriormente en el presente documento, los inventores de la presente invención han generado ZFN que escinden específicamente el gen PDS de plantas de petunia. Para analizar las modificaciones moleculares realizadas al gen PDS tras la inoculación con pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-PDS-ZFN1-T2A-PDS-ZFN2, se extrajo el ADN de planta total de las hojas de plantas de *Petunia hybrida* silvestres (WT, *wild type*) o tratadas con pTRV1 y pTRV2- $\Delta$ 2b-sgP-PDS-ZFN1-T2A-PDS-ZFN2 usando el método de fenol-cloroformo. Se amplificó por PCR la región que rodea el sitio diana (TS) de ZFN usando los cebadores 5'-TATTGAGTCAAAGGTGGCCAAGTC-3' (phPDS-F 208, SEQ ID NO: 117) y 5'-GCAGATGATCATATGTGTTCTTCAG-3' (phPDS-R-487, SEQ ID NO: 118). Se digirió el producto de PCR con MfeI durante la noche y se volvió a amplificar la fracción no digerida resultante y se clonó TA en pGEM-T-easy (Promega inc., WI, EE.UU.). Entonces se secuenciaron insertos de colonias seleccionadas al azar. La figura 28B representa los cambios en la secuencia de PDS tras la modificación mediante PDS-ZFN específicos, en comparación con la secuencia de PDS original en plantas de petunia.

Aunque se ha descrito la invención junto con realizaciones específicas de la misma, resulta evidente que resultarán obvias muchas alternativas, modificaciones y variaciones para los expertos en la técnica. Por consiguiente, se pretende abarcar todas esas alternativas, modificaciones y variaciones que se encuentran dentro del espíritu y amplio alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan al presente documento en su totalidad como referencia en la memoria descriptiva, en la misma medida que si cada publicación, patente o solicitud de patente individual se indicase específica e individualmente que se incorpora al presente documento como referencia. Además, la cita o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no debe interpretarse como un reconocimiento de que tal referencia está disponible como técnica anterior de la presente invención. En la medida en que se usan encabezados de sección, no deben interpretarse como necesariamente limitativos.

**Lista de secuencias**

<110> DANZIGER INNOVATION LTD.  
YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW  
UNIVERSITY OF JERUSALEM LTD.  
VAINSTEIN, Alexander  
ZUKER, Amir

<120> VECTORES DE EXPRESIÓN VIRALES DE PLANTAS Y USO DE LOS MISMOS PARA GENERAR VARIACIONES GENOTÍPICAS EN GENOMAS DE PLANTAS

<130> 45523

<150> Documento US 61/071.288  
<151> 21/04/2008

<160> 143

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 1

tgaggtgaa gagttattac cgaacg

<210> 2  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

	<400> 2	
	aagaattcga aactcaaatg ctaccaa	27
5	<210> 3 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
10	<400> 3	
	tagaattctc gtaactcgg gtaagtga	28
	<210> 4 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 4	
	aaactcgaga tggaacgagc tatacaagga a	31
20	<210> 5 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
25	<400> 5	
	aaaccggga gactctgtct tactcgcctt ct	32
30	<210> 6 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 6	
	aagagctcga gcatcttggt ctggggtt	28
35	<210> 7 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 7	
	accggggtta tttgtagagt tcatccatgc ca	32
45	<210> 8 <211> 1203 <212> ADN <213> <i>Petunia x hybrida</i>	
	<220>	

ES 2 551 318 T3

<221> misc\_feature

<223> Fragmento de ADN al azar de *Petunia* RB P1-25

<400> 8

```

gaattcggac atgtgccaaa tggatagagt ggaatcctcc tactttgggg cggaatectc      60
ctaccctcaa tatgatgcca ggagcgggat cctcctactc ctagggcgga atcctcatac      120
cctcaatatg atgcaaggag cggaatcctc ctactcctag ggtggaatcc tcctaccctc      180
aatatgatgc aaggagtgga atcctcctac cctcattatg atgcaaggag cagaatcctc      240
ctgctcctag gacggaatcc tcttaccctc aatatgatgt aaggagcgga atcctcctgc      300
tccgaggggg aatcctcctg cctgcaatat aatataaagt tgaggcgaaa tactcctata      360
atcataatat ggcatagcag ccataacca aaaaataaa tacatatgaa tgcggtatga      420
tacaataaca acccttcacc ggtgcgggac cttatcggg tgccaaaaag tatatgtcaa      480
gctcagaacc agagtacaat gctcagatgc tcaatataat accaacaaca ggacataaca      540
tataatatac aatataaatc caaagctaag gcgtaatgag tacgcctatc ggtagctaca      600
cacgtaagga acacgtggtg gaatatccac aaggccaagg gcctccaaag aatggatat      660
aatcacttac cttattccaa agtgctactc aacaaccgct ttgtcctttg ggttcaactg      720
caaacgatcc cactctattc aataagcaga aaaatatac aaataaggct aaaggcttca      780
ttccttcatc ctagaaciaa ttcgggtagg aaccaacac ccattttgaa tagacaatac      840
gcggtccagg cctatgtata tggttcaaaa tcacataatc aaaccctaaa taaattacat      900
ttacggggtc caattaacga atatataatc aattccatta tcgggggtcca attaaccctt      960
gaaactatca atttaactta ttaaacgat ttttaatac ccaatttcta cgtcaaaat     1020
atattcaaac acatgtaata gactaaaata atgaattaac atccttacct ggatgtttcg     1080
ggttgaaaaa totatTTTTT tctgtctcct tttcctttct attctctctt tcttgcttt     1140
tttctcgtt gcgtcctcaa ttgtttcggt tctgttctg tttccatttg caaatgtaag     1200
5   ctt                                                                                   1203

```

<210> 9

<211> 1175

<212> ADN

<213> *Petunia x hybrida*

10

<220>

<221> misc\_feature

<223> Fragmento de ADN al azar de *Petunia* RB P1-36

<400> 9

ES 2 551 318 T3

	gaattctata gaatggetga ctatgcacta gaactagtcc atgaaccttc cgagaatggt	60
	caaagattta ttgatgacct ttcttttttc tagagatccc agatggctcg agagattgac	120
	gtcgggattt catttgatgt tgttgtttat attgcccga ggtacgagge atatcataag	180
	ttagagcggg aagagttaga gcaggagagc aagagatccc gtggccctag tgggcaaccg	240
	tggtaacctca tttggaggta agagttctgg ttattttggg aggtcacctt ccaggttatc	300
	tcagcttggtg tcatgtgatt cttagagtgc gcgggtagtt catcaagatt agactcagct	360
	ttctctttgt agctttcaac aatctgtcca gctcccatat tcagcgaaaa ggtgttatca	420
	ttctctttgt agctttcaac aatctgtcct gctcagttgt aagggtttc atttagatct	480
	taatcagcaa aagaaatacc accatccaat agagggtgag agtgtggtgg cagtggttct	540
	ccagaaagtg attgccaggg tagtggctca gctcagctgc agaggcagtt ttatgaactg	600
	ccagctctggc aggatgttga ggtatctgat gtagtacatc catgtatttc ttcttccatt	660
	atatgtgagt aaattttcat tcttctgacg ggtctggact tcatttattt taccatgttt	720
	ccatggctctc tttggatatt gtttctatta agaattgatt gcggtagagg ggtgagcttc	780
	tagtatgatt tattcaagga atttgtgaga ccctattaat ttatctggtc taaatatgag	840
	agatttgaca atgagtgtcg ttattgtctg cctggcatct tgttgtgcca ccttctatta	900
	ttatatcaaa ttagtttacc tctcttctcg gaattccgtg ttggttgat tatgggattc	960
	tagttcatca ccataagggg gtgtcatggt ttcttccagt gtaaagtgat tagtaagtaa	1020
	tagtcgatct acgtatctcc tcttggttca aaacgctagt aaagtcatgt gatcgtatga	1080
	gcttgtctgg attataaaag ggttttctcg taaattgtta gagtttcctt attattggga	1140
	gattaaattg gcatggaagt tgttccataa agctt	1175
	<210> 10	
	<211> 9	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Petunia x hybrida</i>	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> Motivo de unión a ADN de proteína de dedos de zinc P1-25TS1	
	<400> 10	
10	tcctcctgc	9
	<210> 11	
	<211> 9	
	<212> ADN	
	<213> <i>Petunia x hybrida</i>	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> Motivo de unión a ADN de proteína de dedos de zinc P1-25TS2	
	<400> 11	
	gagggggaa	9
20	<210> 12	
	<211> 9	
	<212> ADN	
	<213> <i>Petunia x hybrida</i>	
	<220>	

# ES 2 551 318 T3

	<221> misc_feature <223> Motivo de unión a ADN de proteína de dedos de zinc P1-36TS1	
	<400> 12	
	accaccatc	9
5	<210> 13 <211> 9 <212> ADN <213> <i>Petunia x hybrida</i>	
	<220>	
10	<221> misc_feature <223> Motivo de unión a ADN de proteína de dedos de zinc P1-36TS2	
	<400> 13	
	ggttgagag	9
	<210> 14 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
20	<400> 14	
	gaaaacctt acaagtgcc tgaatgtgga aagtctttt ct	42
	<210> 15 <211> 59 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 15	
	cagcgaacac acacagtgga gaagccatat aaatgccctg aatgtggtaa atcattcag	59
30	<210> 16 <211> 58 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 16	
	caacggaccc acaccgggga gaagccattt aaatgccctg agtgcgggaa gagttttt	58
	<210> 17 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 17	
45	acctgtgtg gttcgctggt gcttctgaag gttgctagac tgagaaaaag actttccaca	60
	<210> 18 <211> 60	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
5	<400> 18	
	cccggtgtgg gtccgttgg gacgaaccaa cttatcagaa cgactgaatg attaccaca	60
	<210> 19	
	<211> 61	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 19	
	<b>tccagtatga gtacgttgat gacgaaccaa attatcagaa cgtgaaaaac tcttcccga</b>	<b>60</b>
	<b>c</b>	<b>61</b>
15	<210> 20	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 20	
	ccgctcgagc tgaaaaacct tacaagtgc c	31
	<210> 21	
	<211> 31	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 21	
30	ggactagtcc tccagtatga gtacgttgat g	31
	<210> 22	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 22	
	acctgtgtgt gtcgctggt gacgttcaag atgagcacgc tgagaaaaag actttccaca	60
	<210> 23	
40	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
45	<400> 23	

ES 2 551 318 T3

	cccgtgtgg gtccgttgg gacgttcaag atgagcacgc tgactgaatg attaccaca	60
	<210> 24	
	<211> 61	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 24	
	<b>tccagtatga gtacgttgat gacgacgcaa atctccagac tgtgaaaaac tcttcccgca</b>	<b>60</b>
	<b>c</b>	<b>61</b>
10	<210> 25	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 25	
	acctgtgtgt gttcgtggt gacgaacaag atgtccagaa gtgaaaaag acttccaca	60
	<210> 26	
	<211> 60	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 26	
25	cccgtgtgg gtccgttgg gacgaacaag atgtccagaa gtactgaatg attaccaca	60
	<210> 27	
	<211> 61	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 27	
	<b>tccagtatga gtacgttgat gacgaaccaa atttccagaa gttgaaaaac tcttcccgca</b>	<b>60</b>
	<b>c</b>	<b>61</b>
35	<210> 28	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
40	<400> 28	
	acctgtgtgt gttcgtggt gacgaaccaa attatcagaa cgagaaaaag acttccaca	60
	<210> 29	
	<211> 60	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	



ES 2 551 318 T3

	<220>		
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario		
	<400> 29		
	cccgggtgtgg gtccgttggg gagaagccaa atgtccagcc tgactgaatg attaccaca		60
5	<210> 30		
	<211> 61		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario		
	<400> 30		
	<b>tccagtatga gtacgttgat gacgaacaag atgtccagaa gttgaaaaac tcttcccgc</b>		<b>60</b>
	<b>c</b>		<b>61</b>
	<210> 31		
	<211> 894		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Casete de expresión de NLS-P1-25-ZFN1		
	<400> 31		
	<b>atggtgccaa aaaagaagag aaaggtagaa gaccctctc gagctgaaa accttacaag</b>		<b>60</b>
	<b>tgtcctgaat gtggaaagtc tttttctcag cgtgctcatc ttgaacgtca ccagcgaaca</b>		<b>120</b>
	<b>cacacaggtg agaagccata taaatgccca gaatgtggta aatcattcag tcagcgtgct</b>		<b>180</b>
	<b>catcttgaac gtcaccaacg gaccacacc ggggagaagc catttaaatg ccctgagtgc</b>		<b>240</b>
	<b>gggaagagtt tttcacagtc tggagatttg cgctgctcatc aacgtactca tactggagga</b>		<b>300</b>
	<b>ctagtcaaaa gtgaactgga ggagaagaaa tctgaacttc gtcataaatt gaaatatgtg</b>		<b>360</b>
	<b>cctcatgaat atattgaatt aattgaaatt gccagaaatt ccaactcagga tagaattctt</b>		<b>420</b>
	<b>gaaatgaag taatggaatt ttttatgaaa gtttatggat atagaggtaa acatttgggt</b>		<b>480</b>
	<b>ggatcaagga aaccggacgg agcaatttat actgtcggat ctctattga ttacgggtgtg</b>		<b>540</b>
	<b>atcgtggata ctaaagctta tagcggaggt tataatctgc caattggcca agcagatgaa</b>		<b>600</b>
	<b>atgcaacgat atgtcgaaga aatcaaaaca cgaaacaaac atatcaacc taatgaatg</b>		<b>660</b>
	<b>tggaaagtct atccatcttc tgtaacggaa ttaagtttt tatttgtgag tggtcacttt</b>		<b>720</b>
	<b>aaaggaaact acaaagctca gcttacacga ttaaatcata tcactaattg taatggagct</b>		<b>780</b>
	<b>gttcttagtg tagaagagct ttaattggt ggagaaatga ttaaagccgg cacattaacc</b>		<b>840</b>
20	<b>ttagaggaag tgagacggaa atttaataac ggcgagataa actttggatc ctaa</b>		<b>894</b>
	<210> 32		
	<211> 894		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> Casete de expresión de NLS-P1-25-ZFN2		
	<400> 32		

ES 2 551 318 T3

```

atggtgccaa aaaagaagag aaaggtagaa gaccctctc gagctgaaaa accttacaag      60
tgtcctgaat gtggaagtc tttttctcag tctagcaacc tgcagaagca ccagcgaaca      120
cacacaggtg agaagccata taaatgccca gaatgtggta aatcattcag tcgttctgat      180
aagttggttc gtcaccaacg gaccacacc ggggagaagc catttaaatg ccctgagtgc      240
gggaagagtt tttcacgttc tgataatttg gttcgtcatc aacgtactca tactggagga      300
ctagtcaaaa gtgaactgga ggagaagaaa tctgaacttc gtcataaatt gaaatatgtg      360
cctcatgaat atattgaatt aattgaaatt gccagaaatt cactcagga tagaattctt      420
gaaatgaagg taatggaatt ttttatgaaa gtttatggat atagaggtaa acatttgggt      480
ggatcaagga aaccggacgg agcaatttat actgctggat ctctattga ttacggtgtg      540
atcgtggata ctaaagctta tagcggaggt tataatctgc caattggcca agcagatgaa      600
atgcaacgat atgtcgaaga aatcaaaaca cgaaacaaac atatcaacc taatgaatgg      660
tggaaagtct atccatcttc tgtaacggaa ttaagtttt tatttgtgag tggtcacttt      720
aaaggaaact acaaagctca gcttacacga ttaaatcata tctaattg taatggagct      780
gttcttagtg tagaagagct ttaattggt ggagaaatga ttaaagccgg cacattaacc      840
ttagaggaag tgagacggaa atttaataac ggcgagataa actttggatc ctaa      894

```

<210> 33

<211> 894

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Casete de expresión de NLS-P1-36-ZFN1

<400> 33

```

atggtgccaa aaaagaagag aaaggtagaa gaccctctc gagctgaaaa accttacaag      60
tgtcctgaat gtggaagtc tttttctact tctggacatc ttgttcgtca ccagcgaaca      120
cacacaggtg agaagccata taaatgccca gaatgtggta aatcattcag tacttctgga      180
catcttggtc gtcaccaacg gaccacacc ggggagaagc catttaaatg ccctgagtgc      240
gggaagagtt tttcaacttc tggaaatttg gttcgtcatc aacgtactca tactggagga      300
ctagtcaaaa gtgaactgga ggagaagaaa tctgaacttc gtcataaatt gaaatatgtg      360
cctcatgaat atattgaatt aattgaaatt gccagaaatt cactcagga tagaattctt      420
gaaatgaagg taatggaatt ttttatgaaa gtttatggat atagaggtaa acatttgggt      480
ggatcaagga aaccggacgg agcaatttat actgctggat ctctattga ttacggtgtg      540
atcgtggata ctaaagctta tagcggaggt tataatctgc caattggcca agcagatgaa      600
atgcaacgat atgtcgaaga aatcaaaaca cgaaacaaac atatcaacc taatgaatgg      660
tggaaagtct atccatcttc tgtaacggaa ttaagtttt tatttgtgag tggtcacttt      720
aaaggaaact acaaagctca gcttacacga ttaaatcata tctaattg taatggagct      780
gttcttagtg tagaagagct ttaattggt ggagaaatga ttaaagccgg cacattaacc      840
ttagaggaag tgagacggaa atttaataac ggcgagataa actttggatc ctaa      894

```

10

<210> 34

<211> 894

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 551 318 T3

<220>

<223> Casete de expresión de NLS-P1-36-ZFN2

<400> 34

```

atggtgccaa aaaagaagag aaaggtagaa gaccctctc gagctgaaaa accttacaag      60
tgtcctgaat gtggaagtc tttttctcgt tctgataatt tggttcgtca ccagcgaaca      120
cacacaggtg agaagccata taaatgccca gaatgtggta aatcattcag tcaggctgga      180
catttgctt ctcaccaacg gaccacaccc ggggagaagc catttaaatg ccttgagtgc      240
gggaagagtt tttcaacttc tggacatctt gtctcgtcacc aacgtactca tactggagga      300
ctagtcaaaa gtgaactgga ggagaagaaa tctgaacttc gtcataaatt gaaatatgtg      360
cctcatgaat atattgaatt aattgaaatt gccagaaatt cactcagga tagaattctt      420
gaaatgaagg taatggaatt ttttatgaaa gtttatggat atagaggtaa acatttgggt      480
ggatcaagga aaccggacgg agcaatttat actgtcggat ctcctattga ttacgggtgtg      540
atcgtggata ctaaagctta tagcggaggt tataatctgc caattggcca agcagatgaa      600
atgcaacgat atgtcgaaga aatcaaaca cgaaacaaac atatcaacc taatgaatgg      660
tgaaagtct atccatcttc tgtaacggaa tttaagtttt tatttgtgag tggtcacttt      720
aaaggaaact acaaagctca gcttacacga ttaaatacata tctaattg taatggagct      780
gttcttagtg tagaagagct ttaattgggt ggagaaatga ttaaagccgg cacattaacc      840
ttagaggaag tgagacggaa atttaataac ggcgagataa actttggatc ctaa      894

```

5

<210> 35

<211> 297

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido expresado en NLS-P1-25-ZFN1

<400> 35

```

Met Val Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Ser Arg Ala Glu
1           5           10           15

Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Arg Ala
20           25           30

His Leu Glu Arg His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys
35           40           45

Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Arg Ala His Leu Glu Arg
50           55           60

His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Lys Cys Pro Glu Cys
65           70           75           80

```

ES 2 551 318 T3

Gly Lys Ser Phe Ser Gln Ser Gly Asp Leu Arg Arg His Gln Arg Thr  
85 90 95

His Thr Gly Gly Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu  
100 105 110

Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile  
115 120 125

Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val  
130 135 140

Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly  
145 150 155 160

Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile  
165 170 175

Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn  
180 185 190

Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn  
195 200 205

Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr  
210 215 220

Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe  
225 230 235 240

Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn  
245 250 255

Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu  
260 265 270

Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe  
275 280 285

Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Gly Ser  
290 295

<210> 36

<211> 297

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido expresado en NLS-P1-25-ZFN2

<400> 36

Met Val Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Ser Arg Ala Glu  
1 5 10 15

Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Ser Ser  
20 25 30

ES 2 551 318 T3

Asn Leu Gln Lys His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys  
 35 40 45

Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Arg Ser Asp Lys Leu Val Arg  
 50 55 60

His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Lys Cys Pro Glu Cys  
 65 70 75 80

Gly Lys Ser Phe Ser Arg Ser Asp Asn Leu Val Arg His Gln Arg Thr  
 85 90 95

His Thr Gly Gly Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu  
 100 105 110

Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile  
 115 120 125

Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val  
 130 135 140

Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly  
 145 150 155 160

Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile  
 165 170 175

Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn  
 180 185 190

Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn  
 195 200 205

Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr  
 210 215 220

Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe  
 225 230 235 240

Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn  
 245 250 255

Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu  
 260 265 270

Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe  
 275 280 285

Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Gly Ser  
 290 295

<210> 37

<211> 297

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido expresado en NLS-P1-36-ZFN1

ES 2 551 318 T3

<400> 37

Met Val Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Ser Arg Ala Glu  
 1 5 10 15

Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Thr Ser Gly  
 20 25 30

His Leu Val Arg His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys  
 35 40 45

Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Thr Ser Gly His Leu Val Arg  
 50 55 60

His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Lys Cys Pro Glu Cys  
 65 70 75 80

Gly Lys Ser Phe Ser Thr Ser Gly Asn Leu Val Arg His Gln Arg Thr  
 85 90 95

His Thr Gly Gly Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu  
 100 105 110

Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile  
 115 120 125

Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val  
 130 135 140

Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly  
 145 150 155 160

Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile  
 165 170 175

Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn  
 180 185 190

Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn  
 195 200 205

Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr  
 210 215 220

Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe  
 225 230 235 240

Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn  
 245 250 255

Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu  
 260 265 270

Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe  
 275 280 285

Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Gly Ser  
 290 295

ES 2 551 318 T3

<210> 38  
 <211> 297  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Polipéptido expresado en NLS-P1-36-ZFN2

<400> 38

```

Met Val Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Ser Arg Ala Glu
1          5          10          15

Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Arg Ser Asp
          20          25          30

Asn Leu Val Arg His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys
          35          40          45

Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Ala Gly His Leu Ala Ser
50          55          60

His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Lys Cys Pro Glu Cys
65          70          75          80

Gly Lys Ser Phe Ser Thr Ser Gly His Leu Val Arg His Gln Arg Thr
          85          90          95

His Thr Gly Gly Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu
          100          105          110

Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile
          115          120          125

Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val
130          135          140

Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly
145          150          155          160

Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile
          165          170          175

Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn
          180          185          190

Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn
          195          200          205

Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr
210          215          220
    
```

ES 2 551 318 T3

Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe  
225 230 235 240

Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn  
245 250 255

Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu  
260 265 270

Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe  
275 280 285

Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Gly Ser  
290 295

<210> 39

<211> 65

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> MCS de vector pET28

<400> 39

**tcggatccga attcgagctc cgctcgacaag cttgcgggccg cactcgagca ccaccaccac 60**

**cacca 65**

10 <210> 40

<211> 54

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Virus de insecto *Thosea asigna* derivado de secuencia de nucleótidos de T2A

<400> 40

gaaggaagag gatctcttct tactgtggt gatgtgaag agaatcctgg acca 54

<210> 41

<211> 18

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Virus de insecto *Thosea asigna* derivado de polipéptido T2A

<400> 41

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro  
1 5 10 15

25 **Gly Pro**

<210> 42

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Secuencia diana de dedo de zinc

<400> 42

ggggaagaa

9



ES 2 551 318 T3

<210> 43  
 <211> 1065  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Gen del virus del cascabeleo del tabaco para la proteína de cubierta 2b

<400> 43

atgcacgaat tacttaggaa gtggcttgac gacactaatg tgttattggt agataatggt	60
ttggtgggtca aggtacgtag tagagtccca catattcgca cgtatgaagt aattggaaag	120
ttgtcagttt ttgataatc actgggagat gatacgtgt ttgagggaaa agtagagaac	180
gtatttgttt ttatgttcag gcggttcttg tgtgtcaaca aagatggaca ttgttactca	240
aggaagcacg atgagcttta ttattacgga cgagtggact tagattctgt gagtaagggt	300
acctcaggtt acgagaaact ctttattcac agagaacttt atatctaac agatttaatt	360
gagagagtga gtaagttctt taacttagct caggatgtgg tagaagcaag ttttgagtat	420
gccaagggtt aagagagggt aggtcacgtc agaaactgtg tgcaactggc ggggtggaaa	480
tccacgaatg ccgatttgac aattaagatt tctgacgatg tcgaacaact gcttgaaaa	540
cgtggtggat tcttgaaggt tgtgaacggt atcttgagca agaattgtag tgacgtagtc	600
actaacgaca atgagcttat tcatgcaatt aacccaaatc tgggtaccaga taaagtcag	660
tctgtgtcga acgtaatgaa agagactggg tttctgcagt ttccaaagt tttatctaag	720
ttggaaggac aggtaccgaa aggaacaaaa tttctagaca aacacgttcc tgattttact	780
tggataacaag ctcttgaaga aagagtgaat attcggagag gagaatcggg acttcagact	840
ctattagctg atatcgttcc gaggaatgct attgctgctc agaaattgac aatgctaggt	900
tacatcgagt atcagacta tgtggtgatc gtctgtcagt ctggagtatt tagtgacgat	960
tgggcgacat gtagaatgct ttgggcagca ctatctagtg ctcaactata tacctatggt	1020
gacgccagta gaatcgggtcc aatcgtttac ggttggttat tgtga	1065

10 <210> 44  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Potenciador traduccional Omega derivado de TMV

15 <400> 44

gtatttttac aacaattacc aacaacaaca aacaacagac aacattacaa ttactattta	60
caattacaat	70

20 <210> 45  
 <211> 188  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de sgP-CP-PEBV

<400> 45

gagcatcttg ttctgggggt tcacactatc tttagagaaa gtgtaagtt aattaagtta	60
tcttaattaa gagcataatt atactgattt gtctctcgtt gatagagtct atcattctgt	120

ES 2 551 318 T3

	<b>tactaaaaat ttgacaactc ggtttgctga cctactgggtt actgtatcac ttacccgagt</b>	<b>180</b>
	<b>taacgaga</b>	<b>188</b>
	<210> 46	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Señal de localización nuclear (NLS)	
	<400> 46	
	ccaaaaaaga agagaaagg t agaagacccc	30
10	<210> 47	
	<211> 131	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Potenciador traduccional 5'-UTR Omega derivado de virus del grabado del tabaco	
	<400> 47	
	<b>tctcaacaca acatatacaà aacaaacgaa tctcaagcaa tcaagcattc tactttctatt</b>	<b>60</b>
	<b>gcagcaattt aatcatttc ttttaaagca aaagcaattt tctgaaaatt ttcaccattt</b>	<b>120</b>
	<b>acgaacgata g</b>	<b>131</b>
	<210> 48	
	<211> 168	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de sgP-2b-TRV2	
	<400> 48	
	<b>ggatttaagg acgtgaactc tgttgagatc tctgtgaaat tcagagggtg ggtgatacca</b>	<b>60</b>
	<b>tattcactga tgccattagc gacatctaaa tagggctaatt tgtgactaat ttgagggaat</b>	<b>120</b>
25	<b>ttcctttacc attgacgtca gtgtcgttgg tagcatttga gtttcgca</b>	<b>168</b>
	<210> 49	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> MCS modificado de vector pET28c.SX	
	<400> 49	
	tcggatccga attcgagctc cgtcgagcac caccaccacc acca	44
	<210> 50	
35	<211> 300	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Proteína auxiliar viral codificada por el gen 2b de ARN2	
40	<400> 50	

ES 2 551 318 T3

	<b>atgcacgaat tacttaggaa gtggcttgac gacactaatg tgttattggt agataatggt</b>	<b>60</b>
	<b>ttggtgggtca aggtacgtag tagagtccca catattcgca cgtatgaagt aattggaaag</b>	<b>120</b>
	<b>ttgtcagttt ttgataattc actgggagat gatacgcgtg ttgagggaaa agtagagaac</b>	<b>180</b>
	<b>gtatttgttt ttatgttcag gcggttcttg tgtgtcaaca aagatggaca ttgttactca</b>	<b>240</b>
	<b>aggaagcacg atgagcttta ttattacgga cgagtggact tagattctgt gagtaaggtt</b>	<b>300</b>
	<210> 51	
	<211> 54	
5	<212> ADN	
	<213> Virus <i>Thosea asigna</i>	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> Tav-T2A	
10	<400> 51	
	gagggcaggg gaagtcttct aacatgcggg gacgtggagg aaaatcccg cccc	54
	<210> 52	
	<211> 54	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de Tav-T2A modificada según el uso de codones de <i>Petunia</i>	
	<400> 52	
	gaaggaagag gatcttct tacttgggt gatgtgaag agaatcctgg acca	54
20	<210> 53	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 53	
	agttaacgag atggcctct cggaga	26
	<210> 54	
	<211> 28	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 54	
35	tagagctctc acaggaacag gtggtggc	28
	<210> 55	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 55	
	tttggatccg aaggaagagg atcttctct acttgggtg atgttgaaga g	51

# ES 2 551 318 T3

	<210> 56	
	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 56	
	ttactgtgg tgatgtgaa gagaatcctg gaccaaaaaa gaagagaaag	50
10	<210> 57	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
15	<400> 57	
	aagagctctt aggatccaaa gtttatctc	29
	<210> 58	
	<211> 24	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 58	
	aggatcccag gaacaggtgg tggc	24
25	<210> 59	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 59	
	atctcgagtg agcaagggcg a	21
	<210> 60	
	<211> 28	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 60	
40	agagctctac ttgtacagct cgtccatg	28
	<210> 61	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 61	

	atggtgccaa aaaagaagag aaaggtagaa gacccctctc gag	43
	<210> 62	
	<211> 27	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 62	
	cccgggattt aaggacgtga actctgt	27
10	<210> 63	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 63	
	cccgggtcac aggaacaggt ggt	23
	<210> 64	
	<211> 33	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 64	
25	agttaacgag atgccaaaaa agaagagaaa ggt	33
	<210> 65	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 65	
	aagagtcttt aagatccaaa gtttatctc	29
	<210> 66	
35	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
40	<400> 66	
	acccgggta tccaaagttt atctcgccgt	30
	<210> 67	
	<211> 25	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	

ES 2 551 318 T3

	<400> 67	
	aactcgagaa aaactgcgga acgga	25
	<210> 68	
	<211> 31	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 68	
10	agttaacgag atggcttcta tgatcctc t	31
	<210> 69	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 69	
	agttaacgag atggcttctc ggagg	25
	<210> 70	
20	<211> 894	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de polinucleótido de PDS-ZFN1	
25	<400> 70	
	<b>atggtgccaa aaaagaagag aaaggtagaa gaccctctc gagctgaaaa accttacaag</b>	<b>60</b>
	<b>tgctctgaat gtggaagtc ttttctcag tctggagatt tgcgtcgtca ccagcgaaca</b>	<b>120</b>
	<b>cacacaggtg agaagcata taaatgccca gaatgtggta aatcattcag tacttctgga</b>	<b>180</b>
	<b>aatttggttc gtcaccaacg gaccacacc ggggagaagc catttaaatg ccctgagtgc</b>	<b>240</b>
	<b>gggaagagtt tttcacagcg cgcgcatctg gaacgccatc aacgtactca tactggagga</b>	<b>300</b>
	<b>ctagtcaaaa gtgaactgga ggagaagaaa tctgaacttc gtcataaatt gaaatatgtg</b>	<b>360</b>
	<b>cctcatgaat atattgaatt aattgaaatt gccagaaatt cactcagga tagaattctt</b>	<b>420</b>
	<b>gaaatgaagg taatggaatt ttttatgaaa gtttatggat atagaggtaa acatttgggt</b>	<b>480</b>
	<b>ggatcaagga aaccggacgg agcaatttat actgtcggat ctctattga ttacggtgtg</b>	<b>540</b>
	<b>atcgtggata ctaaagctta tagcggaggt tataatctgc caattggcca agcagatgaa</b>	<b>600</b>
	<b>atgcaacgat atgtcgaaga aatcaaaaca cgaacaac atatcaacc taatgaatgg</b>	<b>660</b>
	<b>tggaaagtct atccatcttc tgtaacggaa ttaagtgtt tatttgtgag tggtcacttt</b>	<b>720</b>
	<b>aaaggaaact acaaagctca gtttacagca ttaaatcata tcaactaattg taatggagct</b>	<b>780</b>
	<b>gttcttagtg tagaagagct ttaatttggg ggagaaatga ttaaagccgg cacattaacc</b>	<b>840</b>
	<b>ttagaggaag tgagacggaa atttaataac ggcgagataa actttggatc ctaa</b>	<b>894</b>
	<210> 71	
	<211> 297	
	<212> PRT	
30	<213> Secuencia artificial	

# ES 2 551 318 T3

<220>

<223> Secuencia de polipéptido de PDS-ZFN1

<400> 71

Met Val Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Ser Arg Ala Glu  
1 5 10 15

Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Ser Gly  
20 25 30

ES 2 551 318 T3

Asp Leu Arg Arg His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys  
 35 40 45

Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Thr Ser Gly Asn Leu Val Arg  
 50 55 60

His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Lys Cys Pro Glu Cys  
 65 70 75 80

Gly Lys Ser Phe Ser Gln Arg Ala His Leu Glu Arg His Gln Arg Thr  
 85 90 95

His Thr Gly Gly Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu  
 100 105 110

Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile  
 115 120 125

Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val  
 130 135 140

Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly  
 145 150 155 160

Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile  
 165 170 175

Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn  
 180 185 190

Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn  
 195 200 205

Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr  
 210 215 220

Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe  
 225 230 235 240

Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn  
 245 250 255

Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu  
 260 265 270

Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe  
 275 280 285

Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Gly Ser  
 290 295

<210> 72  
 <211> 894  
 <212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de polinucleótido de PDS-ZFN2



ES 2 551 318 T3

<400> 72

atggtgccaa aaaagaagag aaaggtagaa gacccctctc gagctgaaaa accttacaag 60  
 tgtcctgaat gtggaaagtc tttttctcgc agcgatgaac tgggtgcgcca ccagcgaaca 120  
 cacacaggtg agaagccata taaatgccca gaatgtggta aatcattcag tcagtctagc 180  
 aacctgggta gacaccaacg gacccacacc ggggagaagc catttaaatg ccttgagtgc 240  
 gggaagagtt tttcacataa aaacgcgctg cagaaccatc aacgtactca tactggagga 300  
 ctagtcaaaa gtgaactgga ggagaagaaa tctgaacttc gtcataaatt gaaatatgtg 360  
 cctcatgaat atattgaatt aattgaatt gccagaaatt cactcagga tagaattctt 420  
 gaaatgaagg taatggaatt ttttatgaaa gtttatggat atagaggtaa acatttgggt 480  
 ggatcaagga aaccggacgg agcaatttat actgtcggat ctcctattga ttacgggtgtg 540  
 atcgtggata ctaaagctta tagcggaggt tataatctgc caattggcca agcagatgaa 600  
 atgcaacgat atgtcgaaga aatcaaca cgaacaac atatcaacc taatgaatgg 660  
 tggaaagtct atccatcttc tgtaacggaa ttaagt tttttgtgag tggtcacttt 720  
 aaaggaaact acaaagctca gcttacacga ttaaatcata tcactaattg taatggagct 780  
 gttcttagtg tagaagagct ttaattggt ggagaaatga ttaaagccgg cacattaacc 840  
 ttagaggaag tgagacggaa atttaataac ggcgagataa actttggatc ctaa 894

<210> 73

<211> 297

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polipéptido de PDS-ZFN2

<400> 73

Met Val Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Ser Arg Ala Glu  
 1 5 10 15  
 Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Arg Ser Asp  
 20 25 30  
 Glu Leu Val Arg His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys  
 35 40 45  
 Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Ser Ser Asn Leu Val Arg  
 50 55 60  
 His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Lys Cys Pro Glu Cys  
 65 70 75 80  
 Gly Lys Ser Phe Ser His Lys Asn Ala Leu Gln Asn His Gln Arg Thr  
 85 90 95  
 His Thr Gly Gly Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu  
 100 105 110  
 Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile  
 115 120 125

10

ES 2 551 318 T3

Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val  
 130 135 140

Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly  
 145 150 155 160

Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile  
 165 170 175

Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn  
 180 185 190

Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn  
 195 200 205

Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr  
 210 215 220

Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe  
 225 230 235 240

Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn  
 245 250 255

Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu  
 260 265 270

Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe  
 275 280 285

Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Gly Ser  
 290 295

<210> 74

<211> 894

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótido de FHT-ZFN1

<400> 74

atggtgccaa aaaagaagag aaaggtagaa gaccctctc gagctgaaaa accttacaag 60

tgtcctgaat gtggaagtc tttttctact tctggagaat tggttcgtca ccagegaaca 120

cacacaggtg agaagccata taaatgccca gaatgtgta aatcattcag tacttctgga 180

catcttggtc gtcaccaacg gaccacacc ggggagaagc catttaaatg ccctgagtg 240

gggaagagtt tttcacagag cagcaacctg gtgcgccatc aacgtactca tactggagga 300

ctagtcaaaa gtgaactgga ggagaagaaa tctgaacttc gtcataaatt gaaatattgtg 360

cctcatgaat atattgaatt aattgaaatt gccagaaatt ccactcagga tagaattctt 420

gaaatgaagg taatggaatt ttttatgaaa gtttatggat atagaggtaa acatttgggt 480

ggatcaagga aaccggacgg agcaatttat actgtcggat ctcctattga ttacggtgtg 540

atcgtggata ctaaagctta tagcggaggt tataatctgc caattggcca agcagatgaa 600

ES 2 551 318 T3

atgcaacgat atgtcgaaga aatcaaca cgaacaac atatcaacc taatgaatgg 660  
 tggaaagtct atccatcttc tgtaacggaa ttaagtgtt tatttgtgag tggtcacttt 720  
 aaaggaaact acaaagctca gttacacga ttaaatcata tcactaattg taatggagct 780  
 gttcttagtg tagaagagct ttaattggt ggagaaatga ttaaagccgg cacattaacc 840  
 ttagaggaag tgagacggaa atttaataac ggcgagataa actttggatc ctaa 894

<210> 75

<211> 297

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polipéptido de FHT-ZFN1

<400> 75

Met Val Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Ser Arg Ala Glu  
 1 5 10 15

Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Thr Ser Gly  
 20 25 30

Glu Leu Val Arg His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys  
 35 40 45

Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Thr Ser Gly His Leu Val Arg  
 50 55 60

His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Lys Cys Pro Glu Cys  
 65 70 75 80

Gly Lys Ser Phe Ser Gln Ser Ser Asn Leu Val Arg His Gln Arg Thr  
 85 90 95

His Thr Gly Gly Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu  
 100 105 110

Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile  
 115 120 125

Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val  
 130 135 140

Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly  
 145 150 155 160

Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile  
 165 170 175

Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn  
 180 185 190

Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn  
 195 200 205

ES 2 551 318 T3

Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr  
 210 215 220

Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe  
 225 230 235 240

Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn  
 245 250 255

Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu  
 260 265 270

Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe  
 275 280 285

Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Gly Ser  
 290 295

<210> 76

<211> 894

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótido de FHT-ZFN2

<400> 76

```

atggtgccaa aaaagaagag aaaggtagaa gaccctctc gagctgaaa accttacaag      60
tgtcctgaat gtggaagtc ttttctcgc gcgataacc tgaccgaaca ccagcgaaca      120
cacacaggtg agaagccata taaatgccca gaatgtggta aatcattcag tcagtctagc      180
aacctggtta gacaccaacg gaccacacc ggggagaagc catttaaatg ccctgagtgc      240
gggaagagtt tttcaacttc tggagaattg gtctcctc aacgtactca tactggagga      300
ctagtcaaaa gtgaactgga ggagaagaaa tctgaacttc gtcataaatt gaaatattgtg      360
cctcatgaat atattgaatt aattgaaatt gccagaaatt cactcagga tagaattctt      420
gaaatgaagg taatggaatt ttttatgaaa gtttatggat atagaggtaa acatttgggt      480
ggatcaagga aaccggacgg agcaatttat actgtcggat ctcctattga ttacgggtgtg      540
atcgtggata ctaaagctta tagcggaggt tataatctgc caattggcca agcagatgaa      600
atgcaacgat atgtcgaaga aatcaaaca cgaaacaac atatcaacc taatgaatgg      660
tgaaagtct atccatcttc tgtaacggaa ttaagtgtt tatttgtgag tggtcacttt      720
aaaggaaact acaaagctca gcttacacga ttaaatcata tcaactaattg taatggagct      780
gttcttagtg tagaagagct ttaattggt ggagaaatga ttaaagccgg cacattaacc      840
ttagaggaag tgagacggaa atttaataac ggcgagataa actttggatc ctaa      894
    
```

10 <210> 77

<211> 297

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de polipéptido de FHT-ZFN2

<400> 77

ES 2 551 318 T3

Met Val Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Ser Arg Ala Glu  
 1 5 10 15

Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Arg Ala Asp  
 20 25 30

Asn Leu Thr Glu His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys  
 35 40 45

Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Ser Ser Asn Leu Val Arg  
 50 55 60

His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Lys Cys Pro Glu Cys  
 65 70 75 80

Gly Lys Ser Phe Ser Thr Ser Gly Glu Leu Val Arg His Gln Arg Thr  
 85 90 95

His Thr Gly Gly Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu  
 100 105 110

Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile  
 115 120 125

Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val  
 130 135 140

Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly  
 145 150 155 160

Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile  
 165 170 175

Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn  
 180 185 190

Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn  
 195 200 205

Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr  
 210 215 220

Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe  
 225 230 235 240

Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn  
 245 250 255

Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu  
 260 265 270

Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe  
 275 280 285

Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Gly Ser  
 290 295

<210> 78

<211> 420  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia que carece de 40 nucleótidos de 2b-sgP (pTRV2-2b-2bsgP-sgP)

<400> 78

```

cagctgctag ttcactctgca ccgcctccag cgagtggagg tccgatacgt cctaatecct      60
agggatttaa ggacgtgaac tctgttgaga tctctgtgaa attcagaggg tgggtgatac      120
catattcact gatgccatta gcgacatcta aatagggcta attgtgacta atttgagggga      180
atttccttta ccattctaga aggcctccat ggggatccgg taccgagctc gagcatcttg      240
ttctgggggt tcacactatc tttagagaaa gtgttaagtt aattaagtta tcttaattaa      300
gagcataatt atactgattt gtctctcggt gatagagtct atcattctgt tactaaaaat      360
ttgacaactc ggtttgctga cctactgggt actgtatcac ttaccgaggt tgtaacgag      420
    
```

<210> 79  
 <211> 469  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de pTRV2 que contiene la región de promotores subgenómicos (sgP) PEBV y 2b

<400> 79

```

tttggaggag cagctgctag ttcactctgca ccgcctccag cgagtggagg tccgatacgt      60
cctaatecct agggatttaa ggacgtgaac tctgttgaga tctctgtgaa attcagaggg      120
tgggtgatac catattcact gatgccatta gcgacatcta aatagggcta attgtgacta      180
atttgagggga atttccttta ccattgacgt cagtgtcggt ggtagcattt gagtttcgaa      240
ttctctagaa ggcctccatg ggggatccgt accgagctcg agcatcttgt tctggggttt      300
cacactatct ttagagaaaag tgtaagttt ataatgatt ctaattaaag agcataatta      360
tactgatttg tctctcggtg atagagtcta tcattctggt actaaaaatt tgacaactcg      420
gtttctgctg cactctggta ctgtatcact taccgaggt gtaacgag      469
    
```

<210> 80  
 <211> 420  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia consenso de comparación entre la secuencia que carece de 40 nucleótidos de 2b-sgP y pTRV2 que contiene la región de promotores subgenómicos (sgP) PEBV y 2b

<400> 80

```

cagctgctag ttcactctgca ccgcctccag cgagtggagg tccgatacgt cctaatecct      60
agggatttaa ggacgtgaac tctgttgaga tctctgtgaa attcagaggg tgggtgatac      120
catattcact gatgccatta gcgacatcta aatagggcta attgtgacta atttgagggga      180
atttccttta ccattctaga aggcctccat ggggatccgg taccgagctc gagcatcttg      240
ttctgggggt tcacactatc tttagagaaa gtgttaagtt aattaagtta tcttaattaa      300
    
```

ES 2 551 318 T3

**gagcataatt atactgattt gtctctcggt gatagagtct atcattctgt tactaaaaat 360**  
**ttgacaactc ggtttgctga cctactgggt actgtatcac ttacccgagt tgtaacgag 420**  
 <210> 81  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 5 <213> Virus *Thosea asigna*  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Una secuencia de 54 nucleótidos de tipo 2A  
 <400> 81  
 10 gagggcaggg gaagtctct aacatgcggg gacgtggagg aaaatcccgg cccc 54  
 <210> 82  
 <211> 933  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223 > Secuencia de ácido nucleico de NLS-QEQ-ZFN  
 <400> 82  
**atggtgccaa aaaagaagag aaaggtagaa gaccctctc gagaaaaact gcggaacgga 60**  
**tccggggacc ctggcaaaaa gaaacagcac gcgtgtccgg aatgcggcaa gtcctttagt 120**  
**cagtctagca acctgcagaa gcatcaacgt acgcataaccg gggaaaaacc ttacaaatgt 180**  
**ccggaatgcy gcaagtctt tagtcagtct agcaacctgc agaagcatca acgtacgcat 240**  
**accggggaaa aaccttacia atgtccggaa tgcggcaaga gctttagtag aagtgatcat 300**  
**ctgtcaagac atcaacgtac gcatcagaat aagaagcaac tagtcaaaag tgaactggag 360**  
**gagaagaaat ctgaacttcg tcataaattg aaatatgtgc ctcatgaata tattgaatta 420**  
**attgaaattg ccagaaattc cactcaggat agaattcttg aaatgaaggt aatggaattt 480**  
**tttatgaaag tttatggata tagaggtaaa catttggtg gatcaaggaa accggacgga 540**  
**gcaatttata ctgtcggatc tcctattgat tacggtgtga tcgtggatac taaagcttat 600**  
**agcggaggtt ataatctgcc aattggcaa gcagatgaaa tgcaacgata tgtcgaagaa 660**  
**aatcaaacac gaaacaaca tatcaacct aatgaatggt ggaaagtcta tccatcttct 720**  
**gtaacggaat ttaagtttt atttgtgagt ggtcactta aaggaaacta caaagctcag 780**  
**cttacacgat taaatcatat cactaattgt aatggagctg ttcttagtgt agaagagctt 840**  
**ttaattggtg gagaaatgat taaagccggc acattaacct tagaggaagt gagacggaaa 900**  
**tttaataacg gcgagataaa ctttgatct taa 933**  
 <210> 83  
 20 <211> 310  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de polipéptido de NLS-QEQ-ZFN  
 25 <400> 83  
**Met Val Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Ser Arg Glu Lys**  
**1 5 10 15**

ES 2 551 318 T3

Leu Arg Asn Gly Ser Gly Asp Pro Gly Lys Lys Lys Gln His Ala Cys  
 20 25 30  
 Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Ser Ser Asn Leu Gln Lys His  
 35 40 45  
 Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly  
 50 55 60  
 Lys Ser Phe Ser Gln Ser Ser Asn Leu Gln Lys His Gln Arg Thr His  
 65 70 75 80  
 Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser  
 85 90 95  
 Arg Ser Asp His Leu Ser Arg His Gln Arg Thr His Gln Asn Lys Lys  
 100 105 110  
 Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His  
 115 120 125  
 Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala  
 130 135 140  
 Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe  
 145 150 155 160  
 Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser Arg  
 165 170 175  
 Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly  
 180 185 190  
 Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile  
 195 200 205  
 Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg  
 210 215 220  
 Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser  
 225 230 235 240  
 Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn  
 245 250 255  
 Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn Gly  
 260 265 270  
 Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys  
 275 280 285  
 Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly  
 290 295 300  
 Glu Ile Asn Phe Gly Ser  
 305 310

<210> 84



ES 2 551 318 T3

<211> 1830  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Secuencia de polinucleótido de P36-ZFN2-T2A-P36-ZFN1

<400> 84

```

atggtgccaa aaaagaagag aaaggtagaa gaccctctc gagctgaaaa accttacaag      60
tgtctgaat gtgaaagtc ttttctcgt tctgataatt tggttcgtca ccagcgaaca      120
cacacagggt agaagccata taaatgccca gaatgtggta aatcattcag tcaggctgga      180
catttggett ctaccaacg gaccacacc ggggagaagc catttaaatg ccctgagtgc      240
gggaagagtt tttcaacttc tggacatctt gttcgtcatc aacgtactca tactggagga      300
ctagtcaaaa gtgaactgga ggagaagaaa tctgaacttc gtcataaatt gaaatatgtg      360
cctcatgaat atattgaatt aattgaaatt gccagaaatt cactcagga tagaattctt      420
gaaatgaag taatggaatt ttttatgaaa gtttatggat atagaggtaa acatttgggt      480
ggatcaagga aaccggacgg agcaatttat actgtcggat ctctattga ttacggtgtg      540
atcgtggata ctaaagctta tagcggaggt tataatctgc caattggcca agcagatgaa      600
atgcaacgat atgtcgaaga aatcaaca cgaacaac atatcaacc taatgaatgg      660
tggaaagtct atccatcttc tgtaacggaa ttaagtttt tatttgtgag tggtcacttt      720
aaaggaaact acaaagctca gcttacacga ttaaatcata tactaattg taatggagct      780
gttcttagtg tagaagagct ttaattggt ggagaaatga ttaaagccgg cacattaacc      840
ttagaggaag tgagacggaa atttaataac ggcgagataa actttggatc cgaaggaaga      900
ggatctcttc ttaactgtgg tgatgtgaa gagaatctcg gaccaaaaaa gaagagaaag      960
gtagaagacc cctctcgagc tgaaaaacct tataagtgtc ctgaatgtgg aaagtctttt     1020
tctacttctg gacatcttgt tcgtcaccag cgaacacaca caggtgagaa gccatataaa     1080
tgcccagaat gtggtaaatc attcagtact tctggacatc ttgttcgtca ccaacggacc     1140
cacaccgggg agaagccatt taaatgccct gagtgcggga agagttttct aacttctgga     1200
aatttggttc gtcacaaag tactcatact ggaggactag tcaaaagtga actggaggag     1260
aagaaatctg aacttcgtca taaattgaaa tatgtgcctc atgaatata tgaattaatt     1320
gaaattgcc a gaaattccac tcaggataga attcctgaaa tgaaggtaat ggaatttttt     1380
atgaaagttt atggatatag aggtaaacat ttgggtggat caaggaaacc ggacggagca     1440
atttatactg tcggatctcc tattgattac ggtgtgatcg tggatactaa agcttatagc     1500
ggaggttata atctgccaat tggccaagca gatgaaatgc aacgatatgt cgaagaaat     1560
caaacacgaa acaaacatat caacactaat gaatggtgga aagtctatcc atcttctgta     1620
acggaattta agtttttatt tgtgagtggc cactttaaag gaaactacaa agctcagctt     1680
acacgattaa atcatatcac taattgtaat ggagctgttc ttagttaga agagctttta     1740
attggtggag aatgattaa agccgcaca ttaaccttag aggaagtgag acggaattt     1800
aataacggcg agataaactt tggatcttaa     1830
    
```

<210> 85  
 <211> 609  
 <212> PRT

ES 2 551 318 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polipéptido de P36-ZFN2-T2A-P36-ZFN1

<400> 85

Met Val Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Ser Arg Ala Glu  
 1 5 10 15

Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Arg Ser Asp  
 20 25 30

Asn Leu Val Arg His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys  
 35 40 45

Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Ala Gly His Leu Ala Ser  
 50 55 60

His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Lys Cys Pro Glu Cys  
 65 70 75 80

Gly Lys Ser Phe Ser Thr Ser Gly His Leu Val Arg His Gln Arg Thr  
 85 90 95

His Thr Gly Gly Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu  
 100 105 110

Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile  
 115 120 125

Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val  
 130 135 140

Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly  
 145 150 155 160

Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile  
 165 170 175

Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn  
 180 185 190

Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn  
 195 200 205

Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr  
 210 215 220

Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe  
 225 230 235 240

Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn  
 245 250 255

5

ES 2 551 318 T3

Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu  
 260 265 270  
 Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe  
 275 280 285  
 Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Gly Ser Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu  
 290 295 300  
 Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys  
 305 310 315 320  
 Val Glu Asp Pro Ser Arg Ala Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys  
 325 330 335  
 Gly Lys Ser Phe Ser Thr Ser Gly His Leu Val Arg His Gln Arg Thr  
 340 345 350  
 His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe  
 355 360 365  
 Ser Thr Ser Gly His Leu Val Arg His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu  
 370 375 380  
 Lys Pro Phe Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Thr Ser Gly  
 385 390 395 400  
 Asn Leu Val Arg His Gln Arg Thr His Thr Gly Gly Leu Val Lys Ser  
 405 410 415  
 Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val  
 420 425 430  
 Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln  
 435 440 445  
 Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr  
 450 455 460  
 Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala  
 465 470 475 480  
 Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr  
 485 490 495  
 Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu  
 500 505 510  
 Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn  
 515 520 525  
 Thr Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys  
 530 535 540

ES 2 551 318 T3

Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Glu Leu  
545 550 555 560

Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val  
565 570 575

Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr  
580 585 590

Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Gly  
595 600 605

Ser

<210> 86

<211> 1830

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótido de PDS-ZFN1-T2A-PDS-ZFN2

<400> 86

```

atggtgccaa aaaagaagag aaaggtagaa gaccctctc gagctgaaa acctacaag      60
tgtcctgaat gtggaagtc ttttctcag tctggagatt tgcgtcgtca ccagcgaaca      120
cacacaggtg agaagccata taaatgccca gaatgtggta aatcattcag tacttctgga      180
aatttggttc gtcaccaacg gaccacacc ggggagaagc catttaaatg cctgagtg      240
gggaagagtt ttccacagcg cgcgcatctg gaacgccatc aacgtactca tactggagga      300
ctagtcaaaa gtgaactgga ggagaagaaa tctgaacttc gtcataaatt gaaatatgtg      360
cctcatgaat atattgaatt aattgaaatt gccagaaatt cactcagga tagaattctt      420
gaaatgaagg taatggaatt ttttatgaaa gtttatggat atagaggtaa acatttgggt      480
ggatcaagga aaccggacgg agcaatttat actgtcggat ctctattga ttacgggtgtg      540
atcgtggata ctaaagctta tagcggaggt tataatctgc caattggcca agcagatgaa      600
atgcaacgat atgtcgaaga aatcaaca cgaacaac atatcaacc taatgaatg      660
tgaaagtct atccatcttc tgtaacggaa ttaagtttt tattgtgag tggtcacttt      720
aaaggaaact acaaagctca gtttacagga taaatcata tcactaattg taatggagct      780
gttcttagtg tagaagagct ttaattggt ggagaaatga ttaaagccgg cacattaacc      840
ttagaggaag tgagacggaa atttaataac ggcgagataa actttggatc cgaaggaaga      900
ggatctcttc ttacttgtgg tgatgtgaa gagaatcctg gaccaaaaaa gaagagaag      960
gtagaagacc cctctcgagc tgaaaaacct tacaagtgtc ctgaatgtgg aaagtctttt     1020
tctcgcagcg atgaactggt gcgccaccag cgaacacaca caggtgagaa gccatataaa     1080
tgcccagaat gtggtaaatc attcagtcag tctagcaacc tggtagaca ccaacggacc     1140
cacaccgggg agaagccatt taaatgccct gaggcggga agagtttttc acataaaaac     1200
gcgctgcaga accatcaacg tactcactact ggaggactag tcaaaagtga actggaggag     1260
aagaaatctg aacttcgtca taaattgaaa tatgtgcctc atgaatatat tgaattaatt     1320
gaaattgcc a gaaattccac tcaggataga attcttgaaa tgaaggtaat ggaatttttt     1380

```

ES 2 551 318 T3

atgaaagttt atggatatag aggtaaaccat ttgggtggat caaggaaacc ggacggagca 1440  
 atttatactg tcggatctcc tattgattac ggtgtgatcg tggatactaa agcttatagc 1500  
 ggaggttata atctgccaat tggccaagca gatgaaatgc aacgatatgt cgaagaaaat 1560  
 caaacacgaa acaaacatat caacactaat gaatggtgga aagtctatcc atcttctgta 1620  
 acggaattta agtttttatt tgtgagtggc cactttaaag gaaactacaa agctcagctt 1680  
 acacgattaa atcatatcac taattgtaat ggagctgttc ttagtgtaga agagctttta 1740  
 attggtggag aaatgattaa agccggcaca ttaaccttag aggaagtgag acggaaattt 1800  
 aataacggcg agataaactt tggatcttaa 1830

<210> 87

<211> 609

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polipéptido de PDS-ZFN1-T2A-PDS-ZFN2

<400> 87

Met Val Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Ser Arg Ala Glu  
 1 5 10 15

Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Gln Ser Gly  
 20 25 30

Asp Leu Arg Arg His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys  
 35 40 45

Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Thr Ser Gly Asn Leu Val Arg  
 50 55 60

His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Lys Cys Pro Glu Cys  
 65 70 75 80

Gly Lys Ser Phe Ser Gln Arg Ala His Leu Glu Arg His Gln Arg Thr  
 85 90 95

His Thr Gly Gly Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu  
 100 105 110

Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile  
 115 120 125

Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val  
 130 135 140

Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly  
 145 150 155 160

Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile  
 165 170 175

Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn  
 180 185 190

ES 2 551 318 T3

Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn  
 195 200 205  
 Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr  
 210 215 220  
 Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe  
 225 230 235 240  
 Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn  
 245 250 255  
 Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu  
 260 265 270  
 Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe  
 275 280 285  
 Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Gly Ser Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu  
 290 295 300  
 Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys  
 305 310 315 320  
 Val Glu Asp Pro Ser Arg Ala Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys  
 325 330 335  
 Gly Lys Ser Phe Ser Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg His Gln Arg Thr  
 340 345 350  
 His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe  
 355 360 365  
 Ser Gln Ser Ser Asn Leu Val Arg His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu  
 370 375 380  
 Lys Pro Phe Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser His Lys Asn  
 385 390 395 400  
 Ala Leu Gln Asn His Gln Arg Thr His Thr Gly Gly Leu Val Lys Ser  
 405 410 415  
 Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val  
 420 425 430  
 Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln  
 435 440 445  
 Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr  
 450 455 460  
 Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala  
 465 470 475 480

ES 2 551 318 T3

Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr  
 485 490 495

Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu  
 500 505 510

Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn  
 515 520 525

Thr Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys  
 530 535 540

Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu  
 545 550 555 560

Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val  
 565 570 575

Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr  
 580 585 590

Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Gly  
 595 600 605

Ser

<210> 88

<211> 1830

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polinucleótido de FHT-ZFN1-T2A-FHT-ZFN2

<400> 88

atggtgccaa aaaagaagag aaaggtagaa gaccctctc gagctgaaa accttacaag 60

tgtcctgaat gtgaaagtc ttttctact tctggagaat tggttcgtca ccagcgaaca 120

cacacaggtg agaagccata taaatgcca gaatgtgta aatcattcag tacttctgga 180

catcttgttc gtcaccaacg gaccacacc ggggagaagc catttaaatg ccctgagtgc 240

gggaagagtt ttccacagag cagcaacctg gtgcgccatc aacgtactca tactggagga 300

ctagtcaaaa gtgaactgga ggagaagaaa tctgaacttc gtcataaatt gaaatattgtg 360

cctcatgaat atattgaatt aattgaaatt gccagaaatt ccaactcagga tagaattctt 420

gaaatgaagg taatggaatt ttttatgaaa gtttatggat atagaggtaa acatttgggt 480

ggatcaagga aaccggacgg agcaatttat actgtcggat ctcctattga ttacggtgtg 540

atcgtggata ctaaagctta tagcggaggt tataatctgc caattggcca agcagatgaa 600

atgcaacgat atgtcgaaga aatcaaac cgaacaac atatcaacc taatgaatg 660

tggaaagtct atccatcttc tgtaacggaa ttaagtttt tatttgtgag tggtcacttt 720

aaagaaact acaaagctca gtttacacga ttaaatcata tcactaattg taatggagct 780

gttcttagtg tagaagagct ttaattggt ggagaaatga ttaaagccgg cacattaacc 840

ttagaggaag tgagacggaa atttaataac ggcgagataa actttggatc cgaaggaaga 900

ES 2 551 318 T3

```

ggatctcttc ttacttgtgg tgatgttgaa gagaatcctg gaccaaaaaa gaagagaaag      960
gtagaagacc cctctcgagc tgaaaaacct tacaagtgtc ctgaatgtgg aaagtctttt      1020
tctcgcgcgg ataacctgac cgaacaccag cgaacacaca caggtgagaa gccatataaa      1080
tgcccagaat gtggtaaate attcagtcag tctagcaacc tggttagaca ccaacggacc      1140
cacaccgggg agaagccatt taaatgccct gagtgcggga agagtttttc aacttctgga      1200
gaattggttc gtcacaaacg tactcatact ggaggactag tcaaaagtga actggaggag      1260
aagaaatctg aacttcgtca taaattgaaa tatgtgcctc atgaatata tgaattaatt      1320
gaaattgcc a gaaattccac tcaggataga attcttggaa tgaaggtaat ggaatttttt      1380
atgaaagttt atggatatag aggtaaacat ttgggtggat caaggaaacc ggacggagca      1440
atttatactg tcggatctcc tattgattac ggtgtgatcg tggatactaa agcttatagc      1500
ggaggttata atctgccaat tggccaagca gatgaaatgc aacgatatgt cgaagaaaat      1560
caaacacgaa acaaacatat caacactaat gaatggtgga aagtctatcc atcttctgta      1620
acggaattta agtttttatt tgtgagtggc cactttaag gaaactaca agctcagctt      1680
acacgattaa atcatatcac taattgtaat ggagctgttc ttagtgtaga agagctttta      1740
attggtggag aatgattaa agccggcaca ttaaccttag aggaagtgag acggaattt      1800
aataacggcg agataaactt tggatcttaa      1830

```

<210> 89

<211> 609

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de polipéptido de FHT-ZFN1-T2A-FHT-ZFN2

<400> 89

```

Met Val Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Ser Arg Ala Glu
1          5          10         15
Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Thr Ser Gly
20          25          30
Glu Leu Val Arg His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys
35          40          45
Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Thr Ser Gly His Leu Val Arg
50          55          60
His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Lys Cys Pro Glu Cys
65          70          75          80
Gly Lys Ser Phe Ser Gln Ser Ser Asn Leu Val Arg His Gln Arg Thr
85          90          95
His Thr Gly Gly Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu
100         105         110
Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile
115         120         125

```



ES 2 551 318 T3

Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val  
 130 135 140  
 Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile  
 165 170 175  
 Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn  
 180 185 190  
 Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn  
 195 200 205  
 Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr  
 210 215 220  
 Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe  
 225 230 235 240  
 Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn  
 245 250 255  
 Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu  
 260 265 270  
 Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe  
 275 280 285  
 Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Gly Ser Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu  
 290 295 300  
 Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys  
 305 310 315 320  
 Val Glu Asp Pro Ser Arg Ala Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys  
 325 330 335  
 Gly Lys Ser Phe Ser Arg Ala Asp Asn Leu Thr Glu His Gln Arg Thr  
 340 345 350  
 His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe  
 355 360 365  
 Ser Gln Ser Ser Asn Leu Val Arg His Gln Arg Thr His Thr Gly Glu  
 370 375 380  
 Lys Pro Phe Lys Cys Pro Glu Cys Gly Lys Ser Phe Ser Thr Ser Gly  
 385 390 395 400  
 Glu Leu Val Arg His Gln Arg Thr His Thr Gly Gly Leu Val Lys Ser  
 405 410 415

ES 2 551 318 T3

Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val  
 420 425 430

Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln  
 435 440 445

Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr  
 450 455 460

Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala  
 465 470 475 480

Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr  
 485 490 495

Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu  
 500 505 510

Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg Asn Lys His Ile Asn  
 515 520 525

Thr Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys  
 530 535 540

Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln Leu  
 545 550 555 560

Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val  
 565 570 575

Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr Leu Thr  
 580 585 590

Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn Phe Gly  
 595 600 605

Ser

- <210> 90
- <211> 22
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
- <400> 90
- ctatccttcg caagaccctt cc 22
- 10 <210> 91
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 15 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
- <400> 91
- gctgcaggt tcagttcggt gttc 24

ES 2 551 318 T3

<210> 92  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia diana de QEQ-ZFN derivada de gen uidA

<400> 92

atgttcttcc cctcctgagg ggaagaatta 30

<210> 93  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos deducida diana de QEQ-ZFN derivada de gen uidA

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6̄)  
 <223> Secuencia "traducida" a codón de parada

<400> 93

**Met Phe Phe Pro Ser Xaa Gly Glu Glu Leu**

20 **1 5 10**

<210> 94  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Secuencia diana de QEQ-ZFN derivada de gen uidA tras reparación errónea de la rotura bicatenaria

<400> 94

atgttcttcc cctccgggga agaatta 27

<210> 95  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos deducida diana de QEQ-ZFN derivada de gen uidA con reparación errónea

35 <400> 95

**Met Phe Phe Pro Ser Gly Glu Glu Leu**

**1 5**

<210> 96  
 <211> 77  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> NT-GUS-parada

<400> 96

**ctgcagtcga cggtagcatg ttcttcccct cctgagggga agaattacgt cctgtagaaa 60**

**ccccaaccg tgaaatc 77**

45 <210> 97

ES 2 551 318 T3

	<211> 78		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> N-t7		
	<400> 97		
	<b>ctgcagtcga cggtaccatg ttcttccct cctggagggg aagaattacg tcctgtagaa</b>		<b>60</b>
	<b>acccaaccc gtgaaatc</b>		<b>78</b>
	<210> 98		
	<211> 78		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Pet47		
	<400> 98		
	<b>ctgcagtcga cggtaccatg ttcttccct cctgaagggg aagaattacg tcctgtagaa</b>		<b>60</b>
15	<b>acccaaccc gtgaaatc</b>		<b>78</b>
	<210> 99		
	<211> 79		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> Pet41		
	<400> 99		
	<b>ctgcagtcga cggtaccatg ttcttccct cctgtgaggg gaagaattac gtcctgtaga</b>		<b>60</b>
	<b>aacccaacc cgtgaaatc</b>		<b>79</b>
	<210> 100		
25	<211> 77		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Pet30		
30	<400> 100		
	<b>ctgcagtcga cggtaccatg ttcttcccca cccgagggga agaattacgt cctgtagaaa</b>		<b>60</b>
	<b>ccccaaccg tgaaatc</b>		<b>77</b>
	<210> 101		
	<211> 77		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Pet29		
	<400> 101		
	<b>ctgcagtcga cggtaccatg ttcttccct cttgagggga agaattacgt cctgtagaaa</b>		<b>60</b>
	<b>ccccaaccg tgaaatc</b>		<b>77</b>
40	<210> 102		
	<211> 75		

ES 2 551 318 T3

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> N-t115		
5	<400> 102		
	<b>ctgcagtcga cggtagcatg ttcttcccct cgaggggaag aattacgtcc tgtagaaacc</b>	<b>60</b>	
	<b>ccaacccgtg aaatc</b>	<b>75</b>	
	<210> 103		
	<211> 75		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> N-t11		
	<400> 103		
	<b>ctgcagtcga cggtagcatg ttcttcccct tgaggggaag aattacgtcc tgtagaaacc</b>	<b>60</b>	
	<b>ccaacccgtg aaatc</b>	<b>75</b>	
15	<210> 104		
	<211> 73		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
20	<223> N-t6		
	<400> 104		
	<b>ctgcagtcga cggtagcatg ttcttcccct aggggaagaa ttacgtcctg tagaaacccc</b>	<b>60</b>	
	<b>aaccctgaa atc</b>	<b>73</b>	
	<210> 105		
	<211> 74		
25	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Pet62		
	<400> 105		
	<b>ctgcagtcga cggtagcatg ttcttcccct gaggggaaga attacgtcct gtagaaaccc</b>	<b>60</b>	
30	<b>caacccgtga aaatc</b>	<b>74</b>	
	<210> 106		
	<211> 72		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> N-t4		
	<400> 106		
	<b>ctgcagtcga cggtagcatg ttcttcccct cggaagaat tacgtcctgt agaaaccca</b>	<b>60</b>	
	<b>accctgaaa tc</b>	<b>72</b>	
40	<210> 107		
	<211> 72		
	<212> ADN		

ES 2 551 318 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> N-t114	
	<400> 107	
	<b>ctgcagtcga cggtagcatg ttcttcccct ggggaagaat tacgtcctgt agaaaccca</b>	<b>60</b>
5	<b>accgtagaaa tc</b>	<b>72</b>
	<210> 108	
	<211> 72	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> N-t101	
	<400> 108	
	<b>ctgcagtcga cggtagcatg ttcttcccca ggggaagaat tacgtcctgt agaaaccca</b>	<b>60</b>
	<b>accgtagaaa tc</b>	<b>72</b>
	<210> 109	
15	<211> 68	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Pet26	
20	<400> 109	
	<b>ctgcagtcga cggtagcatg ttcttcggg aagaattacg tcctgtagaa accccaacc</b>	<b>60</b>
	<b>gtgaaatc</b>	<b>68</b>
	<210> 110	
	<211> 60	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Pet49	
	<400> 110	
	<b>ctgcagtcga cggtagcatg ttctcccct cgtcctgtag aaacccaac cgtgaaatc</b>	<b>60</b>
30	<210> 111	
	<211> 58	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Pet48	
	<400> 111	
	<b>ctgcagtcga cggtagggg aagaattacg tcctgtagaa accccaacc gtgaaatc</b>	<b>58</b>
	<210> 112	
	<211> 54	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> N-t104	

# ES 2 551 318 T3

	<400> 112	
	ctgcagtcga cggtagcatg ttacgtcct gtagaaacct caaccctga aatc	54
	<210> 113	
	<211> 51	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Pet51	
	<400> 113	
10	ctgcagtcga cggtagaatt acgtcctgta gaaaccccaa cccgtgaaat c	51
	<210> 114	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> N-t111	
	<400> 114	
	ctgcagtcga cggtagcatg ttctgtaga aacccaacc cgtgaaatc	49
	<210> 115	
20	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Pet34	
25	<400> 115	
	ctgcagtcga cggtagcatg ttctccca acccgtgaaa tc	42
	<210> 116	
	<211> 28	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Pet25	
	<400> 116	
	ctgcagtcga ccccaacct gtgaaatc	28
35	<210> 117	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
	<400> 117	
	tattgagtca aaaggtggcc aagtc	25
	<210> 118	
	<211> 25	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 551 318 T3

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 118  
 gcagatgatc atatgtgttc ttcag 25

5 <210> 119  
 <211> 155  
 <212> ADN  
 <213> *Petunia x hybrida*

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Secuencia de PDS nativa  
 <400> 119  
**tattgagtca aaaggtggcc aagtcagact aaactcacga ataagaaaga tcgagctgaa 60**  
**cgaggatgga agtgtcaagt gttttatact gaataatggc acttcaattg agggagatgc 120**  
**attcgtgttt gctgctccag gtataatata catta 155**

15 <210> 120  
 <211> 155  
 <212> ADN  
 <213> *Petunia x hybrida*

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Secuencia de PDS nativa  
 <400> 120  
**tattgagtca aaaggtggcc aagtcagact aaactcacga ataagaaaga tcgagctgaa 60**  
**cgaggatgga agtgtcaagt gttttatact gaataatggc acttcaattg agggagatgc 120**  
**attcgtgttt gctgctccag gtataatata catta 155**

25 <210> 121  
 <211> 155  
 <212> ADN  
 <213> *Petunia x hybrida*

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Secuencia de PDS nativa  
 <400> 121  
**tattgagtca aaaggtggcc aagtcagact aaactcacga ataagaaaga tcgagctgaa 60**  
**cgaggatgga agtgtcaagt gttttatact gaataatggc acttcaattg agggagatgc 120**  
**attcgtgttt gctgctccag gtataatata catta 155**

35 <210> 122  
 <211> 155  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Mutante de PDS - YPDS6  
 <400> 122



ES 2 551 318 T3

	<b>tattgagtca aaaggtggcc aagtcagact aaactcacga ataagaaaga tcgagctgaa</b>	<b>60</b>
	<b>cgaggatgga agtgtcaagt gttttatact gaataatggc acttcgattg agggagatgc</b>	<b>120</b>
	<b>attcgtgttt gctgctccag gtataatata catta</b>	<b>155</b>
	<210> 123	
	<211> 155	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Mutante de PDS - Y12	
	<400> 123	
	<b>tattgagtca aaaggtggcc aagtcagact aaactcacga ataagaaaga tcgagctgaa</b>	<b>60</b>
	<b>cgaggatgga agtgtcaagt gttttatact gaataatggc acttcagttg agggagatgc</b>	<b>120</b>
	<b>attcgtgttt gctgctccag gtataatata catta</b>	<b>155</b>
10	<210> 124	
	<211> 155	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Mutante de PDS - G38	
	<400> 124	
	<b>tattgagtca aaaggtggcc aagtcagact aaactcacga ataagaaaga tcgagctgaa</b>	<b>60</b>
	<b>cgaggatgga agtgtcaagt gttttatact gaataatggc acttcaactg agggagatgc</b>	<b>120</b>
	<b>attcgtgttt gctgctccag gtataatata catta</b>	<b>155</b>
	<210> 125	
	<211> 155	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Mutante de PDS - G29	
	<400> 125	
	<b>tattgagtca aaaggtggcc aagtcagact aaactcacga ataagaaaga tcgagctgaa</b>	<b>60</b>
	<b>cgaggatgga agtgtcaagt gttttatact gaataatggc acttcaatta agggagatgc</b>	<b>120</b>
25	<b>attcgtgttt gctgctccag gtataatata catta</b>	<b>155</b>
	<210> 126	
	<211> 155	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Mutante de PDS - Y19	
	<400> 126	
	<b>tattgagtca aaaggtggcc aagtcagact aaactcacga ataagaaaga tcgagctgaa</b>	<b>60</b>
	<b>cgaggatgga agtgtcaagt gttttatact gaataatggc actccaatcg agggagatgc</b>	<b>120</b>
	<b>attcgtgttt gctgctccag gtataatata catta</b>	<b>155</b>
	<210> 127	

ES 2 551 318 T3

<211> 155  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Mutante de PDS - Y22

<400> 127

**tattgagtca aaaggtggcc aagtcagact aaactcacga ataagaaaga tcgagctgaa 60**  
**cgaggatgga agtgtaagt gttttatact gaataatggc acttcaatcg agggagatgc 120**  
**attcgtgttt gctgctccag gtataatata catta 155**

<210> 128  
 <211> 155  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Mutante de PDS - YPDS11

<400> 128

**tattgagtca aaaggtggcc aagtcagact aaactcacga ataagaaaga tcgagctgaa 60**  
**cgaggatgga agtgtaagt gttttatact gaataatggc actttaattg agggagatgc 120**  
 15 **attcgtgttt gctgctccag gtataatata catta 155**

<210> 129  
 <211> 678  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia codificante de DsRed2 (n.º de registro de GB AY818373 nucleótidos 1395-2074)

<400> 129

**atggcctcct ccgagaacgt catcaccgag ttcattgcct tcaaggtgag catggagggc 60**  
**accgtgaacg gccacgagtt cgagatcgag ggcgagggcg agggccgccc ctacgagggc 120**  
**cacaacaccg tgaagctgaa ggtgaccaag ggcggcctcc tgccttcgc ctgggacatc 180**  
**ctgtccccc agttccagta cggtccaag gtgtactgta agcaccctgc cgacatcccc 240**  
**gactacaaga agctgtcctt ccccgagggc ttcaagtggg agcgcgtgat gaacttcgag 300**  
**gacggcggcg tggcgaccgt gaccagggc tcctccctgc aggacggctg ctatcatctac 360**  
**aagggtgaagt tcattcggct gaacttcccc tccgacggcc ccgtgatgca gaagaagacc 420**  
**atgggctggg aggctccac cgagcgcctg taccctccgc acggcgtgct gaaggcgag 480**  
**accacaagg ccctgaagct gaaggacggc ggcactacc tggaggagtt caagtccatc 540**  
**tacatggcca agaagcccgt gcagctgccc ggtactact acgtggacgc caagctggac 600**  
**atcacctccc acaacgagga ctacaccatc gtggagcagt acgagcgac cgagggccgc 660**  
**caccacctgt tcctgtga 678**

<210> 130  
 <211> 720  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia codificante de EGFP

25

ES 2 551 318 T3

<400> 130

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60

ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120

ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180

ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccgga ccacatgaag 240

cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300

ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360

gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420

aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480

ggcatcaagg tgaacttaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540

gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600

tacctgagca cccagtcgcc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660

ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtga 720

5 <210> 131  
<211> 217  
<212> ADN  
<213> *Petunia x hybrida*

<220>  
<221> misc\_feature  
10 <223> Exón de PDS

<400> 131

caggagaaac atggttcaaa aatggccttt ttagatggta atcctcctga gagactttgc 60

atgccgattg ttgaacatat tgagtcaaaa ggtggccaag tcagactaaa ctcaagaata 120

agaaagatcg agctgaacga ggatggaagt gtcaagtgtt ttatactgaa taatggcact 180

tcaattgagg gagatgcatt cgtgtttgct gctccag 217

15 <210> 132  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Un fragmento corto complementario del exón de PDS de *Petunia x hybrida*

<400> 132

20 gtgaagttaa ctccctctac gt 22

<210> 133  
<211> 141  
<212> ADN  
<213> *Petunia x hybrida*

25 <220>  
<221> misc\_feature  
<223> Exón de FHT

<400> 133

ES 2 551 318 T3

	<b>cacactgac caggaacat cactctcttg ttacaagacc aagttggtgg gcttcaagct</b>	<b>60</b>
	<b>actaaagata atggcaaac ttggatcact gttcagcctg ttgaaggtgc ttttgttgc</b>	<b>120</b>
	<b>aatcttggtg accacggtca t</b>	<b>141</b>
	<210> 134	
	<211> 23	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Un fragmento corto complementario del exón de FHT de <i>Petunia x hybrida</i>	
	<400> 134	
	gacaagtcgg acaactcca cga	23
10	<210> 135	
	<211> 9	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Sitio de unión a TS1 para las ZFN en el gen PDS	
	<400> 135	
	ggagatgaca	9
	<210> 136	
	<211> 9	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sitio de unión a TS2 para las ZFN en el gen PDS	
	<400> 136	
25	cacttcaat	9
	<210> 137	
	<211> 6	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Sitio MfeI usado para la selección y el aislamiento de mutantes de PDS mediados por las ZFN	
	<400> 137	
	caattg	6
	<210> 138	
35	<211> 174	
	<212> ADN	
	<213> <i>Pisum sativum</i>	
	<220>	
	<221> misc_feature	
40	<223> Secuencia de RSSU	
	<400> 138	
	<b>atggettcta tgatatactc ttccgctgtg acaacagtca gccgtgcttc tagggtgcaa</b>	<b>60</b>
	<b>tccgcgccag tggtccatt cggcggcctg aaatccatga ctggattccc agtgaagaag</b>	<b>120</b>
	<b>gtcaacactg acattacttc cattacaagc aatggtggaa gagtaaagtg catg</b>	<b>174</b>

ES 2 551 318 T3

	<210> 139	
	<211> 156	
	<212> ADN	
	<213> <i>Nicotiana sylvestris</i>	
5	<400> 139	
	<b>cgggcggttc tcacctctct cctccgtcaa tcggctcaac gtggcggcgg tccaatttcc</b>	<b>60</b>
	<b>cgatccttgg gaaactccat ccctaaatcc gctgcacgcg cctcttcacg cgcgtcccct</b>	<b>120</b>
	<b>aagggattcc tcttaaaccg cgcgcccgta cagtac</b>	<b>156</b>
	<210> 140	
	<211> 9	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de sitio diana de PDS-ZFN1	
	<400> 140	
	ggagatgca	9
15	<210> 141	
	<211> 9	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Secuencia de sitio diana PDS-ZFN2	
	<400> 141	
	gtgaagtta	9
	<210> 142	
	<211> 9	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de sitio diana de FHT-ZFN1	
	<400> 142	
30	gaagtgct	9
	<210> 143	
	<211> 9	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Secuencia de sitio diana de FHT-ZFN2	
	<400> 143	
	gacaagtcg	9

**REIVINDICACIONES**

1. Método de generación de variación genotípica en un genoma de una planta, comprendiendo el método introducir en la planta al menos un vector de expresión del virus del cascabeleo del tabaco (TRV) que codifica para al menos una nucleasa quimérica que comprende un dominio de unión a ADN, una nucleasa y una señal de localización para un orgánulo que contiene ADN, en el que dicho dominio de unión a ADN media en el direccionamiento específico de dicha nucleasa al genoma de la planta, y en el que una secuencia de ácido nucleico de dicho vector de expresión de TRV carece de la secuencia 2b expuesta en SEQ ID NO: 43, generando de ese modo variación genotípica en el genoma de la planta.
2. Método de tratamiento de una infección de una planta por un patógeno, comprendiendo el método introducir en la planta al menos un vector de expresión del virus del cascabeleo del tabaco (TRV) que codifica para al menos una nucleasa quimérica que comprende un dominio de unión a ADN y una nucleasa, en el que dicho dominio de unión a ADN media en el direccionamiento de dicha nucleasa al genoma del patógeno, y en el que una secuencia de ácido nucleico de dicho vector de expresión de TRV carece de la secuencia 2b expuesta en SEQ ID NO: 43, previendo o tratando de ese modo una infección de una planta por un patógeno.
3. Método según la reivindicación 1, para su uso en la generación de esterilidad masculina en una planta, comprendiendo el método regular por incremento en la planta un gen estructural o funcional de una mitocondria o un cloroplasto asociado con esterilidad masculina introduciendo en la planta al menos un vector de expresión del virus del cascabeleo del tabaco (TRV) que codifica para al menos una nucleasa quimérica que comprende un dominio de unión a ADN, una nucleasa y una señal de localización de mitocondria o cloroplasto y un constructo de expresión de ácido nucleico que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga que puede regular por incremento dicho gen estructural o funcional de una mitocondria o un cloroplasto cuando se direcciona al interior del genoma de dicha mitocondria o dicho cloroplasto, en el que dicho dominio de unión a ADN media en el direccionamiento de dicha secuencia de ácido nucleico heteróloga al genoma de la mitocondria o el cloroplasto, generando de ese modo esterilidad masculina en la planta; o método según la reivindicación 1, para su uso en la generación de una planta resistente a herbicidas, comprendiendo el método introducir en la planta al menos un vector de expresión del virus del cascabeleo del tabaco (TRV) que codifica para al menos una nucleasa quimérica que comprende un dominio de unión a ADN, una nucleasa y una señal de localización de cloroplasto, en el que dicho dominio de unión a ADN media en el direccionamiento de dicha nucleasa a un gen que confiere sensibilidad a herbicidas, generando de ese modo la planta resistente a herbicidas.
4. Vector de expresión viral de plantas que comprende una estructura principal de pTRV y que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para al menos una nucleasa quimérica que comprende un dominio de unión a ADN, una nucleasa y una señal de localización para un orgánulo que contiene ADN, careciendo dicha secuencia de ácido nucleico de la secuencia 2b expuesta en SEQ ID NO: 43.
5. Vector de expresión basado en pTRV que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para al menos dos secuencias de polipéptidos heterólogas, careciendo dicha secuencia de ácido nucleico de la secuencia 2b expuesta en SEQ ID NO: 43.
6. Planta transgénica que comprende el vector de expresión de plantas según las reivindicaciones 4 ó 5.
7. Método según la reivindicación 1, en el que dicha generación de variación genotípica es transitoria.
8. Métodos según las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en los que dicho al menos un vector de expresión de TRV codifica para dos nucleasas quiméricas.
9. Vector de expresión viral de plantas según la reivindicación 4 o planta transgénica según la reivindicación 6, en los que dicho vector de expresión viral codifica para dos nucleasas quiméricas.
10. Vector de expresión viral de plantas según la reivindicación 4 o planta transgénica según la reivindicación 6, que comprenden además una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido heterólogo.
11. Vector de expresión viral de plantas según la reivindicación 4, vector de expresión basado en pTRV según la reivindicación 5 o planta transgénica según la reivindicación 6, en los que dicha secuencia de ácido nucleico comprende un potenciador  $\Omega$  (SEQ ID NO: 44) y/o comprende dos promotores subgenómicos (sgP) separados.
12. Vector de expresión basado en pTRV según la reivindicación 5 o planta transgénica según la reivindicación 6, en los que dichas dos secuencias de polipéptidos heterólogas están separadas por una secuencia de ácido nucleico que codifica para un dominio de escisión, en los que dicho dominio de escisión comprende una secuencia de proteína de tipo T2A (SEQ ID NO: 40), y/o en los que dicha secuencia de aminoácidos de al menos dos secuencias de polipéptidos heterólogas es tal como se expone en las SEQ ID NO: 85, 87 u

89.

- 5
13. Vector de expresión basado en pTRV según la reivindicación 5 o planta transgénica según la reivindicación 6, en los que dichas al menos dos secuencias de polipéptidos heterólogas comprenden proteínas quiméricas, en los que cada una de dichas proteínas quiméricas comprende un dominio de unión a ADN, una nucleasa y una señal de localización para un orgánulo que contiene ADN.
14. Métodos según las reivindicaciones 1, 2, 3 o planta transgénica según la reivindicación 6, en los que la planta es una *Petunia hybrida* o una *Nicotiana tabacum*.
- 10
15. Métodos o planta transgénica según la reivindicación 14, en los que dicho direccionamiento específico de dicha nucleasa al genoma de dicha *Petunia hybrida* es a una fitoeno desaturasa (PDS) o una flavanona 3 beta-hidroxilasa (FHT) de dicha *Petunia hybrida*.
16. Métodos según las reivindicaciones 1, 2 ó 3, vector de expresión viral de plantas según la reivindicación 4 o planta transgénica según la reivindicación 6, en los que dicha al menos una nucleasa quimérica comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 71, 73, 75, 77, 85, 87 u 89.
- 15
17. Métodos según las reivindicaciones 1, 2, 3, vector de expresión viral de plantas según la reivindicación 4 o planta transgénica según la reivindicación 6, en los que dicha al menos una nucleasa quimérica es una meganucleasa.
- 20
18. Vector de expresión viral de plantas según la reivindicación 4, vector de expresión basado en pTRV según la reivindicación 5 o planta transgénica según la reivindicación 6, en los que dicha secuencia de ácido nucleico ha experimentado una delección de una secuencia codificante de proteína de la cubierta nativa.

**FIG. 1**

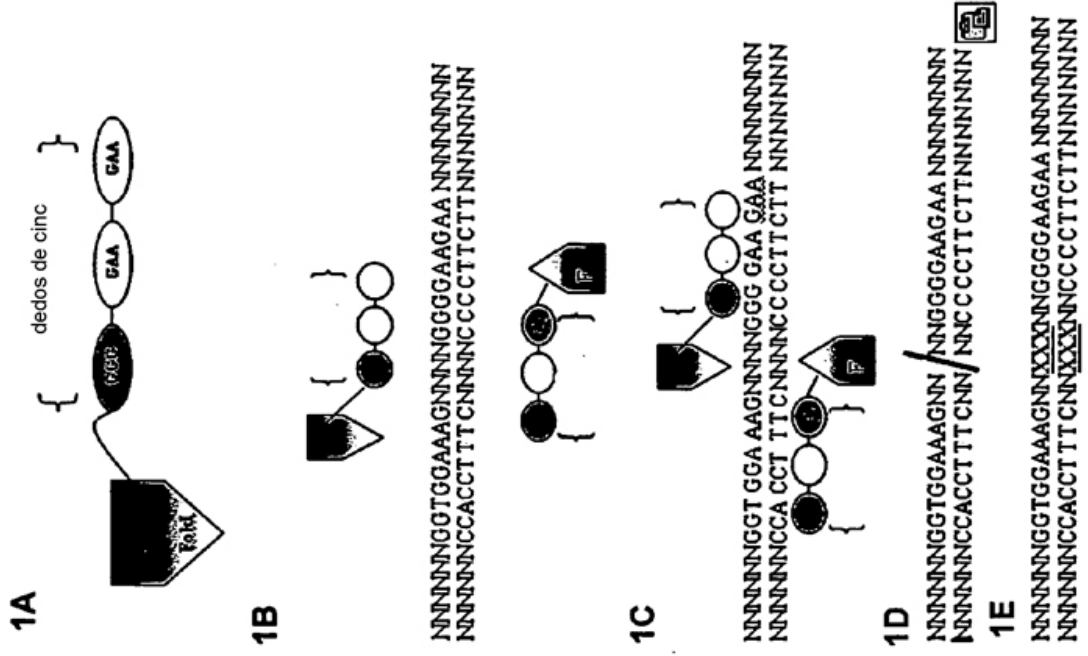
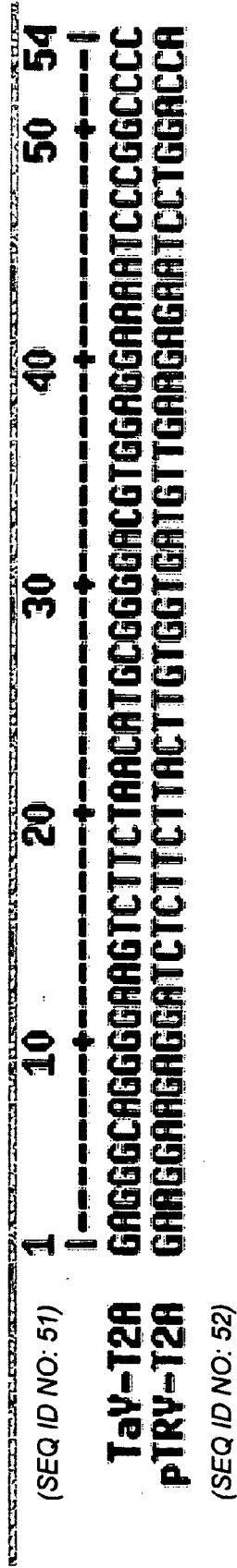




FIG. 2A



**FIG. 2B**

GAATTGGACATGTGCCAAATGGATAGAGTGGAAATCCTCCTACTTTGGGGCGG  
 AATCCTCTACCTCAATATGATGCGAGGAGCGGAATCCTCCTACTCCTA  
 GGGCGGAATCCTCATACCCTCAATATGATGCAAGGAGCGGAATCCTCCTA  
 CTCCTAGGTGGAATCCTCCTACCCTCAATATGATGCAAGGAGTGGAAATC  
 CTCCTACCCTCATTATGATGCAAGGAGCAGAAATCCTCCTCCTAGGAC  
 GGAATCCTCTTACCCTCAATATGATGTAAGGAGCGGAATCCTCCTGCTCC  
GAGGGGAATCCCTCCTGCCCTGCAATATAATAAAGTTGAGGCGGAAATAC  
 TCCATAATCATAATATGGCATTAGCAGCCCCATAACCAAAAATAATAATAC  
 ATATGAATGGGTATGATACAATAACAACCCCTCACCCGGTGGGGACCCCT  
 TATCGGTTGCCAAAAGTATATGTCAAGCTCAGAACCAGAGTACAATGCT  
 CAGATGCTCAATATAATACCAACAACAGGACATAACATAATAATACAAT  
 ATAAATCCAAAAGCTAAGGCGTAATGAGTAGCCCTATCGGTAGCTACACAC  
 GTAAGGAACACGTGGTAGAATATCCACAAGGCCAAGGCCGCCCAAAGAAA  
 TGGATAATAATCACCTTACCTTATCCAAAAGTGTACTCAACAACCCGCTTTG  
 TCCTTTGGGTTCACTGCCAAAACGATCCCACCTCTATTCAATAAGCAGAAA  
 ATATATCAAAATAGGCTAAAGGCTTCATTCCCTTACATCCTAGAACAAATC  
 GGTAGGAACCCCAACACCCATTTGAAATAGACAATACGCGGTCCAGGCCCT  
 ATGTATATGGTTCAAATCACATAATCAAACCCATAATAAATTACATTTA  
 CGGGTCCAATTAACGAATATAATAATCAATCCATTATCGGGTCCAAT  
 AACCCTTGAAACTATCAATTTAACTTATTAAAACGATTTTAAATATCCC  
 AATTTCTACCGTCAAATATAATCAAACACATGTAATAGACTAAAATAATGAATTAACAT  
 CCTTACCCTGGATGTTTCGGGTTGAAAAATCTATTTTTTCCCTCCTTTTCTAT  
 TCTCTCTTCTTGCCTTTTTTTTCTCGTTGCGGTCCTCAATTTGTTTCTGTTTCTGTT  
 TCCATTTGCAAATGTAAGCTT

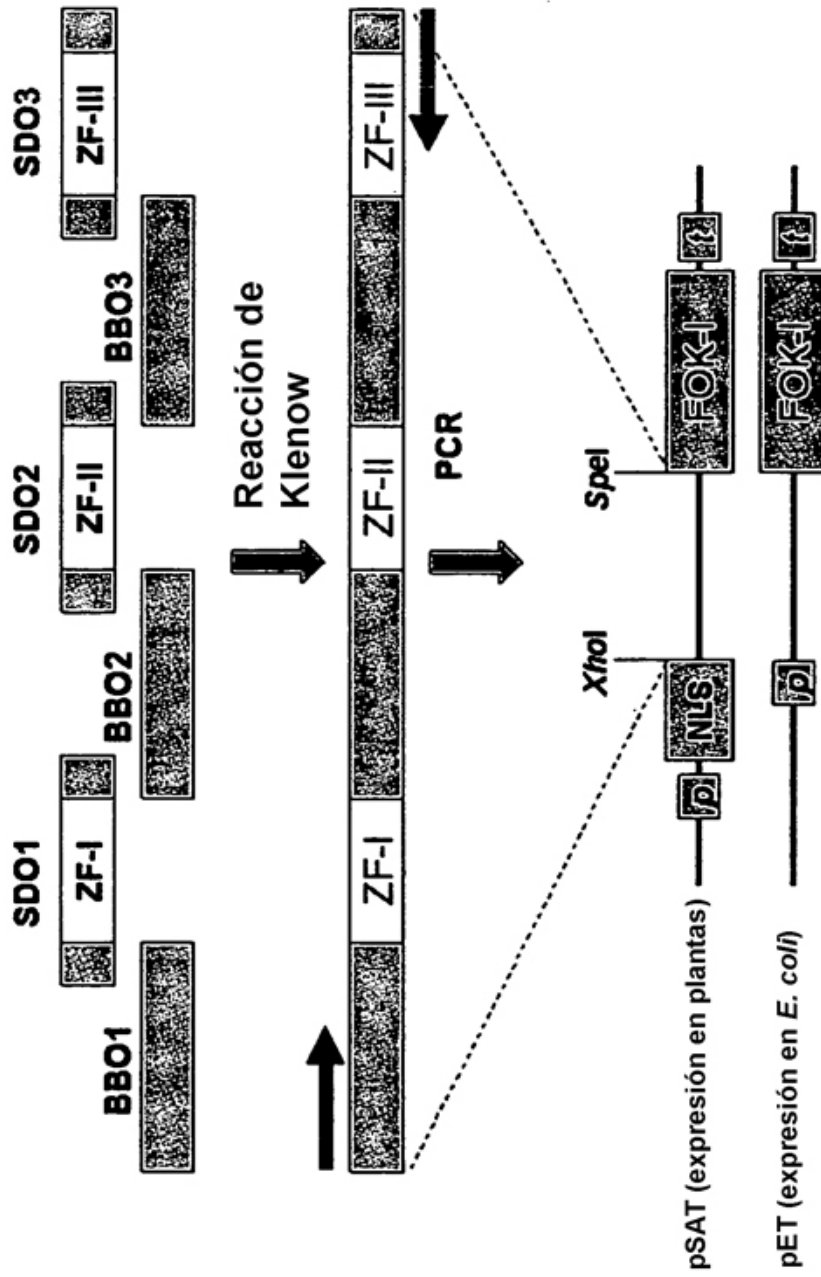
(SEQ ID NO: 8)

FIG. 3

GAA TTCTA TAGAATGGCTGACTATGCACTAGAACTAGTCCATGAACCTTCCG  
 AGAATGTTCAAGATTTATTGATGACCTTCTTTTTCTAGAGATCCCAG  
 ATGGCTCGAGAGATTGACGTCGGATTTTCATTTGATGTTGTTTATAT  
 TGCCCGAAGGTACGAGGCATATCATAAGTTAGAGCGGGAAGTTAGAGC  
 AGGAGCAAGAGATCCCGTGGCCCTAGTGGCAACCGTGGTACCTCATT  
 TGGAGGTAAGAGTTCTGGTTATTTGGGAGGTCACCTTCCAGGTTATCTC  
 AGCTTGTGCATGTGATTC TTAGAGTGC CGGGTAGTTTCATCAAGATTAG  
 ACTCAGCTTCTCTTTGTAGCTTTCACAAATCTGTCCAGCTCCCATATTC  
 AGCGAAAAGGTGTTATCATTCTCTTTGTAGCTTTCACAAATCTGTCTGCG  
 TCAGTTGTAAGGGATTTTCATTTAGATCTTAATCAGCAAAGAAAT**ACCCAC**  
**CATCCAA TAGAGGTTGAGAGTGTGGTGGCAGTGGTTCTCCAGAAAGTGAT**  
 TGCCAGGGTAGTGGCTCAGCTCAGCTGCAGAGGCCAGTTTTATGAAC TGCC  
 AGCTGGCAGGATGTTGAGGTATCTGATGTAGTACATCCATGATTTCTT  
 CTTCCATTATATGTGAGTAAATTTTCATTTCTCTGATCGGCTGGACTTC  
 ATTTATTTTACCATGTTTCCATGGTCTCTTTGGATATTGTTTCTATTAAG  
 AATTGATTGCGGTAGAGGGGTGAGCTTCTAGTATGATTTATTC AAGGAAT  
 T TGTGAGACCC TATTAATTTA TCTGGTCTAAATATGAGAGATTTGACAA  
 TGAGTGTGTTATTGCTGCCCTGGCATCTTGTGTGCCACCTTCTATTAT  
 TATATCAAATTAGTTTACCTCTCTCTCGGAATCCGTTGGTTGGATT  
 ATGGGATTC TAGTTCATCACCAATAAGGGAGTGCATGGTTTCTTCCAGTG  
 TAAAGTGATTAGTAAGTAATAGTCGATCTACGTATCTCCTCTTGGTTCAA  
 AACGCTAGTAAAGTCATGTGATCGTATGAGCTTGTCTGGATTATAAAAGG  
 GTTTTCTGGTAAATTTGTAGAGTTTCTTATTATTGGGAGATTAAATTTGG  
 CATGGAAAGTTGTTCCATAAAGCTT

(SEQ ID NO: 9)

FIG. 4



**FIG. 5A**

NLS-P1-25-ZFN1  
 ATGGTGccaaaaaagaagagaagtagaagaccctcTCGAGCTGAAAAACCTTACAAGTGCCTGAATGTGGAAAGTCTTTTTCT  
 CAGCGTGTCTATCTTGAACGTCAACAGCAGCGAACACACACAGGTGAGAAAGCCATATAAATGCCCAGAAATGTGGTAAATCAT  
 TCAGTCAGCGTGTCTATCTTGAACGTCAACAGCAGCGAACCCACACCGGGGAGAAAGCCATTTAAATGCCCTGAGTGCGGGA  
 AGAGTTTTTCACAGTCTGGAGATTTGGTCGTCTCAACGTACTCATACTGGAGGACTAGTCAAAAGTGAACCTGGAGGA  
 GAAGAAATCTGAACCTCGTCATAAAATTGAAATATGTCCCTCATGAATATAATTGAATTAATTGAAATGCCAGAAAATCCAC  
 TCAGGATAGAAATCTTGAATGAAGGTAATGGAAATTTTATGAAAGTTTATGGATATAGAGGTAAACATTTGGGTGGAT  
 CAAGGAAACCGGACGGAGCAATTTACTGTGGATCTCCTATTGATTACGGTGTGATCGTGGATACTAAAGCTTATAG  
 CGAGGTTATAATCTGCCAATTTGGCCAAAGCAGATGAAATGCAACGATATGTCGAAAGAAAATCAAACACGAAACAAACAT  
 ATCAACCCCTAATGAATGGTGGAAAGTCTATCCATCTCTGTAACGGAAATTTAAGTTTTTATTTGTGAGTGGTCACTTTTAAA  
 GGAAACTACAAAGCTCAGCTTACACGATTAATCAATCACTAATTTGTAATGGAGCTGTTCTTAGTGTAGAAGAGCTTTT  
 AATTGGTGGAGAAATGATTAAGCCGGCACATTAACCTTAGAGGAAGTGAGACGGGAAATTTAATAACGGCGGAGATAAAC  
 TTTGGATCCTAA  
 (SEQ ID NO: 31)

**FIG. 5B**

NLS-P1-25-ZFN2  
 ATGGTGccaaaaaagaagagaagtagaagaccctcTCGAGCTGAAAAACCTTACAAGTGCCTGAATGTGGAAAGTCTTTTTCTC  
 AGTCTAGCAACCTGCAGAAAGCACAGCGAACACACACAGGTGAGAAAGCCATATAAATGCCCAGAAATGTGGTAAATCAT  
 CAGTCGTTCTGATAAGTTGGTTCGTCAACCAACGGACCCACACCGGGGAGAAAGCCATTTAAATGCCCTGAGTGCGGGA  
 GAGTTTTTCACGTTCTGATAATTTGGTTCGTCTCAACGTACTCATACTGGAGGACTAGTCAAAAGTGAACCTGGAGGAGA  
 AGAAATCTGAACCTCGTCATAAAATTGAAATATGTCCCTCATGAATATAATTGAATTAATTGAAATGCCAGAAAATCCACTCA  
 GGATAGAAATCTTGAATGAAGGTAATGGAAATTTTATGAAAGTTTATGGATATAGAGGTAAACATTTGGGTGGATCAA  
 GGAAACCGGACGGAGCAATTTACTGTCCGATCTCCTATTGATTACGGTGTGATCGTGGATACATAAGCTTATAGCCGG  
 AGGTTATAATCTGCCAATTTGGCCAAAGCAGATGAAATGCAACGATATGTCGAAAGAAAATCAAACACGAAACAAACATATCA  
 ACCCTAATGAATGGTGGAAAGTCTATCCATCTTCTGTAAACGGAAATTTAAGTTTTTATTTGTGAGTGGTCACTTTAAAGGA  
 ACTACAAAGCTCAGCTTACACGATTAATCAATCACTAATTTGTAATGGAGCTGTTCTTAGTGTAGAAGAGCTTTTAAATTG  
 GTGGAGAAATGATTAAGCCGGCACATTAACCTTAGAGGAAGTGAGACGGGAAATTTAATAACGGCGGAGATAAACCTTTGG  
 ATCCTAA  
 (SEQ ID NO: 32)

**FIG. 5C**

NLS-P1-36-ZFN1  
 ATGGTGccaaaaaagagagaaggtagaagaccctcTCGAGCTGAAAAACCCTTACAAGTGTCCTGAATGTGGAAGTCTTTTTCTA  
 CTTCTGGACATCTGTTTCGTCACCCAGCGAACACACACAGGTGAGAGCCATATAAATGCCCAGAAATGGTAAATCATTC  
 AGTACTTCTGGACATCTGTTTCGTCACCCAGCGAACCCACACCCGGGAGAGCCATATAAATGCCCTGAGTGCAGGAAAG  
 GTTTTTCAACTTCTGGAAATTTGGTTCGTCATCAACCTACTCATACTGGAGGACTAGTCAAAAGTGAACCTGGAGGAAAG  
 AAATCTGAACCTCGTCAATAAATGAAATATGTCCTCATGAATATAATGAAATTAATGAAATGCCAGAAATCCACTCAGG  
 ATAGAAATCTTGAAATGAAGTAAATGGAAATTTTATGAAAGTTTATGAGATATAGAGGTAACATTTGGGTGGATCAAGGA  
 AACCGACGGAGCAATTTATACTGTCGGATCTCCTATTGATTACGGTGTGATCGTGGATACATAAGCTTATAGCGGAGGT  
 TATAATCTGCCAATGGCCAAAGCAGATGAAATGCAACGATATGTCGAAAGAAAATCAAAACACGAAACAAACATATCAACCCCT  
 AATGAATGGTGGAAAGTCTATCCATCTCTGTAACGGAAATTAAGTTTTTATTTGAGTGGTCACTTTAAAGGAAACTACA  
 AAGCTCAGCTTACACGATTAATCATATCATACTAAATGTAATGGAGCTGTTCTTAGTGTAGAAGAGCTTTTAAATTTGGTGGAG  
 AAATGATTAAGCCCGGCACATTAACCTTAGAGGAAGTGAGACGGAAATTTAATAACGGCGAGATAAACCTTTGGATCCTAA  
 (SEQ ID NO: 33)

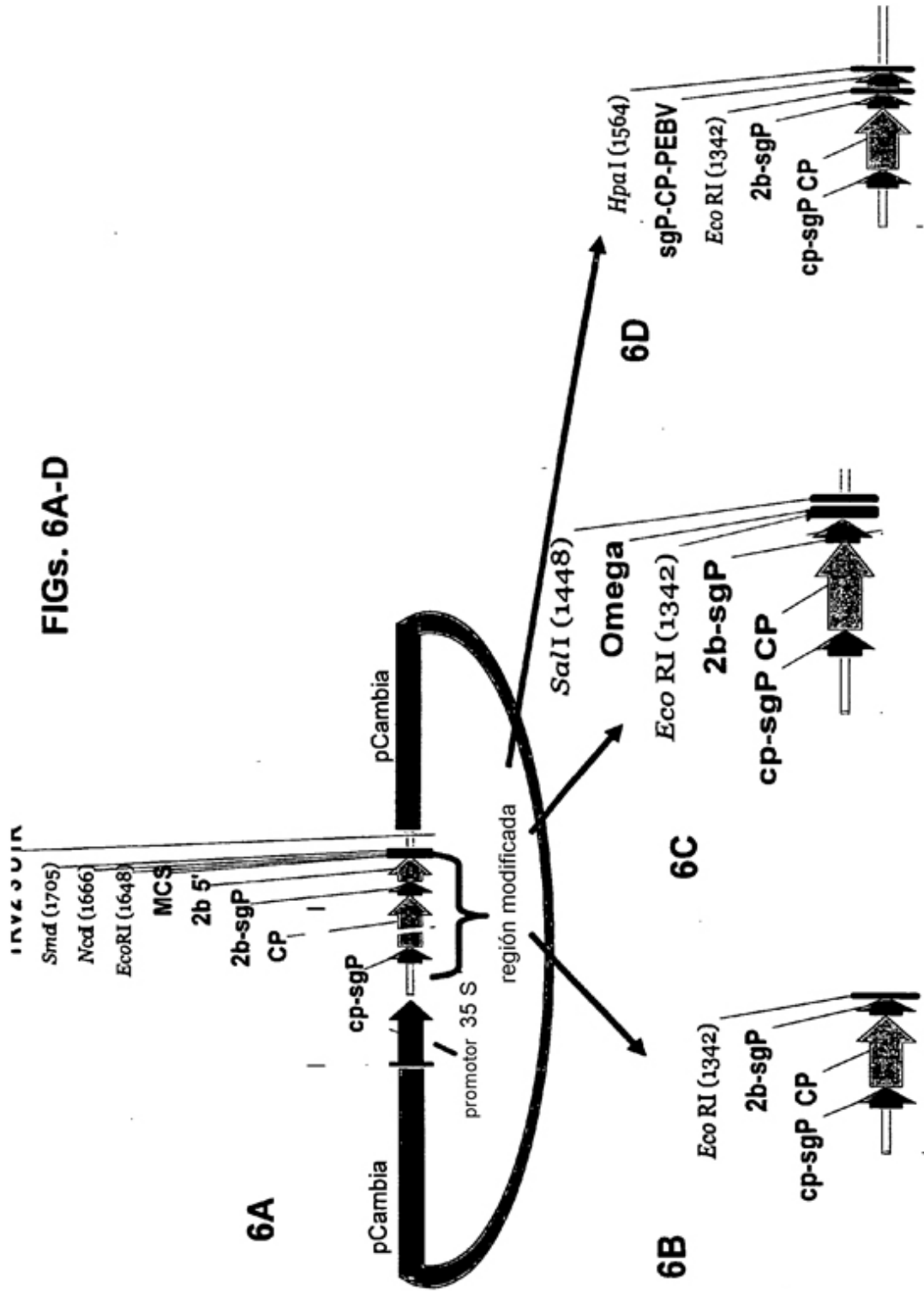
**FIG. 5D**

NLS-P1-36-ZFN2  
 ATGGTGccaaaaaagagagaaggtagaagaccctcTCGAGCTGAAAAACCCTTACAAGTGTCCTGAATGTGGAAGTCTTTTTCTC  
 GTTCTGATAAATTTGGTTCACCCAGCGAACACACACAGGTGAGAAAGCCATATAAATGCCCAGAAATGGTAAATCATTC  
 AGTCAGGCTGGACATTTGGCTTCTCACCAACGGACCCACACCCGGGAGAGCCATTTAAATGCCCTGAGTGCAGGAAAG  
 AGTTTTTCAACTTCTGGACATCTTGTTCGTCACTCAACGTACTCATACTGGAGGACTAGTCAAAAGTGAACCTGGAGGAGAA  
 GAAATCTGAACCTCGTCATAAATGAAATATGTGCCCTCATGAATATAATGAAATTAATGAAATTTGCCAGAAATCCACTCAG  
 GATAGAAATCTGAAATGAAGGTAATGGAATTTTTTATGAAAGTTTATGGATATAGAGGTAACATTTGGGTGGATCAAGG  
 AAACCGGACGGAGCAATTTATACTGTGGATCTCCTATTGATTACGGTGTGATCGTGGATACATAAGCTTATAGCGGAGG  
 TTAATATCTGCCAATGGCCAAAGCAGATGAAATGCAACGATATGTCGAAAGAAAATCAAAACACGAAACAAACATATCAACC  
 CTAATGAAATGGTGGAAAGTCTATCCATCTCTGTAAACGGAAATTAAGTTTTTATTTGAGTGGTCACTTTAAAGGAAACT  
 ACAAGCTCAGCTTACACGATTAATCATATCACTAATGTAATGGAGCTGTTCTTAGTGTAGAAGAGCTTTTAAATTTGGTG  
 GAGAAATGATTAAGCCCGGCACATTAACCTTAGAGGAAGTGAGACGGAAATTTAATAACGGCGAGATAAACCTTTGGATCC  
 TAA  
 (SEQ ID NO: 34)

**FIG. 5E**

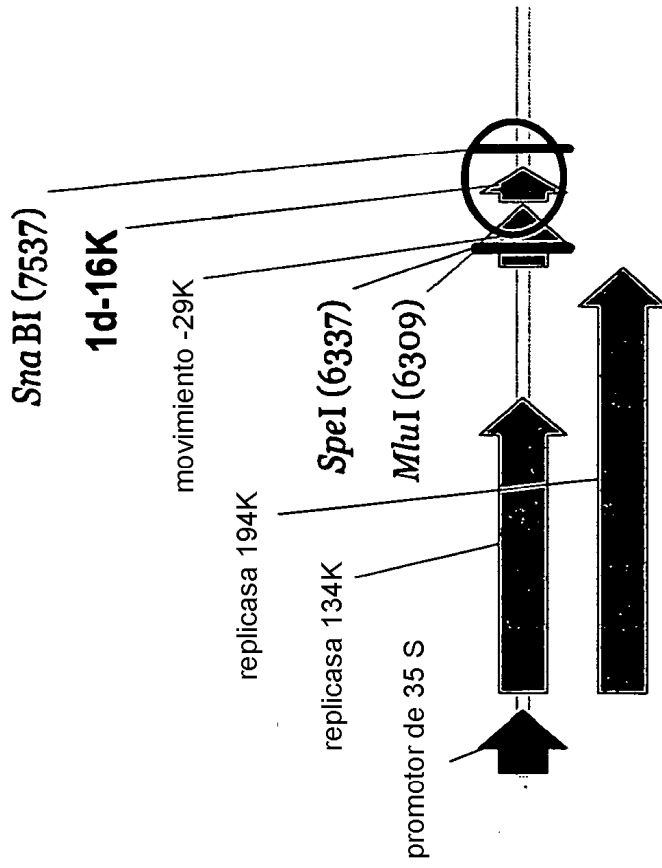
pET28c-SX TCGGATCCGGAATTCGAGCTCCGTCGA.....GCACCACCACCACCACCA  
(SEQ ID NO. 49)

pET28c  
TCGGATCCGGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGGGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCA  
(SEQ ID NO. 39)

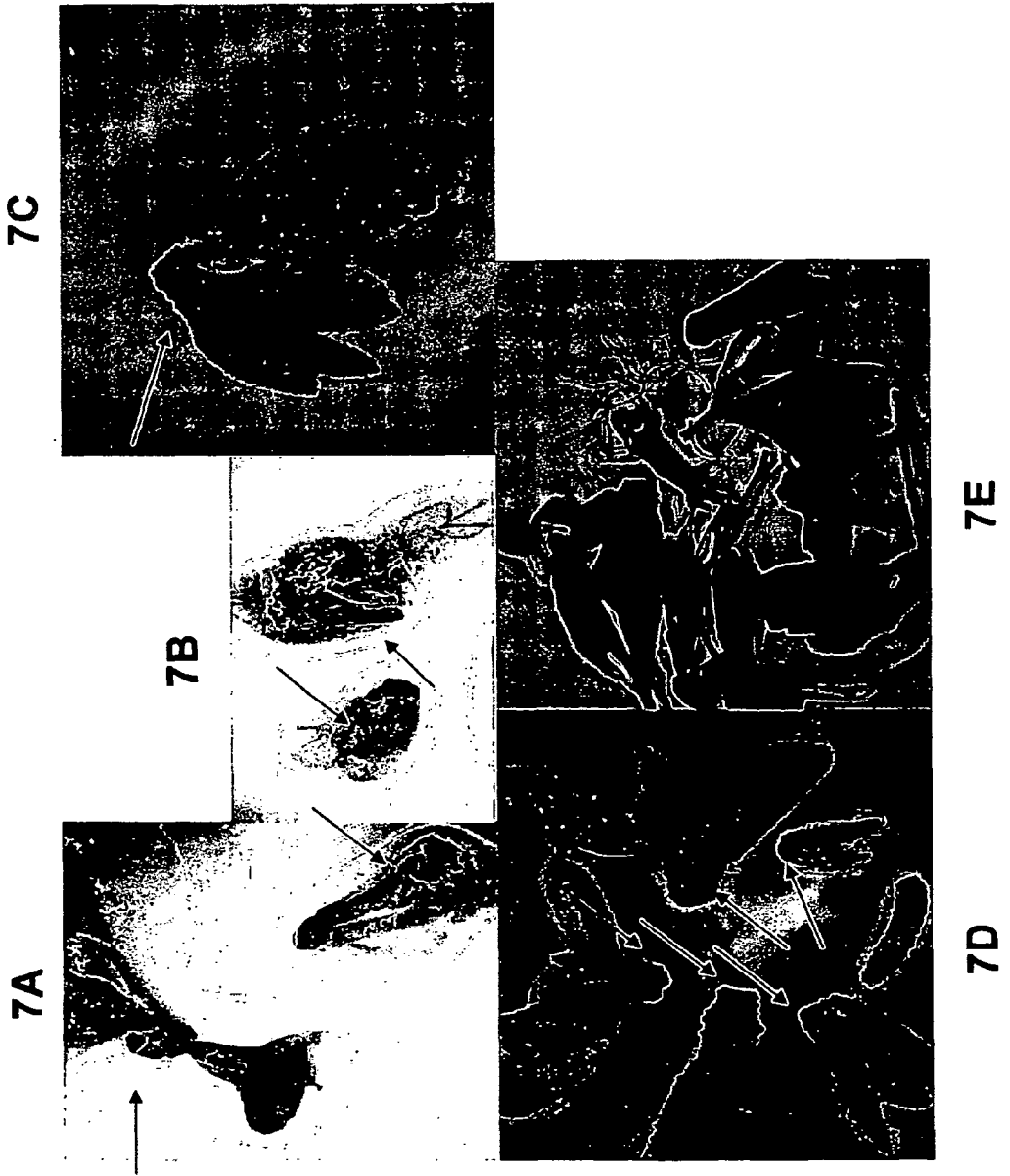




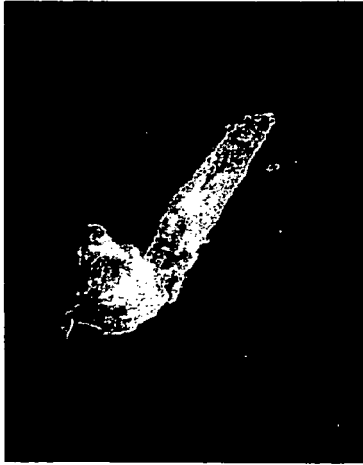
**FIGS. 6E**



FIGS. 7A-E



FIGS. 8A-G



**FIGS. 9A-B**

**9A**

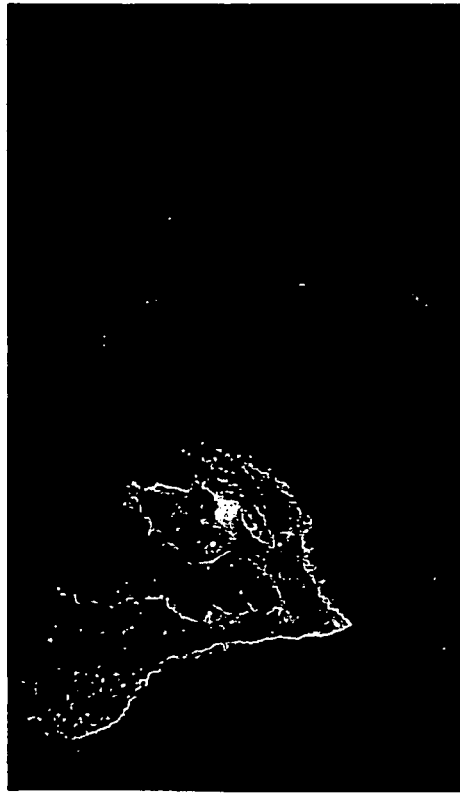


**9B**

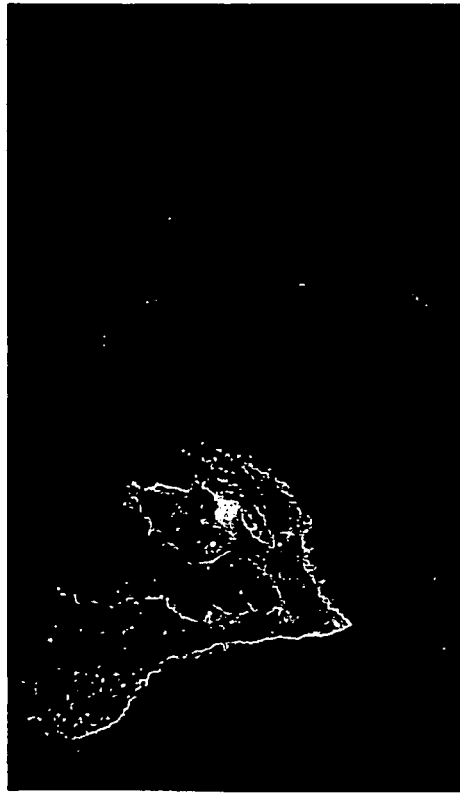


**FIGS. 10A-C**

**10A**



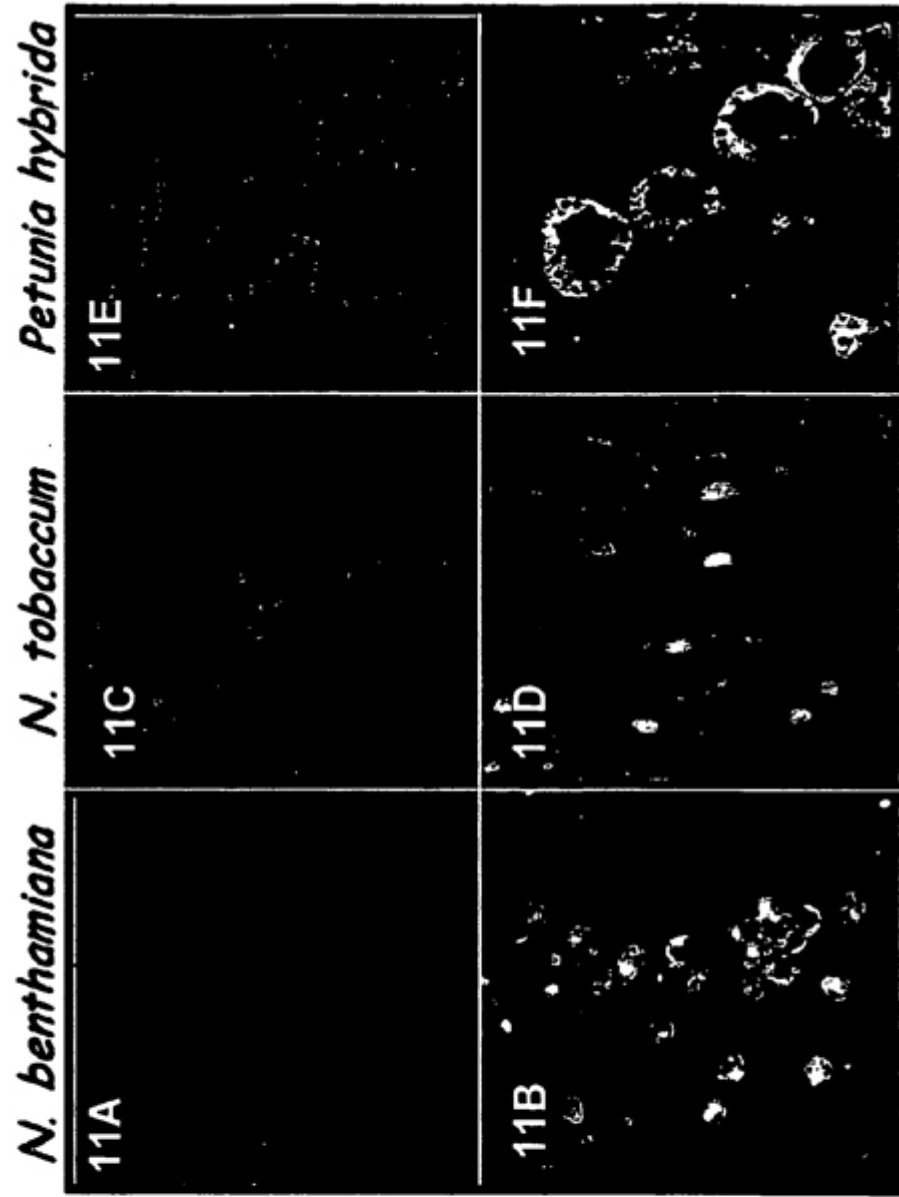
**10B**



**10C**



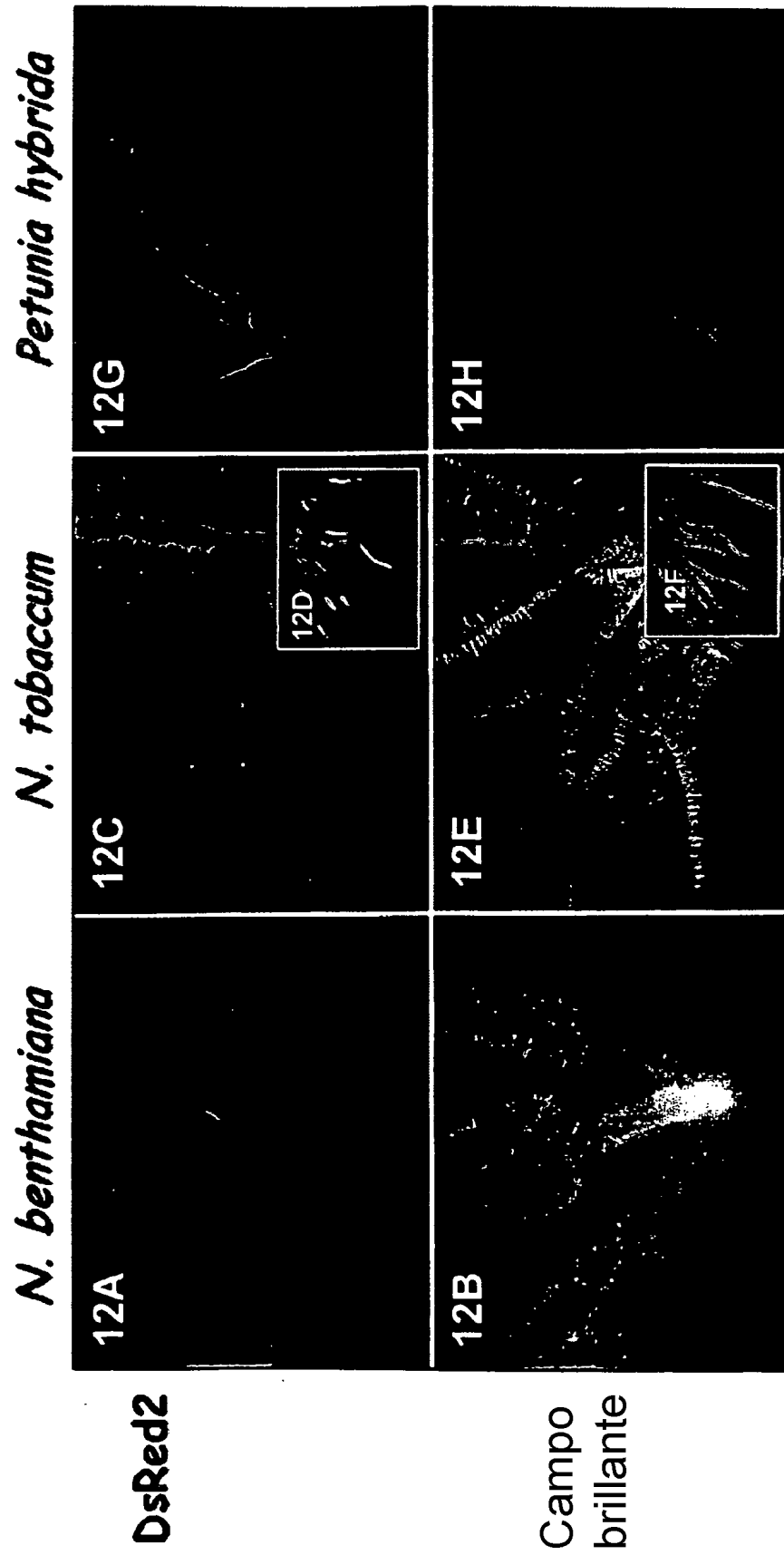
FIGs. 11A-F



Auto-  
fluorescencia  
de cloroplasto

DsRed2

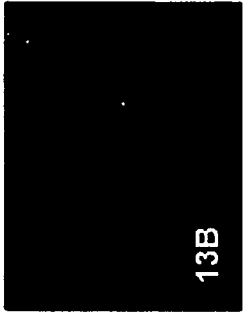
FIGS. 12A-H



FIGS. 13A-K



13A



13B



13C



13D

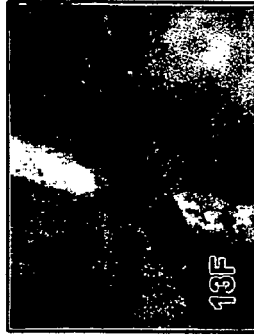
*Cucumis sativus*

*Spinacia oleracea*



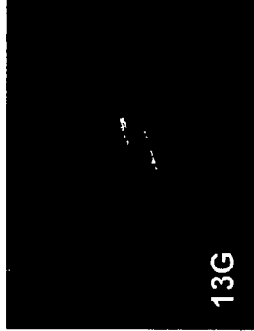
13E

*Beta vulgaris*



13F

*Solanum melongena*

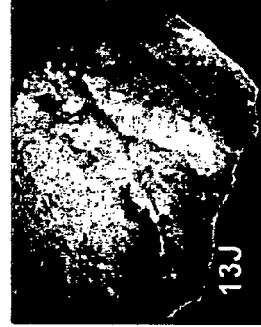


13G



13H

*Gossypium hirsutum*



13J

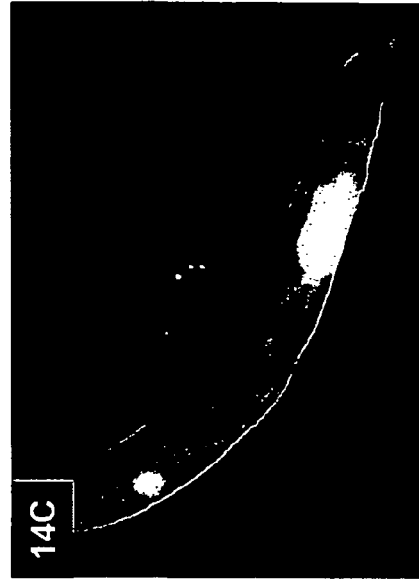
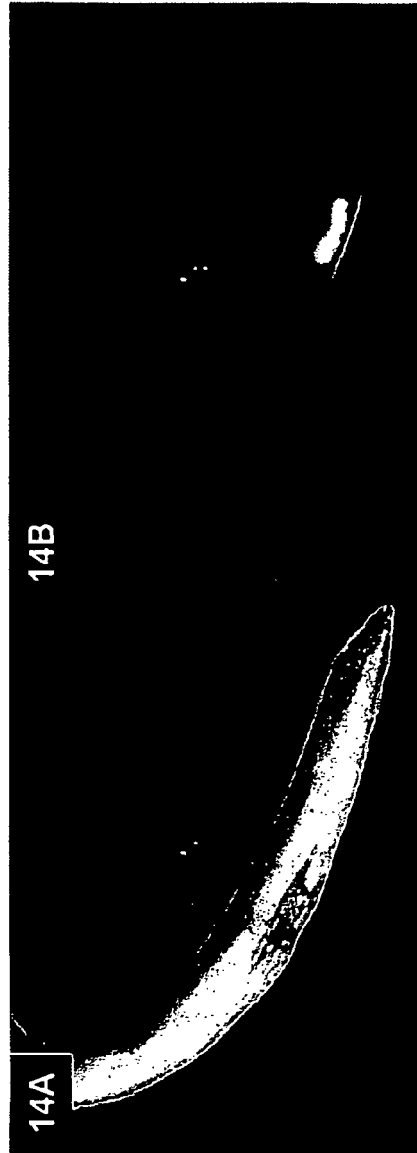
*Brassica napus*



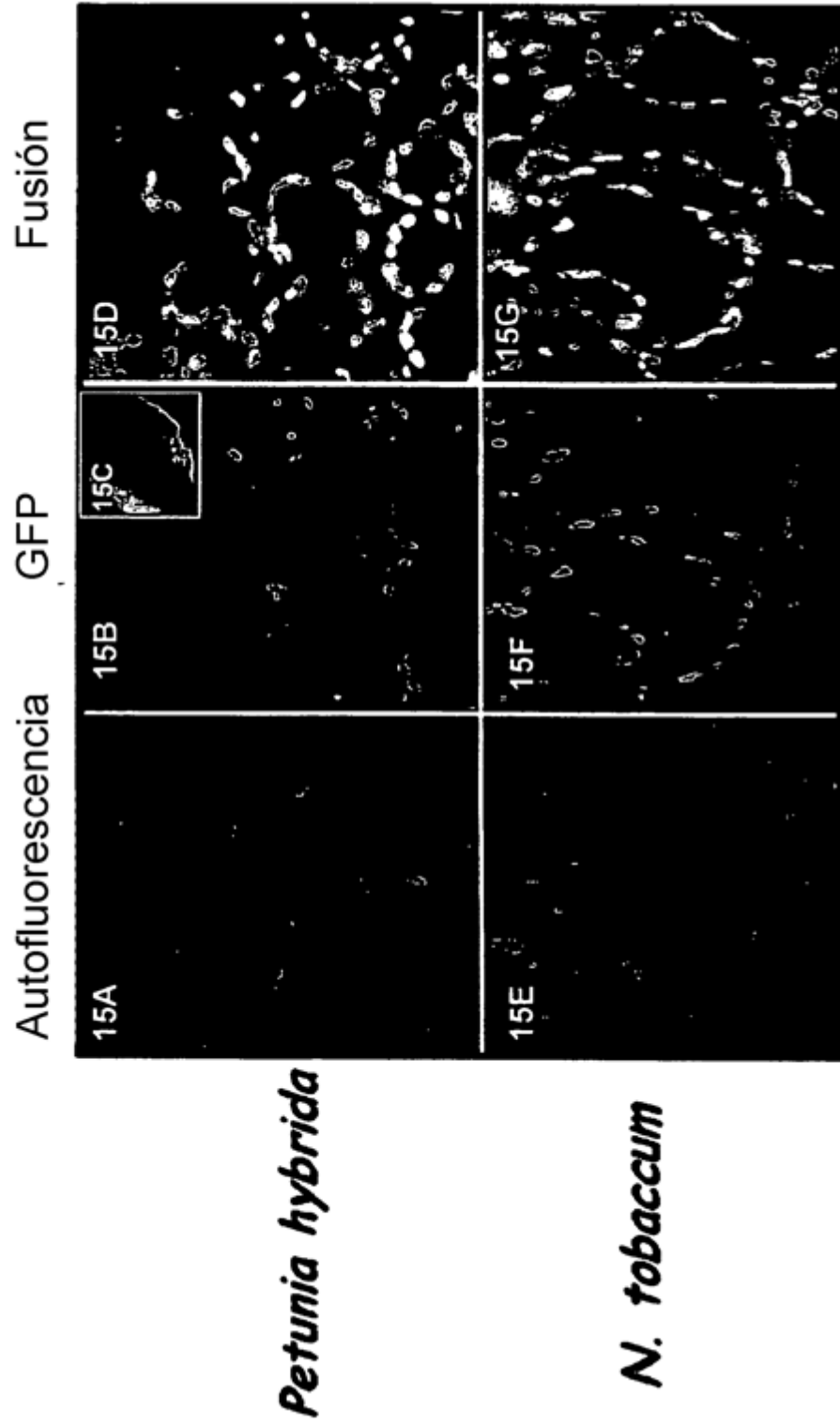
13K



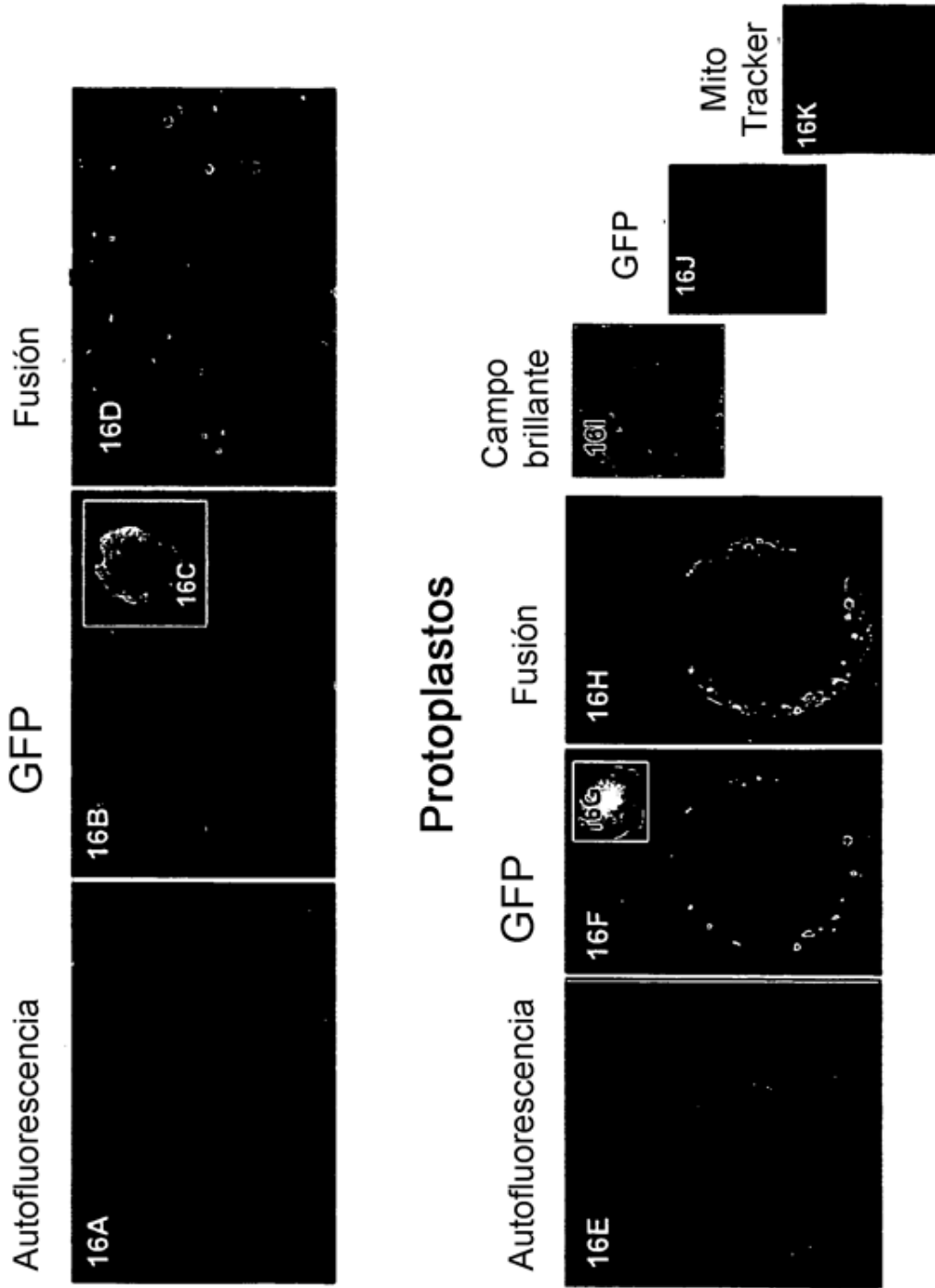
**FIGs. 14A-C**



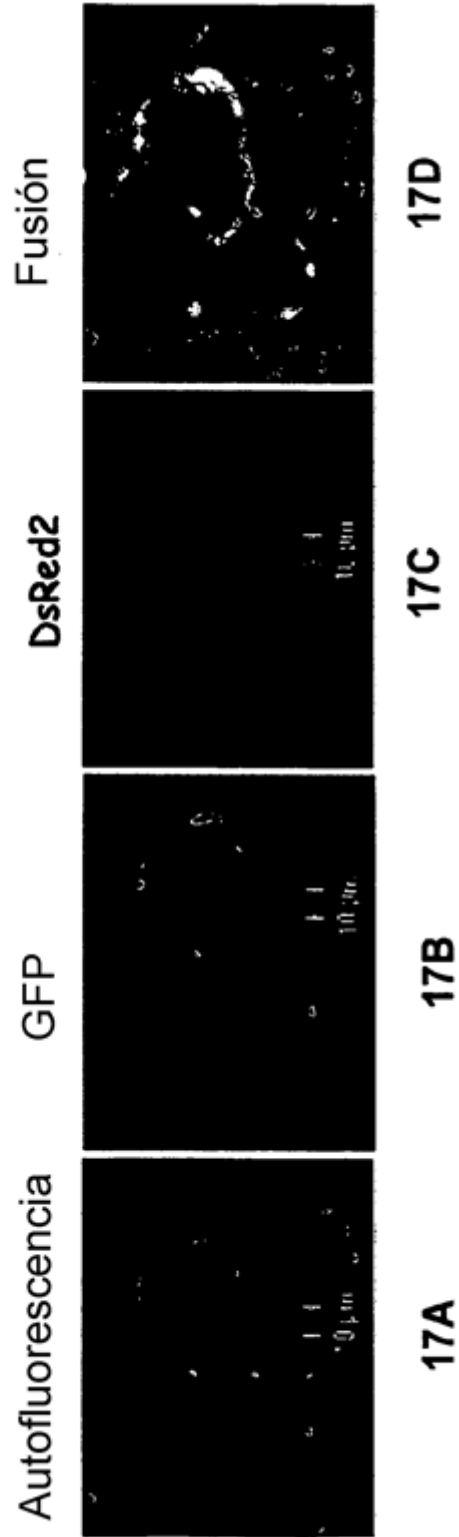
**FIGs. 15A-G**



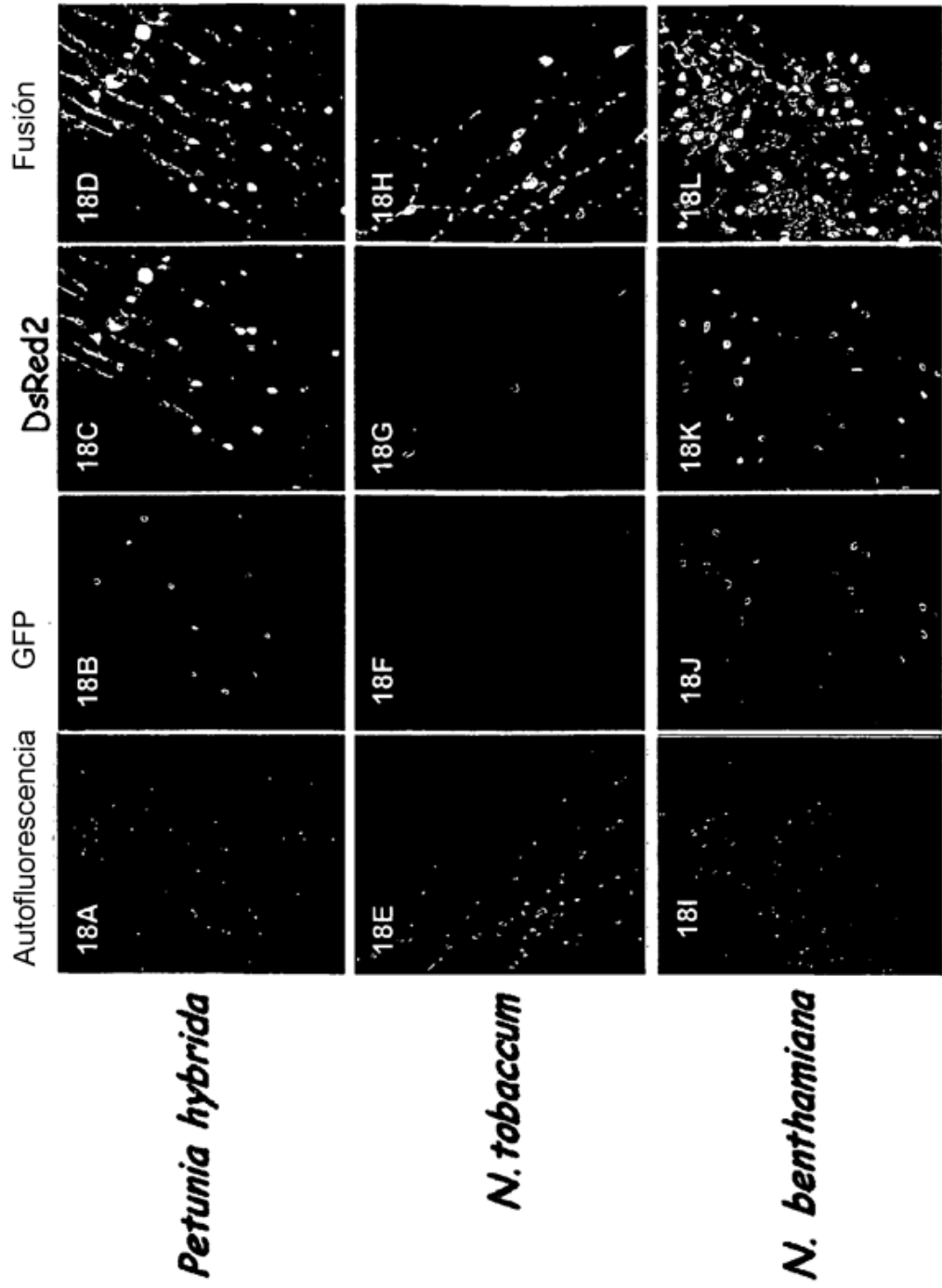
**FIGs. 16A-K**



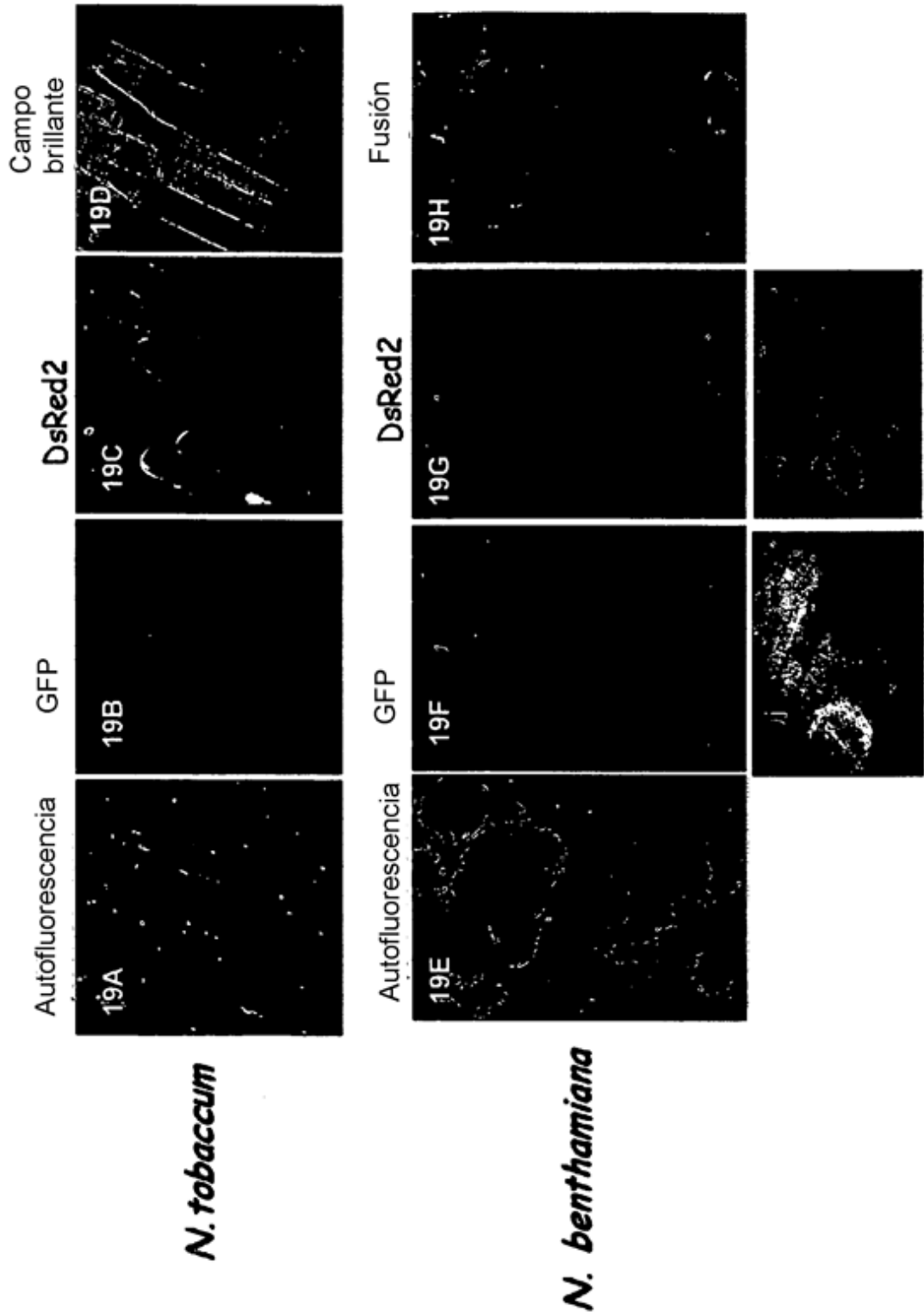
**FIGs. 17A-D**



**FIGS. 18A-L**

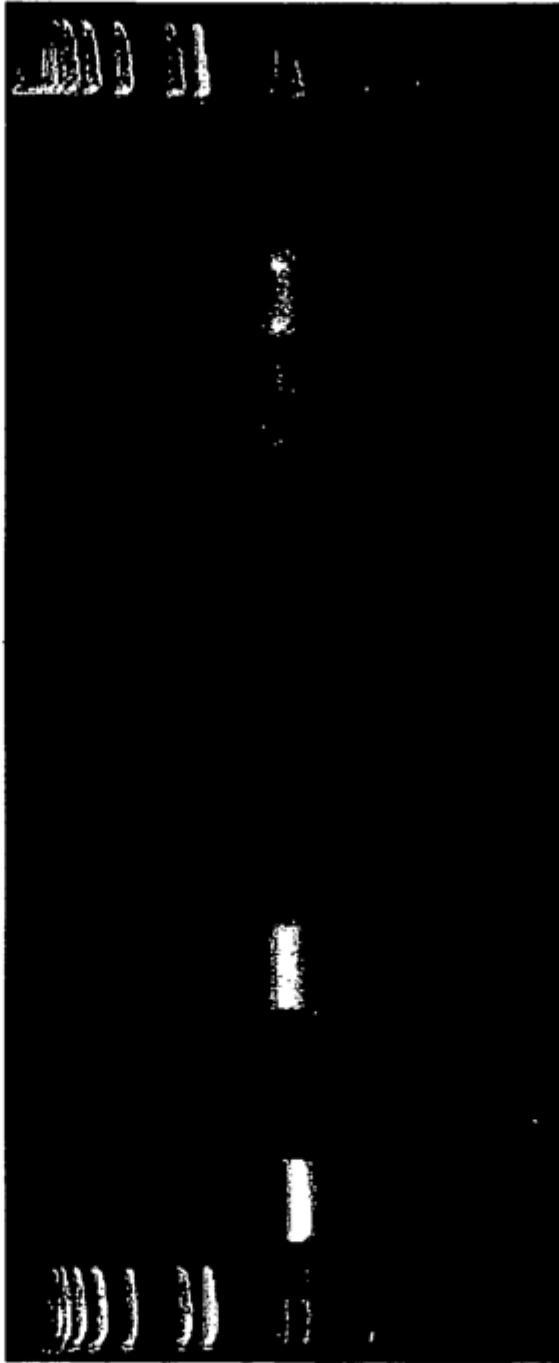


**FIGs. 19A-J**

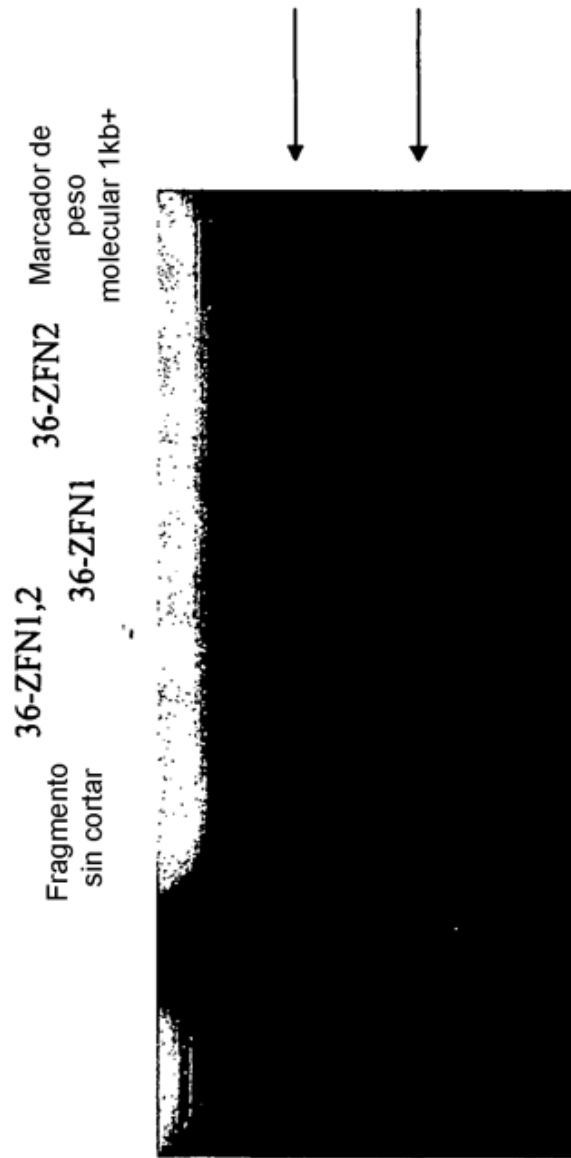


**FIG. 20**

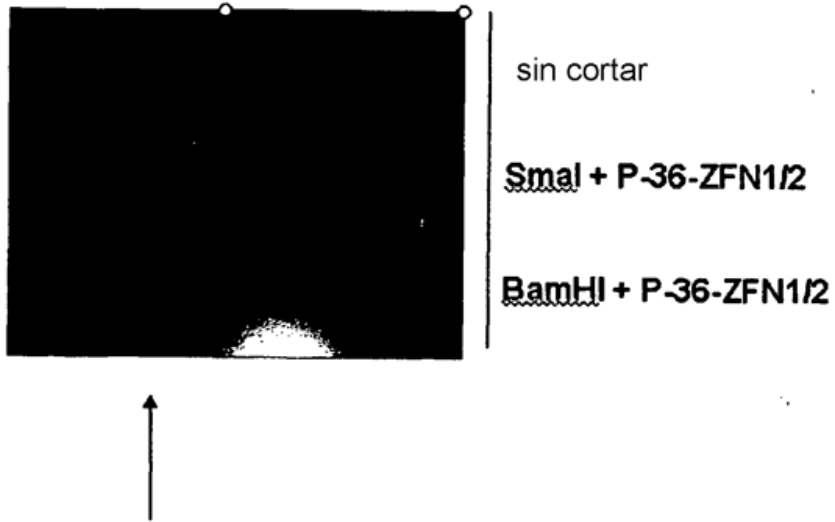
	25-	25-	25-	25-	36-	36-	36-	36-
	ZFN1	ZFN2	ZFN2	ZFN1	ZFN1	ZFN2	ZFN1	ZFN2
	P25-TS1		P25-TS2		P36-TS1		P36-TS2	
Marcador de peso molecular 1kb+	Producto de PCR							



**FIG. 21**

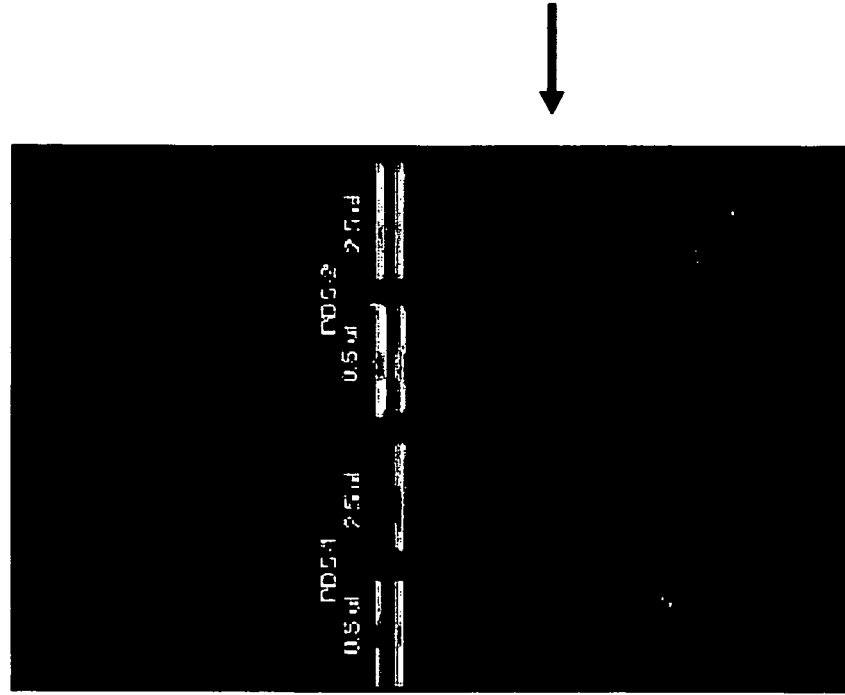






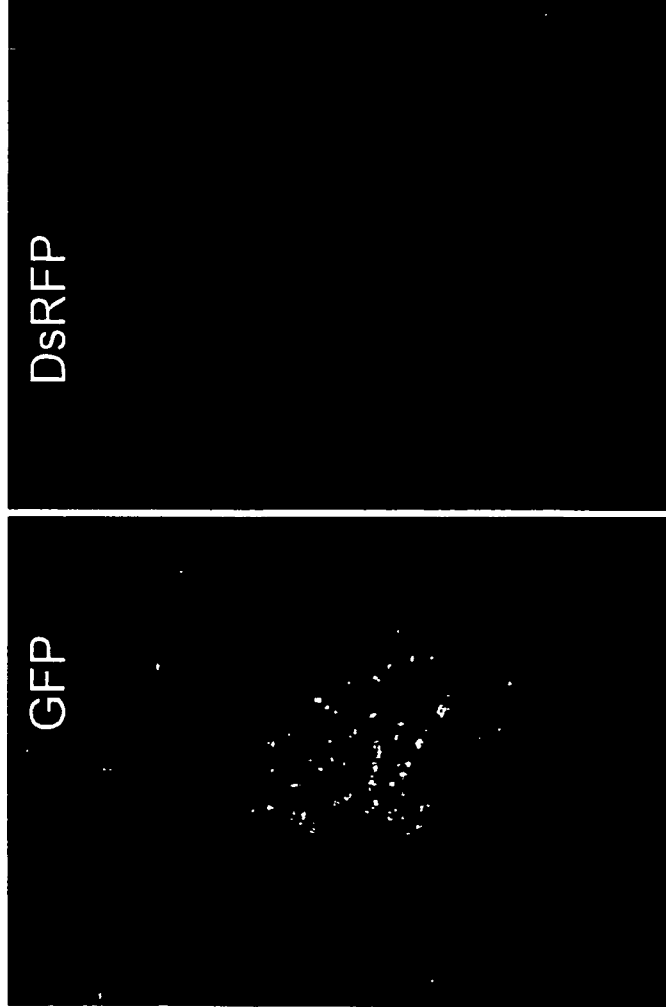
**FIG. 22**

**FIG. 23**



**FIGs. 24A-B**

**24A**                      **24B**



**FIGs. 25A-B**

**25A** ATG **TTC TTC CCC TCC TGA GGG GAA GAA TTA** (SEQ ID NO: 92)  
M **F F F P S \* G E E L** (SEQ ID NO: 93)

**25B** ATG **TTC TTC CCC TCC TGA GGG GAA GAA TTA** (SEQ ID NO: 94)  
M **F F P S G E E L** (SEQ ID NO: 95)

**FIGs. 26A-J**

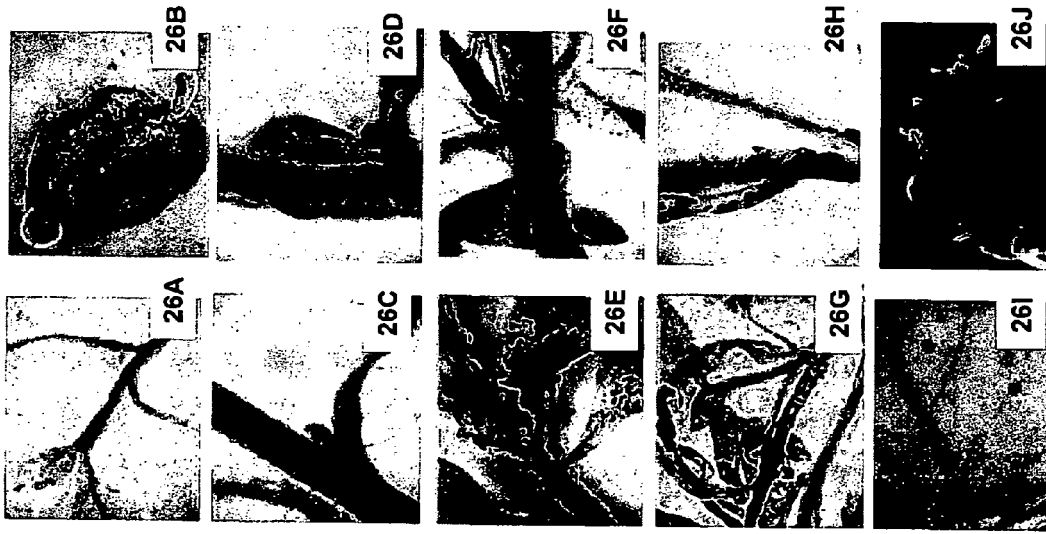


FIG. 27

NT-GUS-parada  
 N\_t7 C T G C A G T C G A C G G T A C C A T G T T C T T C C C C T C C T G -- A G G G G A G A A T T A C G T C C T G T A G A A C C C C A C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 96)  
 Pet 47 C T G C A G T C G A C G G T A C C A T G T T C T T C C C C T C C T G -- G A G G G A G A A T T A C G T C C T G T A G A A C C C C A C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 97)  
 Pet 41 C T G C A G T C G A C G G T A C C A T G T T C T T C C C C T C C T G -- A G G G G A G A A T T A C G T C C T G T A G A A C C C C A C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 98)  
 Pet 30 C T G C A G T C G A C G G T A C C A T G T T C T T C C C C C C C G -- A G G G G A G A A T T A C G T C C T G T A G A A C C C C A C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 99)  
 Pet 29 C T G C A G T C G A C G G T A C C A T G T T C T T C C C C T C T G -- A G G G G A G A A T T A C G T C C T G T A G A A C C C C A C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 100)  
 N\_t115 C T G C A G T C G A C G G T A C C A T G T T C T T C C C C T C C -- G -- A G G G G A G A A T T A C G T C C T G T A G A A C C C C A C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 101)  
 N\_t11 C T G C A G T C G A C G G T A C C A T G T T C T T C C C C T C -- T G -- A G G G G A G A A T T A C G T C C T G T A G A A C C C C A C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 102)  
 N\_t6 C T G C A G T C G A C G G T A C C A T G T T C T T C C C C T ----- A G G G G A G A A T T A C G T C C T G T A G A A C C C C A C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 103)  
 Pet 62 C T G C A G T C G A C G G T A C C A T G T T C T T C C C C T ----- G -- A G G G G A G A A T T A C G T C C T G T A G A A C C C C A C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 104)  
 N\_t4 C T G C A G T C G A C G G T A C C A T G T T C T T C C C C T C ----- G G G A G A A T T A C G T C C T G T A G A A C C C C A C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 105)  
 N\_t114 C T G C A G T C G A C G G T A C C A T G T T C T T C C C C T ----- G G G A G A A T T A C G T C C T G T A G A A C C C C A C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 106)  
 N\_t101 C T G C A G T C G A C G G T A C C A T G T T C T T C C C C A ----- G G G A G A A T T A C G T C C T G T A G A A C C C C A C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 107)  
 Pet 26 C T G C A G T C G A C G G T A C C A T G T T C T T C C C C ----- G G G A G A A T T A C G T C C T G T A G A A C C C C A C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 108)  
 Pet 49 C T G C A G T C G A C G G T A C C A T G T T C T T C C C C ----- T C G T C C T G T A G A A C C C C A C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 109)  
 Pet 48 C T G C A G T C G A C G G T A C C A T G T ----- G G G A G A A T T A C G T C C T G T A G A A C C C C A C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 110)  
 N\_t104 C T G C A G T C G A C G G T A C C A T G T ----- T T A C G T C C T G T A G A A C C C C A C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 111)  
 Pet 51 C T G C A G T C G A C G G T A C C A T G ----- G A A T T A C G T C C T G T A G A A C C C C A C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 112)  
 N\_t111 C T G C A G T C G A C G G T A C C A T G ----- T T C C T G T A G A A C C C C A C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 113)  
 Pet 34 C T G C A G T C G A C G G T A C C A T ----- G T C T ----- T C C C C A C C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 114)  
 Pet 25 C T G C A G T C G A C ----- C C C C A C C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 115)  
 ----- C C C C A C C C C G T G A A T C (SEQ ID NO: 116)

**FIG. 28A**

caggagaacatggttcaaaaatggccttttagatggaatcctcctgagagacttgcattgcatgccgattgtgaaca

78 TATTGAGTCAA AAGGTGGCCAAGTCAGACTAAACTCACGAATAA

122 GAAAGATCGAGCTGAACGAGGATGGAAAGTGCAAGTGTTTATACT

168 GAATAATGGCACTTCAATTGAGGGAGATGCATTCGTGTTGCTGCT

*MfeI (MunI)* PDS-ZFN1

[REDACTED] ACTC CCTCTACGT SEQ ID NO 132

PDS-ZFN2

214 CCAG SEQ ID NO 131

Sitio diana de PDS-ZFN1 - SEQ ID NO 140  
 Sitio diana de PDS-ZFN2 - SEQ ID NO 141



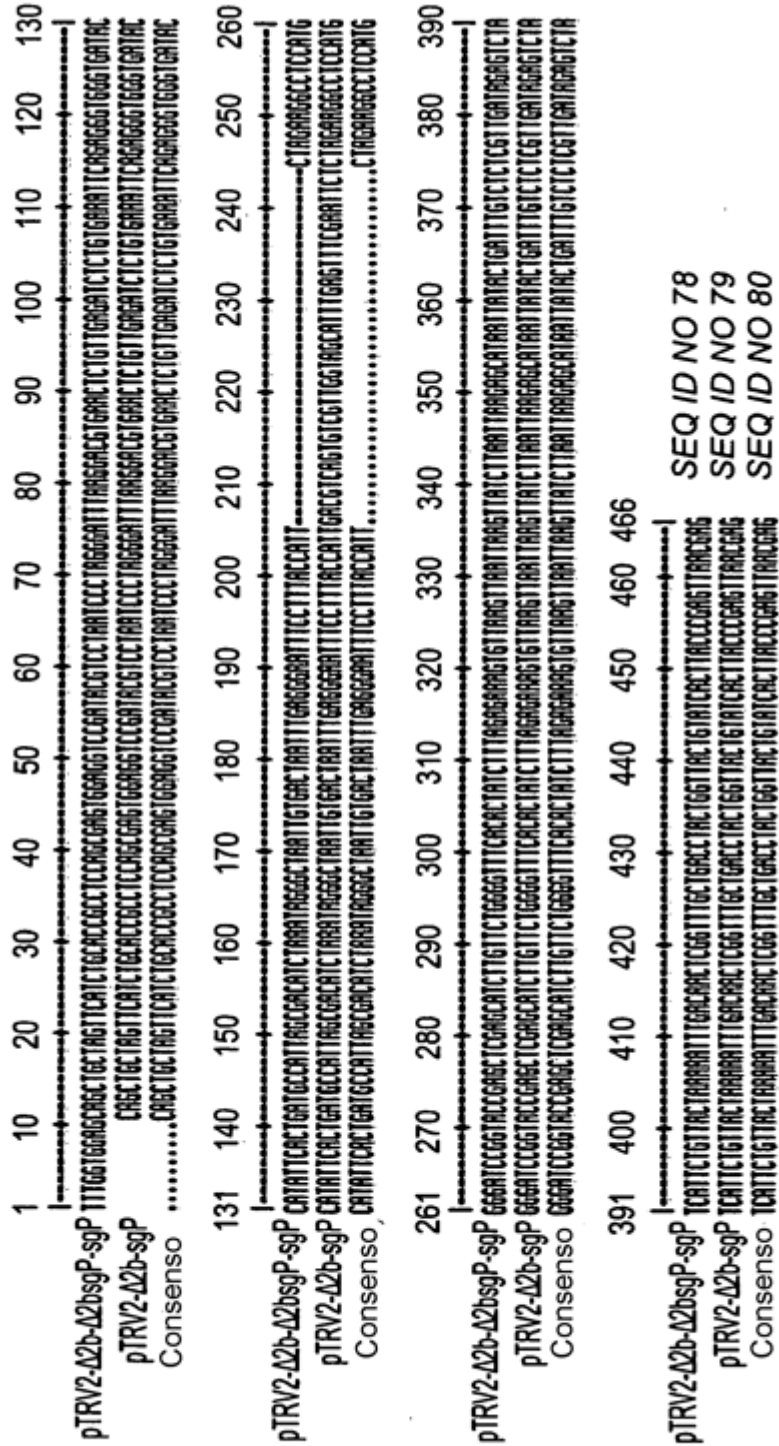


**FIG. 29**

CACACTGATCC AGGAACCATC ACTCTCTTGT TACAAGACCA  
 42 AGTIGGTGGG CTTCAAGCTA CTAAGATAA TGGCAAAACT  
 82 TGGATCA CTGTCAGC CTGTT <sup>EcoNI (XagI)</sup> **GAAGGTGCT** <sup>FHT-ZFN1</sup> TTTGTTGTCA  
**GACAAGTGG** <sup>FHT-ZFN2</sup> **GACAAC**TTCCACGA SEQ ID NO 134  
 122 ATCTTGGTGA CCACGGTCAT SEQ ID NO 133

Sitio diana de FHT-ZFN1 - SEQ ID NO 142  
 Sitio diana de FHT-ZFN2 - SEQ ID NO 143

FIG. 30



**FIG. 31A****La secuencia de NLS-PDS-ZFN1**

ATGGTGc caa a a a a g a g a g a a g g t a g a a g a c c c T C T C G A G C T G A A A A C C T T A C A A G T G T C C T  
 G A A T G T G G A A A G T C T T T T T C T C A G T C T G G A G A T T T G C G T C A C C A G C C A G C G A A C A C A C A C A  
 G G T G A G A A G C C A T A T A A T G C C C A G A A T G T G T A A A T C A T T C A G T A C T T C T G G A A A T T T G  
 G T T C G T C A C C A A C G G A C C C A C A C C G G G A G A A G C C A T T T A A T G C C C T G A G T G C G G G A  
 A G A G T T T T C A C A G C G C G C A T C T G G A A C G C C A T C A A C G T A C T C A T A C T G G A G G A C T A  
**G T C A A A A G T G A A C T G G A G G A G A A T C T G A A C T T C G T C A T A A A T T G A A T A T A T G T G C C T**  
 C A T G A A T A T A T T G A A T T A A T T G A A T T G C C A G A A T T C C A C T C A G G A T A G A A T T C T T G A A A  
 T G A A G G T A A T G G A A T T T T T A T G A A A G T T T A T A C T G T C G G A T C T C C T A T T G A T T A C G G T G A T C G T  
 A A G G A A A C C G G A C G G A G C A A T T T A T A C T G T C G G A T C T C C T A T T G A T T A C G G T G T G A T C G T  
 G G A T A C T A A A G C T T A T A G C G G A G G T T A T A A T C T G C C A A T T G G C C A A G C A G A T G A A A T G C A  
 A C G A T A T G T C G A A G A A A T C A A C A C G A A A C A A C A T A T C A A C C C T A A T G A A T G G T G G A A  
 A G T C T A T C C A T C T T C T G T A C G G A A T T T A A G T T T T A T T T G T G A G T G G T C A C T T T A A A G G A  
 A A C T A C A A A G C T C A G C T T A C A C G A T T A A A T C A T A T C A C T A A T T G T A A T G G A G C T G T T C T T A  
 G T G T A G A A G A G C T T T T A A T T G G T G G A G A A A T G A T T A A G C C G G C A C A T T A A C C T T A G A G G  
 A A G T G A G A C G G A A A T T T A A T A A C G G C G A G A T A A A C T T T G G A T C C T A A

SEQ ID NO 70

**FIG. 31B**

La secuencia de NLS-PDS-ZFN2

ATGGTGccaaaagaagagaaagtagaaccccTCTCGAGCTGAAAAACCTTACAAGTGCCT  
 GAATGTGGAAGTCTTTTTCTCGCAGCGATGAACCTGGTGGCCACCAGCGAACACACAC  
 AGGTGAGAAGCCATATAAATGCCCCAGAAATGTGGTAAATCATTCAAGTCAGTCTAGCAACCT  
 GGTTAGACACCAACGGACCCACACCGGGGAGAGCCATTTAAATGCCCTGAGTGCGGG  
 AAGAGTTTTTACATATAAAACCGCTGCAGAACCATCAACGTACTCATCTGGAGGACTA  
 GTCAAAAGTGAACCTGGAGGAGAGAAATCTGAACCTTCGTACATAAATTGAAAATATGTGCCT  
 CATGAATATAATTGAATTAATTGAAATGGCCAGAAATCCACTCAGGATAGAAATTCCTTGAAA  
 TGAAAGGTAATGGAATTTTTATGAAAGTTTATGGATATAGAGGTAAACATTTGGGTGGATC  
 AAGGAAACCGGACGGAGCAATTTATACTGTGGATCTCCTATTGATTACGGTGTGATCGT  
 GGATACTAAAGCTTAGCGGAGGTTATAATCTGCCAATGGCCAAGCAGATGAAATGCA  
 ACGATATGTCGAAGAAATCAAAACACGAAACAACAATATCAACCTAAATGAAATGGTGGAA  
 AGTCTATCCATCTTCTGTAACGGAATTTAAGTTTTTATTGTGAGTGGTCACTTTAAAGGA  
 AACTACAAAGCTCAGCTTACACGATTAATCAATCAATCACTAATTGTAATGGAGCTGTCTTA  
 GTGTAGAAAGAGCTTTTAAATGGTGGAGAAATGATTAAGCCGGCACATTAACCTTAGAGG  
 AAGTGAGACGGAAATTTAAATACGGCGAGATAAACTTTGGATCCTAA

SEQ ID NO 72

**FIG. 32A**

La secuencia de NLS-FHT-ZFN1

ATGGTGccaa aaa gag aaag gtag aag acccc TCTCGAGCTGAAAAACCTTACAAGTGCCT  
 GAATGTGGAAGTCTTTTTCTACTTCTGGAGAA TTGGTTCGTCCAGCGGAAACACACACA  
 GGTGAGAAAGCCATA TAAATGCC CAGAA TGTGGTAAATCATT CAGTACTTCTGGACATCTT  
 GTTCGTCAACC AACGGACCCACACCGGGAGAA GCCATTTAAATGCCCTGAGTGCGGGA  
 AGAGTTTTTTCACAGAGCAGCAACCTGGTGCGCCATCAACGTACTCATACTGGAGGACTA  
 GTCAAAAGTGAAC TGGAGGAGAAATCTGAAC TCTGTCATAAATTGAAA TATGTGCCT  
 CATGAATATA TTGAATTAATTGAAATTGCCAGAAATCCACTCAGGATAGAAATTC TTGAAA  
 TGAAGGTAATGGAATTTTTATGAAAGTTTTATGGATA TAGAGGTAAACA TTTGGGTGGATC  
 AAGGAAACCGGACGGAGCAATTTA TACTGTGGGATCTCCTA TTGATTACGGTGTGATCGT  
 GGATACTAAAGCTTATAGCGGAGGTTATAATCTGCCAATTGGCCAAAGCAGATGAAATGCA  
 ACGATATGTCGAAGAAATCAAAACACGAAACAACA TATCAACCTAA TGAATGGTGGAA  
 AGTCTATCCATCTTCTGTACGGAATTTAAGTTTTTATTGTGAGTGGTCACTTTAAAGGA  
 AACTACAAAGCTCAGCTTACACGATTAATCA TATCACTAATTTGTAATGGAGCTGTTCTTA  
 GTGTAGAAAGAGCTTTTTAA TTGGTGGAGAAATGATTAAGCCGGCACATAAACCTTAGAGG  
 AAGTGAGACGGAAATTTAA TAACGGCGAGATAAACTTTGGATCCTAA

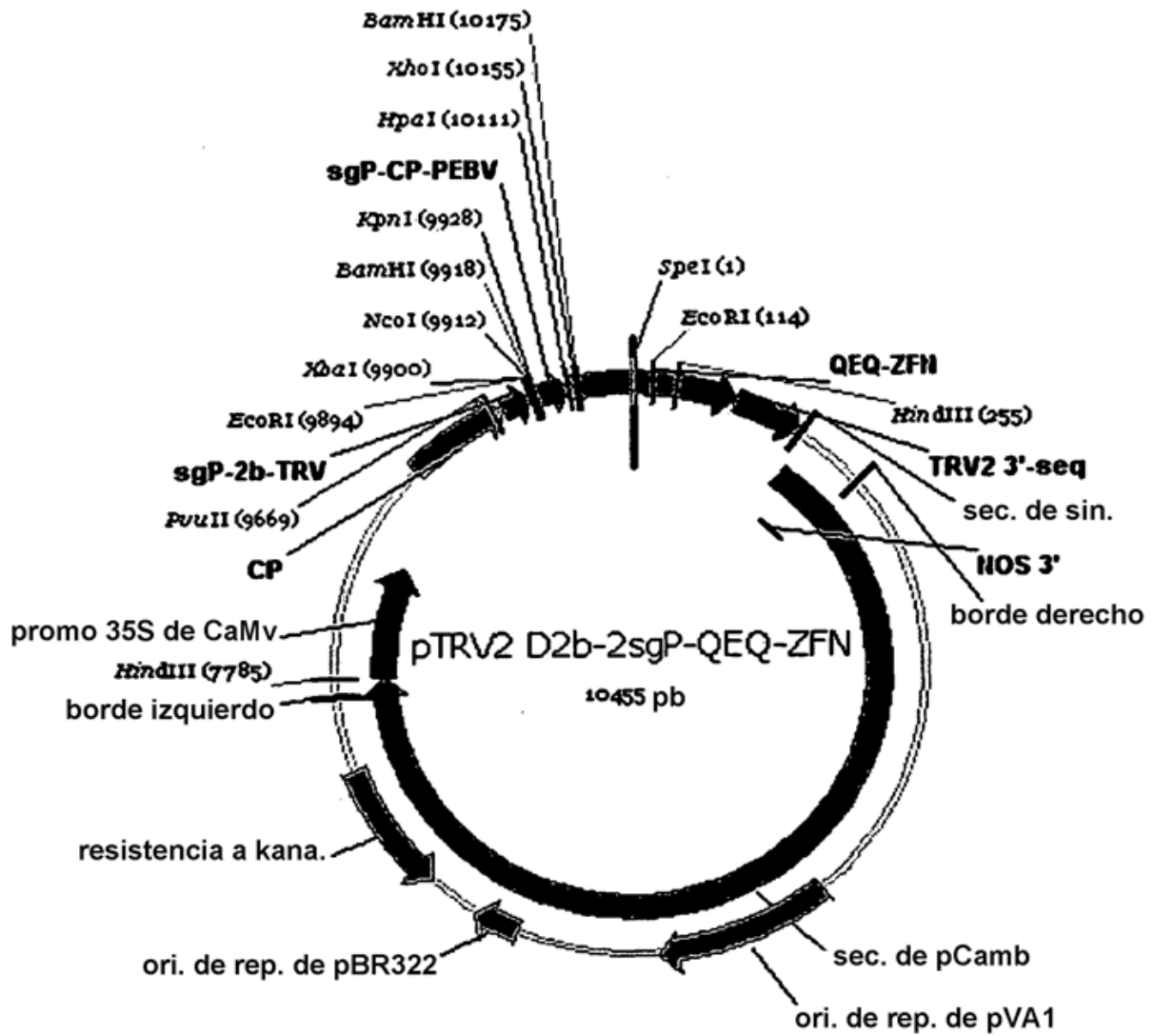
SEQ ID NO 74

**FIG. 32B**

La secuencia de NLS-FHT-ZFN2

ATGGTGccaaa aaagaag agaaagg taga agaccccTCTCGAGCTGAAAAAACC TTACAAGTGTCCCT  
 GAATGTGGAAGTCTTTTTCTCGCGGGATAACCTGACCCGAAACACCAGCGAAACACACACAC  
 AGGTGAGAAGCCATA TAAATGCCAGAA TGTGGTAAATCATT CAGTCAGTCTAGCAACCT  
 GGTTAGACACCAACGACCCAC ACCGGGAGAGCCATTTAAATGCCCTGAGTGCGGG  
 AAGAGTTTTCAACTTCTGGAGAA TTGGTTCGTCATCAACGTACTCA TACTGGAGGACTA  
 GTCAAAAGTGAAC TGGAGGAGAAGAAATCTGAAC TTCGTCATAAA TTGAAA TATGTGCCT  
 CATGAA TATA TTGAATTAATTGAAA TTGCCAGAAA TTCAC TCAGGATAGAA TTC TTGAAA  
 TGAAGGTAATGGAA TTTTTATGAAAGTTTAT GGATA TAGAGGTAACATTTGGGTGGATC  
 AAGGAAACCGGACGGAGCAATTTATACTGTCGGATCTCCTATTGATTACGGTGTGATCGT  
 GGATACTAAAGCTTATAGCGGAGGTTATAATCTGCCAATTGGCCAAAGCAGATGAAATGCA  
 ACGATA TGTCGAAGAAATCAACACGAAACAACATA TC AACCTAATGAA TGGTGGAA  
 AGTCTATCCATCTTCTGTAAACGGAA TTTAAGTTTTTATTGTGAGTGGTCAC TTTAAAGGA  
 AACTACAAAGCTCAGCTTACACGATTAATCA TATCACTAATTGTAATGGAGCTGTTCTTA  
 GTGTAGAAAGAGCTTTTAA TTGGTGGAGAAATGATTAAGCCGGCACATTAACCTTAGAGG  
 AAGTGAGACGGAAATTTAATAACGGCGGAGATAAACTTTGGATCCTAA

SEQ ID NO 76



**FIG. 33**

**FIG. 34**

