

**MOVILIZACIÓN DE ELEMENTOS TRANSPONIBLES PARA AUMENTAR LA  
VARIABILIDAD GENÉTICA Y EPIGENÉTICA EN UNA POBLACIÓN**

Campo de la invención

5

La presente invención se refiere a la movilización de elementos transponibles y usos relacionados de los mismos.

Antecedentes de la invención

10

Los elementos transponibles (TE) fueron descubiertos inicialmente a principios de la década de 1950 por Bárbara McClintock debido a su actividad mutagénica que podría influir en la pigmentación del grano (variegación) en el maíz (McClintock, PNAS, 1950 36 (6): 344-55). Desde sus descubrimientos iniciales se han atribuido numerosas funciones a los TE. De hecho, en la actualidad los TE tienden a ser visualizados como herramientas moleculares naturales que pueden remodelar el genoma (Bire et al., Methods Mol Biol, 2012; 859: 1-28). Los TE se han identificado en el desempeño de papeles importantes (sino principales) en la estructuración de genomas hospedadores; especialmente las regiones centroméricas son ricas en los TE. Se ha encontrado que el número de copias de retrotransposones de repeticiones terminales largas (LTR) se correlaciona en gran medida con el tamaño del genoma hospedador y la movilización de los TE puede tener un impacto en la organización del genoma mediante la inducción de la ruptura del cromosoma y mediante la influencia en la recombinación homóloga. Al nivel genético, los TE pueden tener múltiples efectos: causar mutaciones mediante inserción directamente en genes, mover genes dentro

del genoma, duplicar y/o crear nuevos genes, regular la expresión genética, crear nuevas rutas reguladoras y poner los genes bajo control epigenético. En la actualidad, los TE se consideran como un agente mutágeno que puede acentuar el resultado positivo de la mutagénesis con respecto al hospedador (Bennetzen et al., Annu Rev Plant Biol, 2014, 65:505-30).

Se ha demostrado que los TE son herramientas genéticas muy útiles y se han aprovechado ampliamente para interrupción genética y transgénesis en una gran diversidad de organismos. Sin embargo, dado que los TE de forma natural se llegan a activar en muy raras ocasiones en condiciones de crecimiento normales en la actualidad solamente se conocen unos pocos TE activos. Por lo tanto solamente un número muy limitado de los TE se están usando de forma activa para modificación genética. Algunos ejemplos incluyen elementos P (*Drosophila*), PiggyBac (insectos, líneas de células humanas), elementos de L1 LINE (ratón), Mariner (vertebrados), SleepingBeauty (animales). Con el fin de crear una diversidad genética, estos TE se introducen en los organismos de interés a través de transgénesis. Sin embargo, esto limita el uso de organismos modificados de ese modo de ya que se consideran organismos genéticamente modificados (GMO) de acuerdo con la legislación actual.

En las plantas, se ha demostrado que la movilidad de los elementos transponibles está limitada por la metilación de ADN y ciertos marcadores de histona (Miura et al., Nature, 2001, 411 (6834): 212-4; Mirouze et al., Nature, 2009, 461 (7262): 427-30). Por lo tanto la supresión de la metilación

de ADN en mutantes genéticos puede dar como resultado la movilización de elementos transponibles. También se mostró que los fármacos que reducen la metilación de ADN (por ejemplo, 5-aza-2'-desoxicitidina) pueden movilizar ciertos TE del ADN (Scortecci *et al.*, *Plant Cell Physiol*, 1997, 38 (3): 336-43). Además, se ha informado que los elementos de estrés en las plantas con defecto de metilación de ADN dirigida por ARN (RdDM) activan los elementos transponibles (Ito, H. *et al.*, *Nature*, 2011, 472: 115-19). Sin embargo, la necesidad de mutantes genéticos en componentes implicados en la defensa frente a los TE está limitando la posibilidad de activar los TE en organismos que no son modelos u organismos que son difíciles de transformar. Por lo tanto, en la actualidad el aprovechamiento de los TE endógenos para obtener diversidad genética y epigenética está muy limitado.

En condiciones normales de crecimiento, los TE están movilizados en muy raras ocasiones y hasta el momento los diferentes tratamientos para activar los TE han resultado muy ineficaces en eucariotas. Se ha mostrado que los tratamientos con fármacos que reducen los niveles de metilación genómica del ADN permiten una activación ligera de los TE (Baubec, T. *et al.*, *Plant J*, 2009 57: 542-54), pero sin dar como resultado nuevas inserciones de esos TE. En plantas se ha mostrado que las mutaciones en factores implicados en la ruta de metilación de ADN dirigida por ARN podrían movilizar los TE a una frecuencia elevada. Una limitación importante en estos enfoques es que son ineficaces (tratamiento farmacológico mencionado anteriormente) o necesitan mutaciones genéticas que son difíciles de obtener, especialmente en organismos que no son modelos. Por lo tanto

estos problemas técnicos limitan el uso y el estudio de los elementos transponibles en la mayoría de los organismos.

El problema que subyace a la presente invención es proporcionar los medios para una movilización eficaz de los elementos transponibles. Con la materia objeto de las reivindicaciones independientes.

#### Descripción específica de la invención

En el presente documento los inventores proporcionan un tratamiento basado en fármacos que puede movilizar los elementos transponibles en eucariotas. Además, la combinación de este tratamiento con elementos de estrés específicos conduce a la movilización de los TE específicos que responden a estos elementos de estrés en particular. El tratamiento conduce a una acumulación elevada de ADN extracromosómico de los TE activados en el organismo tratado. Además, la progenie del organismo tratado muestra una integración estable de un número elevado de copias de TE en el genoma y un aumento de la resistencia al estrés que es parte del tratamiento. Por lo tanto, el método de la invención supera la necesidad de mutaciones genéticas para inactivar la defensa de TE, permitiendo de ese modo que los elementos transponibles se activen de forma eficaz prácticamente en cualquier eucariota. La presente invención permite la inducción de cambios mediados por TE en el tamaño y estructura del genoma, modulación de la expresión genética endógena, transduplicación genética, heterosis, recombinación homóloga y adaptación al estrés. Además, la presente invención permite la identificación de nuevos TE funcionales.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un método para la movilización de un elemento transponible, en particular dentro del genoma, de una célula eucariota. El método comprende:

5

a) proporcionar una célula eucariota que comprende uno o varios elementos transponibles latentes, es decir inactivos, y

10

b) poner en contacto la célula(s) con un inhibidor de transcripción,

y opcionalmente, poner en contacto la célula adicionalmente con un inhibidor de la metilación de ADN, proporcionando de ese modo una célula eucariota con uno o varios elementos transponibles movilizados.

15

En el contexto de la presente memoria descriptiva las expresiones elemento transponible o transposones se usan en su significado conocido en la técnica de genética molecular; hacen referencia a secuencias de ADN en el genoma de un organismo que son capaces de cambiar su posición dentro del genoma (mecanismo de corte y empalme) o que son capaces de producir nuevas copias de ellos mismos que integran en el genoma (mecanismo de copia y empalme). La transposición puede dar como resultado la multiplicación del elemento influyendo de ese modo en el tamaño del genoma. Existen dos clases de transposones, los transposones de clase 1 que también se denominan retrotransposones y los transposones de la clase 2 que también se denominan transposones de ADN. Los retrotransposones se transcriben primero en el ARN mediante el aparato molecular proporcionado por la célula hospedadora, y a continuación se transcriben de forma inversa en una copia

de ADN de doble hebra del ARN, denominado ADN complementario (ADNc) antes de que se inserten en una nueva posición en el genoma. Comparten algunas características tales como la dependencia de una transcriptasa inversa con los retrovirus.

5 Los transposones de ADN no tienen un intermedio de ARN y se transfieren a su nueva posición en el genoma mediante una transposasa. La mayoría de los transposones en el genoma son inactivos y no se duplicarán ni cambiarán de posición. Por lo tanto la activación de los transposones también se denomina  
10 movilización de transposones. Los ejemplos de transposones que son sensibles a ciertos elementos de estrés se proporcionan en la Tabla 1. Estos transposones se activan mediante los elementos de estrés indicados hasta un cierto grado. Sin embargo, el uso del método de la invención  
15 moviliza estos transposones en una medida mucho mayor tal como se puede observar en los ejemplos que se proporcionan.

En ciertas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, se moviliza un transposón de clase 1.

20

En ciertas realizaciones de cualquier aspecto de la invención, se moviliza un transposón de clase 2.

En el contexto de la presente memoria descriptiva la  
25 expresión *metilación de ADN* se usa en su significado conocido en la técnica de biología molecular y genética molecular; se refiere a la adición de grupos metilo al ADN, que en eucariotas se produce principalmente en citosinas. La metilación de ADN está catalizada por las ADN  
30 metiltransferasas (DNMT) y se puede dividir en metilación de mantenimiento, que es necesaria para transferir patrones de

metilación en hebras de ADN recién sintetizadas, y metilación de novo. La metilación de ADN está asociada con la inactivación de la expresión genética y el silenciamiento de transposones. La metilación de ADN se puede pasar a las siguientes generaciones y por lo tanto representa una forma común de modificación epigenética.

Tabla 1: Ejemplos de transposones

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

En ciertas realizaciones, el inhibidor de la metilación de ADN es un compuesto exógeno.

En ciertas realizaciones, el inhibidor de transcripción es un compuesto exógeno.

En ciertas realizaciones, el compuesto exógeno es un compuesto de molécula pequeña que tiene una masa molecular  $\leq 1000$  u, en particular  $\leq 920$  u.

5        En el contexto de la presente memoria descriptiva el término compuesto exógeno se refiere a moléculas que no están presentes en la célula en condiciones fisiológicas a menos que se añadan por vía técnica.

10        En ciertas realizaciones, el inhibidor de la metilación de ADN podría estar presente en al menos algunas de las células en al menos algunas de las células en al menos algunas condiciones fisiológicas en particular en cantidades traza, pero se añade en el método de la invención a  
15        concentraciones mucho más elevadas para ejercer un impacto significativo en la fisiología celular. Para conseguir esto, el compuesto está presente en el medio de la célula a una concentración que se selecciona para que sea al menos 10 veces más elevada que la concentración del inhibidor de la  
20        metilación de ADN que se encuentra en el interior de la célula.

En ciertas realizaciones, el inhibidor de transcripción está presente en la célula en condiciones fisiológicas y está  
25        presente en un medio a una concentración que se selecciona para que sea al menos 10 veces, 100 veces, 1000 veces, o incluso 10.000 veces más elevada que la concentración del inhibidor de transcripción que se encuentra en el interior de la célula.

30

En ciertas realizaciones, el método de la invención, tal

como se especifica en cualquier aspecto o realización que se desvela en el presente documento, comprende adicionalmente una etapa c):

- 5      c) exponer la célula a un estrés abiótico, estrés biótico o estrés químico.

En el contexto de la presente memoria descriptiva la expresión estrés abiótico se refiere al impacto negativo de  
10 factores no vivos en un organismo vivo en un entorno específico. La variable no viva influye en el entorno más allá de su intervalo de variación normal. Los ejemplos no limitantes de estrés abiótico son calor, frío, sequía, inmersión/ exceso de agua, viento, radiación UV, radiación  
15 nuclear, salinidad, metales pesados, pH del suelo, cultivo del medio de cultivo tisular y privación de fósforo, nitrógeno, luz, CO<sub>2</sub>, etc. Por el contrario, la expresión estrés biótico se refiere al impacto negativo de hongos, bacterias, virus, insectos, formación de heridas por  
20 herbívoros y competición biológica, etc.

La expresión *estrés químico* se refiere al impacto negativo de sustancias químicas ("agentes estresantes") en un organismo vivo. Estas sustancias también pueden comprender  
25 sustancias que son sustancias imitadoras del estrés que imitan un estrés abiótico o biótico. Los ejemplos no limitantes de agentes estresantes químicos son herbicidas, protector de herbicida, insecticidas, fungicidas, metabolitos secundarios de plantas, compuestos sintéticos o naturales que  
30 inducen la defensa de la planta.

El término *protector de herbicida* se refiere a un compuesto que protege de forma selectiva las plantas monocotiledóneas del daño por herbicida mientras que las plantas dicotiledóneas aún se ven afectadas por los herbicidas. Las plantas de cultivo habituales tales como arroz, trigo, maíz, etc., y además la hierba de forraje, caña de azúcar y bambú son plantas monocotiledóneas mientras que la mayoría de las especies de mala hierba son plantas dicotiledóneas. Los protectores de herbicida se pueden aplicar como un tratamiento para las semillas antes de su siembra, para preparar el suelo de o se pueden aplicar a los suelos de plantas que ya están crecidas. En los dos últimos casos los protectores de herbicida se pueden aplicar junto con los herbicidas. Los ejemplos de protectores de herbicida comunes son: Benoxacor (CAS 98730-04-2), Cloquintocet-mexilo (CAS 99607-70-2), Ciometrinilo (CAS 63278-33-1), Diclormid (CAS 37764-25-3), Fenclorazol-etilo (CAS 103112-35-2), Fenclorim (CAS 3740-92-9), Flurazol (CAS 72850-64-7), Fluxofenim (CAS 88485-37-4), Furilazol (CAS 121776-33-8), Mefenpir-dietilo (CAS 135590-91-9), MG 191 (CAS 96420-72-3), Anhídrido naftálico (CAS 81-84-5), MON-13900 (CAS 121776-33-8), LAB 145138 (CAS 79260-71-2) y Oxabetrinilo (CAS 74782-23-3).

En ciertas realizaciones, el elemento transponible es un retrotransposón.

En cierta realización, la célula es parte de un organismo pluricelular. En ciertas realizaciones, la célula eucariota es parte de un organismo no humano.

En ciertas realizaciones, la célula eucariota es una célula vegetal. En ciertas realizaciones, la célula vegetal es una célula de *Arabidopsis*, en particular *Arabidopsis thaliana*.

5

En ciertas realizaciones, la célula vegetal es parte de plantas de cultivo, en particular de la familia de *Poaceae* que comprende plantas tales como arroz, caña de azúcar, maíz, trigo, centeno, cebada, avena o mijo. En ciertas realizaciones, el método comprende una etapa posterior de aislamiento de dicha célula y determinación de si un fenotipo de la célula ha cambiado.

En ciertas realizaciones, la célula eucariota es parte de un organismo pluricelular, en particular una planta, y en la que después de la exposición de la célula a la etapa c), la célula se cultiva para presentar un organismo pluricelular, y el fenotipo del organismo pluricelular se determina.

20

En ciertas realizaciones, el fenotipo del organismo comprende la determinación de la resistencia al agente estresante, en las que el agente estresante produce el estrés aplicado en la etapa c).

25

En ciertas realizaciones, la resistencia al agente estresante que produce el estrés aplicado en la etapa c) aumenta después de la aplicación del método de la invención.

30

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención se proporciona un método para aumentar la variación genética y/o

epigenética en una población de organismos eucariotas. El método comprende:

- i. proporcionar un organismo eucariota,
- 5 ii. poner en contacto el organismo eucariota con
  - o un inhibidor de la metilación de ADN, y/o
  - o un inhibidor de transcripción,
- iii. propagar el organismo eucariota, proporcionando la población eucariota con un aumento de la variación
- 10 genética y/o genética.

El método moviliza los elementos transponibles latentes, es decir inactivos, en la actualidad no se han transcrito ni se han transcrito de forma inversa, dentro del organismo eucariota. Debido al conocimiento de los inventores, todos los organismos eucariotas comprenden elementos transponibles latentes dentro de su genoma, el elemento "organismo eucariota" es sinónimo de "organismo eucariota que comprende un elemento transponible latente".

20

En ciertas realizaciones, el método se usa en un organismo eucariota que comprende uno cualquiera de los elementos transponibles específicos que se mencionan en la presente memoria descriptiva.

25

En ciertas realizaciones del segundo aspecto de la invención, el método comprende adicionalmente una etapa ii.a, que sigue a la etapa ii., de:

- ii.a exposición del organismo eucariota a un estrés abiótico,
- 30 estrés biótico o estrés químico.

En ciertas realizaciones, el inhibidor de metilación de ADN y/o el inhibidor de transcripción se proporcionan como una solución en un disolvente polar, en particular un disolvente aprótico polar, más particularmente dimetil sulfóxido (DMSO).

En ciertas realizaciones, el inhibidor de metilación de ADN y/o el inhibidor de transcripción se proporcionan como una solución en un disolvente polar, en particular agua.

10

En ciertas realizaciones, el método comprende la etapa iv. posterior que comprende:

- a. determinar cualquier cambio genético y/o epigenético o
- 15 b. determinar cualquier cambio en el fenotipo, en particular la resistencia a cualquier agente estresante aplicado en la etapa ii.a

en el que estos cambios se determinan en los organismos eucariotas constituyentes individuales o para una muestra representativa de la población de organismos eucariotas, o para todos los organismos eucariotas constituyentes de la población.

En ciertas realizaciones del primer y el segundo aspectos de la invención, el estrés abiótico se selecciona entre calor, frío, sequía, inmersión/ exceso de agua, viento, radiación UV, radiación nuclear, salinidad, metales pesados, pH del suelo, cultivo del medio de cultivo tisular y privación (fósforo, nitrógeno, luz, CO<sub>2</sub>, etc.).

30

En ciertas realizaciones del primer y el segundo

aspectos de la invención, el estrés biótico se selecciona entre el impacto negativo de hongos, bacterias, virus, insectos, formación de heridas por herbívoros y competición biológica. Los ejemplos no limitantes de hongos que tienen un

5 impacto negativo podrían ser *Phytophthora infestans* (roya de la patata) y *Magnaporthe grisea* (tizón del arroz). Los ejemplos no limitantes de bacterias que tienen un impacto negativo son *Botrytis cinerea* (moho gris), *Xylella fastidiosa* (Síndrome del Declive Rápido del Olivo) y *Puccinia spp.* (roya

10 del trigo). Los ejemplos no limitantes de virus que tienen un impacto negativo son el virus del mosaico del Tabaco y el virus de la marchitez moteada del Tomate. Los ejemplos no limitantes de insectos que tienen un impacto negativo son

*Mamestra brassicae* (polilla del repollo), *Helicoverpa zea*

15 (gusano elotero del maíz) y *Ostrinia nubilalis* (barrenador europeo del maíz). Los ejemplos no limitantes de otros organismos que pueden tener un impacto negativo debido a competición biológica son *Orobancha* (colza de retama) y *Ambrosia trifida* (ambrosía gigante).

20

En ciertas realizaciones del primer y el segundo aspectos de la invención, el estrés químico se selecciona entre herbicidas, protector de herbicida, insecticidas, fungicidas, metabolitos secundarios de plantas, compuestos

25 sintéticos o naturales que inducen la defensa de la planta. Los ejemplos no limitantes de compuestos que inducen defensa de la planta son flagelina (compuesto natural, inductor bacteriano; Felix et al., 1999, Plant J.), una secuencia de

22 aminoácidos de la parte N-terminal conservada de la

30 flagelina (flg22), ácido salicílico y análogos por ejemplo Bion® (compuesto natural con análogos sintéticos; (Vlot et

*al.*, 2009, *Annu. Rev. Phytopathol.*; Friedrich *et al.*, 1996, *Plant J.*)), ácido jasmónico y éster de metilo del ácido jasmónico (compuestos naturales; Cohen *et al.*, 1993, *Phytopathology*), etileno (compuesto natural; van Loon *et al.*, 2006, *Trends Plant Sci.*), ácido abscísico (compuesto natural; Mauch-Mani y Mauch, 2005, *Curr. Opin. Plant Biol.*) y compuestos volátiles tales como terpenos y compuestos volátiles de hoja verde (compuestos naturales; revisado por Unsicker *et al.*, 2009, *Curr Opin Plant Biol*).

10

En ciertas realizaciones del primer y el segundo aspectos de la invención, el inhibidor de metilación de ADN es un análogo de nucleósido.

15

En ciertas realizaciones del primer y el segundo aspectos de la invención, el inhibidor de metilación de ADN se selecciona entre 5-azacitidina, 5-aza-2'-desoxicitidina, 5-fluoro-2'-desoxicitidina, 5,6-dihidro-5-azacitidina y zebularina.

20

En ciertas realizaciones del primer y el segundo aspectos de la invención, el inhibidor de transcripción es un inhibidor de ARN polimerasa, en particular un inhibidor de la ARN polimerasa II, un inhibidor de la ARN polimerasa IV o un inhibidor de la ARN polimerasa V, más particularmente un inhibidor de la ARN polimerasa II.

25

30

En ciertas realizaciones del primer y el segundo aspectos de la invención, el inhibidor de la ARN polimerasa II se selecciona entre

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

10

En ciertas realizaciones de cualquier aspecto de la invención que se desvela en el presente documento, la amatoxina, en particular la alfa-amanitina se usa con una concentración de 0,0005 µg/ml a 50 µg/ml, en particular de  
15 0,001 µg/ml a 25 µg/ml, más en particular de 0,005 µg/ml a 20 µg/ml, incluso más en particular de 0,005 µg/ml a 5 µg/ml.

En ciertas realizaciones de cualquier aspecto de la invención que se desvela en el presente documento, el  
20 inhibidor de metilación de ADN, en particular zebularina, se usa a una concentración de 5 µM a 100 µM, en particular 10 µM a 80 µM, más en particular de 10 µM a 40 µM, incluso más en particular de 20 µM a 40 µM.

25 En ciertas realizaciones del segundo aspecto de la invención, el aumento de la variación genética y/o epigenética en una pluralidad de organismos eucariotas da como resultado un aumento de la resistencia de los organismos que se han expuesto al estrés abiótico o biótico. En otras  
30 palabras el aumento de la variación genética y/o epigenética no es aleatorio tal como se podría esperar por ejemplo a

partir de un mutágeno químico. El aumento se dirigía hacia la resistencia frente al estrés usada en el método. Por ejemplo usando el calor como estrés abiótico se podría dar como resultado preferentemente a organismos resistentes al calor.

5 Sin desear quedar ligado por la teoría, los inventores suponen que los transposones se integran preferentemente en el genoma en las cercanías de los genes creando de ese modo nuevas rutas reguladoras genéticas que son capaces de responder al estrés aplicado previamente. Esto puede conducir  
10 a una diversidad genética en genes activados por el respectivo estrés y de ese modo confiere un aumento de la resistencia al respectivo estrés.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se  
15 proporciona el uso de una composición en un método de acuerdo con el primer y el segundo aspectos de la invención. La composición comprende un inhibidor de metilación de ADN y un inhibidor de transcripción.

20 En ciertas realizaciones, el inhibidor de metilación de ADN es un análogo de nucleósido.

En ciertas realizaciones, el inhibidor de metilación de ADN se selecciona entre 5-azacitidina (CAS 320-67-2), 5-aza-  
25 2'-desoxicitidina (CAS 2353-33-5), 5-fluoro-2'-desoxicitidina (CAS 10356-76-0), 5,6-dihidro-5-azacitidina (CAS 62488-57-7) y zebularina (CAS 3690-10-6).

En ciertas realizaciones, el inhibidor de transcripción  
30 es un inhibidor de ARN polimerasa, en particular un inhibidor de la ARN polimerasa II, un inhibidor de la ARN polimerasa IV

o un inhibidor de la ARN polimerasa V, más particularmente un inhibidor de la ARN polimerasa II.

En ciertas realizaciones, el inhibidor de la ARN polimerasa II se selecciona entre

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

En ciertas realizaciones, la amatoxina, en particular la alfa-amanitina se usa con una concentración de 0,5 nM a 55 µM, en particular de 1 nM a 27,5 µM, más en particular de 5 nM a 20 µM, incluso más en particular de 5 nM a 5 µM.

En ciertas realizaciones de cualquiera de los aspectos de la invención que se desvelan en el presente documento, la proporción de las concentraciones molares del inhibidor de transcripción, en particular alfa-amanitina, con respecto al inhibidor de metilación de ADN, en particular zebularina, este 0,000005 a 11, más en particular de 0,000125 a 2, incluso más en particular de 0,000125 a 0,125.

En ciertas realizaciones, la proporción de la concentración molar depende de las concentraciones a y b, que

son las que siguen a continuación:

a) el inhibidor de metilación de ADN, en particular zebularina, se usa a una concentración de 5  $\mu$ M a 100  $\mu$ M, en particular de 10  $\mu$ M a 80  $\mu$ M, más en particular de 10  $\mu$ M a 40  $\mu$ M, incluso más en particular de 20  $\mu$ M a 40  $\mu$ M

b) amatoxina, en particular alfa-amanitina se usa a una concentración de 0,0005  $\mu$ g/ml a 50  $\mu$ g/ml, en particular de 0,001  $\mu$ g/ml a 25  $\mu$ g/ml, más en particular de 0,005  $\mu$ g/ml a 20  $\mu$ g/ml, incluso más en particular de 0,005  $\mu$ g/ml a 5  $\mu$ g/ml.

Un cuarto aspecto de la invención proporciona un kit de partes para su uso en el método de acuerdo con el primer y el segundo aspectos de la invención. El kit de partes comprende un inhibidor de metilación de ADN y un inhibidor de transcripción.

En ciertas realizaciones, el inhibidor de metilación de ADN es un análogo de nucleósido.

En ciertas realizaciones, el inhibidor de metilación de ADN se selecciona entre 5-azacitidina (CAS 320-67-2), 5-aza-2'-desoxicitidina (CAS 2353-33-5), 5-fluoro-2'-desoxicitidina (CAS 10356-76-0), 5,6-dihidro-5-azacitidina (CAS 62488-57-7) y zebularina (CAS 3690-10-6).

En ciertas realizaciones, el inhibidor de transcripción es un inhibidor de ARN polimerasa, en particular un inhibidor de la ARN polimerasa II, un inhibidor de la ARN polimerasa IV

o un inhibidor de la ARN polimerasa V, más particularmente un inhibidor de la ARN polimerasa II.

En ciertas realizaciones el inhibidor de la ARN  
5 polimerasa II se selecciona entre

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

En cualquier parte en la que alternativas para características separables individuales tales como, por ejemplo, un tipo de inhibidor u organismo se exponen en el  
20 presente documento como "realizaciones", realizaciones separadas de la invención que se desvela en el presente documento.

La invención se ilustra adicionalmente con los  
25 siguientes ejemplos y figuras, a partir de los cuales se pueden concebir realizaciones y ventajas adicionales. Estos ejemplos pretenden ilustrar la invención pero no limitar su alcance.

30 Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra la acumulación de ADN extracromosómico de *ONSEN* después de tratamiento farmacológico y estrés térmico. (a) Acumulación de ADN de *ONSEN* medida mediante qPCR directamente después de tratamiento de estrés de control (CS) y estrés térmico (HS) en plantas de tipo silvestre (WT) y *nrpb2-3* y tratamientos con alfa-amanitina (A, 5 µg/ml) o zebularina (Z, 10 µM) (media ± e.t.m., n = 6 repeticiones biológicas, valores con respecto a *ACTINA 2*). (b) número de copias de *ONSEN* medido mediante PCR cuantitativa (qPCR) en plántulas de Columbia (Col) WT directamente después del estrés de control (CS; 24 h a 6 °C), estrés térmico (HS; 24 h a 6 °C y 24 h a 37 °C) y un tratamiento con A (5 µg/ml), Z (40 µM) o una combinación de los mismos (A y Z). (Media ± e.t.m., n = 3 repeticiones biológicas). El doble tratamiento (A y Z) conduce a una activación de *ONSEN* dependiente del estrés térmico muy fuerte que da como resultado hasta 700 copias de ADN de *ONSEN* extracromosómico.

La Fig. 2 muestra la dependencia al estrés de la movilización de *ONSEN*. El gráfico muestra el número de copias de *ONSEN* en plántulas de *A. thaliana* después de tratamiento químico con A (5 µg/ml), Z (40 µM), las combinaciones de A y Z (A y Z) en plantas de WT, *nrpb2-3* y *nrpd1* después del CS. Número de copias de *ONSEN* medido por qPCR (media ± e.t.m., n = 3 replicados biológicos, valores con respecto a *ACTINA 2*). Este resultado muestra que la producción de ADN extracromosómico de *ONSEN* depende del estrés térmico.

La Fig. 3 muestra que la inhibición simultánea de metiltransferasas y Pol II imita al mutante de *nrpd1*. (a) análisis de metilación asimétrica de la LTR de *ONSEN* y la

*soloLTR* en plántulas sin tratar y plántulas tratadas con A (5 µg/ml), Z (40 µM) o A y Z de WT y del mutante *nrpd1* después de CS. Productos de PCR obtenidos a partir de ARN genómico que se usó sin digerir (entrada) o después de digestión con la enzima de restricción sensible a la Metilación de CHH *DdeI*. La ACTINA 2 se incluye como un control para digestión completa de *DdeI*. El doble tratamiento con A y Z con A (5 µg/ml) y Z (40 µM) dio como resultado una reducción de la metilación de ADN muy fuerte en *ONSEN* y *soloLTR* comparable a la del mutante *nrpd1*. (b) Transferencia de Northern que indica transcripción de *ONSEN* directamente después de CS, HS y HS más tratamiento con A (5 µg/ml), Z (40 µM) o una combinación de A y Z en plantas de WT y *nrpd1*. Como un control de carga se muestra un gel de agarosa teñido con verde Midori. El nivel del transcrito de *ONSEN* de longitud completa después de estrés térmico y el doble tratamiento con A (5 µg/ml) y Z (40 µM) es comparable con el del mutante *nrpd1*. (c) Acumulación de ADN de *ONSEN* medido por qPCR en plántulas de plantas de WT, *rdr6*, *dcl2/3/4* y *nrpd1* directamente después de CS, HS y HS más tratamiento con A, Z o una combinación de A y Z. este resultado muestra que la ARN pol II es activa cadena arriba de las enzimas similares a DICER.

La Fig. 4 muestra la movilización de *ONSEN* inducida por fármacos en plantas de *Arabidopsis* de tipo silvestre. (a) Presentación de transposón que confirma nuevas inserciones de *ONSEN* en la generación de F2 de plantas de WT tratadas con HS (control de HS) y HS y A (5 µg/ml) y Z (40 µM) y (HS+A y Z). Las copias de *ONSEN* integrado se midieron por qPCR (parte superior) y se detectaron mediante presentación de transposón

(parte inferior). Se representan los números de copias de *ONSEN* de siete plantas individuales no relacionadas, seleccionadas. Los números de copias que superan ocho tal como se mide por qPCR (parte superior) y las bandas adicionales observadas en la presentación del transposón (parte inferior) en las plantas de Col de WT tratadas con HS+A y Z indican nuevas inserciones de copias de *ONSEN* adicionales. M es un marcador con un tamaño de 1kb. (b), Número de copias de *ONSEN* en la generación F1, F2 y F3 medido por qPCR (n = 3 replicados técnicos, valores con respecto a *ACTINA 2*). Un número de copias > 8 en las líneas 1-7 indica inserciones de copias de *ONSEN* adicionales. c, y d, son fotografías de plantas de F2 que contienen nuevas inserciones de *ONSEN* que muestran variabilidad fenotípica tanto homogénea como dependiente del estrés inducida por el tratamiento con HS+A y Z cuando se cultivan en condiciones de día largo (c) y corto (d). Datos de qPCR para la generación de F3 de la línea 6 en (b) así como fotografías de fenotipos en (c) y (d) se pierden debido a una infertilidad grave y a la extinción de esta línea. Los ejemplos para los fenotipos observados en las líneas con nuevas inserciones de *ONSEN* (líneas-7) incluyen biomasa más elevada en condiciones de día corto (línea 3), floración temprana en condiciones de día largo (línea 7) y reducción de la acumulación de clorofila (línea 1). En resumen, este conjunto de datos muestra que el tratamiento con A y Z conduce a un estallido eficaz de la transposición de *ONSEN*. Se heredan nuevas inserciones de *ONSEN* de forma estable con respecto a varias generaciones y producen cambios fenotípicos.

La Fig. 5 muestra el aumento de números de copias de

*ONSEN* en combinaciones de F1 de plantas expresadas con calor tratadas. Las plantas precursoras se trataron y se sometieron a estrés térmico en experimentos independientes (letras a-c) con una combinación de A (5 µg/ml) y Z (40 µM). Las combinaciones con un aumento significativo del número de copias de *ONSEN* (> 10) se resaltan en color gris oscuro. Número de copias de *ONSEN* medido por qPCR (media ± e.t.m., n = 3 repeticiones técnicas, valores con respecto a *ACTINA* 2). Aproximadamente un 29,4 % de las combinaciones de F1 de plantas de tipo silvestre sometidas a estrés térmico y tratadas con A+Z presentaban un aumento significativo del número de copias de *ONSEN*.

La Fig. 6 muestra un resumen de nuevas inserciones de *ONSEN* confirmadas. (a) Distribución amplia de genoma y (b) primer plano de regiones con nuevas inserciones de new *ONSEN* en la generación de F2 de una planta de WT tratada con HS+A y Z seleccionada (línea N° 3). La orientación de las inserciones de *ONSEN* se indica con flechas centrales.

La Fig. 7 muestra la activación inducida por fármacos del retrotransposón *Houba* en arroz (*O. sativa*). Análisis de moviloma de ADN extraído de plántulas después de crecimiento en condiciones de control (C), A (5 µg/ml), Z (40 µM), y la combinación de A y Z. (a) Detalle de la profundidad normalizada de cobertura en comparación con la planta de control sin tratar obtenida después de alineamiento de las lecturas secuenciadas en un elemento de *Houba*. (b) Esquema de localización de cebadores (barra de color negro: elemento de *Houba*, flechas: cebadores de PCR, box: LTR). (c) Las formas circulares extracromosómicas de *Houba* se detectan de forma

específica en plantas tratadas tanto con A como con Z usando PCR inversa con cebadores que se muestran en 4b. (d) La PCR específica en ADN de cloroplasto circular se muestra como un control de carga. El ADN total sometido a una amplificación de círculo giratorio se usó como un molde. Estos resultados demuestran la movilización eficaz dependiente de A y Z del transposón de *Houba* en arroz.

La Fig. 8 muestra un aumento de la tolerancia térmica en la generación de F2 de plántulas de *Arabidopsis* tratadas. Tolerancia al estrés térmico repetitivo (42 °C) en la progenie de F2 de plantas de tipo silvestre que se sometieron solamente a estrés térmico (control) o sometidas a estrés térmico y tratadas con A (5 µg/ml) y Z (40 µM) (N.º 1-3). (a) Se representan dos replicados biológicos (I e II), (b) Porcentaje de plántulas vitales (Media ± e.t.m., n = 2 repeticiones biológicas). Las plántulas de F2 que se originan a partir de plantas sometidas a estrés térmico y tratadas con A y Z muestran un aumento significativo de la tolerancia térmica (> 60 % de plántulas vitales) en comparación con la F2 de una planta que solamente se sometió a estrés térmico (10 % de plántulas vitales). Esto demuestra que la movilización dependiente de A y Z de un transposón sensible al estrés térmico puede producir plantas que se adaptan mejor al estrés térmico.

La Fig. 9 muestra una acumulación dependiente de la dosis de ADN extracromosómico de *ONSEN* después de tratamiento farmacológico y estrés térmico. El número de copias de *ONSEN* se midió por qPCR en plántulas de *Columbia* (Col) de tipo silvestre directamente después del estrés de control (CS),

estrés térmico (HS) y un tratamiento con  $\alpha$ -amanitina en diferentes concentraciones dadas en  $\mu\text{g/ml}$ . (Media  $\pm$  e.t.m.,  $n = 3$  repeticiones técnicas). Esto muestra que el número de transposones movilizados se puede regular con la cantidad de A usada para el tratamiento.

La Fig. 10 muestra cambios epigenéticos a nivel de metilación de ADN inducida por el tratamiento de plantas y células humanas con A. (a) Gel de Agarosa teñido con Midori que muestra una reducción de la metilación de ADN en la LTR de *ONSEN* después de tratamiento farmacológico y estrés térmico en plántulas de WT (Col) directamente después del estrés de control (CS; 24 h a 6 °C), estrés térmico (HS; 24 h a 6 °C y 24 h a 37 °C) y un tratamiento con A (20  $\mu\text{g/ml}$ ), Z (10  $\mu\text{M}$ ) o una combinación de los mismos (A y Z). El ADN sin digerir se usó como un molde de PCR para el control de carga (entrada). La PCR en ADN digerido con *DdeI* muestra una reducción de la metilación de ADN después de tratamiento con A, Z o una combinación de A y Z. (b) Estado de metilación de CHH en la LTR de *ONSEN* evaluado mediante secuenciación de bisulfito realizara en plantas sometidas a CS que crecen en un medio con o sin A. (c) Niveles de metilación de ADN de LINE-1 evaluados en células de cáncer A549 humano cultivadas en medio de control y medio suplementado con 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de A. Esto muestra que A se puede usar como un agente de desmetilación de ADN potente en células vegetales y humanas.

La Fig. 11 muestra acumulación de ADN extracromosómico de *ONSEN* después de tratamiento combinado farmacológico y con flagelina. Número de copias de *ONSEN* medido mediante PCR cuantitativa (qPCR) en plántulas de Col de tipo silvestre

directamente después del estrés de control, 5 h después del tratamiento con flagelina (flg22) sola o en combinación con A (5 µg/ml), Z (40 µM) o una combinación de los mismos (A y Z). (Media ± e.t.m., n = 3 repeticiones técnicas).

5

La Fig. 12 muestra activación de *ATCOPIA17* después de tratamiento combinado farmacológico y con flagelina. El factor de cambio de *ATCOPIA17* se midió mediante PCR cuantitativa (qPCR) en ADN total en plántulas de Col de tipo silvestre directamente después del estrés de control, 5 h después de tratamiento con flagelina (flg22) sola o en combinación con A (5 µg/ml), Z (40 µM) o una combinación de los mismos (A y Z). (Media ± e.t.m., n = 3 repeticiones técnicas).

15

La Fig. 13 muestra acumulación de ADN extracromosómico de *ONSEN* después de tratamiento farmacológico y estrés térmico. El número de copias de *ONSEN* se midió mediante PCR cuantitativa (qPCR) en ADN total en plántulas de WT directamente después del estrés de control (CS; 24 h a 6 °C), estrés térmico (HS; 24 h a 6 °C y 24 h a 37 °C) y HS más tratamiento con alfa-aminitina (A, 20 µg/ml), zebularina (Z, 10 µM) y HS más la combinación de A y Z. Este resultado demuestra la consistencia de los tratamientos independientes de las concentraciones relativas de A y Z.

25

### Ejemplos

Los inventores han descubierto un método altamente eficaz para activar y movilizar los TE en eucariotas. El tratamiento implica fármacos que se dirigen a mecanismos

30

eucariotas altamente conservados: metilación y transcripción de ADN.

### *Ejemplo 1*

5

Para investigar el papel de la Pol II en la movilidad de TE los inventores eligieron el retrotransposón *ONSEN* bien caracterizado similar a copias sensibles al calor (Ito, H. et al., Nature, 2011, 472: 115-119) de Arabidopsis. En primer

10 lugar los inventores sometieron a ensayos si las plantas con déficit de Pol II presentaban un aumento de la actividad de TE. Para este fin, los inventores se aprovecharon del anhelito mutante *nrpb2-3* hipomórfico que acumula a niveles reducidos de proteína NRPB2 (Zeng, B. et al., Genes Dev, 2009, 23:

15 2850-2860). Usando PCR en tiempo real, se determinó que la estimulación de plántulas de *nrpb2-3* con estrés térmico (denominado HS en el presente documento) conducía a un aumento ligero el ADNec de *ONSEN* en comparación con el tipo silvestre (Fig. 1a). Este resultado estaba apoyado por el

20 aumento observado en el ADNec de *ONSEN* después de inactivación farmacológica de Pol II con 5 µg/ml de  $\alpha$ -amanitina (denominada A en el presente documento), un potente inhibidor de Pol II que no afecta a Pol IV o Pol V (Haag, J.R. et al., Mol Cell, 2012, 48: 811-818) (Fig. 1a, b). La

25 transcripción por la ARN Polimerasa II (Pol II) se inhibe con  $\alpha$ -amanitina, derivados de la misma u otros inhibidores de Pol II. La inhibición global de la metilación de ADN se consigue mediante tratamientos con zebularina o 5-aza-2'-desoxicitidina (y derivados de las mismas). Para someter a

30 ensayo la interacción entre la represión mediada por Pol II de la activación de TE y la metilación de ADN, los inventores

cultivaron plantas de tipo silvestre y *nrpb2-3* en medios suplementados con cantidades moderadas de zebularina (denominada Z en el presente documento, 40  $\mu$ M para plantas de tipo silvestre, 10  $\mu$ M para plantas de *nrpb2-3* para asegurar la viabilidad de las plántulas de *nrpb2-3*), un inhibidor de ADN metiltransferasas activo en plantas (Baubec, T. et al., Plant J, 2009, 57: 542-554) y sometiendo las a HS. La presencia de Z en el medio durante el HS aumentaba generalmente la producción de ADNec de *ONSEN*. De forma notable, este aumento inducido en la acumulación de ADNec era más distinto en el fondo de *nrpb2-3* (Fig. 1a). Esto indicaba que tanto, la metilación de ADN como la actividad de transcripción de Pol II contribuyen a la represión de la producción de ADNec de *ONSEN*. Dado que tanto la metilación de ADN como de Pol II se puede inhibir de forma específica mediante la adición de diferentes fármacos, los inventores sometieron a ensayos si el tratamiento de plantas de tipo silvestre tanto con A como con Z al mismo tiempo podría activar fuertemente e incluso movilizar el *ONSEN* después de un tratamiento de estrés térmico. Los inventores cultivaron plántulas de WT en medio MS suplementado con cada fármaco individualmente y ambos combinados. De acuerdo con la fuerte activación de *ONSEN* en plántulas de *nrpb2-3* sometidas a estrés térmico y tratadas con Z, el tratamiento combinado (A+Z) de la plántula de WT da lugar a una acumulación ADNec de *ONSEN* muy elevada (Fig. 1b) y dependiente del HS (Fig. 2) comparable a la del mutante *nrpd1* (Fig. 3c).

#### *Ejemplo 2*

Para una mejor comprensión del efecto que tienen los

fármacos a nivel del ADN que subyace al aumento de activación de *ONSEN* después de HS, los inventores evaluaron como influían en la metilación de ADN en la repetición terminal larga (LTR) de un locus endógeno de *ONSEN* seleccionado (AT1TE12295) y a una diana de RdDM bien caracterizada sin relacionar (soloLTR). El tratamiento de las plantas con A o Z individualmente ya dio como resultado una reducción de los niveles de metilación de CHH en la LTR de *ONSEN* después de CS (Fig. 3a). La combinación de los dos fármacos condujo a una pérdida de metilación de ADN comparable a la del mutante *nRPD1*. La metilación de ADN en la soloLTR mostraba una respuesta diferente en los tratamientos con fármaco en forma de una reducción de los niveles de metilación de ADN que solamente se observan en plantas sometidas a un tratamiento combinado de A y Z. A continuación los inventores comprobaron que mediante Transferencia de Northern el grado de reducción de metilación de CHH podría coincidir con un aumento de los niveles de transcrito de *ONSEN* directamente después de HS. Los inventores encontraron que el tratamiento con Z solo ya daba como resultado los niveles de transcrito de *ONSEN* más elevados después de HS (Fig. 3b). A partir de esta observación, los inventores llegaron a la conclusión de que estos transcritos inducidos por Z adicionales no eran moldes adecuados para la producción de ADNec de *ONSEN* (comparar la Fig. 1 y la Fig. 3b).

En *Drosophila*, se ha mostrado que la transcripción antisentido mediada por Pol II da como resultado la producción de los ARNsi obtenidos a partir de TE de una forma dependiente de Dicer-2 (Russo, J. et al. Genetics, 2016, 202: 107-21). Apoyando esta observación para *Arabidopsis*, una

publicación reciente destacó la importancia de DCL3 en la regulación de *ONSEN* en el fondo de *ddm1* (Panda, K. et al. Genome Biol, 2016, 17: 1-19). Para esclarecer si el efecto de la inhibición de Pol II también dependía de *dicer*, los inventores cultivaron tanto el mutante *rdr6* como el triple mutante *dcl2/3/4* (que tiene defecto de tres de los cuatro enzimas similares a *dicer* de planta, las DCL) en A, aplicaron HS y midieron el ADNec de *ONSEN*. Los inventores encontraron que A todavía estaba aumentando la acumulación de ADNec en *rdr6* mientras que la inhibición de Pol II no tenía efecto en el triple mutante *dcl2/3/4* (Fig. 3c). Este hallazgo apoya la observación de que Pol II actúa cadena arriba de la etapa de procesamiento catalizada por las DCL.

### 15 Ejemplo 3

Hasta el momento la movilización de los TE endógenos en plantas ha sido muy ineficaz, limitando de ese modo su uso en investigación básica y en de producción de plantas. Los inventores no han observado anteriormente transposición de *ONSEN* en plantas de tipo silvestre tratadas con HS (Ito, H. et al. Nature, 2011, 472: 115-119). Dado que el tratamiento con los fármacos A y Z daba como resultado un aumento de la acumulación de ADNec de *ONSEN* hasta un grado similar al igual que en *nrpd1*, los inventores sometieron a ensayos y el tratamiento con fármacos combinados podría conducir a una movilización eficaz de *ONSEN* en plantas de tipo silvestre. En primer lugar, los inventores evaluaron mediante PCR en tiempo real si, y en qué frecuencias, se podrían detectar nuevas copias de *ONSEN* en la progenie de plantas tratadas con A y Z y sometidas a estrés térmico. Los inventores encontraron

nuevas inserciones de *ONSEN* en un 29,4 % de las combinaciones de F1 sometidas a ensayo (n = 51) con números de copias promedio de las combinaciones que alcanzaban hasta 52 (Fig. 5). A continuación los inventores confirmaron nuevas inserciones de *ONSEN* estables en un subconjunto de plantas de copia elevada individuales independientes mediante presentación de transposón (Fig. 4a), PCR en tiempo real (Fig. 4b) y secuenciación de algunas inserciones en una línea de copias elevadas seleccionada (N.º 3) (Fig. 6). La combinación de HS, A y Z dio como resultado un número similar de copias de *ONSEN* extracromosómico tal como se había observado previamente en plantas con deficiencia de RdDM. Los inventores detectaron nuevas inserciones de *ONSEN* en la progenie de un 27 % de las plantas tratadas. De acuerdo con las mediciones de qPCR, se detectaron hasta 90 +/- 6 copias insertadas en plantas individuales en las generaciones de F2 y sucesivas generaciones de plantas tratadas con A, Z y HS (Figura 4a). Estas inserciones se confirmaron adicionalmente mediante presentación de transposón. Los inventores no observaron aumentos adicionales del número de copias de *ONSEN* con respecto a tres generaciones lo que indica que las nuevas inserciones eran estables y que *ONSEN* ya no se estaba trasponiendo (Fig. 4b).

Las inserciones de TE pueden interrumpir genes o alterar su expresión mediante marcas epigenéticas de reclutamiento o mediante transcripción de lectura dependiente del estrés desde la posición 3'LTR en regiones de flaqueo (Lisch, D., Nat Rev Genet, 2013, 14: 49-61). Para someter a ensayo de esto, los inventores cultivaron la generación de F2 de las líneas de copias elevadas seleccionadas mencionadas

anteriormente bajo condiciones de día largo y corto. Los inventores observaron que muchas líneas presentaban fenotipos claros y homogéneos como respuesta a las diferentes condiciones de crecimiento (tamaño, contenido de clorofila y tiempo de floración de la planta, Fig. 4c y d).

#### *Ejemplo 4*

Los inventores sometieron a ensayos y Pol II desempeña un papel más general en la represión de los TE en plantas. Debido a su paisaje epigenético significativamente diferente en comparación con *Arabidopsis*, los inventores eligieron el cultivo de *O. sativa* de arroz monocotiledóneo bien caracterizado genéticamente (Kawahara, Y. et al., 2013, Rice, 6: 4-10). Para capturar los TE movilizados inducidos por fármacos, los inventores caracterizaron el moviloma activo en plántulas de *O. sativa* que se cultivaron en medio MS suplementado sin fármacos, solamente con A, solamente con Z o con la combinación de A y Z, usando un método que permite secuenciar de forma específica un ADN circular extracromosómico (ADNecc). El ADNecc es un producto secundario del ciclo vital del retrotransposón de LTR. Usando este enfoque, los inventores identificaron a *Houba*, un retrotransposón de copia similar (Panaud, O. et al., Mol. Genet. Genomics, 2002, 268: 113-121), como altamente activado solamente cuando las plantas se trataban tanto con A como con Z (Fig. 7a). Los datos de secuenciación se confirmaron mediante una PCR específica de ADNecc en los LTR de *Houba* (Fig. 7b y c).

30

#### *Ejemplo 5*

Dado que el tratamiento con A solo reducía la metilación de ADN (Fig. 3a) en Arabidopsis, los inventores querían someter as ensayo la fortaleza y el carácter general de este tratamiento. Para confirmar la fortaleza, las plantas se

5 trataron con A (20 µg/ml), Z (10 µg/ml) y A y Z. A solo ya reducía fuertemente la metilación de ADN a esta concentración más elevada (Fig. 10a), a continuación estos resultados se verían apoyado adicionalmente por la evaluación de la metilación de ADN en el contexto de CHH mediante

10 secuenciación de bisulfito (promedio de 10 pelones secuenciados para cada muestra). Dado que A inhibe la enzima ARN Pol II altamente conservada y que A también es activa en células humanas, los inventores sometieron a ensayos efecto de A en la metilación de ADN en la línea de células de cáncer

15 humano A549. El contenido de metilación de ADN global en las células se evaluó y se comparó con las células en tratar o tratadas con Z. El suplemento del medio de crecimiento con A (0,5 µg/ml) dio como resultado una reducción de un 40 % de la metilación de ADN. Esta reducción era comparable con un

20 tratamiento con el agente de desmetilación de ADN Z (350 µM) (Fig. 10c). A continuación los autores también evaluaron los niveles de metilación de ADN en el retrotransposón del elemento 1 intercalado largo (LINE-1). En LINE-1, A tenía un efecto incluso más pronunciado en la reducción de la

25 metilación de ADN que Z (reducción de un 40 % con respecto a un 20 %, respectivamente). Estos resultados demuestran que un inhibidor de la transcripción se puede usar como un agente de desmetilación de ADN potente en células eucariotas.

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

10

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

15

Para la formación de fenotipos, las plantas de *A. thaliana* se cultivaron en condiciones de día largo (16 h de luz) a 24 °C (día) y 22 °C (noche) y condiciones de día corto (10 h de luz) a 21 °C (día) y 18 °C (noche).

20

La inducción de cambios epigenéticos y la activación e integración estable de elementos transponibles en plántulas de *Arabidopsis* aumentaba mediante la germinación y crecimiento de las mismas en medio de MS a ½ que contenía zebularina (concentración final: 10-40 µM), α-amanitina (concentración final: 0,005-20 µg/ml) o una combinación de ambos agentes químicos (medio inductor).

25

Para desencadenar la transposición del retrotransposón *ONSEN* sensible al calor, plántulas de siete días de edad se

30

expusieron a un choque frío durante 24 h a 6 °C seguido de un estrés térmico durante 24 h a 37 °C (estrés térmico, HS) en condiciones controladas en una cámara de crecimiento (Sanyo). Las plantas de control se transfirieron de nuevo a condiciones de día largo a 24 °C (día) y 22 °C (noche) después del tratamiento con frío a 6 °C durante 24 h (CS, estrés de control, de acuerdo con Ito *et al.*, 2011).

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

*qPCR en ADN total para medir números de copias de ONSEN y COPIA17*

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

En la preparación para la medición de copias de ADN extracromosómico de *ONSEN* en plántulas sometidas a CS/HS y sin tratar/tratadas, las raíces se diseccionaron directamente después del estrés térmico y las plantas se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido hasta la extracción del ADN.

Para trazar el número de copias de *ONSEN* en las generaciones de F1-F3 de control y líneas de copias elevadas,

se extrajo el ADN de hojas verdaderas.

Para el cálculo de la frecuencia de transposición de *ONSEN*, se aisló el ADN total de combinaciones que consisten  
5 en al menos ocho plántulas de la progenie de plantas tratadas con HS+A y Z. La concentración del ADN se midió medido con un Fluorómetro Qubit (Thermo Fisher Scientific).

El número de copias de *ONSEN* se determinó con las qPCR  
10 en ADN total usando una mezcla maestra TaqMan (Life Technologies) en un volumen final de 10 µl en el Light Cycller 480 (Roche). El número de copias de *ACTOPIA17* se midió mediante PCR cuantitativa (qPCR) en un Light Cycller 480 (Roche), usando la Mezcla Maestra de Verde I XYBR 421. La  
15 Actina 2 (At3 g18780) sirvió como un gen estándar para normalización. Las secuencias de los cebadores y sondas para las qPCR se enumeran en la tabla 2.

Para el análisis de secuencias de moviloma, el ADN de  
20 las partes aéreas de tres plántulas de *O. sativa* se extrajo como se ha informado anteriormente (Mette, M. et al., EMBOJ, 1999, 18: 241-248).

5 µg de ADN genómico para cada muestra se purificaron  
25 usando un kit Geneclean (MPBio, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNec se aisló del producto de GeneClean usando la DNasa PlasmidSafe (Epicentre, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, excepto porque la incubación a 37 °C se realizó durante 17 h. Las muestras  
30 de ADN se hicieron precipitar mediante la adición de 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,2), 2,5 volúmenes de

etanol y 1  $\mu$ l de glucógeno (Fisher, USA) e incubando durante una noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El ADN circular precipitado se amplificó mediante amplificación aleatoria de círculo giratorio usando el kit Illustra TempliPhi (GE Healthcare, USA) de acuerdo con

5 las instrucciones del fabricante excepto porque la incubación se realizó durante 65 h a  $28^{\circ}\text{C}$ . La concentración del ADN se determinó usando el kit PicoGreen de ADN (Invitrogen, USA) usando un Light Cycler 480 (Roche, USA). Un nanogramo de ADNec amplificado para cada muestra se usó para apretar las

10 bibliotecas usando el kit de biblioteca Nextera XT (Illumina, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La calidad y la concentración del ADN se determinaron usando un chip Bioanalizador de ADN de alta sensibilidad (Agilent Technologies, USA). Las muestras se combinaron y se cargaron

15 en una plataforma MiSeq (Illumina, USA) y se realizó la secuenciación con extremos emparejados de  $2 \times 250$  nucleótidos. El control de calidad de los archivos FASTQ se evaluó usando una herramienta FastQC (versión 0.10.1). Para eliminar cualquier lectura que se origine a partir de genomas

20 circulares de orgánulos, se hicieron mapas de las lecturas 198 frente a los genomas de mitocondrias y cloroplastos usando la versión 2.2.2 71 del programa Bowtie2 con --formación de mapas locales sensibles. Se hicieron mapas de las lecturas no mapeadas frente al genoma de referencia

25 IRGSP1.0 (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/E/IRGSP/Build5.html>) usando los siguientes parámetros: -- local sensible, -k 1. Los ADN de genomas tanto de mitocondria como de cloroplasto integrados en G. normas nucleares se enmascararon (1.697.400 pb). Las regiones que contienen TE cubren 194.224.800 pb en

30 *O. sativa*. Por último, para cada biblioteca, un archivo de alineamiento .bam que corresponde a regiones genómicas

enriquecidas se consideró para análisis estadístico y se visualizó con el software Visualizador Genómico Integrante (IGV) (<https://www.broadinstitute.org/igv/home>)

5 Tabla 1: Secuencias de cebadores y sondas que se usaron para las qPCR (TaqMan, Life Technologies) para medir el número total de copias de ADN de ONSEN extracromosómico. La Actina 2 sirvió como un gen de control para normalización.

| Cebador                                       | Secuencia 5` -> 3`                               |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| SEQ ID NO 001<br><br>( <i>ONSEN_RT_fw</i> )   | CCACAAGAGGAACCAACGAA                             |
| SEQ ID NO 002<br><br>( <i>ONSEN_RT_rev</i> )  | TTCGATCATGGAAGACCGG                              |
| SEQ ID NO 003<br><br>(sonda de <i>ONSEN</i> ) | (FAM) AAGTCGGCAATAGCTTTGGCGAAGA (BHQ1)           |
| SEQ ID NO 004<br><br>(Actina 2_RT_fw)         | TGCCAATCTACGAGGGTTTC                             |
| SEQ ID NO 005<br><br>(Actina 2_RT_rev)        | TTACAATTTCCCGCTCTGCT                             |
| SEQ ID NO 006<br><br>(Actina 2_sonda)         | (JOE) TCCGTCTTGACCTTGCTGGACG (BHQ-1)             |
| SEQ ID NO 007<br><br>(GenWalkAdaptator1)      | GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGT |
| GenWalkAdaptor2                               | (FOS) ACCAGCCC (AMINO)                           |
| SEQ ID NO 008<br><br>(AP1)                    | GTAATACGACTCACTATAGGGC                           |
| SEQ ID NO 009<br><br>(LTR en 3' de Copia78)   | AACACTTAAACACTTTCTCCA                            |
| SEQ ID NO 010<br><br>706_ATCOPIA17 QT R       | TTAGTATAAGGCTGAGCTGGAACTG                        |
| SEQ ID NO 011<br><br>705_ATCOPIA17 QT F       | CAAGCCTAACCCCTCAGCTACATG                         |

*Presentación de transposón para confirmar inserción de nuevas copias de ONSEN*

La integración estable de copias adicionales del TE de  
5 *ONSEN* en el genoma de plantas sometidas a estrés térmico y  
tratadas se determinó mediante una presentación de transposón  
simplificada basada en el kit Universal GenomeWalker  
(Clontech Laboratories), de acuerdo con Ito et al. 2011.

10 300 ng de ADN total de plantas adultas de la generación  
F2 de HS +/- A y Z se extrajo con un Kit DNeasy Plant Mini  
(QIAGEN) y se digirió con una enzima de restricción de  
cuchilla truncada (Dra I). Después de la purificación con el  
Kit de Purificación de Producto de PCR de Pureza Elevada  
15 (Roche) el ADN digerido se ligó a los GenWalkAdapters 1 y 2  
hibridados. Para la PCR, se usaron el Cebador AP1 específico  
de adaptador y el LTR en la posición de 3' de Copia 78 de  
Cebador específico de *ONSEN*. Los productos de PCR se  
separaron un gel de agarosa al 2 % se tiñó con una Solución  
20 de Tinción de Ácido Nucleico Verde Midori. Para información  
de secuencias véanse las tablas 2 y 3.

*Clonación, secuenciación y formación de genotipos de nuevas inserciones*

25

Para identificar la región genómica de nuevas  
inserciones de *ONSEN*, el producto de PCR de la presentación  
de transposón se purificó usando un Kit de Purificación de  
Producto de PCR de Pureza Elevada (Roche), ligado en un  
30 Vector pGEM-T (Promega) y transformado en *E. coli*. Después de  
una selección de azul blanco, los clones positivos se usaron

para amplificación y secuenciación del inserto (StarSEQ). Las secuencias obtenidas se analizaron con Geneious 8.2.1 y usaron BLAST frente al genoma de referencia de *Arabidopsis thaliana*. Las PCR de formación de genotipos convencionales para demostrar nuevas inserciones de *ONSEN* se realizaron con combinaciones del cebador específico de *ONSEN* "LTR en la posición 3` de presentación de TE de Copia 78" y cebadores que se indican en las tablas 2 y 3.

10    Tabla 3: Nombres, finalidad y secuencias de cebadores

| Nombre / SEQ ID NO               | Secuencias 5' --> 3 '        | Experimento                                          |
|----------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------|
| OnsenFull_F SEQ ID 12            | AAGTGGTATCAGAGCTTGAAGATCC    | Transferencia de Northern                            |
| OnsenFull_R SEQ ID 13            | CAACACCCCCTCTTAAACTTGATTTTGC |                                                      |
| M13F SEQ ID 14                   | CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC      | Clonación y secuenciación                            |
| M13R SEQ ID 15                   | TCACACAGGAAACAGCTATGAC       |                                                      |
| 286 OnsenBis F1<br>SEQ ID 16     | GGTTGAAGGGTYAAAGAGTAAAT      | Análisis de metilación                               |
| 287 OnsenBis R1<br>SEQ ID 17     | CCTCCAAACTACAAAATATCTAAAA    |                                                      |
| 835 Chop PCR ACT2 F<br>SEQ ID 18 | TGTAGTGTCGTACGTTGAACAGAAAGC  |                                                      |
| 836 Chop PCR ACT2 R<br>SEQ ID 19 | TTGGCACAGTGTGAGACACACCA      |                                                      |
| houba_F2 SEQ ID 20               | ATCCTGGGAAGAACAAACCATTAA     | PCR en TE de arroz circular y control de cloroplasto |
| houba_R2 SEQ ID 21               | GAGTTCGAGTACCTTAGCCATGGT     |                                                      |
| Cloroplasto cyc F<br>SEQ ID 22   | ACAACCACTGATGAAGGATT         |                                                      |
| Cloroplasto cyc R<br>SEQ ID 23   | AGAAAGAAAAGCAACGACTG         |                                                      |
| Prove TED 2_20 R                 | ACCTAGCTCTGAGTGATGAA         | Formación de                                         |

|                        |                       |                                          |
|------------------------|-----------------------|------------------------------------------|
| SEQ ID 24              |                       | genotipos de nuevas inserciones de ONSEN |
| Prove TED4_27 F        | TGGATATACACATTGGTTGCA |                                          |
| SEQ ID 25              |                       |                                          |
| Prove TED 2_19 F       | GGAGAAAGCTGAAAACCTGG  |                                          |
| SEQ ID 26              |                       |                                          |
| Prove TED4_30_rev      | CTAGGTTGGTGACTGATGAG  |                                          |
| SEQ ID 27              |                       |                                          |
| Prove TED 2_17 F       | AAGAATGGGAGCAGCATTA   |                                          |
| SEQ ID 28              |                       |                                          |
| Prove3_2R SEQ ID 29    | GCAGTACTATAACCGGGACT  |                                          |
| prove TED3_1 Fw        | GAACTTTCCGTTGTTACCGG  |                                          |
| SEQ ID 30              |                       |                                          |
| Prove TED3 F SEQ ID 31 | ATGAGACAGGGAGCTTATCT  |                                          |
| Prove TED1 R SEQ ID 32 | GGTGTGAACCGAACCTAAAT  |                                          |
| Prove TED 4_25 F       | AAACACCAGAAATCTTTTCGC |                                          |
| SEQ ID 33              |                       |                                          |

PCR en ADN de Houba extracromosómico

La presencia de copias de Houba circular se demostró mediante una PCR inversa en 7 ng del molde amplificado de círculo giratorio que también se usó para secuenciación. Una PCR específica para un ADN de cloroplasto sirvió como un control de carga. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1 % que se tiñó con una Solución de Tinción de Ácido Nucleico Verde Midori (Nippon Genetics Europe). Las secuencias del cebador se proporcionan en la Tabla suplementaria 4.

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

| Cebador / SEQ ID NO         | Secuencia 5` -> 3`        |
|-----------------------------|---------------------------|
| 286 OnsenLTRchopF SEQ ID 34 | GGTTGAAGGGTYAAAGAGTAAAT   |
| 287 OnsenLTRchopR SEQ ID 35 | CCTCCAAACTACAAAATATCTAAAA |
| Houba_F2 SEQ ID 36          | ATCCTGGGAAGAACAAACCATTAA  |
| Houba_R2 SEQ ID 37          | GAGTTCGAGTACCTTAGCCATGGT  |

*Análisis de ARN y Transferencia de Northern*

El ARN total de la parte aérea de plántulas de Arabidopsis se aisló usando el Reactivo TRI (Sigma) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La concentración de ARN se midió (Kit de Ensayo Qubit RNA HS, Thermo Fisher), 15 µg de ARN se separaron en un gel de Agarosa al 1,5 % desnaturalizante, con transferencias puntuales en una membrana Hybond-N+ (GE Healthcare) y se hibridó con 25 ng de una sonda purificada con gel y marcada con P32 (Megaprime DNA Labelling System, GE Healthcare) específica para el transcrito de *ONSEN* de longitud completa (Véase la tabla 3 para secuencias de cebador).

*Análisis de metilación de ADN*

20 ng de ADN genómico total aislado de plántulas de Arabidopsis se digirió con la enzima de restricción sensible a metilación, DdeI (NEB) a 37 °C durante una noche. Después de inactivación con calor a 60 °C durante 20 min, el ADN digerido se usó como un molde para chopPCR. La Actina 2 sirvió como un control para la digestión. El ADN sin digerir se usó como un control de carga. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1 % y se tiñeron con Verde Midori.

Para la línea de células de cáncer humano A549, las

células se cultivaron en medio sin tratamiento o suplementado con cualquiera de Z (350  $\mu$ M) o A (0,5  $\mu$ g/ml), el ADN se extrajo usando el Kit de QiaAmp DNA mini (Qiagen, Francia). A continuación, la metilación de ADN global se calculó mediante

5 la cuantificación de la presencia de 5-metilcitosina con el Kit ELISA de ADN 5-mC (Zymo Research) de acuerdo con las inserciones del fabricante. La metilación de ADN en los transposones LINE-1 se evaluó con el kit de Ensayo de Metilación de ADN Global de LINE-1 (Motivo Activo).

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la movilización de un elemento transponible en una célula eucariota, dicho método

5 comprendiendo las etapas de:

a) proporcionar una célula eucariota que comprende un elemento transponible

b) poner en contacto dicha célula con un inhibidor de transcripción,

10 proporcionando de ese modo una célula eucariota con un elemento transponible movilizado.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la célula se pone en contacto adicionalmente con un inhibidor

15 de metilación de ADN en la etapa b).

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el inhibidor de metilación de ADN y/o el inhibidor de transcripción es un compuesto exógeno, en particular un

20 compuesto de molécula pequeña exógeno.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente una etapa c) de:

25 c) exposición de dicha célula a un estrés abiótico, ésteres biótico o estrés químico.

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que el método comprende

30 una etapa posterior de aislamiento de dicha célula y determinación de si se ha cambiado un fenotipo de dicha

célula.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en el que dicha célula eucariota es parte de un organismo pluricelular, en particular un organismo no humano, en particular una planta, y en el que después de la exposición de dicha célula a la etapa c), la célula se cultiva para presentar un organismo pluricelular, y el fenotipo de dicho organismo pluricelular, en particular una resistencia a un agente estresante, en el que el agente estresante produce el estrés aplicado en la etapa c), se determina.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha célula vegetal es parte de plantas de cultivo, en particular arroz, caña de azúcar, maíz, trigo, centeno, cebada, avena o mijo.

8. Un método para aumentar la variación genética y/o epigenética en una población de organismos eucariotas que comprende:

- i. proporcionar un organismo eucariota,
- ii. poner en contacto dicho organismo eucariota con
  - un inhibidor de metilación de ADN, y/o
  - un inhibidor de transcripción,
- iii. propagar dicho organismo eucariota, proporcionando una población de organismos eucariotas con un aumento de la variación genética y/o epigenética.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende adicionalmente una etapa ii.a después de la etapa

ii.:

ii.a de exposición de dicho organismo eucariota a un estrés abiótico, estrés biótico o estrés químico.

5 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en las que el método comprende la etapa iv. posterior que comprende:

a. determinar cualquier cambio genético en dicho organismo, y/o

10 ib. determinar cualquier cambio en el fenotipo de dicho organismo, en particular un aumento de la resistencia a un agente estresante aplicado en la etapa ii.a

en el que dichos cambios genéticos o fenotípicos se determinan en los organismos eucariotas constituyentes

15 individuales o para una muestra representativa de la población de organismos eucariotas, o para todos los organismos eucariotas constituyentes de la población.

11. El método de acuerdo con una cualquiera de las 20 reivindicaciones precedentes 4 a 7, en el que

i. dicho estrés abiótico se selecciona entre calor, frío, sequía, inmersión/ exceso de agua, viento, radiación UV, radiación nuclear, salinidad, metales pesados, pH del suelo, cultivo del medio de cultivo tisular y privación 25 de fósforo, nitrógeno, luz o CO<sub>2</sub>, y/o

ii. dicho estrés biótico se selecciona entre el impacto negativo de hongos, bacterias, virus, insectos, formación de heridas por herbívoros y competición biológica, y/o

30 iii. dicho estrés químico se selecciona entre herbicidas, protector de herbicida, insecticidas,

fungicidas, metabolitos secundarios de plantas y que compuestos sintéticos o naturales que inducen la defensa de la planta, en particular flagelina, más particularmente flg22.

5

12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho inhibidor de metilación de ADN se selecciona entre 5-azacitidina, 5-aza-2'-desoxicitidina, 5-fluoro-2'-desoxicitidina, 5,6-dihidro-5-  
10 azacitidina y zebularina.

13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho inhibidor de transcripción es un inhibidor de ARN polimerasa, en  
15 particular un inhibidor de la ARN polimerasa II, un inhibidor de la ARN polimerasa IV o un inhibidor de la ARN polimerasa V, más en particular un inhibidor de la ARN polimerasa II.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13 en el que  
20 dicho inhibidor de la ARN polimerasa II se selecciona entre

- i. amatoxinas, en particular alfa-amanitina,
- ii. derivados de amatoxinas, en particular oleato de alfa-amanitina,
- iii. análogos de nucleósido, en particular 5,6-dicloro-  
25 1-beta-D-ribofuranosilbencimidazol (DRB),
- iv. actinomicina D,
- v. flavopiridol,
- vi. triptólido.

30 15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicha amatoxina, en particular alfa-amanitina se usa a una

concentración de 0,0005 µg/ml a 50 µg/ml, en particular de 0,001 µg/ml a 25 µg/ml, más en particular de 0,005 µg/ml a 20 µg/ml, incluso más particularmente de 0,005 µg/ml a 5 µg/ml.

5

16. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho inhibidor de metilación de ADN, en particular zebularina, se usa a una concentración de 5 µM a 100 µM, en particular de 10 µM a 80 µM, más en particular de 10 µM a 40 µM, incluso más en particular de 20 µM a 40 µM.

17. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16, en el que dicho aumento de la variación genética y/o epigenética en una pluralidad de organismos eucariotas da como resultado un aumento de la resistencia de dichos organismos a dicho estrés abiótico, biótico o químico al que se han expuesto dichos organismos.

18. Uso de una composición en un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 17, en el que la composición comprende un inhibidor de transcripción y un inhibidor de metilación de ADN, y en el que la proporción de las concentraciones molares del inhibidor de transcripción, en particular alfa-amanitina, con respecto al inhibidor de metilación de ADN, en particular zebularina, es de 0,000005 a 11, más en particular de 0,000125 a 2, incluso más en particular de 0,000125 a 0,125.

19. El uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 18, en la que

- dicho inhibidor de metilación de ADN, en particular

zebularina, se usa a una concentración de 5  $\mu$ M a 100  $\mu$ M, en particular de 10  $\mu$ M a 80  $\mu$ M, más en particular de 10  $\mu$ M a 40  $\mu$ M, incluso más en particular de 20  $\mu$ M a 40  $\mu$ M

5 y / o

- dicha amatoxina, en particular alfa-amanitina se usa a una concentración de 0,0005  $\mu$ g/ml a 50  $\mu$ g/ml, en particular de 0,001  $\mu$ g/ml a 25  $\mu$ g/ml, más en particular de 0,005  $\mu$ g/ml a 20  $\mu$ g/ml, incluso más en particular de 0,005  $\mu$ g/ml a 5  $\mu$ g/ml.

10

MOVILIZACIÓN DE ELEMENTOS TRANSPONIBLES PARA AUMENTAR LA  
VARIABILIDAD GENÉTICA Y EPIGENÉTICA EN UNA POBLACIÓN

5

Se proporciona un método para la movilización de un elemento transponible. El método comprende las etapas de a) proporcionar un inhibidor de metilación de ADN, y/o un inhibidor de transcripción, y b) poner en contacto el  
10 inhibidor o inhibidores con una célula que comprende elementos transponibles inactivados, proporcionando una célula con elementos transponibles movilizados. En un segundo aspecto de la invención se proporciona un método para aumentar la variación genética y/o epigenética en una  
15 población de organismos eucariotas. El método comprende las etapas de i. proporcionar un inhibidor de metilación de ADN y/o un inhibidor de transcripción, ii. poner en contacto el organismo con el inhibidor o inhibidores e iii. propagar el organismo.

Fig. 1a, b

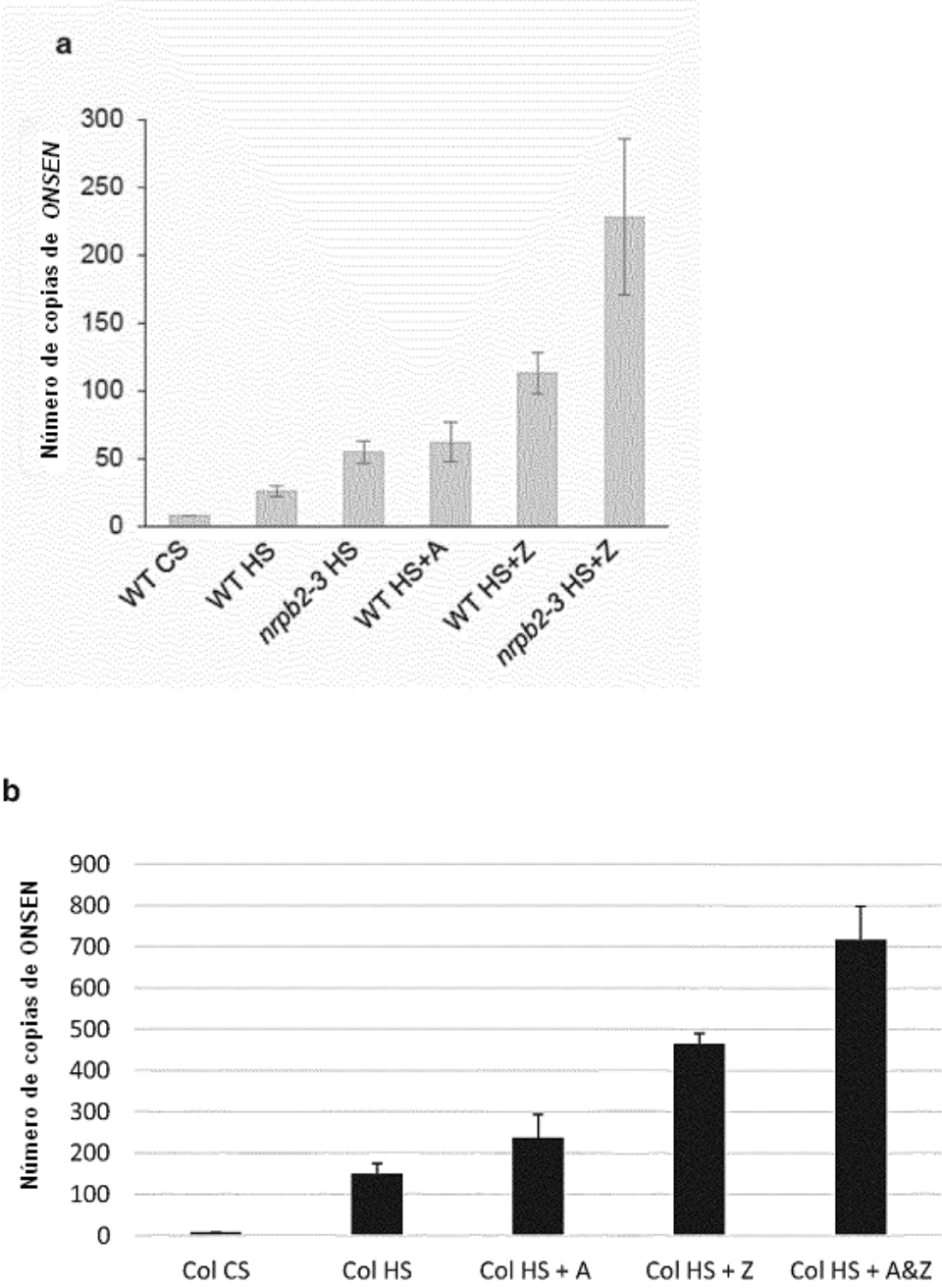


Fig. 2

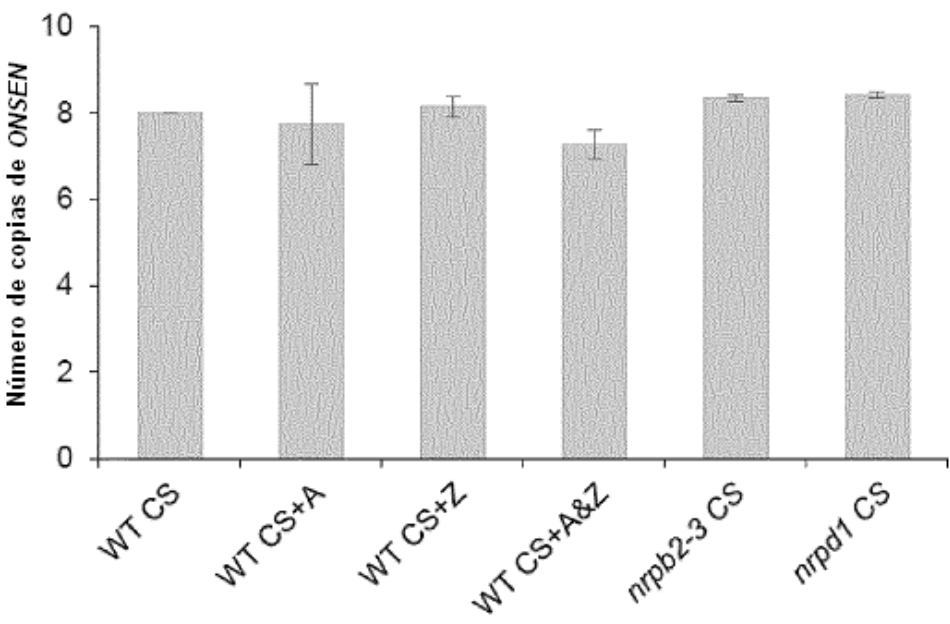


Fig. 3a, b

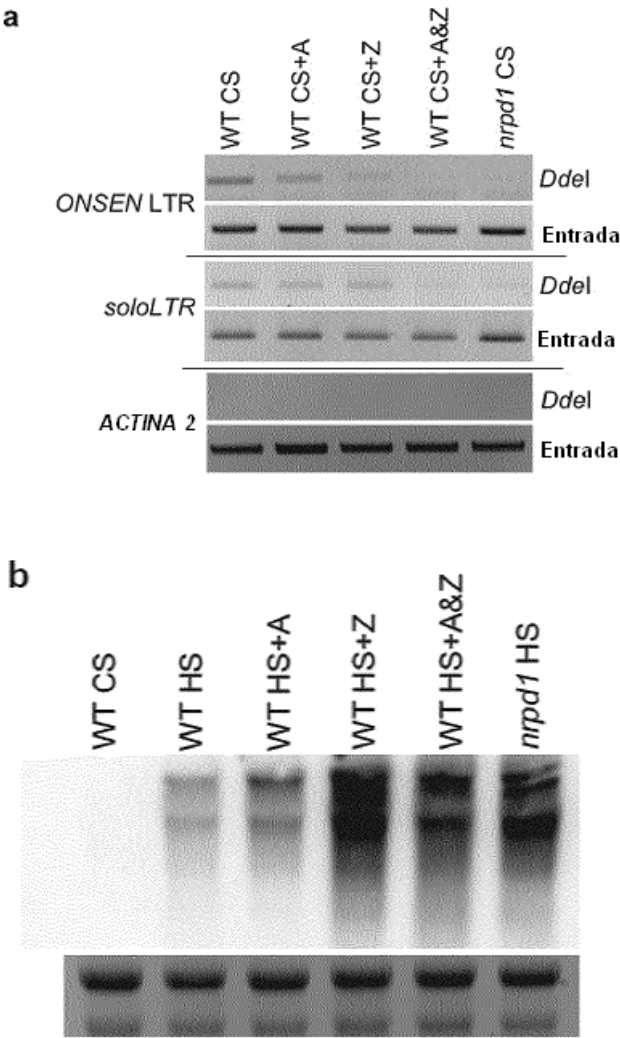


Fig. 3c

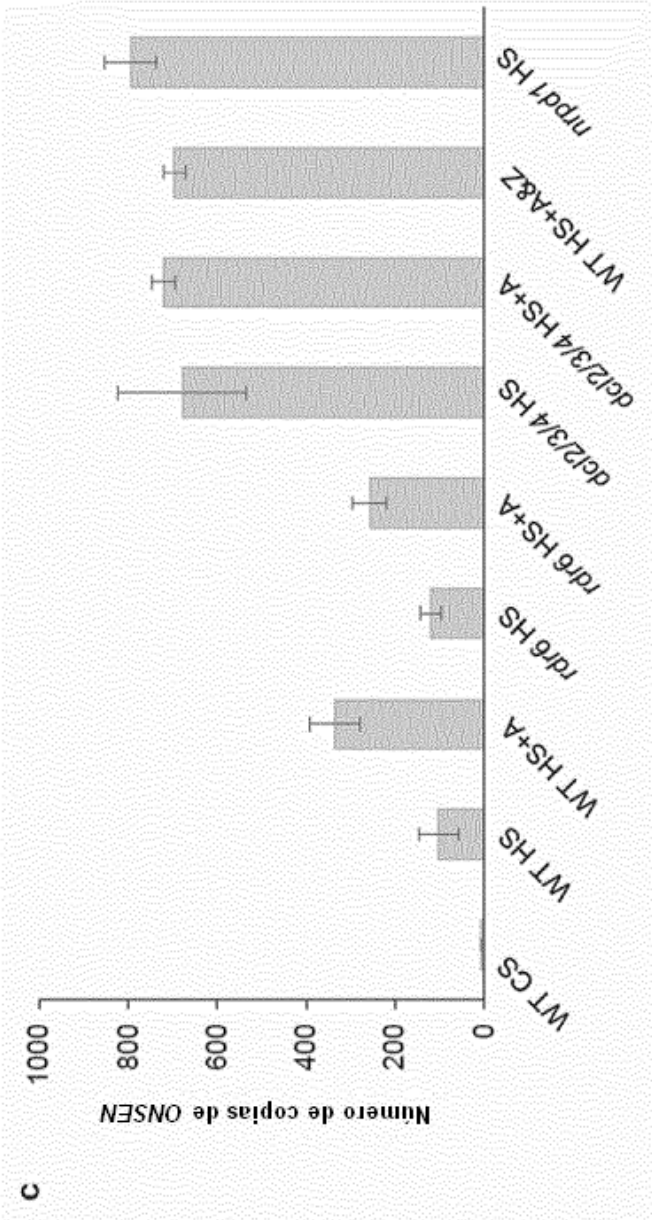


Fig. 4a

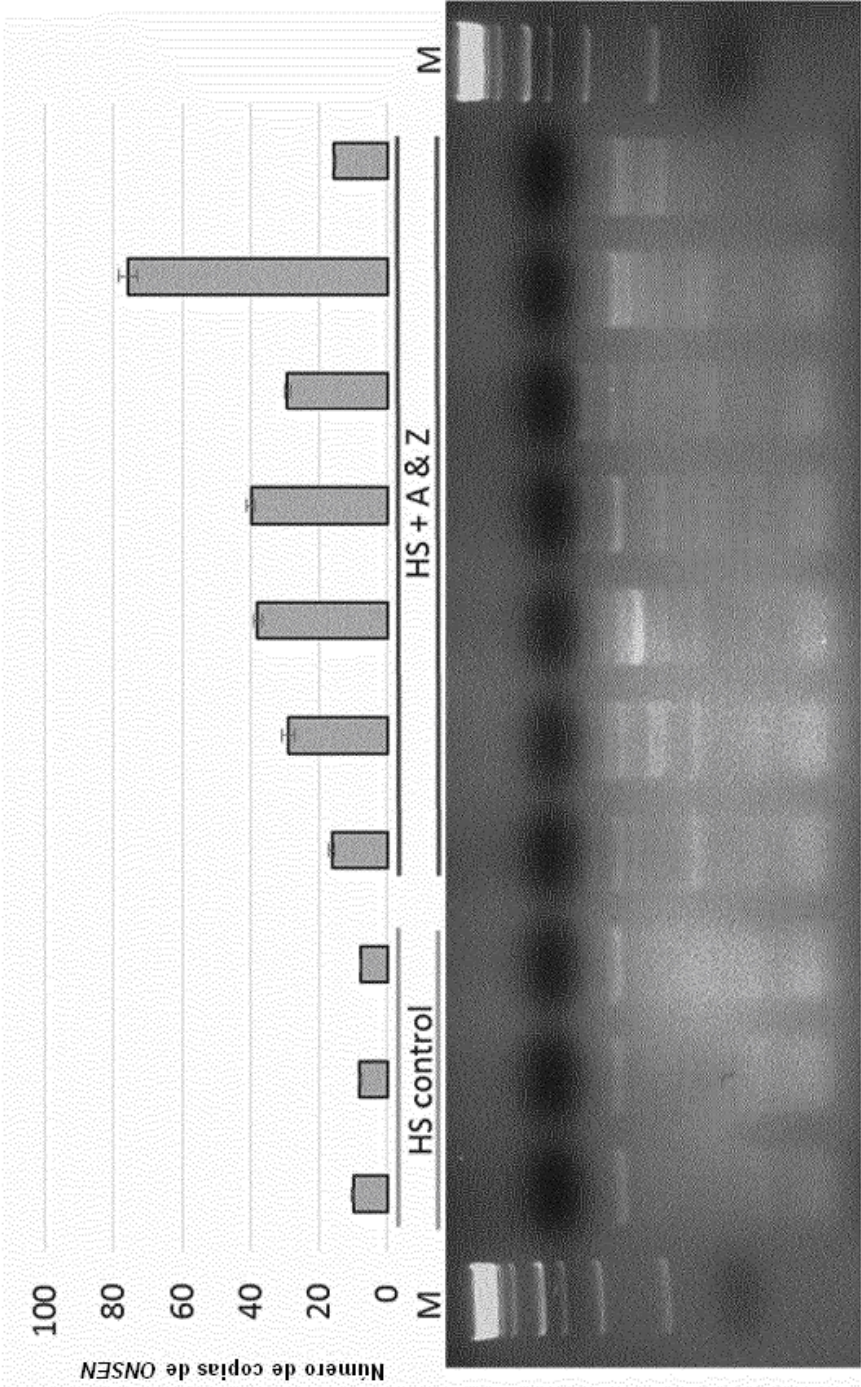


Fig. 4b

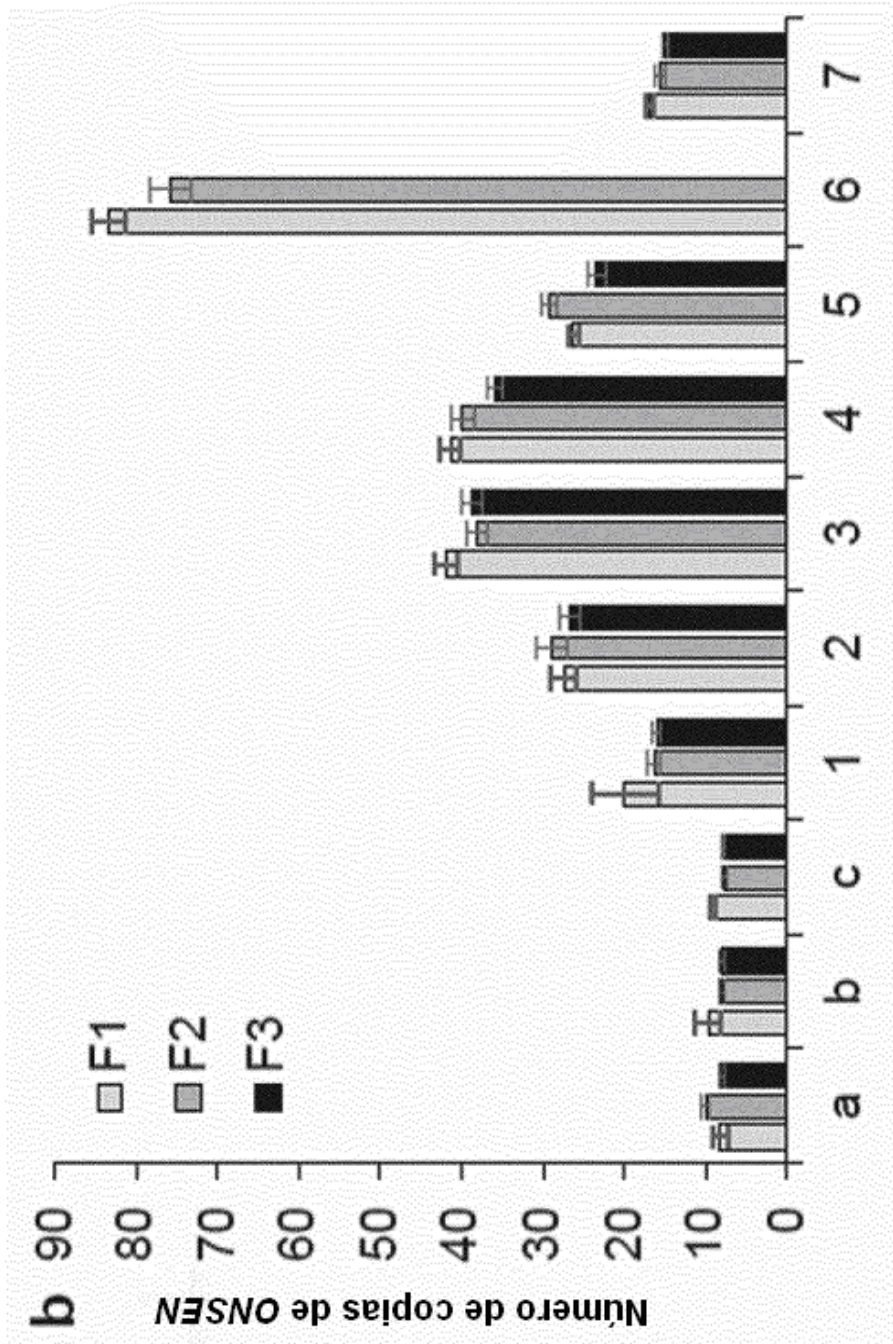


Fig. 4c,d

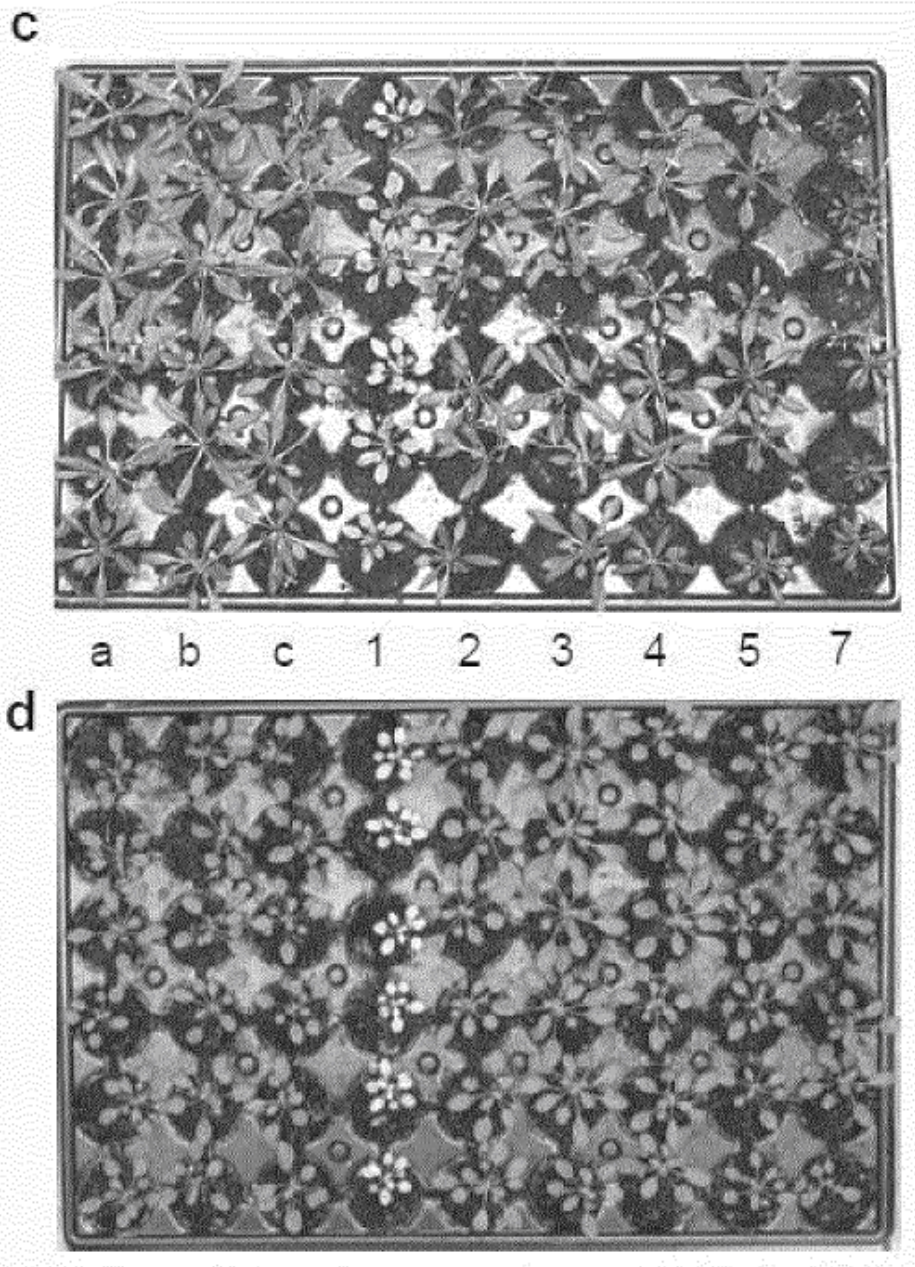


Fig. 5

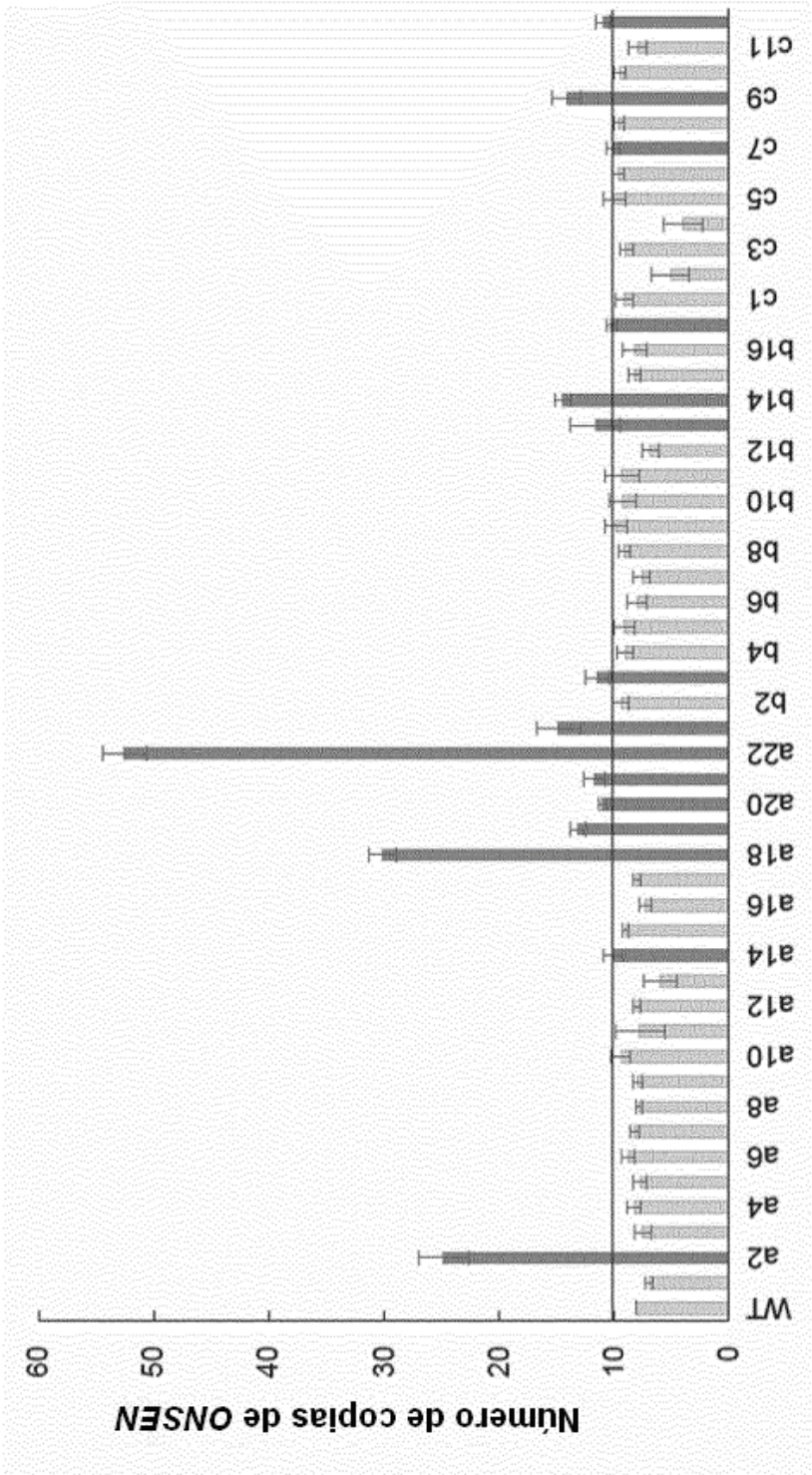


Fig. 6a

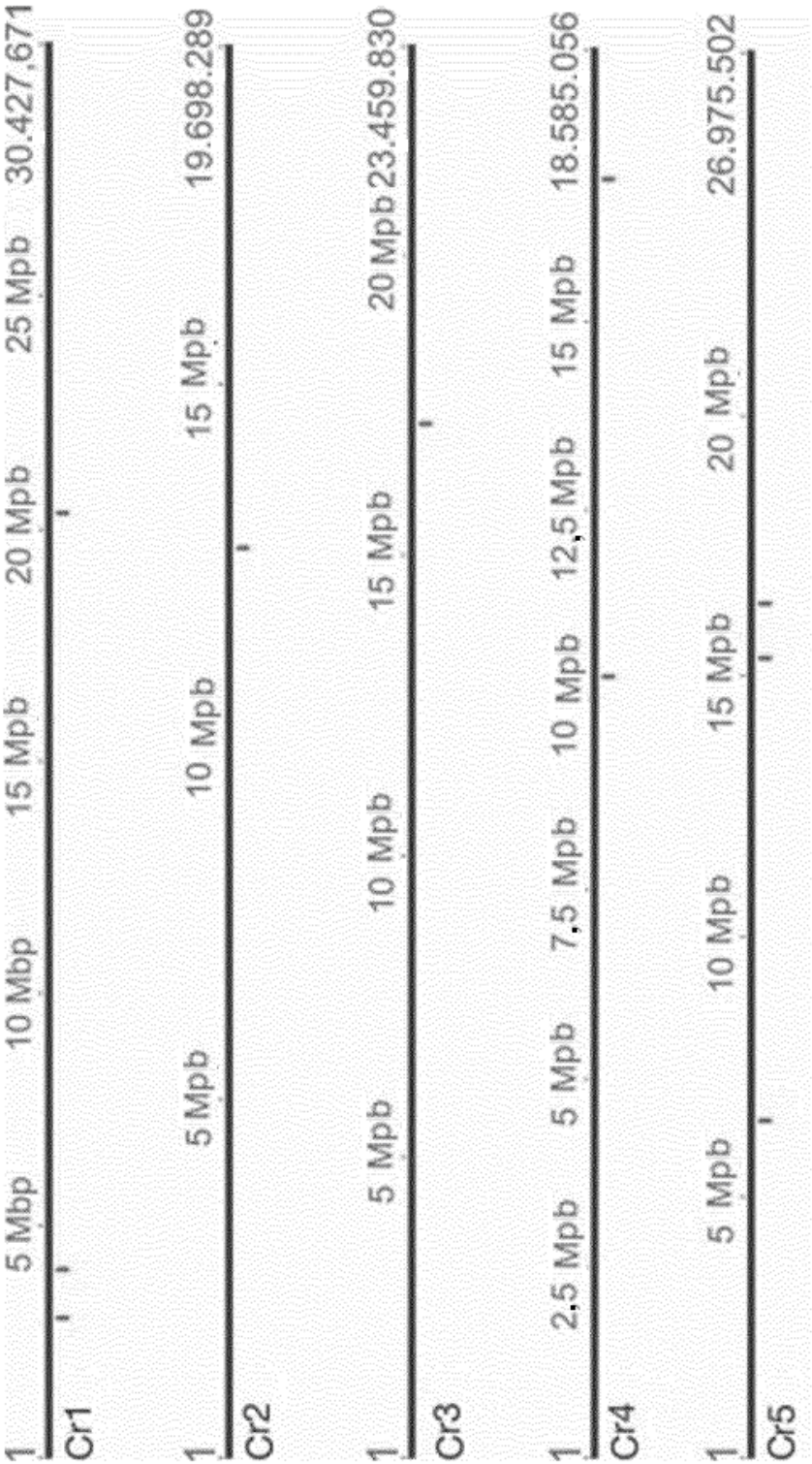


Fig. 6b

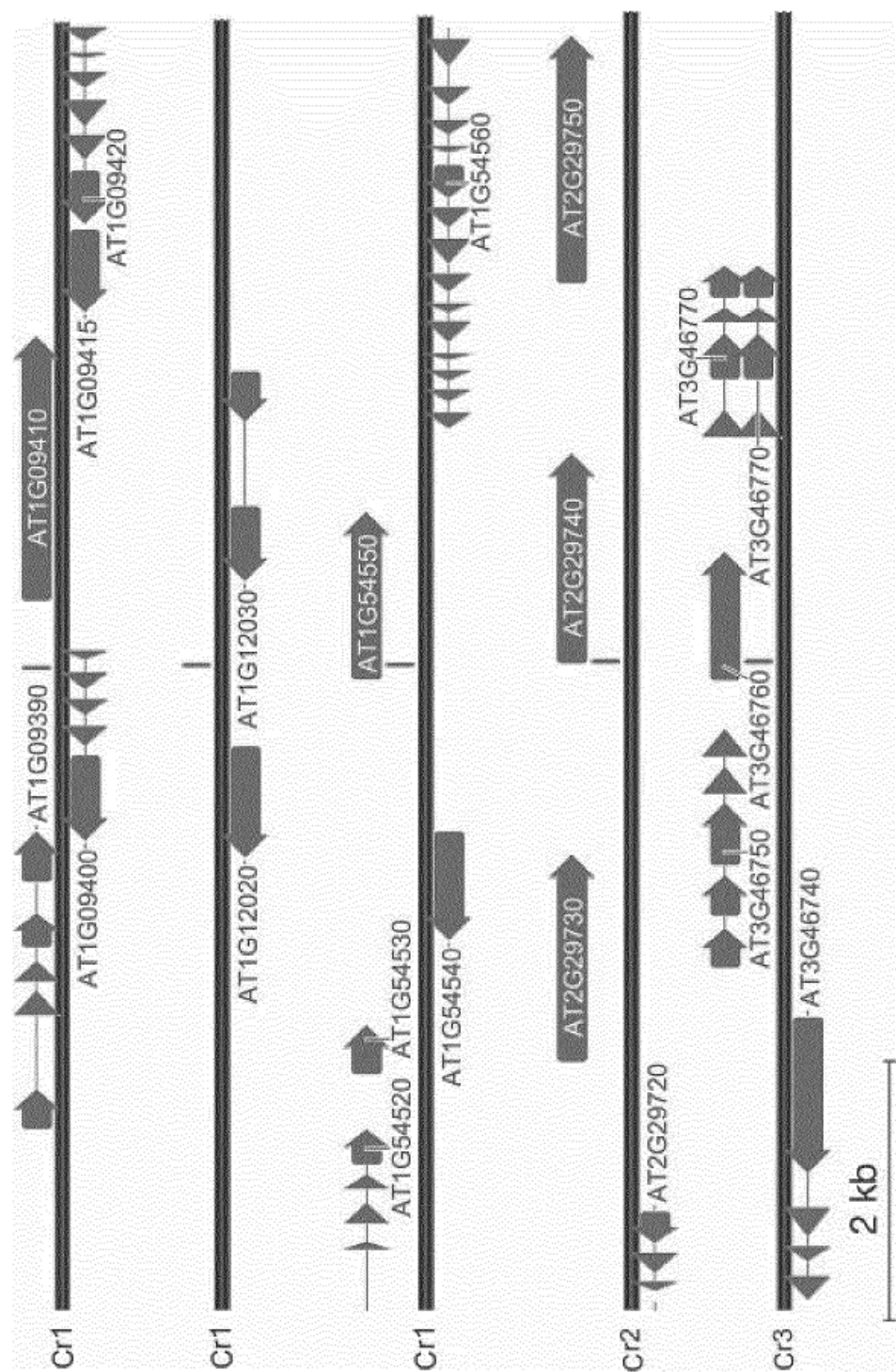


Fig. 6b continuación

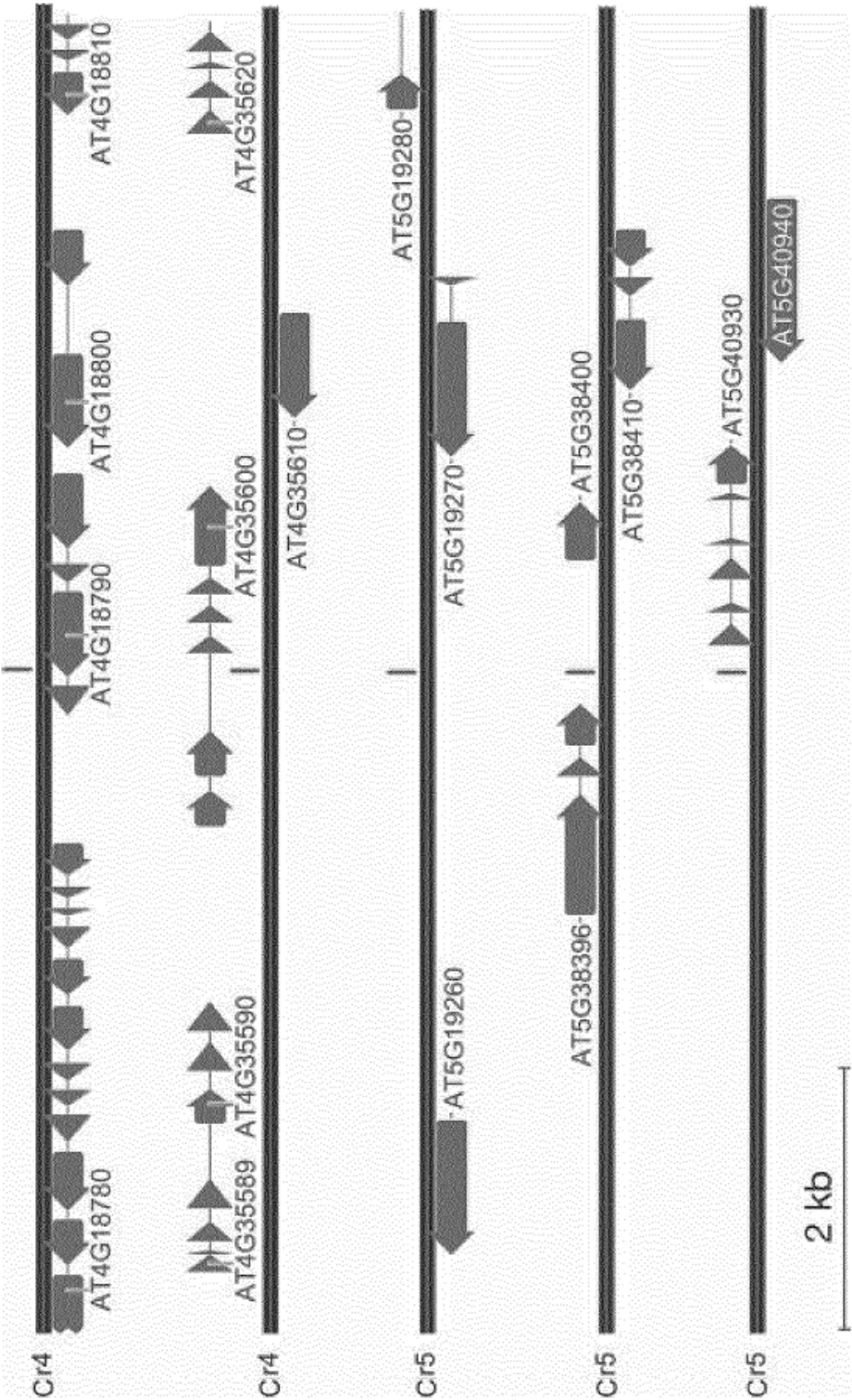


Fig. 7a

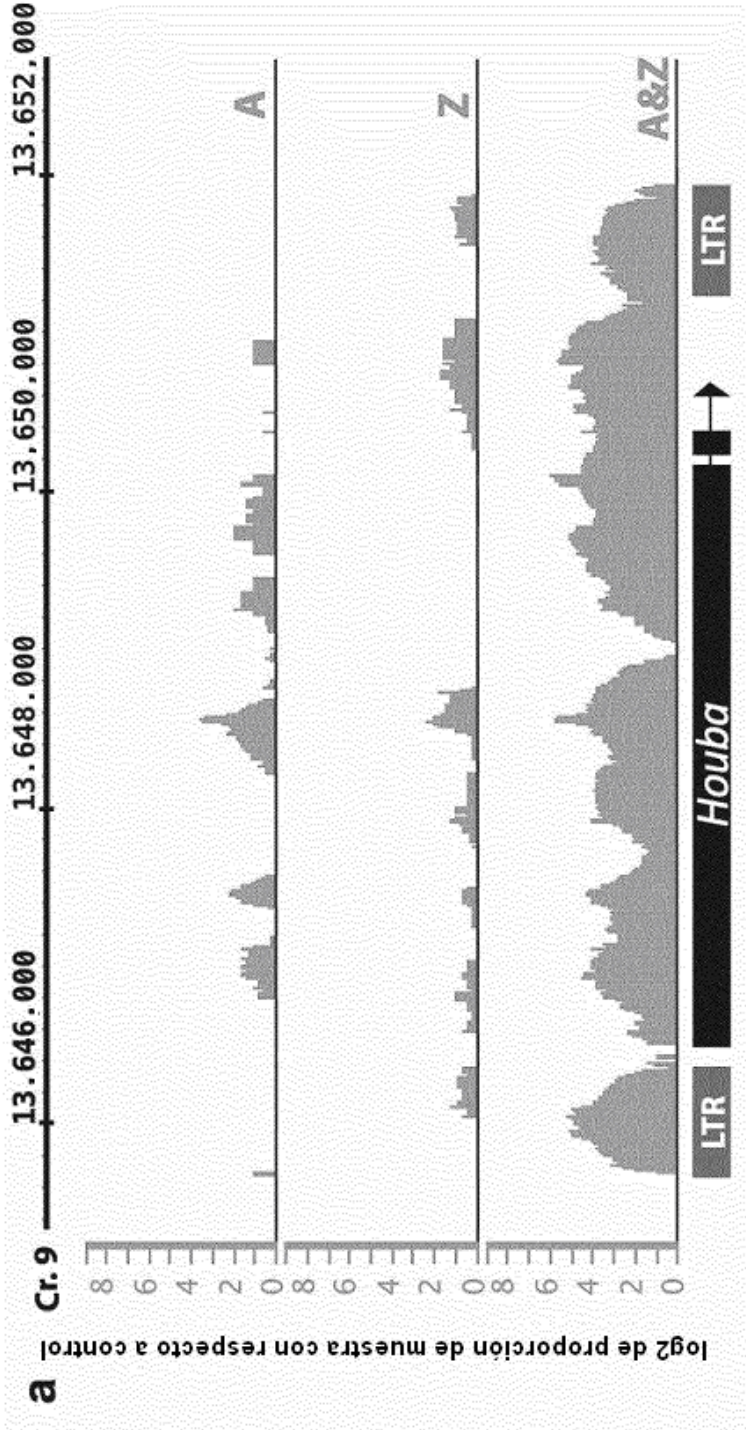


Fig. 7b-d

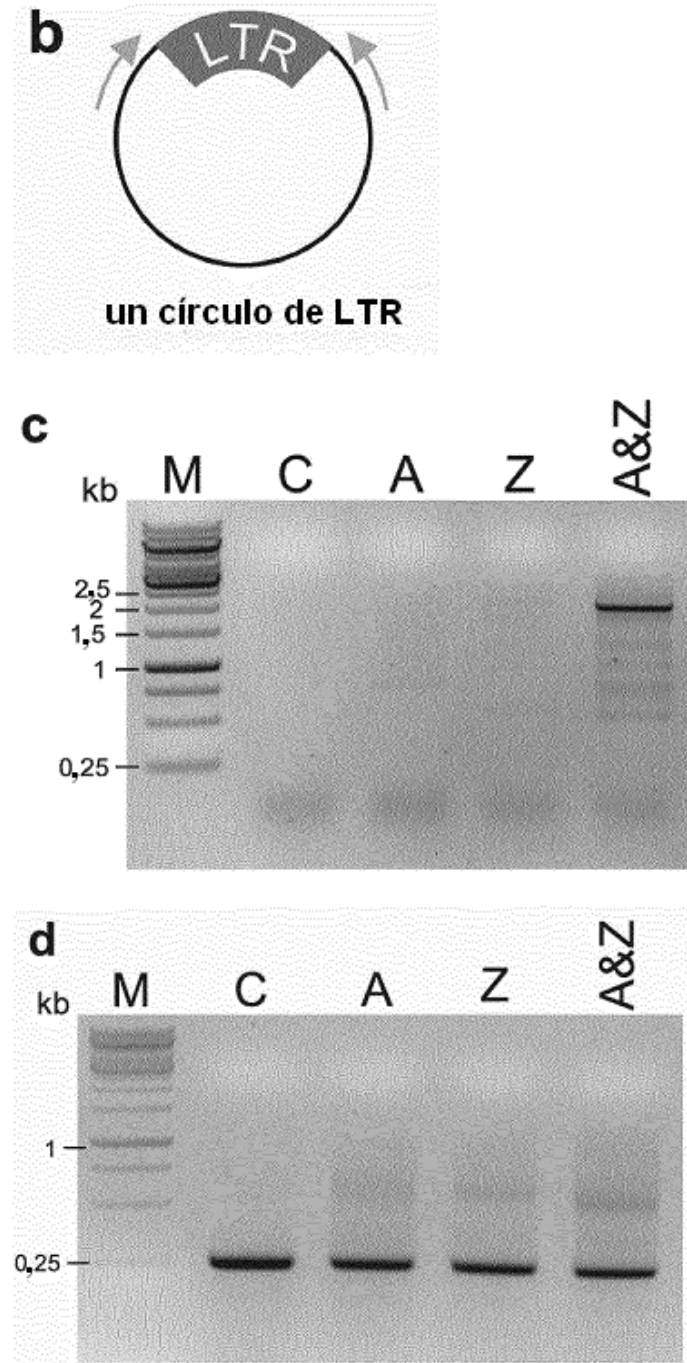


Fig.8

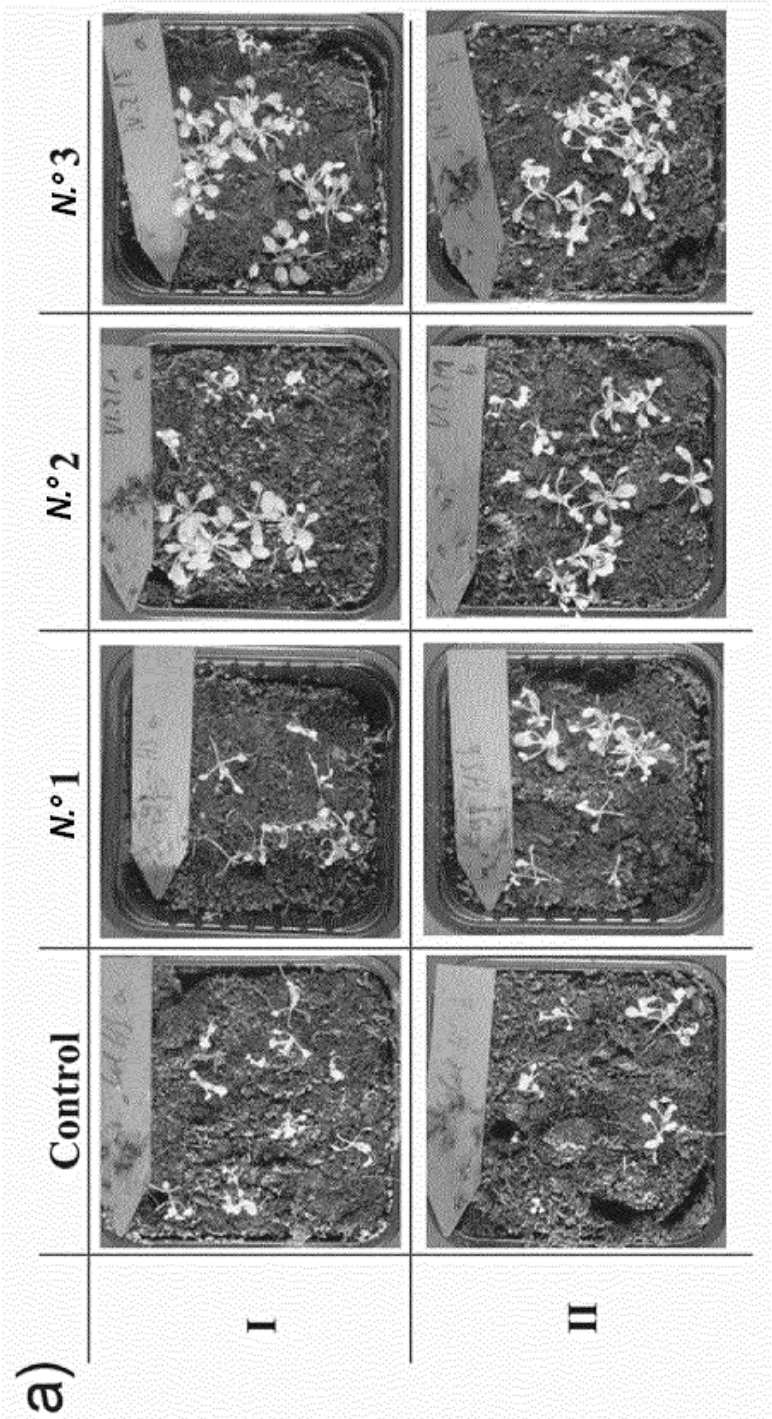


Fig. 8 continuación

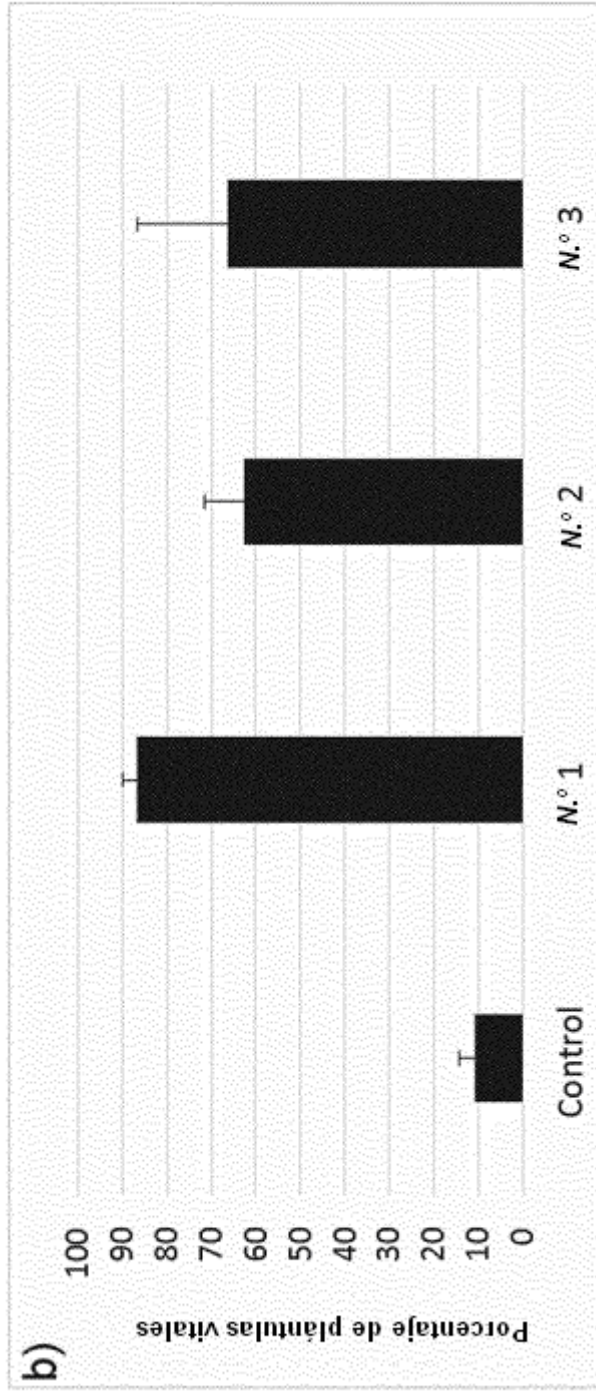


Fig. 9

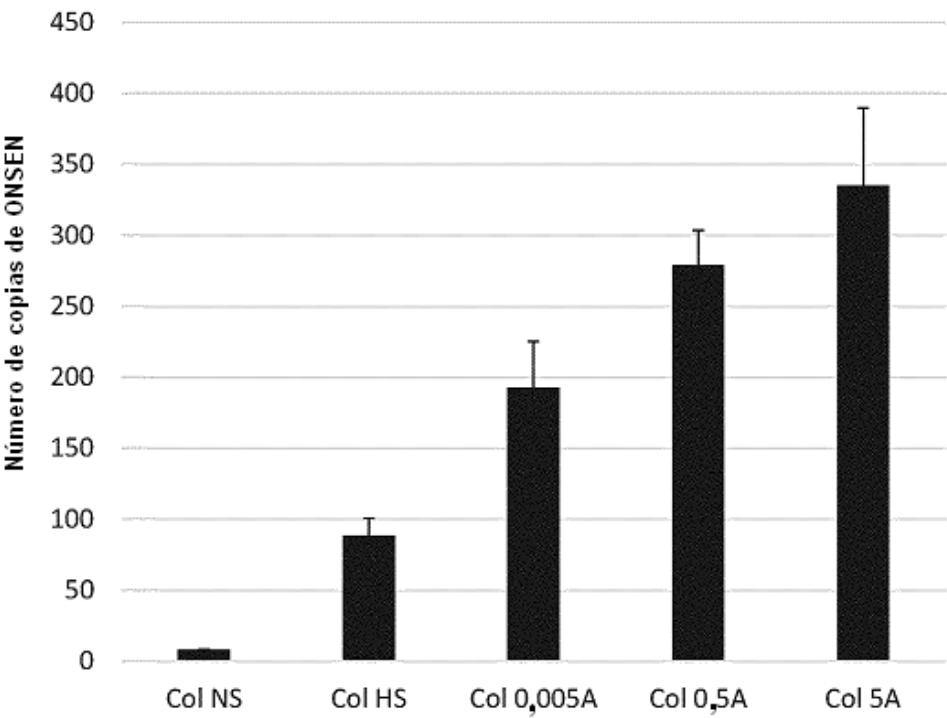


Fig. 10 a,b,c

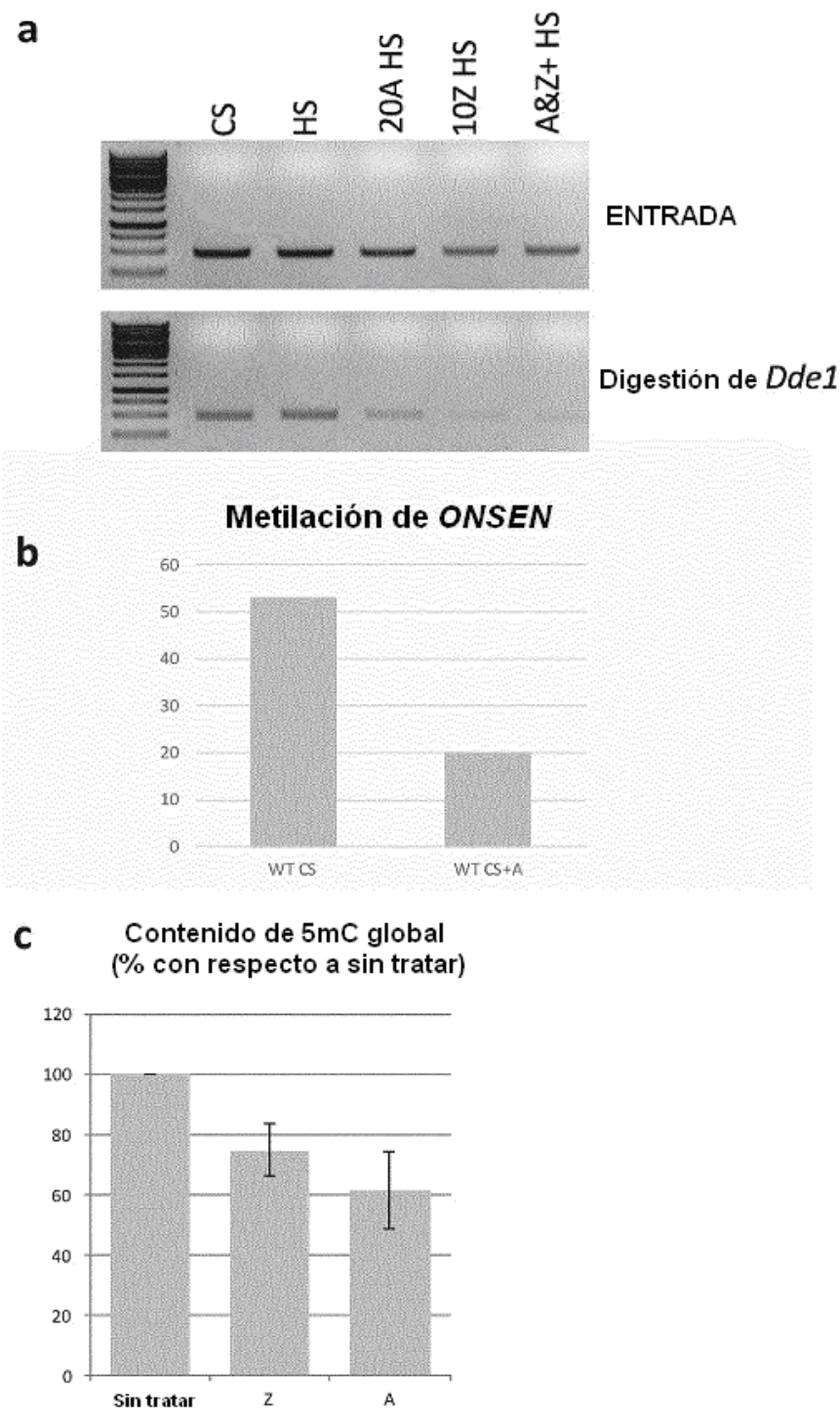


Fig. 10d

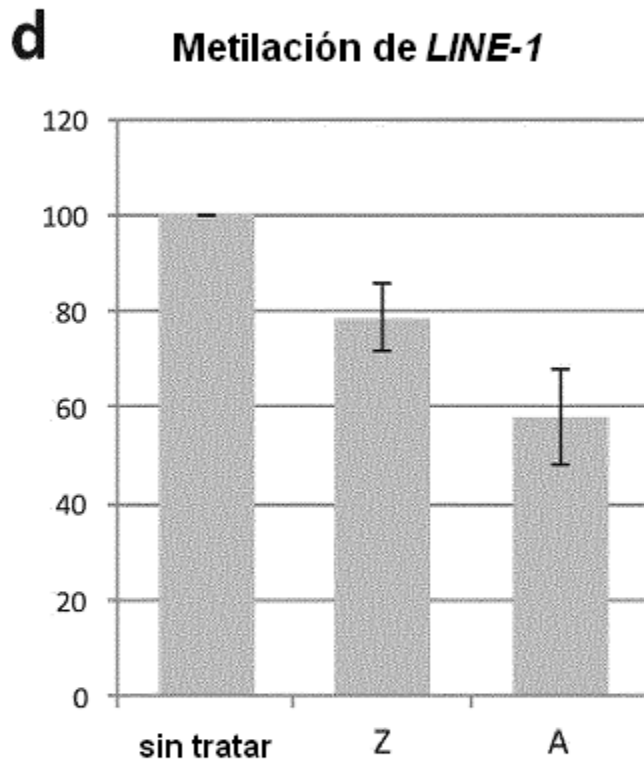


Fig. 11

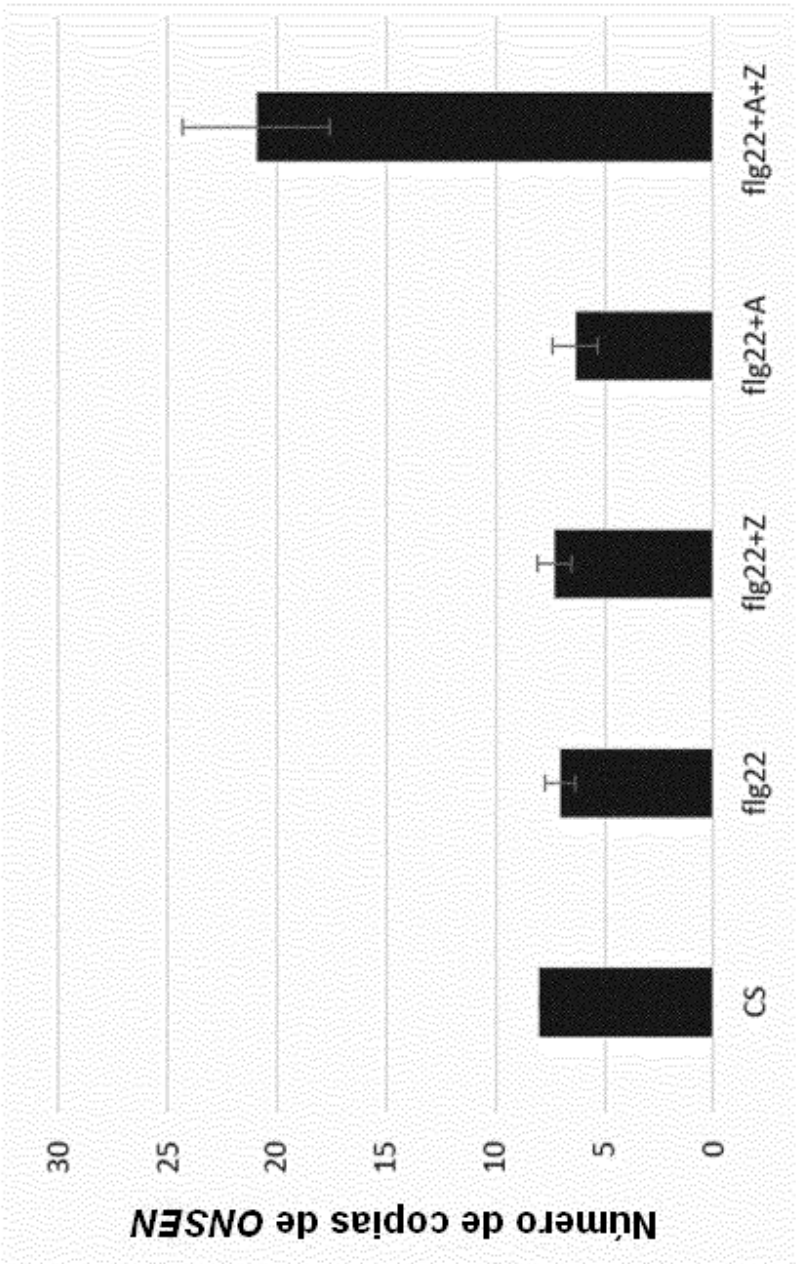


Fig. 12

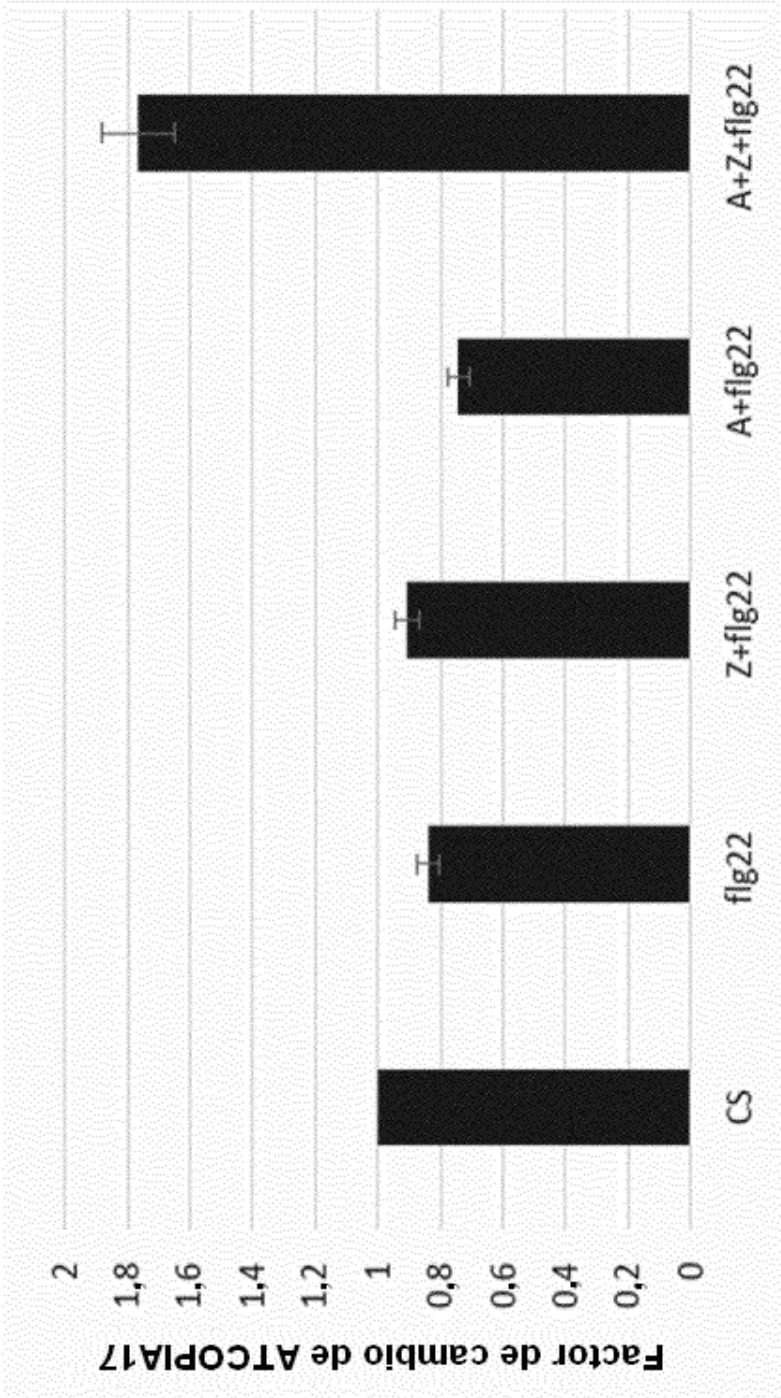


Fig. 13

