

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 864**

51 Int. Cl.:

A01H 5/00 (2008.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/IB2013/003222**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14096972**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13861523 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2934097**

54 Título: **Patatas con endulzamiento inducido en frío reducido**

30 Prioridad:

21.12.2012 US 201261745003 P

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

26.06.2018

73 Titular/es:

**CELLECTIS (100.0%)
8, rue de la Croix Jarry
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**MATHIS, LUC;
VOYTAS, DANIEL, F.;
ZHANG, FENG;
CLASEN, BENJAMIN;
HAUN, WILLIAM y
STODDARD, THOMAS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 673 864 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

Patatas con endulzamiento inducido en frío reducido

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos con N.º de Serie 61/745.003, presentada el 21 de diciembre de 2012.

10 CAMPO TÉCNICO

El presente documento proporciona materiales y métodos para crear variedades de patata con endulzamiento inducido en frío reducido.

15 ANTECEDENTES

La patata (*Solanum tuberosum*) es un importante cultivo alimentario, con una producción mundial estimada en 324 millones de toneladas métricas en 2011 (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAOSTAT), Datos de producción de Cultivo de 2010, en línea en faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anchor). Los procesadores usan una gran proporción de la cosecha total de patata (61 % de la cosecha de 2010 en Estados Unidos) para producir patatas fritas de bolsa, patatas fritas y otros productos procesados. Con el fin de tener un suministro de patatas crudas de alta calidad durante todo el año para la industria de procesamiento, es necesario 'almacenar en frío' los tubérculos de patata hasta que se necesitan. El almacenamiento en frío es específico de la variedad/procesador, con temperaturas que varían de 3 °C a 13 °C durante hasta doce meses, lo que previene la germinación, reduce las pérdidas debido a contracción/envejecimiento y minimiza la propagación de enfermedades.

SUMARIO

30 El presente documento proporciona materiales y métodos para crear variedades de patata que tienen endulzamiento inducido en frío reducido (CIS), que es un fenómeno por el que almidón se convierte en azúcares reductores simples, glucosa y fructosa, durante el almacenamiento en frío. Al procesar a altas temperaturas, la glucosa/fructosa puede interactuar con aminoácidos libres en una reacción de Maillard, lo que da como resultado productos amargos, con pigmentación de color oscuro que pueden presentar un aumento de los niveles de acrilamida - una neurotoxina/carcinógeno sospechada. También se proporcionan variedades de patata con CIS reducido.

La divulgación en el presente documento se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que las patatas que tienen un CIS reducido se pueden obtener usando una nucleasa específica de secuencia para producir una mutación dirigida o desactivada en el gen de la invertasa vacuolar (VInv). Las patatas modificadas pueden tener características de almacenamiento mejoradas y niveles reducidos de acrilamida después de la fritura, en comparación con los niveles de acrilamida en patatas no modificadas al freír después del almacenamiento en frío. Además, las patatas no llevan ningún ADN extraño y, por lo tanto, pueden ser consideradas por las agencias reguladoras como no GM. El presente documento también se basa, al menos en parte, en el desarrollo de variedades cultivadas de patata con mutaciones de VInv con pérdida de función que son creadas por nucleasas específicas de secuencia.

En un aspecto, el presente documento presenta una planta, parte de planta o célula de planta de *Solanum tuberosum* que comprende una delección en al menos dos alelos de VInv endógenos a la planta, parte de planta o célula de planta, en la que dicha delección se indujo introduciendo uno o más endonucleasas de corte raro en una célula de *S. tuberosum*, de modo que la planta, parte de la planta o célula de la planta presenta una reducción de la expresión de invertasa vacuolar en comparación con una planta, una parte de la planta o una célula de planta de control de *Solanum tuberosum* que carece de la delección. Cada delección puede ser una delección de más de un par de bases de nucleótidos. Cada delección puede estar en una secuencia diana tal como se presenta en la SEQ ID NO: 27, o una secuencia diana que tiene una identidad de al menos un 95 por ciento con la SEQ ID NO: 27; o en una secuencia diana tal como se presenta en la SEQ ID NO: 1, o una secuencia diana que tiene una identidad de al menos un 95 por ciento con la SEQ ID NO: 1. La planta, parte de planta o célula de planta se han preparado usando una endonucleasa de corte raro [por ejemplo, una endonucleasa efectora similar a un activador de la transcripción (nucleasa TALE)]. La nucleasa TALE se puede unir a una secuencia tal como se presenta en cualquiera de las SEQ ID NOS: 18-23. Cada uno de los al menos dos alelos de VInv puede presentar la eliminación de un ácido nucleico endógeno y no incluye ningún ácido nucleico exógeno. Cada alelo de VInv endógeno puede estar mutado. Cada alelo de VInv puede presentar la eliminación de un ácido nucleico endógeno, sin incluir ningún ácido nucleico exógeno. La planta, parte de la planta o célula de la planta pueden no tener expresión detectable de invertasa vacuolar. La planta, parte de la planta o célula de la planta de *Solanum* puede ser una planta, parte de la planta o célula de la planta de *S. tuberosum*. La planta, parte de la planta o célula de la planta se pueden someter a condiciones de almacenamiento en frío. La planta, parte de la planta o célula de la planta pueden presenta una

disminución de los niveles de acrilamida en comparación con una planta, parte de la planta o célula de planta de control que carece de la mutación.

5 En otro aspecto, el presente documento presenta un método para preparar una planta de *Solanum tuberosum* que tiene endulzamiento inducido en frío reducido. El método puede incluir (a) poner en contacto una población de células de planta de *Solanum tuberosum* que contienen un alelo de VInv funcional con una endonucleasa de corte raro dirigida a una secuencia de VInv endógeno, (b) seleccionar, a partir de la población, una célula en la que al menos dos alelos de VInv se han inactivado mediante delecciones inducidas por dicha endonucleasa de corte raro, y (c) hacer crecer la célula de planta seleccionada en una planta de *tuberosum*, en la que la planta de *tuberosum* tiene endulzamiento inducido en frío reducido en comparación con una planta de *tuberosum* de control en la que los alelos de alelos de VInv no se han inactivado. Las células de la planta de *Solanum tuberosum* pueden ser protoplastos. El método puede incluir la transformación de los protoplastos con un ácido nucleico que codifica la endonucleasa de corte raro. El ácido nucleico puede ser un ARNm. El ácido nucleico puede estar contenido dentro de un vector. El método puede incluir la introducción en los protoplastos de una proteína endonucleasa de corte raro. La endonucleasa de corte raro puede ser una nucleasa TALE. La nucleasa TALE se puede dirigir a una secuencia tal como se presenta en la SEQ ID NO: 27 o a una secuencia que tiene una identidad de al menos un 95 por ciento con la secuencia que se presenta en la SEQ ID NO: 27, o se puede dirigir a una secuencia tal como se presenta en la SEQ ID NO: 1 o a una secuencia que tiene una identidad de al menos un 95 por ciento con la secuencia que se presenta en la SEQ ID NO: 1. La nucleasa TALE se puede unir a una secuencia tal como se presenta en cualquiera de las SEQ ID NOS: 18-23. El método puede incluir adicionalmente el cultivo de protoplastos para generar líneas de plantas. El método puede incluir el aislamiento de ADN genómico que contiene al menos una porción del locus de VInv a partir de los protoplastos.

25 En otro aspecto, el presente documento presenta un método para producir un producto alimentario. El método puede incluir (a) proporcionar una planta o parte de planta de *Solanum tuberosum* que (i) contiene una delección inducida por una o más endonucleasas de corte raro en al menos dos alelos de VInv endógenos para la planta o parte de la planta, de modo que la planta, parte de la planta, o célula de la planta tiene una reducción de la expresión de la invertasa vacuolar en comparación con una planta o parte de la planta de *Solanum tuberosum* de control que carece de la mutación, e (ii) se ha sometido a almacenamiento en frío; y (b) producir un producto alimentario de la planta o parte de la planta. El método puede incluir adicionalmente (c) cocinar la planta o parte de la planta para obtener un producto alimentario que tiene niveles reducidos de acrilamida en comparación con un producto alimentario producido a partir de una planta o parte de la planta de control cocinada que carece de la mutación y que se sometió a almacenamiento inducido en frío antes de su cocción. La planta o parte de la planta cocinada puede tener aproximadamente el mismo nivel de acrilamida que una planta o parte de la planta de *Solanum tuberosum* cocinada que no se sometió a almacenamiento en frío antes de su cocción. Cada mutación se puede presentar en una secuencia diana tal como se presenta en la SEQ ID NO: 27 o en una secuencia diana que tiene una identidad de al menos un 95 por ciento con la SEQ ID NO: 27, o en una secuencia diana tal como se presenta en la SEQ ID NO: 1 o en una secuencia diana que tiene una identidad de al menos un 95 por ciento con la SEQ ID NO: 1. Cada mutación se puede haber preparado usando una endonucleasa de corte raro (por ejemplo, una nucleasa TALE). La nucleasa TALE se puede unir a una secuencia tal como se presenta en cualquiera de las SEQ ID NOS: 18-23. La planta o parte de la planta de *Solanum tuberosum* puede no tener expresión detectable de invertasa vacuolar.

45 Además en otro aspecto, el presente documento presenta un producto alimentario producido a partir de una planta o parte de planta de *Solanum tuberosum* que (i) contiene una delección inducida por una o más endonucleasas de corte raro en cada alelo de VInv endógeno para la planta o parte de la planta, de modo que la planta, parte de la planta, o célula de la planta no tiene alelo de VInv funcional, y (ii) se ha sometido a almacenamiento en frío. Cada mutación se puede producir en una secuencia diana tal como se presenta en la SEQ ID NO: 27 o en una secuencia diana que tiene una identidad de al menos un 95 por ciento con la SEQ ID NO: 27, o en una secuencia diana tal como se presenta en la SEQ ID NO: 1 o en una secuencia diana que tiene una identidad de al menos un 95 por ciento con la SEQ ID NO: 1. Cada mutación se puede haber preparado usando una endonucleasa de corte raro (por ejemplo, una nucleasa TALE). La nucleasa TALE se puede unir a una secuencia tal como se presenta en cualquiera de las SEQ ID NOS: 18-23. El producto alimentario se puede haber cocinado. El producto alimentario puede tener una disminución de los niveles de acrilamida en comparación con un producto alimentario cocinado preparado a partir de una planta o parte de la planta de control que carece de la mutación y que se sometió a almacenamiento en frío antes de su cocción. El producto alimentario cocinado puede tener aproximadamente el mismo nivel de acrilamida que una planta o parte de la planta de *S. tuberosum* que no se ha sometido a almacenamiento en frío. La planta o parte de la planta de *S. tuberosum* puede ser por ejemplo de una variedad seleccionada entre el grupo que consiste en Ranger Russet, Atlantic, y Burbank. El producto alimentario puede ser una patata frita de bolsa o una patata frita.

60 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente entiende alguien con una experiencia habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque en la práctica de la presente invención se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo definiciones, controlará. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se presentan en las figuras adjuntas y en la descripción que sigue a continuación. Otras características, objetos, y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y las figuras, y a partir de las reivindicaciones.

5

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 muestra sitios diana para nucleasas TALE de VInv. Se muestra una secuencia de ADN del gen de VInv (SEQ ID NO: 1). Las secuencias subrayadas representan sitios diana (SEQ ID NOS: 18-23) para nucleasas TALE que reconocen el gen VInv.

10

La FIG. 2 muestra ejemplos de mutaciones inducidas por nucleasa TALE en el gen VInv. La línea superior de cada panel muestra la secuencia de ADN del sitio de reconocimiento para las nucleasas TALE de VInv (subrayado). Las otras secuencias muestran mutaciones representativas que se indujeron mediante unión imprecisa a extremo no homólogo (NHEJ). Los sitios de delección se proporcionan a la derecha.

15

La FIG. 3 muestra alelos a modo de ejemplo del locus de VInv 2 para la variedad "Ranger Russet", que era el plasma germinal usado para desarrollo de una planta mutante. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) de diagnóstico que diferencian tipos de alelos están subrayados y en letra negrita.

20

La FIG. 4 muestra perfiles de delección a modo de ejemplo para una planta "Ranger Russet" mutante regenerada. Los sitios de reconocimiento de nucleasa TALE están subrayados, y los sitios de SNP están sombreados.

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA

El genoma de la patata contiene una pequeña familia de enzimas denominadas invertasas, que desempeñan un papel importante en la regulación del reparto de carbono entre tejidos de fuente (hojas) y tejidos de almacenamiento (tubérculos, frutos, semillas). Las enzimas catalizan de forma irreversible la reacción de almidón → sacarosa → glucosa/fructosa. Las plantas tienen tres clases de enzimas invertasa, pero se cree que la invertasa vacuolar (VInv) desempeña un papel importante en CIS.

30

El presente documento proporciona variedades de plantas de patata, en particular de la especie *S. tuberosum*, que tienen actividad reducida o incluso falta de actividad de VInv. Se proporcionan métodos para generar las variedades de plantas de ese tipo, métodos para el uso de las variedades de plantas de ese tipo para producir productos alimentarios, y productos alimentarios producidos a partir de variedades de plantas de ese tipo.

35

Como se usa en el presente documento, los términos "planta" y "parte de la planta" se refieren a células, tejidos, órganos, semillas, y partes separadas (por ejemplo, raíces, hojas, y flores) que retienen las características distintivas de la planta precursora. "Semilla" se refiere a cualquier estructura vegetal que se forma mediante diferenciación continuada del óvulo de la planta, siguiendo su punto de maduración normal en el momento de la apertura de la flor, independientemente de si se forma en presencia o ausencia de fertilización e independientemente de si o no la estructura fértil o infértil.

40

El término "alelo(s)" se refiere a una cualquiera o más formas alternativas de un gen en un locus en particular. En una célula diploide (o anfidiplóide) de un organismo, los alelos de un gen dado se sitúan en una ubicación específica o locus en un cromosoma, con un alelo estando presente en cada cromosoma del par de cromosomas homólogos. De forma análoga, en una célula tetraploide de un organismo, un alelo está presente en cada cromosoma del grupo para cuatro cromosomas homólogos. Los alelos "heterocigotos" son alelos diferentes que residen en un locus específico, colocados de forma individual en los cromosomas homólogos correspondientes. Los alelos "homocigotos" son alelos idénticos que residen en un locus específico, colocados de forma individual en los correspondientes cromosomas homólogos en la célula.

45

"Tipo silvestre", como se usa en el presente documento, se refiere a una forma habitual de una planta o un gen tal como se produce de la forma más común en la naturaleza. Un "alelo de VInv de tipo silvestre" es un alelo de VInv de origen natural (por ejemplo, tal como se encuentra en plantas de *S. tuberosum* de origen natural) que codifica una proteína de VInv funcional, mientras que un "alelo de VInv mutante no funcional" es un alelo de VInv que no codifica una proteína de VInv funcional. Un "alelo de VInv mutante no funcional" de este tipo puede incluir una o más mutaciones en su secuencia de ácidos nucleicos, en la que la mutación o mutaciones dan como resultado ninguna cantidad detectable de proteína de VInv funcional en la planta o célula de planta *in vivo*.

50

El genoma de la patata normalmente contiene solo un gen VInv, pero dado que la patata cultivada es un tetraploide, en cada variedad están presentes múltiples alelos de VInv. Los métodos que se proporcionan en el presente documento se pueden usar para inactivar al menos uno (por ejemplo, al menos dos, al menos tres, o los cuatro) alelos funcionales de VInv, eliminando de ese modo al menos algunos de los transcritos de ARN de longitud completa y proteína de VInv funcional de células de patata, y en algunos casos se elimina completamente todos los transcritos de ARN de longitud completa y proteína de VInv funcional.

55

Un ejemplo representativo de una secuencia de nucleótidos de VInv de *S. tuberosum* de origen natural se muestra en el presente documento en la Tabla 4. Las plantas, células, partes de planta, semillas de *S. tuberosum* de las

60

65

mismas que se proporcionan en el presente documento tienen una mutación en cada alelo de VInv endógeno, de modo que la expresión del gen se reduce o se inhibe completamente. Por lo tanto, en algunos casos, las plantas, células de planta, partes de planta, semillas, y progenie no presentan niveles detectables de invertasa vacuolar expresada a partir del gen VInv.

Las plantas, células de planta, partes de planta, semillas, y progenie que se proporcionan en el presente documento se pueden generar usando un sistema de nucleasa TALE para producir una supresión genética dirigida en cada alelo del gen VInv. Por lo tanto, el presente documento proporciona materiales y métodos para el uso de endonucleasas de corte raro (por ejemplo, nucleasas TALE) para generar plantas de patata y productos relacionados (por ejemplo, semillas y partes de planta) que son particularmente adecuadas para almacenamiento en frío antes de su uso en la preparación de productos alimentarios para consumo humano y animal, debido a las supresiones genéticas dirigidas en el gen VInv. Para generar el material de la planta también se pueden usar otras nucleasas específicas de secuencia, incluyendo endonucleasas de asentamiento o nucleasas de dedos de cinc modificadas por ingeniería.

La expresión "endonucleasas de corte raro" en el presente documento se refiere a proteínas naturales modificadas por ingeniería que tienen actividad de endonucleasa dirigidas hacia secuencias de ácidos nucleicos que tienen una secuencia de reconocimiento (secuencia diana) de aproximadamente 12-40 pb de longitud (por ejemplo, 14-40, 15-36, o 16-32 pb de longitud). Las endonucleasas de corte raro habituales producen la escisión dentro de su sitio de reconocimiento, dejando cortes escalonados de 4 nt con salientes en las posiciones 3'OH o 5'OH. Estas endonucleasas de corte raro pueden ser meganucleasas, tales como proteínas de tipo silvestre o variantes de endonucleasas de asentamiento, más particularmente que pertenecen a la familia de dodecapéptidos (LAGLIDADG (SEQ ID NO: 28); véase el documento WO 2004/067736) o pueden resultar a partir de proteínas de fusión que asocian un dominio de unión a ADN y un dominio catalítico con actividad de escisión. Las endonucleasas efectoras de TAL (nucleasas TALE) y nucleasa de dedos de cinc (ZFN) son ejemplos de fusiones de dominios de unión a ADN con el dominio catalítico de la endonucleasa *FokI*. Las nucleasas TALE adaptadas están disponibles en el mercado con el nombre comercial TALEN™ (Collectis, París, Francia). Para una revisión de endonucleasas de corte raro, véase Baker, *Nature Methods* 9: 23-26, 2012).

"Mutagénesis", como se usa en el presente documento, se refiere a procesos en los que se introducen mutaciones en una secuencia de ADN seleccionada. Las mutaciones inducidas por endonucleasas se obtienen generalmente mediante una ruptura de la doble hebra, que da como resultado mutaciones por inserción/delección ("indels") que se pueden detectar mediante análisis de secuenciación profunda. Las mutaciones de ese tipo por lo general son deleciones de varios pares de bases, y tienen el efecto de inactivación del alelo mutado. En los métodos se describen el presente documento, por ejemplo, la mutagénesis se produce a través de rupturas de ADN bicatenario producidas por nucleasas TALE dirigidas a secuencias de ADN seleccionadas en una célula de planta. La mutagénesis de ese tipo da como resultado "mutaciones inducidas por nucleasa TALE" (por ejemplo, supresiones genéticas inducidas por nucleasa TALE) y una reducción de la expresión del gen al que se dirige. Después de la mutagénesis, las plantas se pueden regenerar a partir de las células tratadas usando técnicas conocidas (por ejemplo, semillas de plantación de acuerdo con procedimientos de crecimiento convencionales, seguido de autopolinización).

El término "expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a la transcripción de una secuencia de ácidos nucleicos en particular para producir ARN sentido o antisentido o ARNm, y/o la traducción de una molécula de ARNm para producir un polipéptido (por ejemplo, una proteína terapéutica), con o sin sucesos post-traducción posteriores.

La "reducción de la expresión" de un gen o polipéptido en una planta o una célula de planta incluye inhibición, interrupción, supresión genética, o atenuación genética del gen o polipéptido, de modo que la transcripción del gen y/o traducción del polipéptido codificado se reduce en comparación con una planta o célula de planta correspondiente de control en la que la expresión del gen o polipéptido no se inhibe, interrumpe, experimenta supresión genética, o experimenta atenuación genética. Los niveles de expresión se pueden medir usando métodos tales como, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), transferencia de Northern, hibridación de transferencia puntual, hibridación *in situ*, run-on nuclear (*in vivo*) y/o run-off nuclear (*in vitro*), protección de RNasa, o métodos inmunológicos y enzimáticos tales como ELISA, radioinmunoensayo, y transferencia de Western.

En general, una planta, parte de planta, o célula de planta de *Solanum* puede tener su expresión de invertasa vacuolar reducida en más de un 60 por ciento (por ejemplo, en más de un 70 por ciento, más de un 80 por ciento, o más de un 90 por ciento) en comparación con una planta de *Solanum* de control que carece de la mutación o mutaciones. La planta de *Solanum* de control puede ser, por ejemplo, el tipo silvestre de la planta de *Solanum* de la cual se ha mutado el gen de invertasa.

En algunos casos, un ácido nucleico puede tener una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencias de al menos aproximadamente un 75 por ciento con respecto a una secuencia de nucleótidos de VInv representativa. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos puede tener una identidad de secuencias de al menos un 75 por ciento,

al menos un 80 por ciento, al menos un 85 por ciento, al menos un 90 por ciento, al menos un 91 por ciento, al menos un 92 por ciento, al menos un 93 por ciento, al menos un 94 por ciento, al menos un 95 por ciento, al menos un 96 por ciento, al menos un 97 por ciento, al menos un 98 por ciento, o al menos un 99 por ciento con respecto a una secuencia de nucleótidos de VInv de origen natural, representativa.

En algunos casos, una mutación se puede producir en una secuencia diana tal como se presenta en una secuencia de VInv tal como se presenta en el presente documento (por ejemplo, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 27), o en una secuencia diana que es idéntica en al menos un 95 por ciento (por ejemplo, al menos un 96 por ciento, al menos un 97 por ciento, al menos un 98 por ciento, o al menos un 99 por ciento) a la secuencia que se presenta en una secuencia de VInv tal como se presenta en el presente documento (por ejemplo, SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 27).

El porcentaje de identidad de secuencias entre un ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos en particular y una secuencia a la que se hace referencia con un número de identificación de secuencia en particular se determina como sigue a continuación. En primer lugar, una secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos se compara con la secuencia que se presenta en un número de identificación de secuencias en particular usando del programa de Secuencias BLAST 2 (B12sequiv.) a partir de la versión independiente de BLASTZ que contiene la versión 2.0.14 de BLASTN y la versión 2.0.14 de BLASTP. Esta versión independiente de BLASTZ se puede obtener en línea en fr.com/blast o en ncbi.nlm.nih.gov. Las instrucciones que explican cómo usar el programa B12seq Se pueden encontrar en el archivo readme que acompaña a BLASTZ. B12seq realiza una comparación entre dos secuencias usando cualquiera de los algoritmos BLASTN o BLASTP. BLASTN se usa para comparar secuencias de ácidos nucleicos, mientras que BLASTP se usa para comparar secuencias de aminoácidos. Para comparar dos secuencias de ácidos nucleicos, las opciones son las que se presentan a continuación: -i se presenta para un archivo que contiene la primera secuencia de nucleótidos a comparar (por ejemplo, C:\seq1.txt); -j se presenta para un archivo que contiene la segunda secuencia de ácidos nucleicos a comparar (por ejemplo, C:\seq2.txt); -p se presenta para blastn; -o se presenta para cualquier nombre de archivo deseado (por ejemplo, C:\output.txt); -q se presenta para -1; -r se presenta para 2; y las demás opciones se dejan en su ajuste por defecto. Por ejemplo, para generar un archivo de salida que contiene una comparación entre dos secuencias se puede usar el siguiente comando: C:\B12seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastn -o c:\output.txt -q -1-r 2. Para comparar dos secuencias de aminoácidos, las opciones de B12seq sondas que se presentan a continuación: -i se presenta para un archivo que contiene la primera secuencia de aminoácidos a comparar (por ejemplo, C:\seq1.txt); -j se presenta para un archivo que contiene la segunda secuencia de aminoácidos a comparar (por ejemplo, C:\seq2.txt); -p se presenta para blastp; -o se presenta para cualquier nombre de archivo deseado (por ejemplo, C:\output.txt); y las demás opciones se dejan en su ajuste por defecto. Por ejemplo, para generar un archivo de salida que contiene una comparación entre dos secuencias se puede usar el siguiente comando: C:\B12seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastp -o c:\output.txt. Si las dos secuencias comparadas comparten homología, entonces el archivo de salida designado presentará esas regiones de homología como secuencias alineadas. Si las dos secuencias comparadas no comparten homología, entonces el archivo de salida designado no presentará secuencias alineadas.

Una vez alineadas, el número de coincidencias se determina mediante el recuento del número de posiciones en las que está presente un resto de nucleótido o aminoácido idéntico en ambas secuencias. El porcentaje de identidad de secuencias se determina dividiendo el número de coincidencias ya sea entre la longitud de la secuencia que se presenta en la secuencia identificada (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), o mediante una longitud articulada (por ejemplo, 100 restos de nucleótidos o aminoácidos consecutivos de una secuencia que se presenta en una secuencia identificada), seguido de la multiplicación del valor resultante por 100. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que tiene 120 coincidencias cuando se alinea con la secuencia que se presenta en la SEQ ID NO: 1 es idéntica en un 86,3 por ciento a la secuencia que se presenta en la SEQ ID NO: 1 (es decir, $120 \div 139 \times 100 = 86,3$). Se indica que el valor del porcentaje de identidad de secuencia se redondea a la décima más próxima. Por ejemplo, 75,11, 75,12, 75,13, y 75,14 se redondea a la baja a 75,1, mientras que 75,15, 75,16, 75,17, 75,18, y 75,19 se redondean al alza a 75,2. También se indica que el valor de longitud siempre será un número entero.

Tal como se describe en cualquier parte en el presente documento se pueden realizar métodos para seleccionar secuencias diana endógenas y para generar nucleasas TALE dirigidas a tales secuencias. Véase, por ejemplo, la Publicación de PCT N.º WO 2011/072246, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, se puede usar el software que identifica de forma específica de los sitios de reconocimiento de nucleasa TALE, tales como TALE-NT 2.0 (Doyle *et al.*, Nucleic Acids Res 40: W117-122, 2012).

Los efectores similares a activador de la transcripción (TAL) se encuentran en bacterias patogenéticas de plantas en el género *Xanthomonas*. Estas proteínas desempeñan papeles importantes en enfermedad, o desencadenamiento de defensa, mediante unión de ADN hospedador y de genes hospedadores específicos de efector activante (véase, por ejemplo, Gu *et al.*, Nature 435: 1122-1125, 2005; Yang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 10503-10508, 2006; Kay *et al.*, Science 318: 648-651, 2007; Sugio *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 10720-10725, 2007; y Römer *et al.*, Science 318: 645-648, 2007). La especificidad depende de un número variable de efectores de repeticiones imperfectas, por lo general de 34 aminoácidos (Schornack *et al.*, J. Plant Physiol. 163: 256-272, 2006; y documento WO 2011/072246). Los polimorfismos se presentan principalmente en las posiciones repetidas 12 y 13, que en el presente documento se denominan dirresto variable de repetición (RVD).

Los RVD de los efectores TAL corresponden a los nucleótidos en sus sitios diana de una forma lineal, directa, un RVD con respecto a un nucleótido, con cierta degeneración y sin dependencia del contexto evidente. Este mecanismo para reconocimiento de ADN de proteína permite la predicción del sitio diana para nuevos efectores TAL específicos de diana, así como selección del sitio diana no hay modificación por ingeniería de los nuevos efectores TAL con especificidad y unión hacia los sitios seleccionados.

Los dominios de unión a ADN de efector TAL se pueden fusionar a otras secuencias, tales como secuencias de endonucleasa, dando como resultado endonucleasas quiméricas dirigidas a secuencias de ADN seleccionadas, específicas, y que conducen al posterior corte del ADN en o cerca de las secuencias Triana. Los cortes de ese tipo (es decir, de roturas de la doble cadena) en el ADN pueden inducir mutaciones en la secuencia de ADN de tipo silvestre a través de NHEJ o recombinación homóloga, por ejemplo. En algunos casos, se pueden usar nucleasas TALE para facilitar la mutagénesis dirigida al sitio en genomas complejos, supresión genética o de otro modo alteración de la función genética con gran precisión y alta eficacia. Tal como se describe en los Ejemplos que siguen a continuación, se pueden usar nucleasas TALE y giras al gen de VInv de *S. tuberosum* para mutagénesis del gen endógeno, dando como resultado plantas sin expresión detectable de VInv. El hecho de que algunas endonucleasas (por ejemplo, *FokI*) funcionan como dímeros se puede usar para aumentar la especificidad de la diana de la nucleasa TALE. Por ejemplo, en algunos casos se puede usar un par de monómeros de nucleasa TALE dirigidos a diferentes secuencias de ADN (por ejemplo, las secuencias diana subrayadas que se muestran en la FIG. 1). Cuando los dos sitios de reconocimiento de nucleasa TALE se encuentran en estrecha proximidad, tal como se representa en la FIG. 1, los monómeros inactivos se pueden poner juntos para crear una enzima funcional que escinde el ADN. Al ser necesaria la unión del ADN para activar la nucleasa, se puede crear una enzima de restricción altamente específica del sitio.

Los métodos para usar nucleasas TALE para generar plantas, células de planta, o partes de plantas de patata que tienen mutaciones en genes endógenos incluyen, por ejemplo, los que se describen en los Ejemplos en el presente documento. Por ejemplo, uno o más ácidos nucleicos que codifican nucleasas TALE dirigidas a secuencias de VInv seleccionadas (por ejemplo, las secuencias de VInv que se muestran en la FIG. 1) se pueden transformar en células de planta (por ejemplo, protoplastos), en las que se pueden expresar. En algunos casos, una o más proteínas de nucleasa TALE se pueden introducir en células de planta (por ejemplo, protoplastos). Las células, o una línea de células de planta o parte de planta generada a partir de las células, se puede analizar posteriormente para determinar si se han introducido mutaciones en el sitio o los sitios diana, a través de ensayos basados en ácidos nucleicos o ensayos basados en proteínas para detectar niveles de expresión como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, o usando ensayos basados en ácidos nucleicos (por ejemplo, PCR y secuenciación de ADN, o PCR seguido de un ensayo de T7E1; Mussolino *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 39: 9283-9293, 2011) para detectar mutaciones en los locus genómicos. En un ensayo de T7E1, el ADN genómico se puede aislar a partir de callos combinados, y secuencias que flanquean sitios de reconocimiento de nucleasa TALE para VInv se pueden amplificar por PCR. Los productos de amplificación a continuación se pueden desnaturalizar y volver a hibridar. Si los fragmentos hibridados de nuevo forman un heterodúplex, la T7 endonucleasa I corta en el sitio de falta de coincidencia. Los productos digeridos se pueden visualizar mediante electroforesis en gel para cuantificar la actividad de mutagénesis de la nucleasa TALE.

Más recientemente, se ha desarrollado una nueva herramienta de ingeniería genómica basada en la nucleasa Cas9 guiada por ARN del sistema inmune adaptable CRISPR (Repeticiones palindrómicas Cortas Agrupadas y Espaciadas de forma Regular) procarionta de tipo II (véase, por ejemplo, Belahj *et al.*, *Plant Methods* 9: 39, 2013). Este sistema permite la escisión de secuencias de ADN que están flanqueadas por un motivo de secuencia corta, denominado motivo adyacente proto-espaciador (PAM). La escisión se consigue mediante ingeniería de un ARNcr específico que es complementario a la secuencia diana, que se asocia en la célula viva con la endonucleasa Cas9 de *S. pyogenes* que se expresa de forma heteróloga. En el complejo de ARNcr/Cas9, una estructura doble de ARNtracr:ARNcr actúa como un ARN guía que dirige la endonucleasa Cas9 a la secuencia diana afín. Dado que hay varios motivos de PAM presentes en la secuencia de nucleótidos del gen VInv, el ARNcr específico para el gen VInv se puede diseñar para introducir mutaciones o para inactivar todos o parte de los alelos del gen VInv dentro de células de planta *Solanum* en las que la endonucleasa Cas9 y el ARNcr se transfectan y se expresan. Este enfoque se puede usar como una alternativa a las nucleasas TALE en algunos casos, para obtener las plantas tal como se describe en el presente documento.

El presente documento también incluye mutaciones adicionales que se podrían introducir en otros genes de *Solanum* con el fin de, por ejemplo:

- proporcionar una reducción de acrilamida adicional mediante modificación de la expresión de genes implicados en la síntesis de asparagina;
- prevenir la magulladura de manchas negras mediante la reducción de la expresión de la polifenol oxidasa-5;
- prevenir el Virus Y de la Patata mediante la reducción de la expresión genética de eIF4E;
- prevenir la roya tardía; o
- mejorar la resistencia a nemátodos, herbicidas o insectos.

Por lo tanto, los métodos que se proporcionan en el presente documento se pueden usar para obtener apilamiento genético en un rasgo de *Solanum*.

La presente divulgación también proporciona métodos para producir productos alimentarios usando variedades de planta de patata con reducción de CIS, así como productos alimentarios preparados con los métodos de ese tipo. Los métodos que se proporcionan en el presente documento pueden incluir, por ejemplo, la provisión o preparación de plantas o partes de planta de *S. tuberosum* que contienen una mutación inducida por nucleasa TALE en dos o más alelos de VInv endógenos y que se han sometido al almacenamiento en frío, y el uso de métodos convencionales de cocción y/o preparación para producir un producto alimentario (que incluye, pero no se limita a, patatas fritas de bolsa, patatas fritas, copos de patata, y puré de patatas) a partir de las plantas o partes de la planta. En algunas realizaciones, el CIS reducido se puede observar como una reducción de carácter amargo y/o pigmentación de color oscuro en comparación con el carácter amargo y/o pigmentación observados en productos alimentarios preparados a partir de plantas o partes de planta de control que no contienen los alelos de VInv mutados y que se han sometido a almacenamiento en frío. En algunas realizaciones, los productos alimentarios (por ejemplo, productos alimentarios preparados usando métodos que incluyen la cocción de las plantas o partes de planta) pueden tener niveles reducidos de acrilamida en comparación con los niveles de acrilamida en productos alimentarios preparados a partir de plantas o partes de planta de *S. tuberosum* que no tienen mutaciones en los alelos de VInv endógenos y que se han sometido a almacenamiento en frío (por ejemplo, antes de la cocción). En algunos casos, los productos alimentarios pueden tener niveles de acrilamida que son comparables con los niveles de acrilamida en productos alimentarios preparados a partir de plantas o partes de planta de *S. tuberosum* que no se sometieron a almacenamiento en frío.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención que se describen las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1 -Modificación por ingeniería de nucleasas específicas de secuencia para someter a mutagénesis el gen de VInv

Para inactivar o producir supresión genética completamente de los alelos del gen de VInv en *S. tuberosum*, se diseñaron nucleasas específicas de secuencia que se dirigen a la región codificante de la proteína en las cercanías del codón de parada. Se diseñaron tres pares de nucleasa TALE para dirigirse a la familia del gen de VInv dentro de los primeros 200 pb de la secuencia codificante usando software que identifica de forma específica sitios de reconocimiento de nucleasa TALE. Los sitios de reconocimiento de nucleasa TALE para los genes de VInv están subrayados en la FIG. 1 y se enumeran en la Tabla 1. Las nucleasas TALE se sintetizaron usando métodos similares a los que se describen en cualquier parte (Cermak *et al.*, Nucleic Acids Res. 39: e82, 2011; Reyon *et al.*, Nat. Biotechnol. 30: 460-465, 2012; y Zhang *et al.*, Nat. Biotechnol. 29: 149-153, 2011).

Ejemplo 2 - Actividad de nucleasa TALE de VInv en levadura

Para evaluar la actividad de las nucleasas TALE que se dirigen al gen de VInv, se realizaron ensayos de actividad en levadura con métodos similares a los que se describen en cualquier parte (Christian *et al.*, Genetics 186: 757-761, 2010). Para estos ensayos, un plásmido diana se construyó con el sitio de reconocimiento de nucleasa TALE clonado en un gen indicador de β -galactosidasa no funcional. El sitio diana estaba flanqueado por una repetición directa de secuencia codificante de β -galactosidasa de modo que si el gen indicador se distinguía con la nucleasa TALE, la recombinación se podría producir entre las repeticiones directas y la función se podría restablecer para el gen de β -galactosidasa. Por lo tanto, la actividad de β -galactosidasa, sirvió como una medida de la actividad de escisión de nucleasa TALE.

En el ensayo de levadura, todos los pares de nucleasa TALE de VInv (VInv_T01, VInv_T02 y VInv_T03) presentaban actividad de escisión elevada en dos condiciones de temperatura distintas (es decir, 37 °C y 30 °C). Las actividades de escisión se normalizaron con respecto a la nucleasa de punto de referencia, I-SceI. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Ejemplo 3 - Actividad de nucleasas TALE de VInv en sus sitios diana endógenos en *S. tuberosum*

La actividad de nucleasa TALE en sitios diana endógenos en *S. tuberosum* se midió mediante la expresión de las nucleasas TALE en protoplastos e investigando los sitios diana de nucleasa TALE para mutaciones introducidas por NHEJ. Los métodos para preparación de protoplasto se realizaron como se describe en cualquier parte (Shepard, en: Genetic Improvement of Crops/Emergent Techniques (pp.185-219), Rubenstein, Gengenbach, Philips, Y Green (Eds.), Univ. of Minnesota Press, Minneapolis, MN, 1980; y Shepard y Totten, Plant Physiol. 60: 313-316, 1977). En resumen, se plantaron mini tubérculos de *S. tuberosum* en vermiculita humedecida y se cultivaron en condiciones de luz baja durante 3-5 semanas. Las hojas jóvenes, totalmente abiertas se recogieron y la superficie se esterilizó, y los protoplastos se aislaron.

Los plásmidos que codifican nucleasa TALE, junto con un plásmido que codifica YFP, se introdujeron en protoplastos de *S. tuberosum* mediante transformación mediada por PEG tal como se describe en cualquier parte elsewhere (Yoo *et al.*, Nature Protocols 2: 1565-1572, 2007). Veinticuatro horas después del tratamiento, la eficacia de la transformación se midió mediante la evaluación de una alícuota de los protoplastos transformados usando un microscopio de fluorescencia para controlar la fluorescencia de YFP. El resto de los protoplastos transformados se cosechó, y el ADN genómico se preparó usando un método basado en CTAB. Usando ADN genómico preparado a partir de los protoplastos como un molde, un fragmento de 272 pb que incluye el sitio de reconocimiento de nucleasa TALE se amplificó por PCR. Los tipos de alelo se analizaron mediante secuenciación directa de clones individuales y mediante 454 piro-secuenciación. Se consideró que las lecturas de secuenciación con mutaciones de indel en la región espaciadora se habían obtenido a partir de reparación imprecisa de un sitio de reconocimiento de nucleasa TALE escindida por NHEJ. La frecuencia de mutagénesis se calculó como el número de lecturas de secuenciación con mutaciones NHEJ del total de las lecturas de secuenciación. A continuación los valores se normalizaron mediante la eficacia de transformación.

La actividad de los pares de nucleasa TALE de VInv, VInv_T01, VInv_T02 y VInv_T03, con respecto a su gen diana se resume en la Tabla 3. Las nucleasas TALE indujeron mutaciones de NHEJ en VInvT1, VInvT2, y VInvT3, que variaban de un 3,6 % a un 9,5 %. Los ejemplos de mutaciones inducidas por nucleasa TALE en VInvT1, VInvT2, y VInvT3 se muestran en la FIG. 2.

Ejemplo 4 – Regeneración de líneas de *S. tuberosum* con mutaciones inducidas por nucleasa TALE en VInv

Se crearon líneas de *S. tuberosum* con mutaciones en uno o más alelos del gen de VInv. Los protoplastos se aislaron de hojas esterilizadas en la superficie, y se transformaron con plásmidos que codifican una de las siguientes: (i) VInv_T01 de nucleasa TALE (ii) VInv_T02 de nucleasa TALE; (iii) VInv_T03 de nucleasa TALE; o (iv) YFP. Las eficaces de transformación se monitorizaron mediante la administración del plásmido YFP, que se visualiza usando un microscopio de fluorescencia o mediante citometría de flujo.

Después de transformación mediada por PEG, los protoplastos se cultivaron usando métodos y medios que se describen en cualquier parte (Gamborg *et al.*, en: Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture (pp.115-153), Thorpe (Ed.), Academic Press, Inc., New York, NY, 1981), con ligeras modificaciones. Los protoplastos se volvieron a suspender en medio de siembra líquido a una densidad celular de 1×10^5 /ml en una placa de Petri pequeña, y se almacenaron a 25 °C en la oscuridad. El día 14 después de la transformación, cuando la mayoría de los protoplastos se había dividido al menos una vez, el cultivo de protoplastos se diluyó dos veces en una suspensión de medio P. El día 28 después de la transformación, los cultivos de protoplastos se sembraron en un depósito sólido (10 ml) de medio CUL (Haberlach *et al.*, Plant Science 39: 67-74, 1985). En este momento, los callos obtenidos a partir de protoplastos eran visibles al ojo.

El día 65 después de la transformación, los callos obtenidos a partir de protoplastos identificados como mutantes (por ejemplo, usando métodos tal como se describe en el Ejemplo 5) se transfirieron a un depósito sólido de medio DIF (Haberlach *et al.*, mencionado anteriormente). Los callos se transfirieron a medio DIF recién preparado a intervalos bisemanales. A medida que se formaban los brotes, se separaban y se colocaban en un depósito sólido de medio R (Gamborg *et al.*, mencionado anteriormente). Estos callos individuales se transfirieron a medio de inducción de brote. Una vez formadas las raíces, éstas se transferían a suelo y se cultivan hasta madurez para producción de tubérculo.

Ejemplo 5 – Verificación de líneas de *S. tuberosum* con mutaciones inducidas por nucleasa TALE en VInv

Las líneas de *S. tuberosum* con mutaciones en todos los alelos del gen de VInv se evaluaron un mes después de la transformación. Las plantas con supuestas mutaciones en el gen de VInv se verificaron mediante amplificación por PCR del locus diana, y posteriormente se secuenciaron. La FIG. 4 muestra las mutaciones recuperadas en todos los alelos de una sola planta, denominada St116_1. Aunque la patata es tetraploide, se ha documentado que muchos loci tienen tres o menos alelos (Draffehn *et al.*, BMC Plant Biol. 10: 271, 2010). En la variedad de cultivo "Ranger Russett", que se usó en estos experimentos, solamente se identificaron los tres alelos de tipo silvestre (SEQ ID NOS: 28, 29, y 30; FIG. 3). Las mutaciones portadas por la planta St116_1 se presentan en las SEQ ID NOS: 32, 33, y 34, y deleciones de tienen 4 pb, 4 pb y 17 pb, respectivamente.

Ejemplo 6 - Las líneas de *S. tuberosum* mutante tienen fenotipos deseados

La cuantificación del transcrito de VInv se determina usando PCR en tiempo real cuantitativa de ADNc generado a partir de extractos de ARNm de tubérculo mutante y de control (Bhaskar *et al.*, Plant Physiol. 154 (2): 939-948, 2010). La reducción de la expresión de VInv se cuantifica usando el método de umbral de ciclo comparativo que se describe en cualquier parte (Livak y Schmittgen, Method. Methods 25: 402-408, 2001). Para evaluar los niveles de acrilamida, las patatas fritas de bolsa se procesan a partir de tubérculos almacenados en frío sin reacondicionamiento. Los tubérculos de patata se cortan de forma axial para obtener rebanadas y se extiende en aceite vegetal durante 2 minutos a 187 °C o hasta que se detiene la formación de burbujas. Se permite que las patatas fritas de bolsa se enfríen a temperatura ambiente (22 °C) de 5 a 8 minutos y se machacan de forma

minuciosa con un mortero y mano, y el polvo se usa para análisis de acrilamida usando métodos que se describen en cualquier parte (Bhaskar *et al.*, mencionado anteriormente). Para evaluar los cambios en la composición del azúcar en tubérculos después de almacenamiento en frío, se usa un ensayo de glucosa colorimétrico usando métodos validados previamente (Bethke y Busse, Am. J. Potato Res. 85: 414-421, 2008).

5

Tabla 1

<i>Secuencias diana de nucleasa TALE</i>				
Gen	Secuencia Diana Izquierda	SEQ ID NO:	Secuencia Diana Derecha	SEQ ID NO:
Vinv_T1	TTCCTCCCGGATCAACC	18	GAAGTCCCTTAAAATCA	19
Vinv_T2	TTCCTCTCCTCTTTCCT	20	CTTCTTTCCGATCCTCA	21
Vinv_T3	TAGCCTTCTTTCCGATC	22	CCGGACTTGCAGAGTAA	23

Tabla 2

Actividad de Nucleasa TALE de <i>Vinv</i> en levadura				
Nombre del Par de nucleasa TALE	Secuencia Diana de nucleasa TALE	SEQ ID NO:	Actividad en Levadura*	
			37 °C	30 °C
Vinv_T01	TTCCCTCCCGGATCAACCCCGATTCCGGCCACCAGGAGTCCCTTAAAATCA	24	0,94	0,95
Vinv_T02	TTCCCTCCCTCTTTCCCTTTGCTTTCTGTAGCCCTCTTTCCGATCCTCA	25	0,92	0,89
Vinv_T03	TAGCCCTCTTTCCGATCCTCAACAACCCAGTCAACCCGACTTGCAGAGTAA	26	0,96	0,82

*Normalizado a I-SceI (máx = 1,0)

Tabla 3

Datos de 454 Piro-Secuenciación para nucleasa TALE de VInv		
Nombre de la nucleasa TALE	Ubicación del sitio diana	Frec. de mutagénesis de NHEJ con nucleasa TALE *
VInv_T01	VInvT1	3.6% (4614)
VInv_T02	VInvT2	9.5% (4957)
VInv_T03	VInvT3	9.9% (3350)

Tabla 4

CDS completo de VInv de *S. tuberosum*; GenBank JN661860; SEQ ID NO: 27)

ATGGCCACGCAGTACCATTCAGTTATGACCCGAAAACTCCGCCTCCCATTACACATT
 CCTCCCGGATCAACCCGATTCGGCCACCGGAAGTCCCTTAAAATCATCTCCGGCATT
 TCCTCTCCTCTTTCCCTTTGCTTTCTGTAGCCTTCTTTCCGATCCTCAACAACAGTCA
 CCGGACTTGCAGAGTAACTCCCGTTCCGGCGCCGCCGTCAAGAGGTGTTTCTCAGGG
 AGTCTCCGATAAAGACTTTTCGAGATGTCGTCATGCTAGTCACGTTTCTTATGCGTGGT
 CCAATGCTATGCTTAGCTGGCAAAGAAGTGCCTTACCATTTTCAACCTCAAAAAAATTGG
 ATGAACGATCCTAATGGTCCATTGTACCACAAGGGATGGTATCATCTTTTTTATCAATA
 CAATCCAGATTCAGCTATTTGGGGAAATATCACATGGGGCCATGCCGTATCCAAGGACT
 TGATCCACTGGCTCTACTTGCCTTTTGCCATGGTTCCTGATCAATGGTACGATATTAAC
 GGTGTCTGGACTGGGTCCGCTACCATCTACCCGATGGTCAGATCATGATGCTTTATAC
 CGGTGACACTGATGATTATGTGCAAGTGCAAAATCTTGCGTACCCCACTTATCTG
 ATCCTCTCCTTCTAGACTGGGTCAAGTACAAAGGCAACCCGGTCTGGTTCCTCCACC
 GGCATTGGTGTCAAGGACTTTAGAGACCCGACCACTGCTTGGACCGGACCCCAAAATGG
 GCAATGGCTCTTAACAATCGGGTCTAAGATTGGTAAAACGGGTATTGCACTTGTATTATG
 AAATTCCAACTTCACAAGCTTTAAGCTATTGGATGAAGTGTGTCATGCGGTTCCGGGT
 ACGGGTATGTGGGAGTGTGTGGACTTTTACCCGGTATCGACTGAAAAAACAAACGGGTT
 GGACACATCATATAACGGCCCCGGGTGTAAAGCATGTGTTAAAAGCAAGTTTAGATGACA
 ATAAGCAAGATCACTATGCTATTGGGACGTATGACTTGACAAAGAACAATGGACACCC
 GATAAGCCGGAATTGGATTGTGGAATTGGGTGAAGCTGGATTATGGGAAATATTATGC
 ATCAAAGACATTTTATGACCCGAAGAAACAACGAAGAGTACTGTGGGGATGGATTGGGG
 AAATGATAGTGAATCTGCTGACCTGCAGAAGGGATGGGCATCTGTACAGAGTATFCCA
 AGGACAGTGTCTTACGACAAGAAGACAGGGACACATCTACTTCAGTGGCCAGTTGAAGA
 AATTGAAAGCTTAAGAGCGGGTGATCCTATTGTTAAGCAAGTCAATCTTCAACCAGGT
 CAATTGAGCTACTCCATGTTGACTCAGCTGCAGAGTTGGATATAGAAGCCTCATTGAA
 GTGGACAAAGTCCGCTCCAGGGAATAAATTGAAGCAGATCATGTAGGTTTCAGCTGCTC
 TACTAGTGGAGGTGCTGCTAGCAGAGGCATTTTGGGACATTTGGTGTGCTGTAATTG
 CTGATCAAACGCTATCTGAGCTAACGCCAGTTTACTTCTTCAATTTCTAAAGGAGCTGAT
 GGTGAGCTGAGACTCACTTCTGTGCTGATCAAAGTATCCTCAGAGGCTCCGGGAGT
 TGCTAAACGAGTTTATGGTAGTTTCACTACCCGTGTTGGACGGTGAAAAACATTTCGATGA
 GATTATTGGTGGACCACTCAATTGTGGAGAGCTTTGCTCAAGGAGGAAGAAGCAGTCATA
 ACATCGCAATTTACCCAACAAGGCAGTGAATGGAGCAGCAGACTCTTCGTTTTCAA
 TAATGCCACAGGGCTAGCGTACTGCCTCCGTCAAGATTTGGTCACTTGAGTCGGCTA
 ATATTCGATCCTTCCCTTGCAAGACTTGATA

5

OTRAS REALIZACIONES

Se debe observar que aunque la invención se ha descrito en conjunto con la descripción detallada de la misma, la descripción mencionada anteriormente pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define con el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas, y modificaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones que siguen a continuación.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

15

<110> Collectis SA

<120> PATATAS CON ENDULZAMIENTO INDUCIDO EN FRÍO REDUCIDO

<130> 36861-0004W01

20

<150> US 61/745.003
 <151> 21-12-2012

5 <160> 34

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

10 <210> 1
 <211> 139
 <212> ADN
 <213> *Solanum tuberosum*

<400> 1

```

attcctcccg gatcaaccg attccggcca ccggaagtcc cttaaatca tctccggcat 60
tctcctctcc tctttccttt tgctttctgt agccttcttt ccgacctca acaaccagtc 120
accggacttg cagagtaac 139
    
```

15

<210> 2
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> *Solanum tuberosum*

20

<400> 2
 ttctcccg atcaaccga tccggccac ccggaagtcc ttaaatca 49

25

<210> 3
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> mutante

<400> 3
 ttctcccg atcaactccc ttaaatca 28

35

<210> 4
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> mutante

<400> 4
 ttctcccg atcagccacc ggaatccct taaactca 39

45

<210> 5
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> mutante

<400> 5
 ttctcccg atcaaccga ttgtccctta aatca 36

55

<210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> mutante

5 <400> 6
 ttctctccgg atcaaccgga t 21

<210> 7
 <211> 27
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> mutante

15 <400> 7
 ttctctccgg atcaaccgga ttccggc 27

<210> 8
 <211> 49
 <212> ADN
 20 <213> *Solanum tuberosum*

<400> 8
 25 ttctctctct ctttctttt gctttcgtga gccttcttc cgatctca 49

<210> 9
 <211> 43
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> mutante

<400> 9
 35 ttctctctct ctttctttt gctagccttc ttccgatcc tca 43

<210> 10
 <211> 46
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> mutante

<400> 10
 45 ttctctctct ctctctttt gcttttagtc ttcttccga tctca 46

<210> 11
 <211> 45
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> mutante

<400> 11
 55 ttctctctct ctttctttt gctgtagcct tcttccgat cctca 45

<210> 12
 <211> 44
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> mutante

<400> 12
 ttctctctct ctttcctttt gcgtagcctt ctttccgatc ctca 44

5

<210> 13
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> *Solanum tuberosum*

10

<400> 13
 tagcctctt tccgatcctc aacaaccagt cacgggactt gcagagtaa 49

15

<210> 14
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> mutante

<400> 14
 tagcctctt tccgatcctc aacacaccgg acttgcagag taa 43

25

<210> 15
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> mutante

<400> 15
 tagcctctt tccgatcctc aaagtcaccg gacttgcaga gtaa 44

35

<210> 16
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> mutante

<400> 16
 tagcctctt tccgatcctc tcaccggact tgcagagtaa 40

45

<210> 17
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> mutante

<400> 17
 tagcctctt tccgatcctc agtcaccgga cttgcagagt aa 42

55

<210> 18
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> *Solanum tuberosum*

60

<400> 18

ttctcccg atcaacc 17
 <210> 19
 <211> 17
 5 <212> ADN
 <213> *Solanum tuberosum*
 <400> 19
 gaagtcctt aaaatca 17
 10
 <210> 20
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> *Solanum tuberosum*
 15
 <400> 20
 ttctctct ctttct 17
 20
 <210> 21
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> *Solanum tuberosum*
 25
 <400> 21
 cttcttccg atcctca 17
 30
 <210> 22
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> *Solanum tuberosum*
 <400> 22
 tagcctt tccgatc 17
 35
 <210> 23
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> *Solanum tuberosum*
 40
 <400> 23
 cggactgc agagtaa 17
 45
 <210> 24
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> *Solanum tuberosum*
 <400> 24
 ttctcccg atcaaccga ttccggccac cggaagtccc tfaaatca 49
 50
 <210> 25
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> *Solanum tuberosum*
 55
 <400> 25
 ttctctct ctttcttt gcttctgta gccttcttc cgatcctca 49
 60
 <210> 26
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> *Solanum tuberosum*
 <400> 26

tagccttctt tccgatctc aacaaccagt caccggactt gcagagtaa 49

5 <210> 27
 <211> 1920
 <212> ADN
 <213> *Solanum tuberosum*

<400> 27

```

atggccacgc agtaccattc cagttatgac cgggaaaact cgcctccca ttacacattc 60
ctcccggatc aacccgattc cggccaccgg aagtccctta aaatcatctc cggcattttc 120
ctctcctctt tctctttgct ttctgtagcc ttctttccga tcctcaacaa ccagtcacog 180
gacttgacga gtaactcccg ttogccggcg cgcgcgtcaa gaggtgtttc tcagggagtc 240
tccgataaga cttttcgaga tgtcgtcaat gctagtacag tttcttatgc gtggtccaat 300
gctatgctta gctggcaaag aactgcttac cattttcaac ctcaaaaaaa ttggatgaac 360
gatcctaattg gtccattgta ccacaaggga tggatcatc ttttttatca atacaatcca 420
gattcagcta tttggggaaa tatcacatgg ggccatgccg tatccaagga cttgatccac 480
tggctctact tgccttttgc catggttcct gatcaatggg acgatattaa cgggtgctgg 540
actgggtccg ctaccatcct acccgatggg cagatcatga tgctttatac cggtgacact 600
gatgattatg tgcaagtgca aaatcctgcg taccocacca acttatctga tcctctcctt 660
ctagactggg tcaagtacaa aggcaaccgg gttctgggtc ctccaccogg cattggtgtc 720
aaggacttta gagaccggac cactgcttgg accggacccc aaaatgggca atggctctta 780
acaatcgggt ctaagattgg taaaacgggt attgcacttg tttatgaaac ttccaacttc 840
acaagcttta agctattgga tgaagtgtg catgocggtc cgggtacggg tatgtgggag 900
tgtgtggact tttaccogg atogactgaa aaaacaaacg ggttggacac atcatataac 960
ggcccgggtg taaagcatgt gttaaaagca agtttagatg acaataagca agatcactat 1020
gctattggga cgtatgactt gacaaagaac aaatggacac ccgataagcc ggaattggat 1080
tgtggaattg ggttgaagct ggattatggg aaatattatg catcaaagac attttatgac 1140
ccgaagaaac aacgaagagt actgtgggga tggattgggg aaactgatag tgaatctgct 1200
gacctgcaga agggatgggc atctgtacag agtattccaa ggacagtgct ttacgacaag 1260
aagacaggga cacatctact tcagtggcca gttgaagaaa ttgaaagctt aagagcgggt 1320
gatcctattg ttaagcaagt caatcttcaa ccaggttcaa ttgagctact ccatgttgac 1380
tcagctgcag agttggatat agaagcctca tttgaaagtg acaaagtgcg gctccaggga 1440
ataattgaag cagatcatgt aggtttcagc tgctctacta gtggaggtgc tgctagcaga 1500
ggcattttgg gaccatttgg tgtcgttcta attgctgac aaacgctatc tgagctaacg 1560
ccagtttact tcttcatttc taaaggagct gatggctcag ctgagactca cttctgtgct 1620
gatcaaaacta gatcctcaga ggctccggga gttgctaaac gagtttatgg tagttcagta 1680
cccgtgttg acggtgaaaa acattcgatg agattattgg tggaccactc aattgtggag 1740
agctttgctc aaggaggaag aacagtcata acatcgcgaa tttaccaaac aaaggcagtg 1800
aatggagcag cagcactctt cgttttcaat aatgccacag gggctagcgt gactgcctcc 1860
gtcaagattt ggtcacttga gtoggetaat attogatcct tccccttgca agacttgtaa 1920
    
```

10
 <210> 28
 <211> 230
 <212> ADN
 15 <213> *Solanum tuberosum*

<400> 28

```

atagctctcg cagttatgac cgggaaactc cgcctcccat tacacattcc tcccggatca 60
acctgattcc ggccaccgga agtcccttaa aatcatctcc ggcattttcc tctcctcttt 120
ccttttgctt tctgtagcct tctttccgat cctcaacaac cagtcacogg acttgacagag 180
taactcccgt tcgccggcgc cgccgtcaag aggtgtttct cagggagtct 230
    
```

20
 <210> 29
 <211> 230
 <212> ADN
 25 <213> *Solanum tuberosum*

<400> 29

```

atagctctcg cagttatgac cgggaaactc cgcctcccat tacacattcc tcccggatca 60
accogattcc ggccaccgga agtcccttaa aatcatctcc ggcattttcc tctcctcttt 120
ccttttgctt tctgtagcct tctttccgat cctcaacaac cagtcacogg acttgacagag 180
taactcccgt tcgccggcgc cgccgtcaag aggtgtttct cagggagtct 230
    
```

ES 2 673 864 T3

<210> 30
 <211> 230
 <212> ADN
 <213> *Solanum tuberosum*
 5
 <400> 30

 atagctctcg cagttatgac ccggaactc cgcctcccat tacacattcc tcccgatca 60
 acacgattcc ggccaccgga aatcccttaa aatcatctcc ggcattttcc tctcctctct 120
 ccttttgctt tctttatcct tctttccgat cctcaacaac cagtcaccgg acttgaaaag 180
 taacgcccgt tcgcccggcg cgccgtcaag aggtgtttct cagggagtct 230

 10
 <210> 31
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> *Solanum tuberosum*

 15
 <400> 31
 ttcctctct ctctccttt gctttctta gctctttc cgatcctca 49

 20
 <210> 32
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25
 <220>
 <223> mutante

 <400> 32
 ttcctctct cttcctttt gctgtagcct tcttccgat cctca 45

 30
 <210> 33
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35
 <220>
 <223> mutante

 <400> 33
 ttcctctct ctctccttt gcttagtct tcttccgat cctca 45

 40
 <210> 34
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45
 <220>
 <223> mutante

 <400> 34
 ttcctctct ctagccttct ttccgatct ca 32
 50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una planta, parte de planta, o célula de planta de *Solanum tuberosum* que comprende una delección en al menos dos alelos de VInv endógenos para dicha planta, parte de planta, o célula de planta, en la que dicha delección se indujo mediante introducción de una o más endonucleasas de corte raro en una célula de *S. tuberosum*, de modo que dicha planta, parte de planta, o célula de planta tiene una expresión reducida de invertasa vacuolar en comparación con una planta, parte de planta, o célula de planta de *S. tuberosum* de control que carece de dicha delección.
- 10 2. La planta, parte de planta, o célula de planta de la reivindicación 1, en la que cada delección mencionada es una delección de más de un par de bases de nucleótidos.
- 15 3. La planta, parte de planta, o célula de planta de la reivindicación 1, en la que cada delección mencionada se produce en una secuencia diana tal como se presenta en la SEQ ID NO: 27, o en una secuencia diana que tiene una identidad de al menos un 95 por ciento con la SEQ ID NO: 27; o en la que cada una de dicha delección se produce en una secuencia diana tal como se presenta en la SEQ ID NO: 1, o en una secuencia diana que tiene una identidad de al menos un 95 por ciento con la SEQ ID NO: 1.
- 20 4. La planta, parte de planta, o célula de planta de la reivindicación 1, en la que dicha una o más endonucleasas de corte raro comprenden una endonucleasa efectora de tipo activador de transcripción (nucleasas TALE), preferentemente en la que dicha nucleasa TALE se une a una secuencia tal como se presenta en cualquiera de las SEQ ID NOS: 18-23.
- 25 5. La planta, parte de planta, o célula de planta de la reivindicación 1, en la que cada uno de dichos al menos dos alelos de VInv presenta eliminación de un ácido nucleico endógeno y no incluye ningún ácido nucleico exógeno.
- 30 6. La planta, parte de planta, o célula de planta de la reivindicación 1, en la que cada alelo de VInv endógeno está mutado, preferentemente en la que cada uno de dicho alelo de VInv presenta eliminación de un ácido nucleico endógeno y no incluye ningún ácido nucleico exógeno.
- 35 7. La planta, parte de planta, o célula de planta de la reivindicación 1, en la que dicha planta, parte de planta, o célula de planta se somete a condiciones de almacenamiento en frío.
8. La planta, parte de planta, o célula de planta de la reivindicación 7, en la que dicha planta, parte de planta, o célula de planta tiene niveles de acrilamida disminuidos en comparación con una planta, parte de planta, o célula de planta de control que carece de dicha mutación.
- 40 9. Un método para preparar una planta de *Solanum tuberosum* que tiene endulzamiento inducido en frío reducido, en el que dicho método comprende:
- 45 (a) poner en contacto una población de células de planta de *S. tuberosum* que comprenden un alelo de VInv funcional con una endonucleasa de corte raro dirigida a una secuencia de VInv endógeno,
 (b) seleccionar, a partir de dicha población, una célula en la que al menos dos alelos de VInv se han inactivado mediante delecciones inducidas por dicha endonucleasa de corte raro, y
 (c) hacer crecer dicha célula de planta seleccionada en una planta de *S. tuberosum*, en la que dicha planta de *S. tuberosum* tiene endulzamiento inducido en frío reducido en comparación con una planta de *S. tuberosum* de control en la que dichos alelos de VInv no se han inactivado.
- 50 10. El método de la reivindicación 9, en el que dichas células de planta de *S. tuberosum* son protoplastos, método que comprende preferentemente la introducción en dichos protoplastos de una proteína endonucleasa de corte raro.
- 55 11. El método de la reivindicación 10, que comprende la transformación de dichos protoplastos con un ácido nucleico que codifica dicha endonucleasa de corte raro, en el que preferentemente dicho ácido nucleico es un ARNm, y en el que opcionalmente dicho ácido nucleico está contenido dentro de un vector.
- 60 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que dicha endonucleasa de corte raro es una nucleasa TALE.
- 65 13. El método de la reivindicación 12, en el que dicha nucleasa TALE está dirigida a una secuencia tal como se presenta en la SEQ ID NO: 27, o a una secuencia que tiene una identidad de al menos un 95 por ciento con la secuencia que se presenta en la SEQ ID NO: 27; o en el que dicha nucleasa TALE está dirigida a una secuencia tal como se presenta en la SEQ ID NO: 1, o a una secuencia que tiene una identidad de al menos un 95 por ciento con la secuencia que se presenta en la SEQ ID NO: 1, o en el que dicha nucleasa TALE se une a una secuencia tal como se presenta en cualquiera de las SEQ ID NOS: 18-23.

14. El método de la reivindicación 10, que comprende adicionalmente el cultivo de dichos protoplastos para generar líneas de plantas.
- 5 15. El método de la reivindicación 10, que comprende el aislamiento de ADN genómico que comprende al menos una porción del locus de VInv de dichos protoplastos.
16. Un método para producir un producto alimentario, que comprende:
- 10 (a) proporcionar una planta o parte de planta de *S. tuberosum* tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que se ha sometido a almacenamiento en frío; y
(b) producir un producto alimentario a partir de dicha planta o parte de planta.
17. El método de la reivindicación 16, que comprende adicionalmente:
- 15 (c) cocinar dicha planta o parte de planta para obtener un producto alimentario que tiene niveles reducidos de acrilamida en comparación con un producto alimentario producido a partir de una planta o parte de planta cocinada de control que carece de dicha delección y que se sometió a almacenamiento inducido en frío antes de su cocción.
- 20 18. Un producto alimentario producido a partir de una planta o parte de planta de *S. tuberosum* tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que (i) comprende una delección en cada alelo de VInv endógeno a dicha planta o parte de planta, de modo que dicha planta, parte de planta, o célula de planta no tiene alelo de VInv funcional, y (ii) se ha sometido a almacenamiento en frío.
- 25 19. El producto alimentario de la reivindicación 18, en el que dicho producto alimentario es una patata frita de bolsa o una patata frita.

Figura 1

VInv_T1
AttcctcccggatcaaacCGattccgggccaccgggaagtcccttaaaatcatctccggcattttccctctcttct
 tttgcttctgtagccttcttccgatacctcaacaaccaGtcaccggacttgacagagtaac (SEQ ID NO:1)

VInv_T2
AttcctcccggatcaaacCGattccgggccaccgggaagtcccttaaaatcatctccggcattttccctctcttct
 tttgcttctgtagccttcttccgatacctcaacaaccaGtcaccggacttgacagagtaac (SEQ ID NO:1)

VInv_T3
AttcctcccggatcaaacCGattccgggccaccgggaagtcccttaaaatcatctccggcattttccctctcttct
 tttgcttctgtagccttcttccgatacctcaacaaccaGtcaccggacttgacagagtaac (SEQ ID NO:1)

Figura 2

VInv_T1				
Secuencia		Número de Delecciones	SEQ ID NO:	
<u>TTCCTCCCGGATCAACCCGATTCGGGCCACCGGAAGTCCCTTAAAAATCA</u>		0	2	
TTCCTCCCGGATCAACTCCCTT-----AAATCA		21	3	
TTCCTCCCGGATCAGCCACCGGAAATC-----CCTTAAAACTCA		10	4	
TTCCTCCCGGATCAACCCGATT-----GTCCCTTAAAAATCA		13	5	
TTCCTCCCGGATCAACCCGAT-----		38	6	
TTCCTCCCGGATCAACCCGATTCGGC-----		30	7	
VInv_T2				
Secuencia		Número de Delecciones	SEQ ID NO:	
<u>TTCCTCCTCCTCTTCCCTTTTGCTTTCTGTAGCCTTCTTTCCGATCCTCA</u>		0	8	
TTCCTCCTCCTCTTCCCTTTTGCT-----AGCCTTCTTTCCGATCCTCA		6	9	
TTCCTCCTCCTCCTCCTTTTGCTTT---TAGTCTTCTTTCCGATCCTCA		3	10	
TTCCTCCTCCTCTTCCCTTTTGCTGT----AGCCTTCTTTCCGATCCTCA		4	11	
TTCCTCCTCCTCTTCCCTTTTGCT-----AGCCTTCTTTCCGATCCTCA		6	9	
TTCCTCCTCCTCTTCCCTTTTGCT-----AGCCTTCTTTCCGATCCTCA		5	12	
VInv_T3				
Secuencia		Número de Delecciones	SEQ ID NO:	
<u>TAGCCTTCTTTCCGATCCTCAACAACCAGTCAACCGGACTTGCAGAGTAA</u>		0	13	
TAGCCTTCTTTCCGATCCTCAAC-----ACACCGGACTTGCAGAGTAA		6	14	
TAGCCTTCTTTCCGATCCTCAAA-----GTCACCGGACTTGCAGAGTAA		5	15	
TAGCCTTCTTTCCGATCCTC-----TCACCGGACTTGCAGAGTAA		9	16	
TAGCCTTCTTTCCGATCCTCAG-----TCACCGGACTTGCAGAGTAA		7	17	
TAGCCTTCTTTCCGATCCTCAG-----TCACCGGACTTGCAGAGTAA		7	17	

Figura 4

Sitio de VInv_T2	Número de Deleciones	SEQ ID NO:
TTCCTCCTCCTCCTCCTTTTGCTTTCTTTAGTCTTCTTTCCGATCCCTCA	0	31
TTCCTCCTCCTCCTTTTGCTTTGCTTTTGTAGCTTCTTTCCGATCCCTCA	4	32
TTCCTCCTCCTCCTTTTGCTTTGCTTTTGTAGCTTCTTTCCGATCCCTCA	4	33
TTCCTCCTCCTCCTTTTGCTTTGCTTTTGTAGCTTCTTTCCGATCCCTCA	17	34