

DOCTORA:

EDNA MARCELA RAMÍREZ OROZCO

DIRECTORA NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

REF. EXPEDIENTE No.: NC2019/0014469.
SOLICITUD PATENTE: COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA
SOLICITANTE: INCREMENTAR LA VIDA ÚTIL DEL BANANO.
TROPIC BIOSCIENCES UK LIMITED.

RESPUESTA A REQUERIMIENTO OFICIAL **OFICIO NO. 18162** NOTIFICADO EL
24 DE NOVIEMBRE DE 2021.

CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, mayor de edad, domiciliada en Bogotá D.C.,
identificada con cedula No 40.017.374, en mi condición de apoderada de la
sociedad **TROPIC BIOSCIENCES UK LIMITED.**, por el presente escrito y estando
dentro del término legal para hacerlo, doy respuesta al oficio arriba referenciado,
de acuerdo con lo siguiente:

En respuesta al oficio No. 18162, a continuación, encuentran:

- i. Respuesta a los puntos del requerimiento
 - Respuesta punto por punto a los requerimientos de la examinadora.
- ii. Adjunto a este memorial se presentan los siguientes documentos
 - Nuevo capítulo reivindicatorio.
 - Nuevo capítulo descriptivo.
 - Comprobante de pago por las modificaciones al capítulo reivindicatorio.
 - Comprobante de pago por las modificaciones al capítulo descriptivo.

1. De la solicitud de patente.

Excepción de la patentabilidad

Manifiesta la examinadora que el objeto de las reivindicaciones 19 y 20 no es patentable, toda vez que, las etapas técnicas a) y b) del método para producir banano, están relacionadas con la obtención de plantas por medio de un proceso esencialmente biológico que involucran la producción, reproducción y propagación de plantas y, en consecuencia, no requieren de ningún tipo de intervención humana.

El solicitante ha modificado la antigua reivindicación 19 (nueva reivindicación 10) incluyendo las características técnicas de la antigua reivindicación 10 para que la misma este en el alcance de la nueva reivindicación 1.

Al solicitante le gustaría manifestar su desacuerdo con la afirmación de la examinadora, en específico el solicitante quisiera aclarar que, las plantas de banano cultivadas son estériles y no se necesita polinización (y mucho menos cruce/autocruzamiento) para que tales plantas de banano produzcan frutos. Más bien, las flores femeninas no fertilizadas dan frutos una vez que las flores pasan demasiado tiempo sin fertilización. Sus óvulos dejan de desarrollarse y la pulpa de la fruta se hincha a medida que crecen las frutas de la planta (banano). Además, las plantas de banano cultivadas dependen de la propagación asexual a través de la clonación, ya sea mediante el uso de retoños y esquejes y/o mediante el cultivo de tejidos (intervención humana).

De acuerdo con lo anterior, para el solicitante es claro entonces que las nuevas reivindicaciones 10 y 11 (antiguas reivindicaciones 19 y 20) no se refieren a un proceso esencialmente biológico, sino a un proceso técnico que requiere de intervención humana y por tanto corresponden a materia patentable.

Título

La examinadora objeta el título de la invención ya que el mismo no se relaciona con el objeto de la solicitud contenido en la descripción y las reivindicaciones. La examinadora recomienda modificar el título de la invención por el siguiente:

MÉTODO PARA AUMENTAR LA VIDA ÚTIL DEL BANANO QUE COMPRENDE EDITAR UN GEN INVOLUCRADO EN LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE ETILENO.

El solicitante siguiendo las recomendaciones de la examinadora solicita modificar el título de la solicitud por el siguiente:

MÉTODO PARA AUMENTAR LA VIDA ÚTIL DEL BANANO QUE COMPRENDE EDITAR UN GEN INVOLUCRADO EN LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE ETILENO.

Reivindicaciones

- La examinadora objeta la reivindicación 1 porque, esta reivindicación menciona *"un agente de edición"* sin precisar a qué tipo de sistema se refiere ni su estructura. Asimismo, menciona la examinadora, que la reivindicación 1 no es clara cuando menciona *"una secuencia de ácido nucleico que codifica un componente en una ruta de biosíntesis de etileno del banano"*.

El solicitante ha modificado a modificado la antigua reivindicación 1, incorporando las características técnicas de la antigua reivindicación 10.

El solicitante quisiera manifestar que una persona versada en la materia comprendería fácilmente el significado del término *"agente de edición"* en el contexto de las reivindicaciones y la descripción. En la descripción tal y como se adjunta a este memorial de respuesta el 18/02/2022 se proporcionan numerosos ejemplos de *"agentes de edición"*, para mejor referencia, ver página 27, línea 17, a la página 36, línea 8, del capítulo descriptivo tal y como

se adjunta a este memorial de respuesta. Por lo tanto, la reivindicación 1 sería clara.

Adicionalmente la examinadora considera que la frase *“una secuencia de ácido nucleico que codifica un componente en una ruta de biosíntesis de etileno del banano”* no estaba clara, así como la expresión *“componente”* debería reemplazarse. En este sentido, las nuevas reivindicaciones independientes 1 y 10 definen cada uno de estos componentes refiriéndose a los respectivos SEQ ID NO específicos, y las reivindicaciones dependientes se limitan a las mismas características; por dicha dependencia, el solicitante entiende que la objeción ha sido subsanada.

- La examinadora objeta la reivindicación 1 porque, esta reivindicación hace referencia a un resultado a alcanzar al mencionar *“para resultar en una mutación de pérdida de función en dicha secuencia de ácido nucleico que codifica la mencionada ruta de biosíntesis de etileno”*. La examinadora manifiesta que los resultados alcanzar no definen las características esenciales de la invención.

Al solicitante le gustaría manifestar su desacuerdo con la afirmación que la reivindicación 1 se refiere a un resultado a alcanzar, la nueva reivindicación 1 se ha limitado referenciando los SEQ ID NO específicos de los componentes enumerados. El solicitante entiende que la objeción ha sido subsanada.

- La examinadora objeta las reivindicaciones 9 a 12 porque, estas reivindicaciones, utilizan las expresiones *“Ma04_g35640”, “Ma07_g19730”, “Ma09_g19150”, “Ma04_g31490”, “Ma01_g11540”* que corresponden a nombres arbitrarios.

Al solicitante ha modificado la reivindicación 1. La nueva reivindicación 1 se ha limitado referenciando los SEQ ID NO específicos de los componentes enumerados. El solicitante entiende que la objeción ha sido subsanada.

- La examinadora objeta las reivindicaciones 13 y 14 porque, estas reivindicaciones, no son claras porque se refieren a porcentajes de identidad cuando mencionan *"al menos 99% idéntica a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo consistiendo de SEQ ID NO: 47-54"* o *"al menos 99% idéntica a una secuencia de ácido nucleico establecido en SEQ ID NO: 47"*.

El solicitante ha eliminado la antigua reivindicación 14, con respecto a la reivindicación 13 el solicitante ha eliminado la referencia a los porcentajes de identidad. Por tanto la objeción ha sido subsanada.

- La examinadora objeta las reivindicaciones 16 a 18 porque, estas reivindicaciones, no son claras porque se refieren a *"una pluralidad de secuencias de ácido nucleico"* o *"una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos"* lo que no define el alcance de la invención. La examinadora sugiere eliminar la referencia a *"una pluralidad de secuencias"* y definir de manera precisa el número de secuencias e identificarlas por su SEQ ID NO.

Con respecto a la antigua reivindicación 16 (nueva reivindicación 9) se ha modificado, limitando dicha reivindicación, al grupo seleccionado de SEQ ID NOs: 47-54. Adicionalmente las antiguas reivindicaciones 17 y 18 han sido eliminadas. El solicitante entiende que la objeción ha sido subsanada.

Descripción

La examinadora manifiesta que el capítulo descriptivo no es claro al presentar errores párrafos que no se corresponden con el idioma castellano y errores de redacción.

El solicitante ha revisado el capítulo descriptivo y ha corregido los errores y la redacción de algunos apartados que presentaban los errores mencionados por la examinadora. Con respecto a la referencia a la figura 6A el solicitante quisiera manifestar que el extracto describe de forma adecuada lo representado en la

futura 6A y por tanto no amerita hacer ninguna corrección adicional a este respecto.

2. Determinación de Estado de la técnica:

Como resultado del examen de patentabilidad el examinador encontró los siguientes documentos relevantes:

Ítem	Documento	Título	Fecha de publicación
D1	US2010/293671	"Composition and method for prolonging the shelf life of banana by using interfering RNA"	18 de noviembre de 2010
D2	WO2016/205613	"CRISPR enzyme mutations reducing off-target effects"	22 de diciembre de 2016

3. Examen de patentabilidad

Nivel inventivo:

La examinadora inicia el examen de nivel inventivo realizando una comparación entre la reivindicación 1 de la presente invención (expediente NC2019/0014471) con D1 y D2.

Luego de esta comparación, la examinadora manifiesta que D1 corresponde al estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 1cita la examinadora el párrafo [0007], el ejemplo 4, del párrafo [0093] de D1.

La examinadora manifiesta que, la diferencia técnica entre la invención definida en la reivindicación 1 de la presente invención, con las características técnicas reveladas en D1, radica que la presente invención revela a transformación con un agente de edición de ADN dirigido a una secuencia de ácido nucleico que codifica un componente en una ruta de biosíntesis de etileno del banano.

Manifiesta la examinadora que *“No hay efecto técnico asociado a la diferencia. Toda vez que, no se evidencia que el incluir específicamente un agente de edición de ADN dirigido a una secuencia de ácido nucleico que codifica un componente en una ruta de biosíntesis de etileno del banano proporcione un método con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el método de D1, puesto que, en el documento D1 se enseña el aumento de la vida útil del banano mediante la inhibición de la expresión del gen ACO que codifica la enzima ACC oxidasa, involucrada en la síntesis de etileno (Figs. 6B, 7B, 9A, 9B, 10B, 11A, 11B y 12B, Ejs. 4-6). Por lo que, no se puede atribuir algún efecto técnico a la materia reclamada”* (tomado del oficio No. 18162).

El examinador plantea entonces que, el problema técnico se reduce al siguiente *“¿Cómo modificar el método conocido en D1 con el fin de obtener un método alternativo?”* (Tomado del oficio N.º 18162).

Manifiesta la examinadora que, el incluir un agente de edición de ADN dirigido a una secuencia de ácido nucleico específica para obtener el método, ya está divulgado en el documento D2. Cita la examinadora los siguientes párrafos de D2 para darle soporte a la afirmación, párrafos [001112], [001191] y [001192]

Manifiesta el examinador que, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir un agente de edición de ADN dirigido a una secuencia de ácido nucleico involucrada en la síntesis de etileno en plantas de banano del documento D2 en el método de D1, para así llegar al objeto de la reivindicación 1. Por lo cual se considera obvia.

Finaliza la examinadora manifestando que las reivindicaciones dependientes 2 a 18 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al método de la reivindicación 1, por lo cual se considera que carece de nivel inventivo.

El solicitante quisiera manifestar su desacuerdo con la objeción realizada por la examinadora.

En vista de la objeción realizada por la examinadora referente a que las reivindicaciones son obvias sobre D1 al combinarse con D2, las nuevas reivindicaciones independientes 1 y 10 ahora definen cada uno de los componentes enumerados en la ruta de biosíntesis de etileno haciendo referencia a su SEQ ID NO específico. Las reivindicaciones dependientes presentan las mismas limitaciones, gracias a su dependencia con las reivindicaciones 1 u 11.

La identificación de los genes ACS y ACO específicos del banano expuestos en los SEQ ID NO reivindicados no fue sencilla. Antes de la fecha de prioridad de la presente invención, tales secuencias fueron buscadas por homología con genes en otros organismos. En la presente solicitud, por otro lado, se utilizaron en su lugar secuencias homologas de tomate, seguidas de la construcción de un mapa filogenético (véanse las Figuras 9 y 10 de la Solicitud tal como se presentó el 19 de diciembre de 2019). Este análisis complejo permitió la caracterización de secuencias que son a la vez homólogas y tienen un ancestro común (ver página 64, líneas 20 a 30, del capítulo descriptivo tal y como se adjunta a este memorial de respuesta), es decir, parálogos que mantienen la función de la secuencia homóloga, incluido el gen ACO Ma01_g11540 no identificado en el estado de la técnica.

Se tuvieron que superar desafíos importantes para realizar la edición de genes en el banano. Esto se debe sobre todo a las complejidades que presenta el genoma del banano (las especies y los híbridos cultivados son en su mayoría triploides ($2n = 3x = 33$; unos pocos son diploides o tetraploides). El nivel de ploidía presente en el banano significa que el genoma contiene múltiples secuencias homólogas a los objetivos genéticos deseados, y fue un desafío identificar los genes ACS y ACO correctos para el desarrollo de la presente invención. Por lo tanto, la

enseñanza previa en el contexto de otras especies de plantas no puede aplicarse fácilmente/directamente al banano.

En cuanto a D1 (US2010/293671) citado por la examinadora, este documento, de hecho, se refiere exclusivamente a la tecnología de interferencia de ARN (ver las reivindicaciones de D1) y no hace referencia a la edición de ADN. Como se establece explícitamente en el resumen de D1, la interferencia de ARN da como resultado una disminución (es decir, una pérdida parcial) de la expresión génica, que es diferente a la materia técnica que se protege en las presentes reivindicaciones, que en cambio requieren una pérdida de función (es decir, una eliminación). En consecuencia, D1 es no debe compararse con el objeto del nuevo capítulo reivindicatorio que se presenta como respuesta al oficio 18162, ya que D1 no proporciona una tecnología que pudiese lograr una mutación con pérdida de función en un gen en la vía de biosíntesis del etileno en el banano, y mucho menos en las secuencias específicas que ahora se refiere el nuevo capítulo reivindicatorio modificado. De acuerdo con lo anterior, la materia técnica descrita en D1 no resulta relevante como punto de partida para llegar la invención (NC2019/0014469) tal y como se propone en el nuevo capítulo reivindicatorio.

Incluso si una persona versada en la materia recurriera a D1, necesitaría sustituir la tecnología de interferencia de ARN de D1 con un enfoque experimental completamente diferente. El D2 (WO2016/205613) citado por la examinadora, se ha utilizado para suplir las deficiencias de D1, sin embargo, D2 no contempla ningún protocolo experimental relevante para el banano y, en el contexto de la maduración de la fruta, solo contempla la incorporación de copias de genes antisentido en el genoma de una célula (ver, por ejemplo, el párrafo [001191] de D2). Por lo tanto, D2 se aleja directamente de la presente invención tal y como se reivindica, que se refiere, en forma opuesta a las enseñanzas de D2, a la edición de genes de banano endógenos. D2 no sugiere o enseña métodos para afectar la maduración de la fruta de ninguna otra manera, y la propuesta de insertar copias de secuencias de genes antisentido no permite llegar, a una persona versada en

la materia, explícitamente a el desarrollo de la presente invención tal y como se reivindica.

Además, el enfoque de edición de genes endógenos de la presente invención tiene ventajas específicas en comparación con el método antisentido que se revela en D2. Por ejemplo, al editar un gen endógeno (como se propone en la presente invención), el impacto de la edición de genes puede ser más específico y controlado. Las diferencias con la actividad de la proteína de tipo salvaje solo deberían ser evidentes en los tejidos (como la fruta) y en los momentos en que el gen objetivo se expresaría de forma natural. Por el contrario, la inserción de una copia del gen antisentido en el genoma de una planta, como en D2, podría conducir a la expresión ubicua e incontrolada de esta secuencia. Siguiendo el enfoque de D2, se puede aumentar la demanda de recursos de expresión vegetal y existe un potencial significativo de efectos secundarios no deseados y dañinos. Tales aspectos no se reconocen en D2.

Con base en el estado de la técnica en general, no habría habido ninguna expectativa razonable de que la tecnología de edición de ADN existente pudiera transferirse con éxito al banano. No hay ninguna enseñanza en ningún documento de la técnica anterior que muestre la viabilidad práctica de la invención tal y como se reivindica. Debido a la eficacia variable de los componentes de edición/expresión de genes tales como nucleasas y promotores en diferentes especies, no sería obvio para una persona versada en la materia que la edición de genes funcionaría apropiadamente en un nuevo sistema modelo (Banano). Por lo tanto, el estado de la técnica no permite, y mucho menos facilita, la edición de genes en el banano, y mucho menos en los genes específicos que ahora se enumeran en las reivindicaciones modificadas. Al menos por estas razones, el solicitante quisiera manifestar que las reivindicaciones modificadas son inventivas.

Así, se solicita al examinador que, con base a estos argumentos, reconsidere las objeciones relativas al nivel inventivo de la presente invención.

Por todo lo dicho, solicitamos que la Superintendencia de Industria y Comercio admita las modificaciones que se han facilitado, las cuales no amplían materia y subsanan las objeciones realizadas por el examinador. Asimismo, solicitamos que continúe el trámite con normalidad y se proceda con la concesión del Derecho sobre la Patente de la referencia.

Para efectos de notificaciones, recibiré estas vía internet al correo electrónico claudia.caro@ponsip.com, en la secretaría de esa Dirección y/o en la de la Delegatura de Propiedad Intelectual o en mi oficina de abogados de la Calle 94 A No 11A-32 Oficina 306 de la ciudad de Bogotá.

Agradezco su atención.



CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ

CC No 40.017.374 de Tunja

T.P. No 36.448 del C.S de la J.

Adjunto lo anunciado.

REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar la vida útil del banano, el método comprendiendo:
 - (a) someter una célula de planta de banano a un agente de edición de ADN dirigido a una secuencia de ácido nucleico que codifica un componente en una ruta de biosíntesis de etileno del banano para resultar en una mutación de pérdida de función en dicha secuencia de ácido nucleico que codifica la mencionada ruta de biosíntesis de etileno; y
 - (b) regenerar una planta a partir de la mencionada célula vegetal;
donde dicho componente se selecciona del grupo que consiste en: Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9), Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8), Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20) y Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).
2. El método de la reivindicación 1, comprendiendo además la cosecha de fruta de dicha planta.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, en donde la planta carece de un transgen que codifique el agente de edición de ADN.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha mutación está en forma homocigótica.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicha mutación es seleccionada del grupo que consiste en una eliminación, una inserción, una inserción/eliminación (Indel), y una sustitución.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho agente de edición de ADN es de un sistema de edición de ADN seleccionado del grupo que consiste meganucleasas, nucleasas de dedos de zinc (ZFN), nucleasas efectoras similares a activadores de transcripción (TALEN) y CRISPR-Cas.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho agente de edición de ADN es de un sistema de edición de ADN comprendiendo CRISPR-Cas.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicho agente de edición de ADN comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo consistiendo de SEQ ID NOs: 47-54.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicho agente de edición de ADN comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico que se seleccionan del grupo consistente en los SEQ ID NOs: 47-54.

10. Un método de producir banano, el método comprendiendo:

(a) cultivar la planta de banano que comprende un genoma que presenta una mutación de pérdida de función en una secuencia de ácido nucleico que codifica un componente en la ruta de biosíntesis del etileno en el banano; y

(b) cosechar fruta de la planta;

donde dicho componente se selecciona del grupo que consiste en: Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9), Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8), Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20) y Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la planta de banano es no-transgénica.

DESCRIPCION CON CONTROL DE CAMBIOS

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA INCREMENTAR LA VIDA ÚTIL DEL BANANO

5

CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a composiciones y métodos para incrementar la vida útil del banano.

Bananos y plátanos cultivados son plantas herbáceas gigantes dentro del género *Musa*. Ambas son estériles y partenocárpicas por lo que la fruta se desarrolla sin semilla. Los híbridos y especies
10 cultivadas son en su mayoría triploides ($2n = 3x = 33$; unos cuantos son diploides o tetraploides), y la mayoría han sido propagados a partir de mutantes encontrados en la naturaleza.

Los bananos son uno de los diez mayores cultivos alimentarios del mundo. Los bananos son comidos tanto crudos como cocidos, dependiendo de la variedad cultivada. Cerca de 60% de los bananos se comen crudos, como una fruta de postre, y el 40% restante es cocinado durante procesos
15 de cocido al vapor, hervido, rostizado y freído. Más de 120 millones de toneladas de fruta de banana son producidas cada año, con los tres productores más grandes, India, Uganda y China, consumiendo casi todo lo que producen domésticamente.

El banano pertenece a una fruta climatérica, después ser cosechado, el banano verde tiene que someterse a cambios climáticos a través de su proceso de maduración, incluyendo la producción de
20 etileno interno, hidrólisis de almidón y protopectina, y similares, hasta que la pulpa de la fruta se ablande, la dulzura se incremente y la fragancia se produzca, y luego, su valor dietético puede ser aumentado.

Convencionalmente, el banano es cosechado con anticipación, y su período de transporte y de almacenamiento es prolongado por el progreso de maduración. Sin embargo, la fruta de banano a
25 menudo puede pasar por maduración debido a la producción de etileno durante el proceso de transporte. Además, la fruta puede madurar demasiado y arruinarse, disminuyendo significativamente el valor marcador. Por consiguiente, el control de la biosíntesis de etileno puede ser utilizado para proveer un método para controlar la maduración del banano.

El etileno es una hormona vegetal presente en forma gaseosa, la cual puede afectar una serie
30 de reacciones fisiológicas y bioquímicas en la planta. El etileno juega un papel importante en el crecimiento, el desarrollo y la respuesta al estrés de la planta, por ejemplo, cuando una planta es sometida a inundaciones, daño mecánico, infección bacteriana, envejecimiento de las hojas y flores, maduración del fruto, y similares, producirá etileno. La ruta de biosíntesis de etileno comprende la

conversión de metionina en S-adenosil-metionina (AdoMet) con la ayuda de AdoMet sintasa, síntesis de 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) a partir de AdoMet con la ayuda de ACC sintasa (ACS) , y luego la oxidación de ACC en etileno con la ayuda de ACC oxidasa (ACO) (ver Figura 1, adaptada de Rudus et al. 2013, Volumen 35, Edición 2, pags. 295–307). Se conoce que ACO es la última enzima utilizada en la ruta de biosíntesis de etileno y, como resultado, la inhibición del gen ACO o la expresión de proteínas del mismo puede inhibir/derribar la biosíntesis de etileno, y además, lograr el objetivo de retardar la maduración posterior de una fruta.

A diferencia de la mayoría de otros cultivos alimenticios principales, los bananos son difíciles de mejorar genéticamente. El desafío es que casi todas las variedades cultivadas de banano y variedades locales son triploides, con altos niveles de infertilidad masculina y femenina. Existen varios programas internacionales de mejoramiento convencional y muchos de ellos están desarrollando nuevas variedades cultivadas. Sin embargo, es virtualmente imposible retrocruzar los bananos, por lo anterior excluyendo la posibilidad de introgresión de nuevas características en una variedad cultivada actual.

Por lo tanto, para cumplir el desafío de incrementar la demanda mundial de producción de alimentos, los enfoques típicos para mejorar la productividad agrícola (por ejemplo, rendimiento mejorado o resistencia a las plagas modificadas por ingeniería) han dependido ya sea en el mejoramiento por mutación o la introducción de genes novedosos en los genomas de las especies de cultivo por transformación. Estos procesos son inherentemente inespecíficos y relativamente ineficientes. Por ejemplo, los métodos de transformación de plantas entregan ADN exógeno que se integra en el genoma en ubicaciones aleatorias. Por ello, para identificar y aislar líneas de plantas transgénicas con atributos deseables, es necesario generar cientos de eventos de integración aleatorios únicos por constructo y subsiguientemente filtrar por los individuos deseados. Como resultado, la ingeniería convencional de rasgos de planta es una tarea laboriosa, que consume mucho tiempo e impredecible. Además, la naturaleza aleatoria de estas integraciones dificulta predecir si los efectos pleiotrópicos debido a la alteración involuntaria del genoma han ocurrido.

La naturaleza aleatoria de los procesos de transformación actuales requiere la generación de cientos de eventos para la identificación y selección de candidatos a eventos transgénicos (la detección de transformación y de eventos limita la velocidad en relación con los candidatos de genes identificados a partir de estudios genómicos funcionales). Además, dependiendo de la ubicación de la integración dentro del genoma, un casete de expresión génica puede ser expresado a diferentes niveles como resultado del efecto de posición genómica. Como resultado, la generación, aislamiento y

caracterización de líneas de plantas con genes o rasgos modificados por ingeniería ha sido un proceso extremadamente laborioso y costoso con una baja probabilidad de éxito. Además de los obstáculos asociados con la selección de eventos transgénicos, algunas preocupaciones importantes relacionadas con el confinamiento de genes y el grado de rigurosidad requerido para la liberación de plantas transgénicas en el medio ambiente para aplicaciones comerciales surgen.

Avances recientes en las técnicas de edición del genoma han hecho posible el alterar las secuencias de ADN en células vivas. La edición del genoma es más precisa que los métodos convencionales de mejoramiento de cultivos o los métodos estándar de ingeniería genética (transgénicos o GM). Al editar solo unos pocos de los billones de nucleótidos (los componentes básicos de los genes) en las células de las plantas, estas nuevas técnicas podrían ser la forma más efectiva de lograr que los cultivos crezcan mejor en climas adversos, resistir las plagas o mejorar la nutrición. Debido a que mientras más precisa es la técnica, menos material genético es alterado, entonces menor es la incertidumbre acerca de otros efectos en la forma que la planta se comporta.

El método más establecido de ingeniería genética de plantas utilizando la tecnología de edición del genoma CRISPR Cas9 requiere la inserción de nuevo ADN en el genoma del huésped. Este inserto, el ADN de transferencia (T-DNA), porta varias unidades transcripcionales para lograr ediciones exitosas del genoma CRISPR Cas9. Estos comúnmente consisten en un gen de resistencia a antibióticos a seleccionar para plantas transgénicas, la maquinaria Cas9 y varias unidades de sgRNA. Debido a la integración de ADN foráneo en el genoma, las plantas generadas de esta manera son clasificadas como transgénicas o genéticamente modificadas (GM). Una vez que una edición del genoma ha sido establecida en el huésped, este espinazo de T-DNA puede ser eliminado a través de la propagación y mejoramiento, ya que la maquinaria CRISPR Cas9 ya no es necesaria para mantener el fenotipo. Sin embargo, como fue mencionado, las especies de banano son partenocárpicas (no producen semillas viables) lo que hace imposible la eliminación del espinazo de T-DNA por reproducción sexual.

Antecedentes adicionales de la técnica anterior incluyen:

Sol. EE.UU., Publ. No. 20130097732

Solicitud de Patente EE.UU. 20140075593;

Zhang, Y., et al., *Edición eficiente y libre de transgenes del genoma en trigo a través de la expresión transitoria de ADN o ARN CRISPR/Cas9*. Nat Commun, 2016. 7: pág. 12617;

Woo, J.W., et al., *Edición libre de ADN del genoma en plantas con ribonucleoproteínas CRISPR-Cas9 preensambladas*. Nat Biotechnol, 2015. 33(11): pág. 1162-4;

Svitashev, S., et al., *Edición del genoma en maíz dirigida por complejos de ribonucleoproteína CRISPR-Cas9*. Nat Commun, 2016. 7: pág. 13274;

Luo, S., et al., *Edición no transgénica del Genoma de Plantas utilizando Nucleasas Purificadas de Secuencias Específicas*. Mol Plant, 2015. 8(9): pág. 1425-7.

5 Hoffmann 2017 PlosOne 12(2):e0172630;

Chiang et al., 2016. SP1,2,3. Sci Rep. 15 de Abril del 2016;6:24356.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una planta de banano que comprende un genoma comprendiendo una mutación de pérdida de función en una
10 secuencia de ácido nucleico que codifica un componente en una ruta de biosíntesis de etileno del banano.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se provee un método para aumentar la vida útil del banano, el método comprende:

- (a) someter una célula vegetal del banano a un agente de edición de ADN dirigido a una secuencia
15 de ácido nucleico que codifica un componente en una ruta de biosíntesis de etileno del banano para resultar en una mutación de pérdida de función en la secuencia de ácido nucleico que codifica la ruta de biosíntesis de etileno y
- (b) regenerar una planta a partir de la célula vegetal.

Conforme a algunas realizaciones de la invención, el método comprende además cosechar la
20 fruta de la planta.

De conformidad con algunas realizaciones de la invención, la planta carece de un transgen que codifique el agente de edición de ADN.

Según algunas realizaciones de la invención, la mutación está en una forma homocigota.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la planta o el antepasado de la misma
25 han sido tratados con un agente de edición de ADN dirigido a la secuencia genómica que codifica el componente en la ruta de biosíntesis de etileno.

Según algunas realizaciones de la invención, la mutación es seleccionada del grupo que consiste en una eliminación, una inserción, una inserción/eliminación (Indel) y una sustitución.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el componente en la ruta de biosíntesis
30 de etileno es seleccionado del grupo que consiste en 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACS) y ACC oxidasa (ACO).

Conforme a un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se provee un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente de edición de ADN dirigido a una secuencia de ácido nucleico que codifica un componente en una ruta de biosíntesis de etileno de un banano siendo operativamente unido a un promotor de plantas

En virtud de algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN es de un sistema de edición de ADN seleccionado del grupo que consiste en seleccionado del grupo que consiste en meganucleasas, nucleasas de dedo de zinc (ZFN), nucleasas efectoras similares a activadores de transcripción (TALEN) y CRISPR-Cas.

Según algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN es de un sistema de edición de ADN que comprende CRISPR-Cas.

Conforme a algunas realizaciones de la invención, el componente en la ruta de biosíntesis de etileno es seleccionado del grupo que consiste en Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9) y Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el componente en la ruta de biosíntesis de etileno es seleccionado del grupo que consiste en Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9), Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8), Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20) y Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

De conformidad con algunas realizaciones de la invención, el componente en la ruta de biosíntesis de etileno es seleccionado del grupo que consiste en Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9) y Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

Según algunas realizaciones de la invención, el componente en la ruta de biosíntesis de etileno es seleccionado del grupo que consiste en Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8) y Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20).

Conforme a algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN está dirigido a coordenadas de ácido nucleico las cuales se dirigen específicamente a más de una secuencia de ácido nucleico que codifica el componente en la ruta de biosíntesis de etileno.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 99% idéntica a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo consistente en SEQ ID NO: 47-54.

De conformidad con algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 99% idéntica a una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 47.

Según algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN comprende un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 47.

Conforme a algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico expuestas en SEQ ID NO: 47-54.

5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico establecidas en SEQ ID NO: 47, 49 o 50.

Según algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico expuestas en SEQ ID NO: 51 y 53.

Conforme a algunas realizaciones de la invención, la planta de banano es no-transgénica.

10 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se provee una parte de planta de la planta como se describe en la presente.

Según algunas realizaciones de la invención, la parte de planta es una fruta.

De conformidad con algunas realizaciones de la invención, la fruta es seca.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona
15 un método para producir banano, el método comprendiendo:

- (a) cultivar la planta como se describe en la presente; y
- (b) cosechar fruta de la planta.

Conforme a un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se provee un producto de banano procesado que comprende ADN genómico de banano comprendiendo una
20 mutación de pérdida de función en una secuencia de ácido nucleico que codifica un componente en una ruta de biosíntesis de etileno del banano.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se provee una planta de banano, o parte de la misma, que comprende una mutación de pérdida de función introducida en una secuencia de ácido nucleico genómico que codifica una proteína que es
25 un componente en una ruta de biosíntesis de etileno del banano, en donde la mutación resulta en un nivel reducido o una actividad reducida de la proteína en comparación con una planta de banano que carece de la mutación de pérdida de función.

Según algunas realizaciones de la invención, la planta comprende una o más mutaciones no naturales pérdida de función introducidas en una o más secuencias de ácido nucleico genómico que
30 codifican una o más proteínas que son componentes en una ruta de biosíntesis de etileno del banano, en donde la una o más mutaciones cada una resulta en niveles reducidos o actividades reducidas de la proteína en comparación con una planta de banano que carece de la mutación de pérdida de función.

Conforme a algunas realizaciones de la invención, la una o más proteínas son seleccionadas del grupo que consiste en 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACS) y ACC oxidasa (ACO).

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la secuencia de ácido nucleico genómico de la proteína ACS comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a, al menos 90% idéntica a, al menos 95% idéntica a o es una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo compuesto de Ma01_g07800.1 (SEQ ID NO: 1), Ma01_g12130.1 (SEQ ID NO: 2), Ma02_g10500.1 (SEQ ID NO: 3), Ma03_g12030.1 (SEQ ID NO: 4), Ma03_g27050.1 (SEQ ID NO: 5), Ma04_g01260.1 (SEQ ID NO: 6), Ma04_g24230.1 (SEQ ID NO: 7), Ma04_g31490.1 (SEQ ID NO: 8), Ma04_g35640.1 (SEQ ID NO: 9), Ma04_g37400.1 (SEQ ID NO: 10), Ma05_g08580.1 (SEQ ID NO: 11), Ma05_g13700.1 (SEQ ID NO: 12), Ma09_g19150.1 (SEQ ID NO: 13), y Ma10_g27510.1 (SEQ ID NO: 14); y en donde la secuencia de ácido nucleico genómico de la proteína ACO comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a, al menos 90% idéntica a, al menos 95% idéntica a o es una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en Ma09_g04370.1 (SEQ ID NO: 15), Ma06_g17160.1 (SEQ ID NO: 16), Ma11_g05490.1 (SEQ ID NO: 17), Ma00_g04490.1 (SEQ ID NO: 18), Ma07_g15430.1 (SEQ ID NO: 19), Ma01_g11540.1 (SEQ ID NO: 20), Ma10_g16100.1 (SEQ ID NO: 21), Ma05_g08170.1 (SEQ ID NO: 22), Ma06_g14430.1 (SEQ ID NO: 23), Ma05_g09360.1 (SEQ ID NO: 24), Ma11_g22170.1 (SEQ ID NO: 25), Ma05_g31690.1 (SEQ ID NO: 26), Ma07_g19730.1 (SEQ ID NO: 27), Ma06_g02600.1 (SEQ ID NO: 28), Ma10_g05270.1 (SEQ ID NO: 29), Ma06_g14370.1 (SEQ ID NO: 30), Ma11_g05480.1 (SEQ ID NO: 31), Ma06_g14410.1 (SEQ ID NO: 32), Ma06_g14420.1 (SEQ ID NO: 33), Ma06_g34590.1 (SEQ ID NO: 34), Ma02_g21040.1 (SEQ ID NO: 35), Ma11_g04210.1 (SEQ ID NO: 36), Ma05_g12600.1 (SEQ ID NO: 37), Ma04_g23390.2 (SEQ ID NO: 38), Ma03_g06970.1 (SEQ ID NO: 39), Ma05_g09980.1 (SEQ ID NO: 40), Ma04_g36640.1 (SEQ ID NO: 41), Ma11_g04180.1 (SEQ ID NO: 42), Ma11_g02650.1 (SEQ ID NO: 43), y Ma00_g04770.1 (SEQ ID NO: 44).

Según algunas realizaciones de la invención, la secuencia de ácido nucleico genómico que codifica el componente de proteína en la ruta de biosíntesis de etileno comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a, al menos 90% idéntica a, al menos 95% idéntica a, o es una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9), Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8), Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20) y Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

Conforme a algunas realizaciones de la invención, la secuencia de ácido nucleico genómico que codifica el componente de proteína en la ruta de biosíntesis de etileno comprende una secuencia

de ácido nucleico al menos 85% idéntica a, al menos 90% idéntica a, al menos 95% idéntica a, o es una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9), y Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

De acuerdo a algunas realizaciones de la invención, la secuencia de ácido nucleico genómico que codifica el componente de proteína en la ruta de biosíntesis de etileno comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 85% idéntica a, al menos 90% idéntica a, al menos 95% idéntica a, o es una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8), y Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20).

De conformidad con algunas realizaciones de la invención, la mutación no natural de pérdida de función fue introducida usando un agente de edición de ADN.

Según algunas realizaciones de la invención, la planta no comprende un transgen que codifica el agente de edición de ADN, un transgen que codifica un marcador seleccionable o un indicador, o no comprende un transgen que codifica ninguno de los agentes de edición de ADN, el marcador seleccionable, o el indicador.

Conforme algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN comprende un sistema de edición de ADN seleccionado del grupo que consiste en meganucleasas, nucleasas de dedos de zinc (ZFN), nucleasas efectoras similares a activadores de transcripción (TALENs) y CRISPR-Cas.

De acuerdo a algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN era CRISPR-Cas.

Según algunas realizaciones de la invención, la mutación es homocigótica.

De conformidad con algunas realizaciones de la invención, la mutación es seleccionada del grupo que consiste en una eliminación, una inserción, una inserción/eliminación (Indel), y una sustitución.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se provee un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente de edición de ADN y un agente de direccionamiento de ADN, en donde el agente de direccionamiento apunta al agente de edición a una secuencia de ácido nucleico genómico que codifica un componente de proteína en una ruta de biosíntesis de etileno de un banano para introducir una mutación de pérdida de función en la secuencia de ácido nucleico genómico, en donde los agentes de edición y de direccionamiento están operablemente unidos a un promotor de plantas y en donde la mutación resulta

en un nivel reducido o actividad reducida de la proteína en comparación con una planta de banano que carece la mutación de pérdida de función.

Conforme algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN y el agente de direccionamiento de ADN generan una de las mutaciones en el genoma de la planta de cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el agente de direccionamiento de ADN es diseñado para apuntar a ácidos nucleicos que son comunes a más de una secuencia de ácido nucleico genómico que codifica un componente en la ruta de biosíntesis de etileno.

De conformidad con algunas realizaciones de la invención, el agente de direccionamiento de ADN comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 99% idéntica a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 47-54.

Según algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 99% idéntica a una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 47.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN comprende un ácido nucleico expuesto en la SEQ ID NO: 47.

Conforme a algunas realizaciones de la invención, el constructo de ácido nucleico comprende dos o más agentes de edición de ADN que se seleccionan de la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 47-54.

De conformidad con algunas realizaciones de la invención, el constructo de ácido nucleico comprende dos o más agentes de edición de ADN seleccionados de las secuencias de ácido nucleico establecidas en la SEQ ID NO: 47, 49 or 50.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el constructo de ácido nucleico comprende al menos dos agentes de edición de ADN que comprenden secuencias de ácido nucleico expuestas en SEQ ID NO: 51 and 53.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método para aumentar la vida útil del banano, el método comprendiendo:

(a) transformar una o más células de una planta de banano con el constructo de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 14-22;

(b) generar la mutación de pérdida de función en la secuencia de ácido nucleico genómico que codifica el componente de proteína de la ruta de biosíntesis de etileno, en donde la mutación resulta en el nivel reducido o actividad reducida de la proteína; y

(c) regenerar una planta a partir de la célula vegetal.

Conforme algunas realizaciones de la invención, el agente de edición de ADN es CRISPR-Cas y el agente de direccionamiento de ADN es un sgRNA.

De acuerdo a algunas realizaciones de la invención, la secuencia de ácido nucleico genómico que codifica un componente de proteína en una ruta de biosíntesis de etileno del banano es seleccionado del grupo que consiste en Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9), Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8), Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20) y Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

De conformidad con algunas realizaciones de la invención, el agente de direccionamiento de ADN de sgRNA es seleccionado del grupo que consiste en sg-183 (SEQ ID NO: 47), sg-184 (SEQ ID NO: 48), sg-188 (SEQ ID NO: 49), sg-189 (SEQ ID NO: 50), sg-190 (SEQ ID NO: 51), sg-191 (SEQ ID NO: 52), sg-194 (SEQ ID NO: 53), y sg-195 (SEQ ID NO: 54).

Según algunas realizaciones de la invención, la mutación de pérdida de función es como se describe en la presente.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se provee una planta de banano mutante que comprende bananos mutantes en donde la planta mutante comprende una mutación en un gen que codifica una proteína 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACS) en donde la actividad de la proteína ACS en la planta de banano mutante es reducida en comparación con la actividad de la proteína de una planta de plátano que carece la mutación y en donde la fruta de banano mutante madura más lentamente que los bananos de una planta de banano que carece de la mutación.

Conforme a un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una planta de banano mutante que comprende bananos mutantes en donde la planta mutante comprende una mutación en el gen Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13) en donde el gen Ma09_g19150 codifica la proteína 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACS) en donde la actividad de la proteína ACS en la planta de banano mutante es reducida en comparación con la actividad de la proteína de una planta de banano que carece de la mutación y en donde la fruta de banano mutante madura más lentamente que los bananos de una planta de banano que carece de la mutación.

De conformidad con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una planta de banano mutante que comprende bananos mutantes en donde la planta mutante comprende una mutación en el gen Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9) en donde el gen

Ma04_g35640 codifica la proteína 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACS) en donde la actividad de la proteína ACS en la planta de banano mutante es reducida en comparación con la actividad de la proteína de una planta de banano que carece de la mutación y en donde la fruta de banano mutante madura más lentamente que los bananos de una planta de banano que carece de la mutación.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una planta de banano mutante que comprende bananos mutantes en donde la planta mutante comprende una mutación en el gen Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8) en donde el gen Ma04_g31490 codifica la proteína 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACS) en donde la actividad de la proteína ACS en la planta de banano mutante es reducida en comparación con la actividad de la proteína de una planta de banano que carece la mutación y en donde la fruta de banano mutante madura más lentamente que los bananos de una planta de banano que carece la mutación.

Conforme un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una planta de banano mutante que comprende bananos mutantes en donde la planta mutante comprende una mutación en el gen que codifica una proteína ACC oxidasa (ACO) en donde la actividad de la proteína ACO en la planta de banano mutante es reducida en comparación con la actividad de la proteína de una planta de banano que carece la mutación y en donde la fruta de banano mutante madura más lentamente que los bananos de una planta de banano que carece la mutación.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una planta de banano mutante que comprende bananos mutantes en donde la planta mutante comprende una mutación en el gen Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20) en donde el gen Ma01_g11540 codifica la proteína ACC oxidasa (ACO) en donde la actividad de la proteína ACO en la planta de banano mutante es reducida en comparación con la actividad de la proteína de una planta de banano que carece la mutación y en donde la fruta de banano mutante madura más lentamente que los bananos de una planta de banano que carece de la mutación.

De conformidad con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una planta de banano mutante que comprende bananos mutantes en donde la planta mutante comprende una mutación en el gen Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27) en donde el gen Ma07_g19730 codifica la proteína ACC oxidasa (ACO) en donde la actividad de la proteína ACO en la planta de banano mutante es reducida en comparación con la actividad de la proteína de una planta de banano que carece de la mutación en donde los bananos mutantes maduran más lentamente que los bananos de una planta de banano que carece de la mutación.

Según un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para producir banano, el método comprendiendo:

- (a) cultivar la planta como se describe en el presente documento; y
- (b) cosechar fruta de la planta.

De acuerdo a algunas realizaciones de la invención, la planta, o parte de la misma, es una parte de planta.

Según algunas realizaciones de la invención, la parte de planta es una fruta.

De conformidad con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un producto de banano procesado comprendiendo la parte de planta.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos utilizados en el presente tienen el mismo significado como es comúnmente entendido por alguien de habilidad ordinaria en la técnica la cual pertenece la invención. Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente pueden ser utilizados en la práctica o en el ensayo de realizaciones de la invención, métodos ejemplares y/o materiales se describen a continuación. En caso de conflicto, la especificación de la patente, incluyendo las definiciones, prevalecerán. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS DIVERSAS VISTAS DE LOS DIBUJO(S)

Algunas realizaciones de la invención se describen en la presente, solo a manera de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se enfatiza que los detalles mostrados son a manera de ejemplo y para propósitos de discusión ilustrativa de realizaciones de la invención. En este contexto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente a aquellos expertos en la técnica cómo realizaciones de la invención pueden ser practicadas.

En los dibujos:

Fig. 1 es un esquema de la ruta de biosíntesis de etileno tomado de Bleecker y Kende. 2000. Annu. Rev. Cell. Dev 16: 1-18.

Fig. 2 es un diagrama de flujo de una realización del método de selección de células que comprende un evento de edición del genoma;

Fig. 3 muestra la transfección positiva de protoplastos de banano con plásmidos mCherry. 1×10^6 protoplastos de banano fueron transfectados utilizando PEG con el plásmido

pAC2010 portando mCherry (marcador fluorescente). 3 días posteriores a la transfección, la eficiencia de la transfección fue analizada bajo un microscopio fluorescente. La figura muestra protoplastos de banano, campo claro del panel superior, fluorescencia del panel inferior.

Fig. 4A muestra el enriquecimiento FACS de banano mCherry positivo. 1×10^6 protoplastos de banano fueron transfectados utilizando PEG con el plásmido pAC2010 portador del marcador fluorescente mCherry. Tres días posteriores a la transfección los protoplastos fueron analizados mediante FACS, todas las células mCherry positivas fueron clasificadas y recopiladas.

Fig. 4B muestra el enriquecimiento FACS de protoplastos de banano mCherry positivos. El enriquecimiento de los protoplastos de banano mCherry fue confirmado por microscopía fluorescente. Se tomaron imágenes de los protoplastos transfectados sin clasificar (paneles superiores) y clasificados (paneles inferiores) con un microscopio fluorescente a los 3 días posteriores a la transfección.

Figs. 5A-C muestran la disminución de los protoplastos de banano mCherry positivos con el tiempo indicando eventos de transformación transitorios. Se tomaron imágenes de protoplastos de banano transfectados con un plásmido portador del marcador fluorescente mCherry a los 3 (Figura 5A) y 10 (Figura 5B) días posteriores a la transfección. Figura 5C. Una reducción progresiva en el número de protoplastos mCherry positivos hasta 25 días después de la transfección fue observada, como fue medida por FACS. El 100% representa la proporción de células que expresan cherry a los 3 días posteriores a la transfección.

Fig. 6A muestra la disminución de protoplastos de banano mCherry-positivos con el tiempo indicando eventos transitorios de transformación en protoplastos no clasificados y visualizado ante FACS. Los protoplastos de *Musa acuminata* fueron transfectados con un plásmido portador del marcador fluorescente mCherry (pAC 2010) o sin ADN. Los protoplastos no clasificados fueron visualizados a los 3, 6 y 10 días posteriores a la transfección como es indicado. Las imágenes de microscopía muestran la reducción progresiva en número e intensidad de protoplastos mCherry positivos a lo largo del tiempo. BF (campo claro).

Fig. 6B muestra la disminución de protoplastos mCherry positivos con el tiempo indicando eventos transitorios de transformación en protoplastos clasificados y visualizados después de **FACS**. Los protoplastos de *Musa acuminata* transfectados con un plásmido portando el marcador fluorescente mCherry (2010) fueron clasificados y visualizados a los 3, 6 y 10 días después de la transfección como fue indicado. Las imágenes de microscopía muestran la reducción progresiva en número e intensidad de protoplastos mCherry positivos a lo largo del tiempo. BF (campo claro).

Figs. 7A-B es una ilustración esquemática de la biosíntesis y regulación de etileno durante la transición del sistema 1 al sistema 2 en *S. lycopersicum* y *M. acuminata*. Esquema simplificado de la ruta bioquímica de dos pasos de etileno de S-adenosil-L-metionina (S-Ado-Met) a 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) a etileno y los genes involucrados en la transición del sistema 1 a sistema 2 durante la maduración del tomate (Figura 7A) y de la fruta de banano (Figura 7B). La transición del sistema 1 al sistema 2 depende de la regulación de la expresión génica de varios miembros de las familias de genes ACC sintasa (ACS) y ACC oxidasa (ACO). Las cajas moradas indican los genes de tomate que fueron seleccionados para análisis posterior. El esquema de tomate fue adaptado de Alexander y Grierson, 2002. Diario de Botánica Experimental, Vol. 53, No. 377, pág. 2039-2055; Cara y Giovannoni, 2008. Ciencia de las Plantas Vol. 175, pág. 106-113; y Pech et al., 2012. Reseña Anual de Plantas, Vol. 44, pág. 275-304. El esquema del banano estaba basado en los hallazgos del tomate y Liu et al., 1999. Fisiología de Plantas, Vol 121, pág. 1257-1265 y Rudus et al., 2013. Acta Physiol Plant. Vol 35, pág. 295-307.

Fig. 8 es una ilustración esquemática de las relaciones evolutivas de los genes ACC sintasa (ACS). La historia evolutiva fue inferida utilizando el método de Unión de Vecinos. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados agrupados en la prueba de bootstrap (1000 réplicas) son mostradas como ramas de colores (rojo < 20%; azul 50%; verde > 90%). Las cajas de líneas discontinuas de color morado indican los genes de tomate que han sido demostrado estar involucrados durante la maduración de la fruta de tomate y que fueron utilizadas como secuencias de consulta para recobrar genes estrechamente relacionados en el genoma de *M. acuminata*. Las ID genéticas en anaranjado indican genes candidatos de *M. acuminata* que son probablemente los homólogos más cercanos a los genes de tomate caracterizados involucrados en la maduración de la fruta.

Fig. 9 es una ilustración esquemática de las relaciones evolutivas de los genes ACC oxidasa (ACO). La historia evolutiva fue inferida utilizando el método de Unión de Vecinos. El porcentaje de árboles replicados en los cuales los taxones asociados agrupados en la prueba de bootstrap (1000 réplicas) son mostrados como ramas de colores (rojo < 20%; azul 50%; verde > 90%). Las ID de genes en morado o rojo indican los genes de Arabidopsis o tomate, respectivamente, que han sido caracterizados durante la maduración de la fruta y que fueron utilizados como secuencias de consulta para recobrar genes estrechamente relacionados en el genoma de *M. acuminata*. Las ID de genes en naranja indican genes candidatos *M. acuminata* que son probablemente los homólogos más cercanos

(de tomate y *Arabidopsis*) a los genes de tomate caracterizados involucrados en la maduración de la fruta.

Fig. 10 muestra un ejemplo de selección de sgRNAs. Después de usar algoritmos disponibles públicamente para encontrar y diseñar sgRNAs en la secuencia de interés, un paso de curación manual asegura la selección de sgRNAs que se superponen con regiones que han sido mostradas empíricamente o pronosticadas de ser importantes para la función de proteína (cuadros rojos). Los cuadros azules resaltan las posiciones donde los sgRNA fueron diseñados. Conforme con realizaciones de la invención, los sgRNA son seleccionados superponiendo los cuadros azul y rojo.

Fig. 11 es un gráfico que muestra la expresión génica de genes candidatos de ACS seleccionados en las frutas de *M. acuminata*. Las condiciones experimentales están descritas en D'Hont et al. 2012 *Naturaleza*. 9 de Agosto 2012; 488(7410):213-7. Las frutas fueron cosechadas después de la floración (40, 60 y 90 días) y mantenidas a 20°C durante 5 días sin tratar (-) o tratadas (+) con acetileno para verificar por cambios del transcriptoma las frutas de banano en maduración. Los datos de RNAseq indicaron que el tratamiento con acetileno indujo cambios en la expresión génica del gen candidato de ACS del banano *Ma04_g35640*.

Fig. 12 es un gráfico que muestra la expresión génica de seleccionados genes candidatos ACO en frutas *M. acuminata*. Las condiciones experimentales están descritas en D'Hont et al. 2012, supra. Las frutas fueron cosechadas después de la floración (40, 60 y 90 días) y fueron mantenidos a 20°C durante 5 días no tratados (-) o tratados (+) con acetileno para revisar por cambios del transcriptoma en las frutas de banano en maduración. Los datos de RNAseq indicaron que el tratamiento con acetileno indujo cambios en la expresión génica del gen candidato de ACO del banano *Ma07_g19730*.

Figs. 13A-D muestran el análisis de secuenciación y ensayo de T7 revelando la presencia de mutaciones en el gen candidato *Ma09_19150*. (Figura 13 A) Caricatura representando el locus *Ma09_19150* que indica las posiciones relativas donde los sgRNAs fueron diseñados y seleccionados en base a regiones conservadas con otros genes ACS. (Figura 13 B) El locus *Ma09_19150* fue amplificado con imprimadores específicos fuera de la región sgRNAs y clonado en pBLUNT (Invitrogen) para el análisis de secuenciación y el ensayo T7E1. (Figura 13 C) Detección de mutaciones medida por el ensayo T7E1. "Ctr" indica plásmido de control sin sgRNAs y WT indica muestra no transfectada (sin ADN). 07 y 08 son la combinación del sgRNA utilizado. (Figura 13 D) Las secuencias de ADN mutante inducidas por la expresión de la maquinaria de edición del genoma guiada por sgRNA específicos son alineados con la secuencia de tipo salvaje

(WT). El PAM es mostrado resaltado en gris y los sgRNA en letras rojas. Pequeñas eliminaciones fueron encontradas en varios clones analizados.

Figs. 14A-C muestran los resultados del ensayo T7 que revelan la presencia de mutaciones en el gen candidato *Ma04_35640*. (Figura 14 A) Caricatura representando el locus *Ma04_35640*, que indica las posiciones relativas donde los sgRNAs fueron diseñados y seleccionados en base a regiones conservadas con otros genes ACS. (Figura 14 B) El locus *Ma04_35640* fue amplificado con imprimadores específicos fuera de la región de sgRNAs para el ensayo T7E1. (Figura 14 C) Detección de mutaciones medidas por el ensayo T7E1. “Ctr” indica plásmido de control sin sgRNAs y WT indica muestra no transfectada (sin ADN). 07 y 08 son la combinación del sgRNA utilizado.

Figs. 15A-D muestran análisis de secuenciación y ensayo T7 que revela la presencia de mutaciones en el gen candidato *Ma04_31490*. (Figura 15 A) Caricatura representando el locus *Ma04_31490* que indica las posiciones relativas donde los sgRNAs fueron diseñados y seleccionados en base a regiones conservadas con otros genes ACS. (Figura 15 B) El locus *Ma04_31490* fue amplificado con imprimadores específicos fuera de la región sgRNAs y clonados en pBLUNT (Invitrogen) para el análisis de secuenciación y el ensayo T7E1. (Figura 15 C) Detección de mutaciones medida por el ensayo T7E1. “Ctr” indica plásmido de control sin sgRNAs y WT indica muestra no transfectada (sin ADN). 07 y 08 son la combinación del sgRNA utilizado. (Figura 15 D) Las secuencias de ADN mutante inducidas por la expresión de la maquinaria de edición del genoma guiada por sgRNA específicos son alineadas con la secuencia de tipo salvaje (WT). El PAM es mostrado resaltado en gris y los sgRNA en letras rojas. WT y pequeñas eliminaciones fueron encontradas en varios clones analizados.

Figs. 16A-C muestran los resultados del ensayo T7 que revelan la presencia de mutaciones en el gen candidato *Ma07_19730*. (Figura 16 A) Caricatura representando el locus *Ma07_19730* indicando las posiciones relativas donde los sgRNAs fueron diseñados y seleccionados en base a regiones conservadas con otros genes ACO. (Figura 16 B) El locus *Ma07_19730* fue amplificado con imprimadores específicos fuera de la región de sgRNAs para el ensayo T7E1. (Figura 16 C) Detección de mutaciones medida por el ensayo T7E1. “Ctr” indica plásmido de control sin sgRNAs y WT indica muestra no transfectada (sin ADN). 11 y 12 son la combinación de los sgRNAs utilizados.

Figs. 17A-C muestran los resultados del ensayo T7 revelando que el ensayo T7 reveló la presencia de mutaciones en el gen candidato *Ma01_11540*. (Figura 17 A) Caricatura representando el locus *Ma01_11540* que indica las posiciones relativas donde los sgRNAs fueron diseñados y seleccionados en base a regiones conservadas con otros genes ACO. (Figura 17 B)

El locus *Ma01_11540* fue amplificado con imprimadores específicos fuera de la región de sgRNAs para el ensayo T7E1. (Figura 17 C) Detección de mutaciones medidas por el ensayo T7E1. “Ctr” indica plásmido de control sin sgRNAs y WT indica muestra no transfectada (sin ADN). 11 y 12 son la combinación del sgRNA utilizado y 231 es gDNA de tipo salvaje.

Fig. 18 muestra el análisis de secuenciación de mutaciones en el gen *Ma01_11540*. Las secuencias de ADN mutante inducidas por la expresión de la maquinaria de edición del genoma guiada por sgRNA específicos son alineadas con la secuencia de tipo salvaje (WT). El PAM es mostrado resaltado en gris y los sgRNA en letras rojas. WT e indels fueron encontrados en varios clones analizados.

Fig. 19 muestra el análisis de secuenciación de mutaciones en el gen candidato *Ma01_11540*. Las secuencias de ADN mutante inducidas por la expresión de la maquinaria de edición del genoma guiada por sgRNA específicos son alineados con la secuencia de tipo salvaje (WT). El PAM es mostrado resaltado en gris, los sgRNA en letras rojas y las inserciones en letras verdes. WT y pequeños indels fueron encontrados en varios clones analizados.

Figs. 20A-B muestran análisis de secuenciación de mutaciones en el gen candidato *Ma01_11540* con varios sgRNAs. Las secuencias de ADN mutante inducidas por la expresión de la maquinaria de edición del genoma guiada por sgRNA específicos son alineadas con la secuencia de tipo salvaje (WT). El PAM es mostrado resaltado en gris y los sgRNA en letras rojas. Secuencia WT, pequeñas y grandes eliminaciones fueron encontradas en varios clones analizados.

Fig. 21 muestra un resumen de la evidencia de eventos de edición del genoma en genes ACS específicos. Los eventos de edición del genoma fueron evaluados mediante (i) PCR, clonación y secuenciación; y (ii) ensayo de T7EI. Y = indels detectados; N = no se detectaron indels; X = datos inconcluyentes.

Fig. 22 muestra un resumen de la evidencia de eventos de edición del genoma en genes ACO específicos. Los eventos de edición del genoma fueron evaluados mediante (i) PCR, clonación y secuenciación; y (ii) ensayo de T7EI. Y = indels detectados; N = no se detectaron indels; X = datos inconcluyentes.

Figs. 23 A-E muestran regeneración de protoplastos de banano transfectados. Figura 23A. Protoplastos recién aislados, los cuales fueron sometidos a transfección con los plásmidos pAC007, pAC2008, pAC2010, pA C2011 o pAC2012. Figura 23B. Las primeras divisiones celulares ocurren 48h después del aislamiento y transfección de protoplastos. Figura 23C. Microcalli de células

embriogénicas se desarrollan después de 1-2 meses. Figura 23 D. Desarrollo pro-embiones a partir de células embriogénicas; Figura 23 E. Embiones globulares.

Figs. 24A muestra la regeneración de protoplastos de banano transfectados. Figura 24 A. Embiones maduros derivados de protoplastos de banano transfectados en medio de germinación (GM) conteniendo sales y vitaminas MS.

Figs. 24B-C Los embiones comienzan a germinar 1-2 semanas después de la transferencia;

Fig. 24D Embiones en germinación 3-4 semanas después de la transferencia a GM (medio de germinación), listos para ser transferidos al medio de proliferación para el alargamiento del brote.

Figs. 25A-E muestran la regeneración de suspensiones de células embriogénicas de banano bombardeadas (ECS) para extender la vida útil. Figura 25A. ECS de 3 días después del bombardeo en medio de proliferación; Figura 25B. Proliferación de ECS bombardeados una semana después del bombardeo; Figura 25C. Los embiones se desarrollan a partir de ECS bombardeados, un mes después del bombardeo en el medio de desarrollo embrionario (EDM); Figura 25D. Embiones en medio de maduración; Figura 25E. Embiones globulares.

Fig. 26 muestra secuencias de ACO y ACS, así como de sgRNAs, sitios de enlace de sgRNA e imprimadores usados de acuerdo con algunas realizaciones de la invención. El resaltado rojo denota las posiciones de los sgRNA a lo largo de las secuencias focalizadas; el código de color es provisto en la figura.

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES ESPECÍFICAS DE LA INVENCION

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a composiciones y métodos para aumentar la vida útil del banano.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles establecidos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ser practicada o llevada a cabo de varias maneras.

El etileno, el hidrocarburo insaturado más simple (dos carbonos con un doble enlace) es una hormona vegetal gaseosa la cual regula esencialmente todos los procesos fisiológicos durante el ciclo de vida de la planta. Es responsable de señalar los cambios en: latencia y germinación de las semillas, crecimiento y nodulación de las raíces, formación de brotes y hojas, desarrollo de flores y frutos, senescencia y abscisión de diferentes órganos, mecanismos de defensa de plantas y una serie de interacciones con otras hormonas vegetales. Aunque el etileno es indudablemente esencial para el

crecimiento, desarrollo y supervivencia apropiados de la planta, también puede ser perjudicial para las plantas en algunas instancias. Niveles incrementados de etileno en plantas expuestas a varios tipos de estrés, como enfriamiento, calor, privación de nutrientes, anaerobiosis, heridas e infección por patógenos con un mayor daño al crecimiento y la salud de las plantas han sido reportados. Existe, por lo tanto, un considerable interés comercial en modificar genéticamente la cantidad de etileno producido en condiciones de maduración, senescencia o estrés y, por lo tanto, creando plantas con un rasgo más robusto y/o deseable.

El método más establecido de ingeniería genética de plantas usando la tecnología de edición del genoma CRISPR-Cas requiere la inserción de nuevo ADN en el genoma del huésped. Este inserto, un ADN de transferencia (T-DNA), porta varias unidades transcripcionales para lograr ediciones exitosas del genoma mediadas por CRISPR-Cas. Estos comúnmente consisten en un gen de resistencia a antibióticos para seleccionar plantas transgénicas, la maquinaria Cas, y varias unidades de sgRNA. Debido a la integración de ADN extraño en el genoma, las plantas generadas de esta manera son clasificadas como transgénicas o genéticamente modificadas (GM). Una vez que una edición del genoma ha sido establecida en el huésped, el T-DNA puede ser removido mediante propagación sexual y mejoramiento, ya que la maquinaria CRISPR Cas9 ya no es necesaria para mantener el fenotipo. Sin embargo, para cultivos partenocárpicos, como ser el banano, que no producen semillas viables, la eliminación del T-DNA por reproducción sexual es imposible.

Las realizaciones de la invención se refieren a la identificación de objetivos para la edición del genoma en la ruta de biosíntesis de etileno del banano.

Por lo tanto, para reducir los niveles de etileno en las plantas de banano, lo que puede resultar en una vida útil prolongada de las frutas de banano, la eliminación de genes involucrados en la biosíntesis de etileno, incluyendo ACS y ACO (Figura 7A, 7B). Sin embargo, el genoma del banano contiene múltiples secuencias que son homólogas a estos genes.

Para identificar genes objetivo superiores dentro del genoma del banano, los cuales codifican ACS y ACO funcionales, secuencias homólogas de rutas caracterizadas en especies modelo o de cultivo fueron identificadas. El proceso involucró una serie de pasos secuenciales para análisis comparativo de secuencias de ADN y proteínas que apuntan a reconstruir la historia evolutiva de genes a través de análisis filogenético, filtración de candidatos mediante la validación de su expresión en el tejido general y de objetivo, y la secuenciación de genes candidatos para asegurar el diseño apropiado de sgRNA (para evitar desajustes). Este procedimiento permitió la selección de genes, la

identificación de regiones objetivo optimizadas para la eliminación (dominios conservados y potencialmente catalíticos) y el diseño de sgRNA apropiados.

Después de la transfección de protoplastos de banano con sgRNAs dirigidos a una pluralidad de genes en la ruta de biosíntesis de etileno, los presentes inventores fueron capaces de identificar edición genoma robusta en genes clave, por ejemplo, Ma07_g19730 y Ma04_g35640 así como en otros genes de las familias para evitar la compensación por redundancia. Tales protoplastos también fueron sometidos a protocolos de regeneración para obtener una planta de banano que tenga una larga vida útil (ver Figuras 8-2 5A-E).

Por lo anterior, según un aspecto, se proporciona un método para aumentar la vida útil del banano, el método comprendiendo:

(a) someter una célula de planta de banano a un agente de edición de ADN dirigido a una secuencia de ácido nucleico que codifica un componente en una ruta de biosíntesis de etileno del banano para resultar en una mutación de pérdida de función en dicha secuencia de ácido nucleico que codifica dicha ruta de biosíntesis de etileno y

(b) regenerar una planta a partir de dicha célula vegetal.

Como se usa aquí, el término “banano” se refiere a una planta del género *Musa*, incluyendo los plátanos.

Según una realización específica, el banano es triploide.

También se contemplan otras ploidias, incluyendo diploide y tetraploide.

Como se usa aquí “planta” se refiere a planta(s) completa(s), una planta injertada, ancestros y progenie de las plantas y partes de planta, incluyendo semillas, frutos, brotes, tallos, raíces (incluyendo tubérculos), portainjertos, vástagos y células, tejidos, y órganos vegetales.

Según una realización específica, la parte de planta es una fruta.

Conforme una realización específica, la parte de planta es una semilla.

“Semilla” se refiere a la unidad de reproducción de una planta de floración, capaz de desarrollar en otra planta tal.

De acuerdo con una realización específica, la célula es una célula germinal.

Según una realización específica, la célula es una célula somática.

La planta puede estar en cualquier forma, incluyendo cultivos en suspensión, protoplastos, embriones, regiones meristemáticas, tejido de callo, hojas, gametofitos, esporofitos, polen y microsporas.

De conformidad con una realización específica, la parte de planta comprende ADN.

Lo que sigue es una lista no limitante de variedades cultivadas que se pueden ser utilizadas de acuerdo con las enseñanzas presentes.

Grupo AA

Diploide *Musa acuminata*, tanto plantas de banano silvestre como variedades cultivadas

- 5 Banano Chingan
- Banano Lacatán
- Banano Lady Finger (Dedo de Dama) (Banano de azúcar)
- Pisang jari buaya (Banano Crocodile fingers (Dedos de Cocodrilo))
- Banano Señorita (Monkoy, Banano Arnibal, Cuarenta dias, Cariñosa, Pisang Empat Puluh Hari,
- 10 Pisang Lampung)^[12]
- Banano Sinwobogi

Grupo AAA

Triploide *Musa acuminata*, tanto plantas de banano silvestre como variedades cultivadas

Subgrupo Cavendish

- 15 ‘Dwarf Cavendish’ ‘Cavendish Enano’
- ‘Giant Cavendish’ (‘Williams’) ‘Cavendish Gigante’
- ‘Grand Nain’ (‘Chiquita’)
- ‘Masak Hijau’
- ‘Robusta’
- 20 ‘Red Dacca’
- Banano Dwarf Red (Banano Rojo Enano)
- Banano Gros Michel
- Banano East African Highland (Banano de las Tierras Altas de África Oriental) (Subgrupo AAA-EA)

25 Grupo AAAA

Tetraploide *Musa acuminata*, tanto bananos silvestres como variedades cultivadas

- Banano Bodles Altafort
- Golden Beauty banana (Banano Belleza Dorada)

Grupo AAAB

- 30 Variedades cultivadas tetraploides de *Musa* × *paradisiaca*
- Banano Atan
- Banano Goldfinger

Grupo AAB

Variedades cultivadas triploides de *Musa* × *paradisiaca*. Este grupo contiene el subgrupo de plátano, compuesto de plátanos “verdaderos” o Plátanos Africanos - cuyo centro de diversidad es África central y occidental, donde una gran cantidad de variedades cultivadas fueron domesticadas siguiendo la introducción de plátanos ancestrales de Asia, posiblemente hace 2000–3000 años.

Los subgrupos Iholena y Maoli-Popo'ulu se conocen como Plátanos del Pacífico.

Subgrupo Iholena: *subgrupo de bananos para cocinar domesticados en la región del Pacífico*

Subgrupo Maoli-Popo'ulu: *subgrupo de bananos para cocinar domesticados en la región del Pacífico*

10 Banano Maqueño

Banano Popoulu

Subgrupo Mysore - *bananos para cocinar y para postre*^[15]

Banano Mysore

Subgrupo Pisang Raja

15 Banano Pisang Raja

Subgrupo de Plátano

Plátano Francés

Banano Green French (Banano Verde Francés)

Plátano Horn y Banano Rhino Horn (Plátano Cuerno y Banano Cuerno de Rinoceronte)

20 Banano Nendran

Banano Pink French (Banano Rosado Francés)

Banano Tiger (Banano Tigre)

Subgrupo Pome

Banano Pome

25 Banano Prata-anã (Banano Dwarf Brazilian, Dwarf Prata) (Banano Brasileño Enano)

Subgrupo de Seda

Banano Latundan (Banano Silk, Banano Apple) (Banano de Seda, Banano Manzano)

Otros

Banano Pisang Seribu

30 Banano plu

Grupo AABB

Variedades cultivadas tetraploides de *Musa* × *paradisiaca*

Banano Kalamagol

Pisang Awak (Banano Ducasse)

Grupo AB

Variedades cultivadas diploides de *Musa* × *paradisiaca*

5 Banano Ney Poovan

Grupo ABB

Variedades cultivadas triploides de *Musa* × *paradisiaca*

Banano Blue Java (Banano Ice Cream, Ney mannan, Plátano Ash, Pata hina, Dukuru, Vata)
(Banano Helado)

10 Subgrupo Bluggoe

Banano Bluggoe (también conocido como orinoco y “burro”)

Banano Silver Bluggoe

Banano Pelipita (Pelipia, Pilipia)

Subgrupo Saba

15 Banano Saba (Cardaba, Dippig)

Banano Cardaba

Banano Benedetta

Grupo ABBB

Variedades cultivadas tetraploides de *Musa* × *paradisiaca*

20 Banano Tiparot

Grupo BB

Diploide *Musa balbisiana*, bananos silvestres

Grupo BBB

Triploide *Musa balbisiana*, bananos silvestres y variedades cultivadas

25 Kluai Lep Chang Kut

Según una realización específica, la planta es una célula vegetal, por ejemplo, una célula vegetal en una suspensión de células embrionarias.

Conforme una realización específica, la célula vegetal es un protoplasto.

Los protoplastos son derivados de cualquier tejido vegetal, por ejemplo, raíces, hojas,
30 suspensión de células embrionarias, callos o tejido de plántulas.

Como se usa aquí, “componente en la ruta de biosíntesis de etileno” se refiere a un polipéptido que es esencial para la biosíntesis de etileno en banano, por ejemplo, una enzima. Específicamente, la

biosíntesis de etileno comienza a partir de *S*-adenosilmetionina (SAM) e incluye dos pasos clave (Figura 1) tal como fue revisado por Pech et al. (2010, Biosíntesis de Etileno. En: Hormonas de plantas: biosíntesis, transducción, acción, 3^{ra} edición. Springer, Dordrecht, pp 115–136).

La ruta de biosíntesis de etileno comprende la conversión de metionina en *S*-adenosilmetionina (AdoMet, SAM) con la ayuda de AdoMet sintasa. 1 sintasa-aminociclopropano-1-carboxilato de etilo (ACS) [EC 4.4.1.14] cataliza la ciclación de SAM a 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC), el cual a menudo es considerado la reacción limitante de la velocidad en la vía. ACS también produce 5'-metiltioadenosina (MTA) la cual es reciclada para regenerar metionina. El paso final, la conversión dependiente de oxígeno de ACC a etileno, es catalizada por ACC oxidasa (ACO) [EC 1.14.17.4]. ACC es convertido en etileno mediante una modificación de los carbonos C-2 y C-3 de ACC, mientras que C-1 es convertido en cianuro y el grupo carboxilo es convertido en dióxido de carbono.

De acuerdo con una realización específica, AdoMet sintasa es AdoMet de banano.

Todos los números de acceso corresponden al genoma disponible públicamente *M. acuminata* doble-haploide de la acceso de recolección de germoplasma llamada Pahang (2n=22) versión de ensamblaje 2.

Todos los números de acceso corresponden al genoma disponible públicamente *M. acuminata* doble-haploide de la acceso de recolección de germoplasma llamada Pahang (2n=22) versión de ensamblaje 2.

Según una realización específica, el ACS es:

>Ma01_g07800.1 (SEQ ID NO: 1
 >Ma01_g12130.1 (SEQ ID NO: 2);
 >Ma02_g10500.1 (SEQ ID NO: 3);
 >Ma03_g12030.1 (SEQ ID NO: 4);
 >Ma03_g27050.1 (SEQ ID NO: 5);
 >Ma04_g01260.1 (SEQ ID NO: 6);
 >Ma04_g24230.1 (SEQ ID NO: 7);
 >Ma04_g31490.1 (SEQ ID NO: 8);
 >Ma04_g35640.1 (SEQ ID NO: 9);
 >Ma04_g37400.1 (SEQ ID NO: 10);
 >Ma05_g08580.1 (SEQ ID NO: 11);
 >Ma05_g13700.1 (SEQ ID NO: 12);

>Ma09_g19150.1 (SEQ ID NO: 13); o

>Ma10_g27510.1 (SEQ ID NO: 14);

Conforme una realización específica, el ACO es

>Ma09_g04370.1 (SEQ ID NO: 15);

5 >Ma06_g17160.1 (SEQ ID NO: 16);

>Ma11_g05490.1 (SEQ ID NO: 17);

>Ma00_g04490.1 (SEQ ID NO: 18);

>Ma07_g15430.1 (SEQ ID NO: 19);

>Ma01_g11540.1 (SEQ ID NO: 20);

10 >Ma10_g16100.1 (SEQ ID NO: 21);

>Ma05_g08170.1 (SEQ ID NO: 22);

>Ma06_g14430.1 (SEQ ID NO: 23);

>Ma05_g09360.1 (SEQ ID NO: 24);

>Ma11_g22170.1 (SEQ ID NO: 25);

15 >Ma05_g31690.1 (SEQ ID NO: 26);

>Ma07_g19730.1 (SEQ ID NO: 27);

>Ma06_g02600.1 (SEQ ID NO: 28);

>Ma10_g05270.1 (SEQ ID NO: 29);

>Ma06_g14370.1 (SEQ ID NO: 30);

20 >Ma11_g05480.1 (SEQ ID NO: 31);

>Ma06_g14410.1 (SEQ ID NO: 32);

>Ma06_g14420.1 (SEQ ID NO: 33);

>Ma06_g34590.1 (SEQ ID NO: 34);

>Ma02_g21040.1 (SEQ ID NO: 35);

25 >Ma11_g04210.1 (SEQ ID NO: 36);

>Ma05_g12600.1 (SEQ ID NO: 37);

>Ma04_g23390.2 (SEQ ID NO: 38);

>Ma03_g06970.1 (SEQ ID NO: 39);

>Ma05_g09980.1 (SEQ ID NO: 40);

30 >Ma04_g36640.1 (SEQ ID NO: 41);

>Ma11_g04180.1 (SEQ ID NO: 42);

>Ma11_g02650.1 (SEQ ID NO: 43); o

>Ma00_g04770.1 (SEQ ID NO: 44);

De acuerdo con una realización específica, el ACO es Ma01_g11540.1 (SEQ ID NO: 20) y/o Ma07_g19730.1 (SEQ ID NO: 27):

Según una realización específica, el ACS es Ma09_g19150.1 (SEQ ID NO: 13),
 5 Ma04_g35640.1 (SEQ ID NO: 9) y/o Ma04_g31490.1 (SEQ ID NO: 8):

También están contemplados homólogos funcionales naturales de cada uno de los genes anteriores, por ejemplo, exhibiendo al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con los genes arriba mencionados y que tienen una actividad ACS o ACO, como se definió anteriormente.

10 Como se usa en el presente documento, "identidad de secuencia" o "identidad" o equivalentes gramaticales como son usados aquí en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido incluye referencia a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando están alineados. Cuando el porcentaje de identidad de secuencia es utilizado en referencia a las proteínas se reconoce que las posiciones de los residuos que no son idénticas a menudo difieren por sustituciones conservadoras de
 15 aminoácidos, donde los residuos de aminoácidos son sustituidos por otros residuos de aminoácidos con propiedades químicas similares (*p. ej.*, carga o hidrofobicidad) y por lo tanto no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Las secuencias que difieren según tales sustituciones
 20 conservadoras son consideradas de tener "similitud de secuencia" o "similitud". Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por aquellos expertos en la materia. Típicamente, esto involucra calificar una sustitución conservadora como un desajuste parcial en lugar de uno completo, de esta forma aumentando la identidad de secuencia porcentual. Así, por ejemplo, en donde un aminoácido idéntico recibe una calificación de 1 y una sustitución no conservadora recibe una calificación de cero,
 25 una sustitución conservadora recibe una calificación entre cero y 1. La calificación de las sustituciones conservadoras es calculada, *p. ej.*, según el algoritmo de Henikoff S y Henikoff JG. [Matrices de sustitución de aminoácidos a partir de bloques de proteínas. Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 1992, 89 (22): 10915-9].

La identidad puede ser determinada utilizando cualquier software de comparación de
 30 homología, incluyendo, por ejemplo, el software BlastN del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), como ser al utilizar los parámetros predeterminados.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la identidad es una identidad global, es decir, una identidad sobre todas las secuencias de ácido nucleico de la invención y no sobre porciones de las mismas.

Como es usado aquí, "planta" se refiere a planta(s) completa(s), una planta injertada, ancestros y progenie de las plantas y partes de planta, incluyendo semillas, frutos, brotes, tallos, raíces (incluidos tubérculos), portainjertos, vástagos y células, tejidos y órganos vegetales.

La planta puede estar en cualquier forma, incluyendo cultivos en suspensión, protoplastos, embriones, regiones meristemáticas, tejido de callo, hojas, gametofitos, esporofitos, polen y microsporas.

De acuerdo con una realización específica, la parte de planta comprende ADN.

Según una realización específica, la planta de banano es de una línea de mejoramiento de banano, más preferiblemente una línea de élite.

Conforme una realización específica, la planta de banano es de una línea elite.

De acuerdo a una realización específica, la planta de banano es de línea de raza pura.

De conformidad con una realización específica, la planta de banano es de una variedad de banano o germoplasma de mejoramiento.

El término "línea de mejoramiento", como es usado en el presente, se refiere a una línea de un banano cultivado teniendo características comercialmente valiosas o agronómicamente deseables, a diferencia de variedades silvestres o variedades locales. El término incluye referencia a una línea de mejoramiento de élite o línea de élite, la cual representa una línea esencialmente homocigótica, por lo general endogámica, de plantas usadas para producir híbridos comerciales F₁. Una línea de mejoramiento de élite es obtenida mediante mejoramiento y selección para un rendimiento agronómico superior que comprende una multitud de rasgos agronómicamente deseables. Una planta de élite es cualquier planta de una línea de élite. El rendimiento agronómico superior se refiere a una combinación deseada de rasgos agronómicamente deseables como es definida aquí, en donde es deseable que la mayoría, preferiblemente todos los rasgos agronómicamente deseables, sean mejorados en la línea de mejoramiento de élite en comparación con una línea de mejoramiento que no sea de élite. Las líneas de mejoramiento de élite son esencialmente homocigóticas y son preferiblemente líneas endogámicas.

El término "línea elite", como se usa en la presente, se refiere a cualquier línea que haya resultado del mejoramiento y la selección para un rendimiento agronómico superior. Una línea elite

preferiblemente es una línea que tiene múltiples, preferiblemente al menos 3, 4, 5, 6 o más (genes para) rasgos agronómicos deseables como son definidos en el presente documento.

Los términos “variedad cultivada” y “variedad” son utilizados de manera intercambiable en la presente y denotan que una planta ha sido deliberadamente desarrollada mediante mejoramiento genético, p. ej., cruzamiento y selección, con el propósito de ser comercializado, p. ej., utilizado por agricultores y productores, para producir productos agrícolas para consumo propio o para comercialización. El término “germoplasma de mejoramiento” denota una planta que tiene un estado biológico que no sea el estado “salvaje”, dicho estado “salvaje” indica el estado original no cultivado o natural de una planta o accesión.

El término “germoplasma de mejoramiento” incluye, pero no está limitado a, semi-natural, semi-silvestre, maleza, variedades cultivadas tradicionales, variedades locales, material de mejoramiento, material de investigación, línea de mejoramiento, población sintética, híbrido, población de origen/población base, línea endogámica (padre de variedad cultivada híbrida), segregación de población, población mutante/genético, clase de mercado y variedad cultivada avanzada/mejorada. Como se usan aquí, los términos “pura raza”, “endogamia pura” o “endogamia” son intercambiables y se refieren a una planta o línea de planta sustancialmente homocigótica obtenida por autofecundación y/o retrocruzamiento repetido.

Como se utiliza en la presente, “modificar un genoma” se refiere a introducir al menos una mutación en al menos un alelo que codifica un componente en la ruta de biosíntesis de etileno en banano. Según algunas realizaciones, la modificación se refiere a la introducción de una mutación en cada alelo de un componente en la ruta de biosíntesis de etileno. De acuerdo con al menos algunas realizaciones, la mutación en los dos alelos del componente en la ruta de biosíntesis de etileno está en una forma homocigótica.

Según algunas realizaciones, las mutaciones en los dos alelos que codifican el componente en la ruta de biosíntesis de etileno no son complementarias.

De acuerdo con una realización específica, el agente de edición de ADN modifica la secuencia objetivo del componente en la vía de la biosíntesis de etileno y está desprovisto de actividad “fuera del objetivo”, es decir, no modifica otras secuencias en el genoma de banano.

Conforme una realización específica, el agente de edición de ADN comprende una “actividad fuera del objetivo” en un gen no esencial en el genoma del banano.

No esencial se refiere a un gen que cuando es modificado con el agente de edición de ADN no afecta el fenotipo del genoma objetivo de una manera agrícolamente valiosa (p. ej., valor nutricional, sabor, biomasa, rendimiento, tolerancia al estrés biótico/abiótico y similares).

5 Los efectos fuera del objetivo pueden ser analizados utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica y están descritos en el presente documento.

Como es utilizado aquí mutación de “pérdida de función” se refiere a una aberración genómica la cual resulta en la capacidad reducida (es decir, función deteriorada) o la incapacidad del componente de la ruta de biosíntesis de etileno para facilitar en la síntesis de etileno o precursor del mismo.

10 Como se usa en el presente documento “capacidad reducida” se refiere a una actividad reducida del componente en la actividad de la vía de biosíntesis de etileno (es decir, síntesis de etileno) en comparación con aquella de la enzima de tipo salvaje desprovista de la mutación de pérdida de función. De acuerdo con una realización específica, la actividad reducida es al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o incluso más en comparación con aquella de la enzima de tipo salvaje bajo las mismas condiciones de ensayo. La biosíntesis de etileno puede ser medida en
15 pequeñas plántulas mediante cromatografía de gases (GC) o ensayos basados en láser (Cristescu SM, Mandon J, Arslanov D, De Pessemier J, Hermans C, Harren FJM. Métodos actuales para detectar etileno en plantas. Ann Bot- Londres.2013; 111 (3): 347–60).

De acuerdo con una realización específica, la mutación de pérdida de función resulta en ninguna expresión del mRNA del componente de la ruta de biosíntesis de etileno o proteína
20 (dependiente de la ubicación de la aberración en el gen que codifica el componente de la ruta de biosíntesis de etileno).

Según una realización específica, la mutación de pérdida de función resulta en la expresión del componente de la ruta de biosíntesis de etileno, pero la cual es incapaz o ineficiente de sintetizar etileno o un precursor del mismo.

25 Conforme una realización específica, la mutación de pérdida de función es seleccionada del grupo que consiste en una eliminación, inserción, inserción-eliminación (Indel), inversión, sustitución y una combinación de las mismas (por ejemplo, eliminación y sustitución, por ejemplo, deleciones y SNPs).

De conformidad con una realización específica, la mutación de pérdida de función es menor
30 que 1 Kb o 0.1 Kb.

Según una realización específica, la mutación de “pérdida de función” está en el 5’ del gen que codifica el componente de la ruta de biosíntesis de etileno para inhibir la producción de cualquier producto de expresión α (p. ej., exón 1).

Conforme una realización específica, la mutación de “pérdida de función” está en cualquier lugar en el gen que permite la producción del producto de expresión, mientras siendo incapaz de facilitar (contribuir a) la síntesis de etileno o precursor del mismo, es decir, proteína inactiva. También provisto aquí está una mutación en elementos reguladores del gen, p. ej., promotor.

Como fue mencionado, la planta de banano comprende la mutación de pérdida de función en al menos un alelo de un gen que codifica el componente de la ruta de biosíntesis de etileno.

Según una realización específica, la mutación es homocigótica.

Conforme un aspecto, se proporciona un método para aumentar la vida útil del banano, el método comprendiendo:

(a) someter una célula de planta de banano a un agente de edición de ADN dirigido a una secuencia de ácido nucleico que codifica un componente en una ruta de biosíntesis de etileno del banano para dar como resultado una mutación de pérdida de función en la secuencia de ácido nucleico que codifica la ruta de biosíntesis de etileno y

(b) regenerar una planta a partir de la célula vegetal.

Según una realización específica, el método comprende además cosechar los frutos de la planta.

De conformidad con una realización específica, la fruta es cosechada aún verde y firme, 7-14 días antes de maduración. Cada planta adulta de banano produce un solo racimo, que está formado por muchas frutas de banano o ‘dedos’ y agrupadas en varias “manos” (FAO, 2014). Los racimos de banano son cortados por “mano” (generalmente involucrando 2-3 personas) con un cuchillo afilado o un machete.

Como es utilizado aquí, “aumentar la vida útil” se refiere al menos al 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o incluso 95%, aumento de vida útil de la fruta de banano cosechada teniendo la mutación de pérdida de función en el genoma (como se describe aquí) en comparación con la de una planta de banano del mismo origen genético que no comprende la mutación de pérdida de función y que se manifiesta por la vida útil, según lo analizado por métodos que son bien conocidos en la técnica (ver la sección de Ejemplos que sigue). La vida útil es estimada siguiendo el color y la consistencia de la fruta.

A continuación, está una descripción de varios ejemplos no limitantes de métodos y agentes de edición de ADN utilizados para introducir alteraciones de ácido nucleico a un gen de interés y

agentes para implementar el mismo que pueden usarse de acuerdo con realizaciones específicas de la presente divulgación.

Edición del Genoma utilizando endonucleasas modificadas por ingeniería - este enfoque se refiere a un método de ingeniería genética reversa que utiliza nucleasas modificadas artificialmente para típicamente cortar y crear interrupciones de cadena doble específicas en la(s) ubicación(es) deseada(s) en el genoma, las cuales luego son reparadas por procesos celulares endógenos como ser recombinación homóloga (HR) o unión de extremos no homóloga (NHEJ). NHEJ une directamente a los extremos del ADN en una rotura de cadena doble, mientras que HR utiliza una secuencia donante homóloga como plantilla (es decir, la cromátida hermana formada durante la fase-S) para regenerar la secuencia de ADN faltante en el sitio de rotura. Para introducir modificaciones específicas de nucleótidos en el ADN genómico, una plantilla de reparación de ADN del donante conteniendo la secuencia deseada debe estar presente durante HR (ADN de cadena sencilla o cadena doble proporcionado exógenamente).

La edición del genoma no puede realizarse utilizando endonucleasas de restricción tradicionales ya que la mayoría de las enzimas de restricción reconocen algunos pares base en el ADN como su objetivo y estas secuencias a menudo serán encontradas en muchas ubicaciones a lo largo del genoma resultando en múltiples cortes los cuales no se limitan a una ubicación deseada. Para superar este desafío y crear interrupciones de cadena sencilla o de cadena doble específicas del sitio, varias clases distintas de nucleasas han sido descubiertas y elaborado por bioingeniería hasta la fecha. Estas incluyen las meganucleasas, las nucleasas de dedos de zinc (ZFN), las nucleasas efectoras similares a activadores de transcripción (TALEN) y el sistema CRISPR/Cas.

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

Esto puede ser explotado para hacer interrupciones de cadena doble específicas del sitio en la edición del genoma. Alguien de experiencia en la técnica puede usar estas meganucleasas de origen natural, sin embargo, el número de tales meganucleasas de origen natural es limitado. Para superar este desafío, métodos de detección de mutagénesis y alto rendimiento han sido utilizados para crear
 5 variantes de meganucleasa que reconocen secuencias únicas. Por ejemplo, varias meganucleasas que han sido fusionadas para crear enzimas híbridas que reconocen una nueva secuencia.

Alternativamente, los aminoácidos que interaccionan con el ADN de la meganucleasa pueden ser alterados para diseñar meganucleasas específicas de secuencia (ver, p. ej., Patente de EE.UU. 8,021,867). Las meganucleasas pueden ser diseñadas usando los métodos descritos en, por ejemplo,
 10 Certo, MT *et al.* Métodos de Naturaleza (2012) 9: 073-975; Patentes de EE.UU. Nos. 8,304,222; 8,021,867; 8,119,381; 8,124,369; 8,129,134; 8,133,697; 8,143,015; 8,143,016; 8,148,098 ; o 8,163,514, los contenidos de cada una son incorporadas aquí por referencia en su totalidad. Alternativamente, meganucleasas con características de corte específicas del sitio pueden ser obtenidas utilizando tecnologías disponibles comercialmente, p. ej., la tecnología de edición del
 15 genoma Editor Dirigido de Nucleasa (Directed Nuclease Editor™) de Precision Biosciences.

ZFNs y *TALENs* - dos clases distintas de nucleasas diseñadas, nucleasas con dedos de zinc (ZFN) y nucleasas efectoras similares a activadores de transcripción (TALEN), ambas han demostrado ser eficaces en la producción de interrupciones de cadena doble (Christian *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2011; Mahfouz *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2010).

Básicamente, la tecnología de endonucleasa de restricción ZFN y TALEN utiliza una enzima de corte de ADN no específica la cual está vinculada a un dominio de unión a ADN específico (ya sea una serie de dominios de dedos de zinc o repeticiones TALE, respectivamente). Típicamente, una enzima de restricción cuyo sitio de reconocimiento de ADN y sitio de escisión están separados entre sí es seleccionada. La porción de escisión es separada y luego unida a un dominio de unión a ADN,
 20 produciendo de esta forma una endonucleasa con una especificidad muy alta para una secuencia deseada. Una enzima de restricción ejemplar con tales propiedades es FokI. Además, FokI tiene la ventaja de requerir que la dimerización tenga actividad de nucleasa y esto significa que la especificidad aumenta dramáticamente a medida que cada pareja de nucleasa reconozca una secuencia de ADN única. Para potenciar este efecto, nucleasas FokI han sido diseñadas que solo pueden
 25 funcionar como heterodímeros y tienen una mayor actividad catalítica. Las nucleasas que funcionan con heterodímeros evitan la posibilidad de actividad homodímera no deseada y por lo tanto aumentan la especificidad de la rotura de cadena doble.

Por lo tanto, por ejemplo, para apuntar a un sitio específico, los ZFNs y TALENs son contruidos como pares de nucleasas, con cada miembro del par diseñado para unir secuencias adyacentes en el sitio objetivo. Tras la expresión transitoria en las células, las nucleasas se unen a sus sitios objetivo y los dominios FokI se heterodimerizan para crear una rotura de cadena doble. La
 5 reparación de estas interrupciones de cadena doble a través de la ruta de unión de extremos no homóloga (NHEJ) a menudo resulta en pequeñas eliminaciones o pequeñas inserciones de secuencia. Ya que cada reparación realizada por NHEJ es única, el uso de un solo par de nucleasas puede producir una serie alélica con un rango de diferentes eliminaciones en el sitio objetivo.

En general, NHEJ es relativamente preciso (cerca de 85% de los DSB en las células humanas
 10 son reparadas por NHEJ dentro de aproximadamente de 30 minutos posteriores a partir de la detección) en la edición de genes de NHEJ erróneo es confiada cuando la reparación es precisa la nucleasa continuará cortando hasta que el producto de reparación sea mutagénico y el motivo de reconocimiento/sitio de corte/PAM ha desaparecido/mutado o que la nucleasa introducida transitoriamente ya no esté presente.

Las eliminaciones típicamente varían desde unos pocos pares base hasta unos cientos de pares
 15 base en longitud, pero eliminaciones más grandes han sido exitosamente generadas en el cultivo celular utilizando dos pares de nucleasas simultáneamente (Carlson *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2010) Además, cuando un fragmento de ADN con homología con la región objetivo es introducido en conjunción con el par de nucleasas, la rotura de cadena doble se puede reparar mediante
 20 recombinación homóloga (HR) para generar modificaciones específicas (Li *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2010; Urnov *et al.*, 2005).

Aunque las porciones de nucleasas tanto de ZFNs como de TALENs tienen propiedades similares, la diferencia entre estas nucleasas diseñadas está en su péptido de reconocimiento de ADN. Los ZFNs dependen de los dedos de zinc Cys2-His2 y los TALENs de los TALEs. Ambos de
 25 estos dominios de péptidos que reconocen el ADN tienen la característica de que se encuentran naturalmente en combinaciones en sus proteínas. Los dedos de zinc Cys2-His2 son típicamente encontrados en repeticiones que están separadas por 3 bp y son encontrados en diversas combinaciones en una variedad de proteínas que interactúan con ácidos nucleicos. Los TALEs, por otra parte, son encontrados en repeticiones con una proporción de reconocimiento uno-a-uno entre los
 30 aminoácidos y los pares de nucleótidos reconocidos. Debido a que tanto los dedos de zinc como los TALEs ocurren en patrones repetidos, diferentes combinaciones pueden ser probadas para crear una amplia variedad de especificidades de secuencia. Los enfoques para hacer endonucleasas de dedo de

zinc específicas del sitio incluyen, p. ej., ensamblaje modular (donde los dedos de zinc correlacionados con una secuencia de triplete son adjuntos en una fila para cubrir la secuencia requerida), ABIERTO (selección de baja astringencia de dominios de péptidos vs. nucleótidos de triplete seguidos de selecciones de alta astringencia de combinación de péptidos vs. el objetivo final en sistemas bacterianos), y la detección de un híbrido bacteriano de bibliotecas de dedos de zinc, entre otros. Los ZFNs también pueden estar diseñados y obtenidos comercialmente de, p. ej., Sangamo Biosciences™ (Richmond, CA).

El método para diseñar y obtener TALENs son descritos en, p. ej., Reyon *et al.* *Biotecnología de la Naturaleza* 2012 Mayo; 30(5):460-5; Miller *et al.* *Nat Biotechnol.* (2011) 29: 143-148; Cermak *et al.* *Investigación de Ácidos Nucléicos* (2011) 39 (12): e82 y Zhang *et al.* *Biotecnología de la Naturaleza* (2011) 29 (2): 149–53. Un programa basado en la Web recientemente desarrollado llamado Mojo Hand fue introducido por la Clínica Mayo para diseñar constructos TAL y TALEN para aplicaciones de edición del genoma (puede ser accedido a través de [www\(punto\)talendesign\(punto\)org](http://www(punto)talendesign(punto)org)). TALEN también puede ser diseñado y obtenido comercialmente de, p. ej., Sangamo Biosciences™ (Richmond, CA).

Sistema T-GEE (Motor de edición del genoma de TargetGene) - un complejo molecular de nucleoproteína programable conteniendo una fracción de polipéptido y un ácido nucleico que confiere especificidad (SCNA) el cual se ensambla in vivo, en una célula objetivo, y es capaz de interactuar con la secuencia predeterminada de ácido nucleico objetivo, es proporcionado. El complejo molecular de nucleoproteína programable es capaz de modificar y/o editar específicamente un sitio objetivo dentro de la secuencia de ácido nucleico objetivo y/o modificar la función de la secuencia de ácido nucleico objetivo. La composición de nucleoproteína comprende (a) una molécula polinucleotídica que codifica un polipéptido quimérico y que comprende (i) un dominio funcional capaz de modificar el sitio objetivo, y (ii) un dominio de enlace que es capaz de interactuar con un ácido nucleico que confiere especificidad, y (b) ácido nucleico que confiere especificidad (SCNA) que comprende (i) una secuencia de nucleótidos complementaria a una región del ácido nucleico objetivo que flanquea el sitio objetivo, y (ii) una región de reconocimiento capaz de unirse específicamente al dominio de enlace del polipéptido. La composición permite modificar una secuencia predeterminada de ácido nucleico objetivo de forma precisa, confiable y rentable con alta especificidad y capacidades de unión del complejo molecular al ácido nucleico objetivo a través del emparejamiento de bases de ácido nucleico que confiere especificidad y un ácido nucleico objetivo. La composición es menos genotóxica, modular en su ensamblaje, utiliza una plataforma única sin personalización, práctica para

uso independiente fuera de las instalaciones centrales especializadas y tiene un marco de tiempo de desarrollo más corto y costos reducidos.

Sistema CRISPR-Cas (también referido en el presente documento como “CRISPR”) - muchas bacterias y arqueas contienen sistemas inmunes adaptables basados en ARN endógeno que pueden degradar los ácidos nucleicos de fagos y plásmidos invasores. Estos sistemas consisten en secuencias de nucleótidos de repetición palindrómica corta (CRISPR) agrupadas interespaciadas regularmente que producen componentes de ARN y genes asociados a CRISPR (Cas) que codifican componentes de proteínas. Los ARN CRISPR (crRNAs) contienen tramos cortos de homología con el ADN de virus y plásmidos específicos y actúan como guías para dirigir las nucleasas Cas para degradar los ácidos nucleicos complementarios del patógeno correspondiente. Los estudios del sistema tipo II CRISPR/Cas de *Streptococcus pyogenes* han mostrado que tres componentes forman un complejo de ARN/proteína y juntos son suficientes para la actividad de nucleasa específica de secuencia: la nucleasa Cas9, un crRNA conteniendo 20 pares base de homología con la secuencia objetivo y un crRNA activadora-trans (tracrRNA) (Jinek *et al. Ciencia* (2012) 337: 816 - 821).

Se demostró además que un ARN guía quimérico sintético (gRNA) compuesto por una fusión entre crRNA y tracrRNA podría dirigir a Cas9 a escindir objetivos de ADN que son complementarios al crRNA *in vitro*. También fue demostrado que la expresión transitoria de Cas9 en conjunción con gRNAs sintéticos puede ser utilizada para producir frenos de cadena doble específicos en una variedad de diferentes especies (Cho *et al.*, 2013; Cong *et al.*, 2013; DiCarlo *et al.*, 2013; Hwang *et al.*, 2013a, b; Jinek *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013).

El sistema CRISPR/Cas para la edición del genoma contiene dos componentes distintos: un gRNA y una endonucleasa, p. ej. Cas9.

El gRNA es típicamente una secuencia de 20 nucleótidos que codifica una combinación de la secuencia homóloga objetivo (crRNA) y el ARN bacteriano endógeno que une el crRNA con la nucleasa Cas9 (tracrRNA) en un transcrito quimérico único. El complejo gRNA/Cas9 es reclutado en la secuencia objetivo mediante el emparejamiento de bases entre la secuencia de gRNA y el complemento de ADN genómico. Para la unión exitosa de Cas9, la secuencia genómica objetivo debe también contener la secuencia correcta del Motivo Adyacente Protoespaciador (PAM) inmediatamente después de la secuencia objetivo. La unión del complejo gRNA/Cas9 localiza el Cas9 a la secuencia genómica objetivo de modo que el Cas9 pueda cortar ambas cadenas del ADN causando una ruptura de cadena doble. Al igual que con ZFNs y TALENs, las interrupciones de cadena doble producidas por CRISPR/Cas pueden ser reparadas mediante HR (recombinación homóloga) o NHEJ

(unión de extremos no homóloga) y son susceptibles de modificación de secuencia específica durante la reparación del ADN.

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

Una ventaja significativa de CRISPR/Cas es que la alta eficiencia de este sistema combinada con la capacidad de crear fácilmente gRNAs sintéticos. Esto crea un sistema que puede ser fácilmente modificado para apuntar a modificaciones en diferentes sitios genómicos y/o para apuntar a diferentes modificaciones en el mismo sitio. Además, protocolos han sido establecidos los cuales permiten la
10 focalización simultánea de múltiples genes. La mayoría de las células portadoras de la mutación presentan mutaciones bialélicas en los genes objetivo.

Sin embargo, la aparente flexibilidad en las interacciones de emparejamiento de bases entre la secuencia de gRNA y la secuencia objetivo del ADN genómico permite emparejamientos imperfectos para que la secuencia objetivo sea cortada por Cas9.

Las versiones modificadas de la enzima Cas9 conteniendo un dominio único catalítico
15 inactivo, ya sea RuvC- o HNH-, son llamadas ‘nickasas’. Con solo un dominio de nucleasa activo, la nickasa Cas9 corta solo una cadena del ADN objetivo, creando una rotura de cadena sencilla o ‘nick’. Una rotura de cadena sencilla, o nick, es principalmente reparado mediante un mecanismo de reparación de rotura de cadena sencilla que involucra proteínas tales como, pero no solo, PARP
20 (sensor) y complejo XRCC1/LIG III (ligadura). Si una ruptura de cadena sencilla (SSB) es generada por venenos de topoisomerasa I o por medicamentos que atrapan PARP1 en SSB que ocurren naturalmente entonces estos podrían persistir y cuando la célula entra en la fase S y la bifurcación de replicación encuentra tales SSB, se convertirán en DSBs de un solo extremo que solo puede ser reparado por HR. Sin embargo, dos nicks proximales de cadenas opuestas introducidos por una
25 nickasa Cas9 son tratados como una rotura de cadena doble, en lo que a menudo se refiere como un sistema CRISPR de ‘doble nick’. Un doble nick el cual es básicamente un DSB no paralelo puede ser reparado como otros DSBs por HR o NHEJ dependiendo del efecto deseado sobre el gen objetivo y la presencia de una secuencia donante y la etapa del ciclo celular (HR es de mucha menor abundancia y solo puede ocurrir en las etapas S y G2 del ciclo celular). Por lo tanto, si la especificidad y los efectos
30 reducidos fuera del objetivo son cruciales, utilizando la nickasa Cas9 para crear un doble nick al diseñar dos gRNA con secuencias objetivo en proximidad cercana y en las cadenas opuestas del ADN

genómico disminuirían el efecto fuera del objetivo ya que cualquier gRNA solo resultará en nicks que probablemente no cambien el ADN genómico, a pesar de que estos eventos no son imposibles.

Versiones modificadas de la enzima Cas9 conteniendo dos dominios catalíticos inactivos (Cas9 muerto o dCas9) no tienen actividad nucleasa mientras que aún pueden unirse al ADN en función de la especificidad del gRNA. El dCas9 puede ser utilizado como una plataforma para que los reguladores transcripcionales de ADN activen o repriman la expresión génica fusionando la enzima inactiva con dominios reguladores conocidos. Por ejemplo, la unión de dCas9 solo a una secuencia objetivo en el ADN genómico puede interferir con la transcripción génica.

Hay una serie de herramientas disponibles públicamente para ayudar a elegir y/o diseñar secuencias objetivo, así como listas de gRNAs únicos determinados de forma bioinformática para diferentes genes en diferentes especies como ser el Buscador de Objetivos del laboratorio Feng Zhang (Feng Zhang lab's Target Finder), el Buscador de Objetivos del laboratorio Michael Boutros (Michael Boutros lab's Target Finder) (E-CRISP), las Herramientas RGEN: Cas-OFFinder, el CasFinder: Algoritmo flexible para identificar objetivos Cas9 específicos en genomas y el Buscador de Objetivos Óptimo CRISPR (CRISPR Optimal Target Finder).

Ejemplos no limitantes de un gRNA que pueden ser utilizados en la presente divulgación incluyen aquellos descritos en la sección de Ejemplos que sigue.

Para utilizar el sistema CRISPR, tanto el gRNA como el Cas9 deberían estar en una célula objetivo o administrarse como un complejo de ribonucleoproteína. El vector de inserción puede contener ambos casetes en un solo plásmido o los casetes son expresados a partir de dos plásmidos separados. Los plásmidos CRISPR están disponibles comercialmente como ser el plásmido px330 de Addgene. El uso de tecnología de ARN de guía (Cas) asociada a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR) y una endonucleasa Cas para modificar genomas de plantas son también al menos reveladas por Svitashv *et al.*, 2015, Fisiología de Plantas, 169 (2): 931-945; Kumar y Jain, 2015, J Exp Bot 66: 47–57; y en la Publicación de la Solicitud de Patente de los EE.UU. No. 20150082478, la cual es específicamente incorporada a la presente como referencia en su totalidad.

“Hit and run” (Golpe y funcionamiento) o “in-out” (entrada-salida) - involucra un procedimiento de recombinación de dos pasos. En el primer paso, un vector de tipo de inserción conteniendo un casete marcador seleccionable dual positivo/negativo es usado para introducir la alteración de secuencia deseada. El vector de inserción contiene una única región continua de homología con el locus objetivo y es modificada para portar la mutación de interés. Este constructo

de direccionamiento se linealiza con una enzima de restricción en un sitio dentro de la región de homología, se introduce en las células, y una selección positiva es realizada para aislar eventos de recombinación homóloga. El ADN que porta la secuencia homóloga puede ser provisto como un plásmido, un oligo de cadena sencilla o de cadena doble. Estos recombinantes homólogos contienen una duplicación local que está separada por la secuencia del vector interviniente, incluyendo el casete de selección. En el segundo paso, los clones objetivo son sometidos a una selección negativa para identificar células que han perdido el casete de selección mediante recombinación intracromosómica entre las secuencias duplicadas. El evento de recombinación local elimina la duplicación y, dependiendo del sitio de recombinación, el alelo ya sea retiene la mutación introducida o se revierte al tipo salvaje. El resultado final es la introducción de la modificación deseada sin la retención de ninguna secuencia exógena.

La estrategia de “doble reemplazo” o “etiquetado e intercambio” - involucra un procedimiento de selección de dos pasos similar al enfoque de golpe y correr (hit and funcionamiento), pero requiere el uso de dos constructos de focalización diferentes. En el primer paso, un vector de direccionamiento estándar con brazos de homología 3' y 5' es utilizado para insertar un casete seleccionable dual positivo/negativo cerca de la ubicación donde se va a introducir la mutación. Después que los componentes del sistema hayan sido introducidos en la célula y se haya aplicado la selección positiva, los eventos HR podrían ser identificados. A continuación, un segundo vector de direccionamiento que contiene una región de homología con la mutación deseada es introducida en los clones objetivos, y la selección negativa es aplicada para eliminar el casete de selección e introducir la mutación. El alelo final contiene la mutación deseada mientras elimina las secuencias exógenas no deseadas.

Recombinasas específicas del sitio - la recombinasa Cre derivada del bacteriófago P1 y la recombinasa Flp derivada de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* son recombinasas de ADN específicas del sitio cada una reconociendo una secuencia de ADN única de 34 pares base (denominadas "Lox" y "FRT", respectivamente) y secuencias que están flanqueadas ya sea con sitios Lox o sitios FRT pueden eliminarse fácilmente vía recombinación específica del sitio tras la expresión de la recombinasa Cre o Flp, respectivamente. Por ejemplo, la secuencia Lox está compuesta de una región espaciadora asimétrica de ocho pares base flanqueada por repeticiones invertidas de 13 pares base. Cre recombina la secuencia de ADN lox de 34 pares base al unirse a las repeticiones invertidas de 13 pares base y catalizando la escisión y la re-ligadura de la cadena dentro de la región espaciadora. Los cortes de ADN escalonados realizados por Cre en la región espaciadora están

separados por 6 pares base para dar una región de superposición que actúa como un sensor de homología para garantizar que solo los sitios de recombinación teniendo la misma región de superposición se recombinen.

Básicamente, el sistema de recombinasa específica de sitio ofrece medios para la eliminación de casetes de selección después de eventos de recombinación homóloga. Este sistema también permite la generación de alelos alterados condicionados que se pueden ser inactivados o activados de manera temporal o específica de tejido. Es de destacar que las recombinasas Cre y Flp dejan una “cicatriz” Lox o FRT de 34 pares base. Los sitios Lox o FRT que permanecen son típicamente dejados atrás en un intrón o 3' UTR del locus modificado, y la evidencia actual sugiere que estos sitios generalmente no interfieren significativamente con la función del gen.

De este modo, la recombinación Cre/Lox y Flp/FRT involucra la introducción de un vector de direccionamiento con brazos de homología 3' y 5' conteniendo la mutación de interés, dos secuencias Lox o FRT y típicamente un casete seleccionable colocado entre las dos secuencias Lox o FRT. La selección positiva es aplicada y los eventos de recombinación homóloga que contienen mutación dirigida son identificados. La expresión transitoria de Cre o Flp en conjunción con la selección negativa resulta en la escisión del casete de selección y selecciona las células donde se ha perdido el casete. El alelo final dirigido contiene la cicatriz Lox o FRT de secuencias exógenas.

Según una realización específica, el agente de edición de ADN es CRISPR-Cas9. Secuencias de gRNA ejemplares son provistas en la presente.

>Ma04_g31490
GACTCTAAGATCAGGGTTAAAGG (SEQ ID NO: 45);
>Ma09_g19150/Ma04_g35640/Ma04_g31490
GCAGCTAACATCAGGGTTAAAGG (SEQ ID NO: 46).

De acuerdo con una realización específica, el componente en dicha ruta de biosíntesis de etileno es seleccionado del grupo que consiste en Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9), Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8), Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20) y Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

Según una realización específica, el componente en dicha ruta de biosíntesis de etileno es seleccionado del grupo que consiste en Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9) y Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

Según una realización específica, el componente en dicha ruta de biosíntesis de etileno es seleccionado del grupo que consiste en Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8) y Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20).

5 Según una realización específica, el agente de edición de ADN está dirigido a coordenadas de ácido nucleico las cuales se dirigen específicamente a más de una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho componente en la mencionada ruta de biosíntesis de etileno.

Conforme una realización específica, el agente de edición de ADN comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 99% idéntica a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 47-54 (sgRNAs: 183, 184, 188, 189, 190, 191, 194, y 195).

10 De acuerdo con una realización específica, el agente de edición de ADN comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 99% idéntica a una secuencia de ácido nucleico establecida en SEQ ID NO: 47 (sgRNA: 183).

De acuerdo con una realización específica, el agente de edición de ADN comprende un ácido nucleico establecido en la SEQ ID NO: 47 (sgRNA: 183).

15 De conformidad con una realización específica, el agente de edición de ADN comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico establecidas en SEQ ID NO: 47-54 (sgRNAs: 183, 184, 188, 189, 190, 191, 194, y 195).

Según una realización específica, el agente de edición de ADN comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico establecidas en SEQ ID NO: 47, 49 y/o 50 (sgRNAs: 183, 188, 189).

20 Conforme a una realización específica, el agente de edición de ADN comprende una pluralidad de secuencias de ácido nucleico establecidas en SEQ ID NO: 51 y/o 53 (sgRNAs: 190 y 194).

El agente de edición de ADN es típicamente introducido en la célula vegetal usando vectores de expresión.

25 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente de edición de ADN capaz de hibridarse con un gen que codifica un componente de la biosíntesis de etileno de un banano y facilitar la edición de dicho gen, la mencionada secuencia de ácido nucleico siendo unida operativamente a un elemento regulador de acción-cis para expresar dicho agente de edición de ADN en una célula de un banano.

30 Las realizaciones de la invención se refieren a cualquier agente de edición de ADN, tal como se describe anteriormente

Según una realización específica, el agente de edición del genoma comprende una endonucleasa, la cual puede comprender o tener una unidad auxiliar de un módulo de direccionamiento de ADN (p. ej., sgRNA, o también referido en la presente como “gRNA”).

De acuerdo con una realización específica, el agente de edición de ADN es CRISPR/Cas9
5 sgRNA.

De conformidad con una realización específica, el constructo de ácido nucleico además comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una endonucleasa de un agente de edición de ADN (p. ej., Cas9 o las endonucleasas descritas anteriormente).

Conforme otra realización específica, la endonucleasa y el sgRNA están codificados a partir
10 de diferentes constructos conforme a los cuales cada uno está operativamente unido a un elemento regulador de acción-cis activo en células vegetales (p. ej., promotor).

En una realización particular de algunas realizaciones de la invención, la secuencia reguladora es un promotor expresable en plantas.

Los constructos útiles en los métodos de acuerdo con algunas realizaciones pueden ser
15 contruidos usando tecnología de ADN recombinante bien conocida por aquellas personas expertas en la técnica. Tales constructos pueden estar disponibles comercialmente, adecuados para transformarse en plantas y adecuados para la expresión del gen de interés en las células transformadas.

Como se usa en el presente documento, la frase “expresable en plantas” se refiere a una secuencia promotora, que incluye cualquier elemento regulador adicional agregado a la misma o
20 contenida en la misma, es al menos capaz de inducir, conferir, activar o mejorar la expresión en una célula, tejido u órgano vegetal, preferiblemente una célula, tejido u órgano vegetal monocotiledóneo o dicotiledóneo. Los ejemplos de promotores útiles para los métodos de algunas realizaciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, Actina, CANV 35S, CaMV19S, GOS2. Promotores que son activos en diversos tejidos, o etapas de desarrollo también pueden ser utilizados.

25 Las secuencias de ácido nucleico de los polipéptidos de algunas realizaciones de la invención pueden optimizarse para la expresión de plantas. Los ejemplos de tales modificaciones de secuencia incluyen, pero no están limitadas a, un contenido de G/C alterado para acercarse más de cerca a lo que se encuentra típicamente en las especies de plantas de interés, y la eliminación de codones encontrados atípicamente en las especies de plantas comúnmente referidas como optimización de codones.

30 Las células vegetales pueden transformarse de manera estable o transitoria con los constructos de ácido nucleico de algunas realizaciones de la invención. En la transformación estable, la molécula de ácido nucleico de algunas realizaciones de la invención es integrada en el genoma de la planta y

como tal representa un rasgo estable y heredado. En la transformación transitoria, la molécula de ácido nucleico es expresada por la célula transformada pero no está integrada en el genoma y como tal representa un rasgo transitorio.

Según una realización específica, la planta se transfecta transitoriamente con un agente de edición de ADN.

Conforme una realización específica, los promotores en el constructo de ácido nucleico comprenden un promotor Pol3. Ejemplos de promotores Pol3 incluyen, pero no están limitados a, AtU6-29, AtU626, AtU3B, AtU3d, TaU6.

De acuerdo a una realización específica, los promotores en el constructo de ácido nucleico comprenden un promotor Pol2. Ejemplos de promotores Pol2 incluyen, pero no están limitados a, CaMV 35S, CaMV 19S, ubiquitina, CVMV.

Según una realización específica, los promotores en el constructo de ácido nucleico comprenden un promotor 35S.

De conformidad con una realización específica, los promotores en el constructo de ácido nucleico comprenden un promotor U6.

De acuerdo a una realización específica, los promotores en el constructo de ácido nucleico comprenden un promotor Pol 3 (p. ej., U6) unido operativamente al agente de ácido nucleico que codifica al menos un gRNA y/o un promotor Pol2 (p. ej., CamV35S) unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica el agente de edición del genoma o la secuencia de ácido nucleico que codifica el indicador fluorescente (como está descrito en una realización específica abajo).

Según una realización específica, el constructo es útil para la expresión transitoria por transformación mediada por *Agrobacterium* (Helens et al., 2005, Métodos de Planta 1:13). Los métodos de transformación transitoria se describen adicionalmente en la presente.

De acuerdo con una realización específica, las secuencias de ácido nucleico comprendidas en el constructo carecen de secuencias las cuales sean homólogas al genoma de la célula vegetal que no sean secuencias de guía en las secuencias de sgRNA para evitar la integración al genoma de la planta.

En ciertas realizaciones, el constructo de ácido nucleico es un constructo no integrador, preferiblemente donde la secuencia de ácido nucleico que codifica el indicador fluorescente también es no integrante. Como es usado en la presente, “no integrante” se refiere a un constructo o secuencia que no está diseñada afirmativamente para facilitar la integración del constructo o secuencia en el genoma de la planta de interés. Por ejemplo, un sistema de vector de T-DNA funcional para la

transformación genética mediada por *Agrobacterium* no es un sistema de vector no integrante ya que el sistema está diseñado afirmativamente para integrarse en el genoma de la planta. De manera similar, una secuencia del gen indicador fluorescente o una secuencia marcadora seleccionable que tiene secuencias flanqueantes que son homólogas al genoma de la planta de interés para facilitar la recombinación homóloga de la secuencia del gen indicador fluorescente o secuencia marcadora seleccionable en el genoma de la planta de interés no sería una secuencia del gen indicador fluorescente no integrante o una secuencia marcadora seleccionable.

Varios kits de clonación pueden ser usados de acuerdo con las enseñanzas de algunas realizaciones de la invención.

Según una realización específica, el constructo de ácido nucleico es un vector binario. Ejemplos de vectores binarios son pBIN19, pBI101, pBinAR, pGPTV, pCAMBIA, pBIB-HYG, pBecks, pGreen o pPZP (Hajukiewicz, P. et al., Plant Mol. Biol. 25, 989 (1994), y Hellens et al, Tendencias en Ciencia de las Plantas 5, 446 (2000)).

Ejemplos de otros vectores a ser utilizados en otros métodos de suministro de ADN (p. ej., transfección, electroporación, bombardeo, inoculación viral) son: pGE-sgRNA (Zhang et al. Nat. Comms. 2016 7:12697), pJIT163-Ubi-Cas9 (Wang et al. Nat. Biotechnol 2004 32, 947-951), pICH47742::2x35S-5'UTR-hCas9(STOP)-NOST (Belhan et al. Métodos de Plantas 2013 11;9(1):39).

Las realizaciones descritas en la presente también se refieren a un método de selección de células que comprende un evento de edición del genoma, el método comprendiendo:

(a) transformar células de una planta de banano con un constructo de ácido nucleico que comprende el agente de edición del genoma (como se describe anteriormente) y un indicador fluorescente;

(b) seleccionar células transformadas que exhiben fluorescencia emitida por el indicador fluorescente usando citometría o imaginología de flujo;

(c) cultivar las células transformadas que comprenden el evento de edición del genoma por el agente de edición de ADN durante un tiempo suficiente para perder la expresión del agente de edición de ADN a fin de obtener células que comprenden un evento de edición del genoma generado por el agente de edición de ADN pero que carecen de codificación de ADN al agente de edición de ADN; y

Según algunas realizaciones, el método comprende además validar en las células transformadas, la pérdida de expresión del indicador fluorescente después del paso (c).

Conforme algunas realizaciones, el método comprende además validar en la pérdida de células transformadas, la expresión del agente de edición de ADN después del paso (c).

Una realización no limitante del método está descrita en el Diagrama de flujo de la Figura 1.

De acuerdo a una realización específica, la planta es una célula de planta, p. ej., una célula de
5 planta en una suspensión de células embrionarias.

Según una realización específica, la célula de planta es un protoplasto.

Los protoplastos son derivados de cualquier tejido vegetal, p. ej., raíces, hojas, suspensión de células embrionarias, callos o tejido de plántulas.

Existen varios métodos de introducir ADN en las células de plantas, p. ej., usando protoplastos
10 y el experto en la técnica sabrá cuál seleccionar.

La entrega de ácidos nucleicos puede ser introducida en una célula de planta en realizaciones de la invención mediante cualquier método conocido a aquellos expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo y sin limitación: mediante transformación de protoplastos (ver, p. ej., Patente de EE.UU. No. 5,508,184); por absorción de ADN mediada por desecación/inhibición (ver, p. ej., Potrykus et al.
15 (1985) Mol. Gen. Genet. 199: 183-8); por electroporación (ver, p. ej., Patente de EE.UU. No. 5,384,253); por agitación con fibras de carburo de silicio (ver, p. ej., Patentes de EE.UU. Nos. 5,302,523 y 5,464,765); por transformación mediada por *Agrobacterium* (ver, p. ej., Patentes de EE.UU. Nos. 5,563,055, 5,591,616, 5,693,512, 5,824,877, 5,981,840 y 6,384,301); por aceleración de partículas recubiertas de ADN (ver, p. ej., Patentes de EE.UU. Nos. 5,015,580, 5,550,318, 5,538,880,
20 6,160,208, 6,399,861 y 6,403,865) y por nanopartículas, nanoportadores y péptidos penetrantes de células (WO201126644A2; WO2009046384A1; WO2008148223A1) en los métodos para entregar ADN, ARN, péptidos y/o proteínas o combinaciones de ácidos nucleicos y péptidos en las células de plantas.

Otros métodos de transfección incluyen el uso de reactivos de transfección (p. ej., Lipofectin,
25 ThermoFisher), dendrímeros (Kukowska-Latallo, JF et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA93, 4897-902), péptidos penetrantes de células (Mäe et al., 2005, Internalización de péptidos penetrantes de células en protoplastos de tabaco, Biochimica et Biophysica Acta 1669 (2):101-7) o poliaminas (Zhang y Vinogradov, 2010, Poliaminas biodegradables cortas para la administración de genes y la transfección células capilares cerebrales del endotelio, J Control Release, 143(3):359-366).

Según una realización específica, la introducción de ADN en células de plantas (p. ej.,
30 protoplastos) es efectuada por electroporación.

Conforme una realización específica, la introducción de ADN en células de plantas (p. ej., protoplastos) es efectuada mediante bombardeo/biolística.

De acuerdo a una realización específica, para introducir ADN en protoplastos, el método comprende la absorción de ADN mediada por polietilenglicol (PEG). Para más detalles ver Karesch et al. (1991) Rep. Células de Plantas 9:575-578; Mathur et al. (1995) Rep. Células de Plantas 14:221-226; Negrutiu et al. (1987) Mol. Biol. Células de Plantas 8:363-373. Los protoplastos son luego cultivados bajo condiciones que les permitieron crecer las paredes celulares, comenzar a dividirse para formar un callo, desarrollar brotes y raíces, y regenerar plantas enteras.

La transformación transitoria también puede efectuarse por infección viral usando virus de plantas modificados.

Los virus que han demostrado ser útiles para la transformación de huéspedes de plantas incluyen CaMV, TMV, TRV y BV. La transformación de plantas usando virus de plantas está descrita en la Patente de EE.UU. No. 4,855,237 (BGV), EP-A 67,553 (TMV), Solicitud Japonesa publicada No. 63-14693 (TMV), EPA 194,809 (BV), EPA 278,667 (BV); y Gluzman, Y. et al., Comunicaciones en Biología Molecular: Vectores Virales, Laboratorio Cold Spring Harbor, Nueva York, pág. 172-189 (1988). Las partículas de pseudovirus para uso en la expresión de ADN extraño en muchos huéspedes, incluyendo plantas, están descritas en el documento WO 87/06261.

La construcción de virus de ARN de plantas para la introducción y expresión de secuencias de ácido nucleico exógeno no-virales en plantas está demostrado por las referencias anteriores, así como por Dawson, WO et al., Virología (1989) 172:285-292; Takamatsu et al. EMBO J. (1987) 6:307-311; French et al. Ciencia (1986) 231:1294-1297; y Takamatsu et al. Cartas FEBS (1990) 269:73-76.

Cuando el virus es un virus de ADN, modificaciones adecuadas pueden ser realizadas al virus mismo. Alternativamente, el ADN del virus puede clonarse primero en un plásmido bacteriano para facilitar la construcción del vector viral deseado con el ADN extraño. El ADN del virus luego puede ser eliminado del plásmido. Si el virus es un virus de ADN, un origen de replicación bacteriano puede ser adjunto al ADN viral, el cual luego es replicado por la bacteria. La transcripción y traducción de este ADN producirá la proteína de cubierta la cual encapsulará el ADN viral. Si el virus es un virus de ARN, el virus es generalmente clonado como un cDNA e insertado en un plásmido. El plásmido es luego utilizado para hacer todas las construcciones. El virus de ARN es luego producido al transcribir la secuencia viral del plásmido y la traducción de los genes virales para producir la(s) proteína(s) de cubierta que encapsulan el ARN viral.

La construcción de virus de ARN de plantas para la introducción y expresión en plantas de secuencias de ácido nucleico exógenas no virales tales como ser aquellas incluidas en el constructo de algunas realizaciones de la invención es demostrado mediante las referencias anteriores, así como en la Patente de EE.UU. No. 5,316,931.

5 En una realización, un ácido nucleico viral de la planta es provisto en el cual la secuencia codificante de proteína de cubierta nativa ha sido eliminada de un ácido nucleico viral, una secuencia codificante de proteína de cubierta viral de la planta no nativa y un promotor no nativo, preferiblemente el promotor subgenómico de la secuencia codificante de proteína de cubierta no nativa, capaz de expresión en la planta huésped, empaque del ácido nucleico viral de planta
10 recombinante y asegurando una infección sistémica del huésped por el ácido nucleico viral de planta recombinante, ha sido insertado. Alternativamente, el gen de recubrimiento de proteína puede ser inactivado mediante la inserción de la secuencia de ácido nucleico no nativa dentro de él, de modo tal que una proteína es producida. El ácido nucleico viral de planta recombinante puede contener uno o
15 más promotores subgenómicos no nativos adicionales. Cada promotor subgenómico no nativo es capaz de transcribir o expresar genes adyacentes o secuencias de ácido nucleico en la planta huésped e incapaz de recombinación entre sí y con promotores subgenómicos nativos. Las secuencias de ácido nucleico no nativas (extrañas) pueden ser insertadas adyacentes al promotor subgenómico viral de planta nativa o los promotores subgenómicos virales de planta nativa y no nativa si más de una secuencia de ácido nucleico es incluida. Las secuencias de ácido nucleico no nativas son transcritas o
20 expresadas en la planta huésped bajo control del promotor subgenómico para producir los productos deseados.

En una segunda realización, un ácido nucleico viral de planta recombinante es provisto como en la primera realización, excepto que la secuencia de codificación de la proteína de cubierta nativa es colocada adyacente a uno de los promotores subgenómicos de la proteína de cubierta no nativa en
25 lugar de una secuencia de codificación de proteína de cubierta no nativa.

En una tercera realización, un ácido nucleico viral de planta recombinante es provisto en el cual el gen de proteína de cubierta nativa está adyacente a su promotor subgenómico y uno o más promotores subgenómicos no nativos han sido insertados en el ácido nucleico viral. Los promotores subgenómicos no nativos insertados son capaces de transcribir o expresar genes adyacentes en una
30 planta huésped y son incapaces de recombinarse entre sí y con los promotores subgenómicos nativos. Las secuencias de ácido nucleico no nativas pueden insertarse adyacentes a los promotores virales de plantas subgenómicas no nativas de modo que dichas secuencias son transcritas o

expresadas en la planta huésped bajo el control de los promotores subgenómicos para producir el producto deseado.

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

Los vectores virales están encapsidados por las proteínas de cubierta codificadas por el ácido nucleico viral de planta recombinante para producir un virus de plantas recombinante. El ácido nucleico viral de la planta recombinante o el virus de planta recombinante es usado para infectar las plantas huésped apropiadas. El ácido nucleico viral de planta recombinante es capaz de replicarse en el huésped, diseminación sistémica en el huésped y transcripción o expresión de gen(es) extraño(s) (ácido nucleico aislado) en el huésped para producir la proteína deseada.

Independientemente del método de transformación/infección empleado, las presentes enseñanzas se refieren además a cualquier célula, p. ej., una célula de planta (p. ej., protoplasto) o una célula bacteriana comprendiendo constructo(s) de ácido nucleico como se describe en la presente.

Siguiendo la transformación, las células son sometidas a citometría de flujo para seleccionar células transformadas que exhiben fluorescencia emitida por el indicador fluorescente (es decir, “proteína fluorescente”).

Como se usa en la presente, “una proteína fluorescente” se refiere a un polipéptido que emite fluorescencia y es típicamente detectable por citometría o imaginología de flujo, por lo tanto, puede usarse como una base para la selección de células que expresan dicha proteína.

Ejemplos de proteínas fluorescentes que pueden ser utilizados como indicadores son la Proteína Verde Fluorescente (GFP), la Proteína Azul Fluorescente (BFP) y la Proteína Roja Fluorescente dsRed. Una lista no limitante de indicadores fluorescentes y demás incluye proteínas detectables por luminiscencia (p. ej. luciferasa) o ensayo colorimétrico (p. ej. GUS). Según una realización específica, el indicador fluorescente es DsRed o GFP.

Este análisis se realiza típicamente dentro de las 24-72 horas, p. ej., 48-72, 24-28 horas, después de la transformación. Para asegurar la expresión transitoria, ninguna selección de antibióticos es empleada, p. ej., antibióticos para un marcador de selección. El cultivo aún puede comprender antibióticos, pero no para un marcador de selección.

La citometría de flujo de las células de plantas es típicamente realizada mediante Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia (FACS). La Clasificación Celular Activada por Fluorescencia (FACS) es un método bien conocido para separar partículas, incluyendo células, basado en las

propiedades fluorescentes de las partículas (ver, p. ej., Kamarch, 1987, Métodos Enzymol, 151:150-165).

Por ejemplo, el FACS de las células GFP positivas hace uso de la visualización de los espectros de emisión verde versus los de emisión roja de los protoplastos excitados por un láser de 488 nm. Los protoplastos GFP positivos pueden ser distinguidos por su proporción incrementada de emisión verde a roja.

Lo que sigue es un protocolo no vinculante adaptado de Bastiaan et al. J Vis Exp . 2010; (36): 1673, el cual, es por la presente, incorporado como referencia. Los aparatos FACS están disponibles comercialmente, p. ej., FACSMelody (BD), FACS Aria (BD).

Una corriente de flujo es establecida con una boquilla de 100 μm y una presión de revestimiento de 20 psi. La densidad celular y la velocidad de inyección de la muestra pueden ser ajustadas al experimento particular basados en si el mejor rendimiento posible o la velocidad más rápida posible es deseada, p. ej., hasta 10,000,000 células/ml. La muestra se agita en el FACS para evitar la sedimentación de los protoplastos. Si la obstrucción del FACS es un problema, hay tres pasos posibles para la resolución de problemas: 1. Realizar un lavado a contra corriente de la línea de muestra. 2. Diluir la suspensión de protoplastos para reducir la densidad. 3. Limpiar la solución de protoplastos repitiendo el paso de filtración después de la centrifugación y la resuspensión. El aparato está preparado para medir la dispersión directa (FSC), la dispersión lateral (SSC) y la emisión a 530/30 nm para GFP y a 610/20 nm para la autofluorescencia de espectro rojo (RSA) después de la excitación con un láser de 488 nm. Estos son, en esencia, los únicos parámetros utilizados para aislar los protoplastos GFP positivos. Los ajustes de voltaje pueden ser utilizados: FSC - 60V, SSC 250V, GFP 350V, y RSA 335V. Notar que la configuración de voltaje óptima será diferente para cada FACS e incluso necesitará ajustarse a lo largo de toda la vida útil del clasificador de células.

El proceso es iniciado configurando una gráfica de puntos para la dispersión directa versus la dispersión lateral. Los ajustes de voltaje son aplicados de modo que los eventos medidos se centren en la gráfica. Luego, una gráfica de puntos es creada a partir de señales de fluorescencia verde versus roja. Los ajustes de voltaje son aplicados de modo que los eventos medidos produzcan una población diagonal centrada en la gráfica cuando se observa una suspensión de protoplastos de tipo salvaje (no-GFP). Una suspensión de protoplastos derivada de una línea de marcador GFP producirá una población clara de eventos fluorescentes verdes nunca vistos en muestras de tipo salvaje. Las restricciones de compensación son establecidas para ajustar por la superposición espectral entre GFP y RSA. La configuración correcta de restricción de compensación permitirá una mejor separación de los

protoplastos GFP positivos de los protoplastos y desechos no-GFP. Las restricciones utilizadas aquí son las siguientes: RSA, menos 17.91% GFP. Una puerta es establecida para identificar eventos GFP positivos, un control negativo de protoplastos no GFP debería ser usado para ayudar a definir los límites de la puerta. Un corte de dispersión directa es implementado para dejar pequeños restos fuera del análisis. Los eventos GFP positivos son visualizados en la gráfica FSC vs. SSC para ayudar a determinar la ubicación del corte. Por ejemplo, el límite de corte se establece en 5,000. Se debe notar que el FACS contará los desechos como eventos de clasificación y una muestra con altos niveles de desechos puede tener un porcentaje de eventos GFP positivos diferentes de lo esperado. Esto no es necesariamente un problema. Sin embargo, mientras más desechos haya en la muestra, más tardará la clasificación. Dependiendo del experimento y la abundancia del tipo de célula a ser analizada, el modo de precisión FACS se establece para obtener un rendimiento óptimo o una pureza óptima de las células clasificadas.

Después de la clasificación de FACS, agrupaciones de células de plantas transformadas seleccionadas positivamente (p. ej., protoplastos) que muestran el marcador fluorescente son recolectadas y se puede usar una alícuota para probar el evento de edición de ADN (paso opcional, ver Figura 1). Alternativamente (o siguiendo la validación opcional), los clones son cultivados en ausencia de selección (p. ej., antibióticos para un marcador de selección) hasta que se desarrollan en colonias, es decir, clones (al menos 28 días) y micro callos. Después de al menos 60-100 días en cultivo (p. ej., al menos 70 días, al menos 80 días), una porción de las células de los callos es analizadas (validadas) para: el evento de edición de ADN y la presencia del agente de edición de ADN, a saber, la pérdida de secuencias de ADN que codifican para el agente de edición de ADN, apuntando a la naturaleza transitoria del método.

Por lo tanto, los clones se validan para la presencia de un evento de edición de ADN también referido en la presente como “mutación” o “edición”, dependiendo del tipo de edición buscado, p. ej., inserción, eliminación, inserción-eliminación (Indel), inversión, sustitución y combinaciones de los mismos.

De acuerdo con una realización específica, el evento de edición del genoma comprende una eliminación, una sustitución de un única par base o una inserción de material genético de una segunda planta que de otro modo podría introducirse en la planta de interés mediante el mejoramiento tradicional.

De conformidad con una realización específica, el evento de edición del genoma no comprende una introducción de ADN extraño en un genoma de la planta de interés que no podría ser introducido a través del mejoramiento tradicional.

Los métodos para detectar la alteración de la secuencia son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, secuenciación de ADN (p. ej., secuenciación de próxima generación), electroforesis, un ensayo de detección de desajuste a base de enzimas y un ensayo de hibridación como ser PCR, RT-PCR, Protección de RNase, hibridación in situ, extensión del imprimador, análisis de Southern blot, Northern blot y transferencia de puntos. Varios métodos utilizados para la detección de polimorfismos de un nucleótido (SNP) también pueden ser utilizadas, como ser la endonucleasa T7 basada en PCR, la secuenciación de Heteroduplex y Sanger.

Otro método de validar la presencia de un evento de edición ADN p. ej., Indels comprende un ensayo de escisión de desajustes que hace uso de una enzima estructura selectiva (es decir, endonucleasa) que reconoce y escinde un ADN con desajuste.

El ensayo de escisión de desajuste es un método simple y rentable para la detección de indels y por lo tanto es el procedimiento típico para detectar mutaciones inducidas por la edición del genoma. El ensayo utiliza enzimas que escinden el ADN heteroduplex en desajustes y bucles extrahelicales formados por múltiples nucleótidos, produciendo dos o más fragmentos más pequeños. Un producto de PCR de ~ 300–1000 pb es generado con el sitio de escisión de nucleasa previsto fuera del centro de modo que los fragmentos resultantes son disímiles en tamaño y pueden resolverse fácilmente mediante electroforesis en gel convencional o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los productos de digestión marcados en extremos también se pueden analizar mediante electroforesis capilar o en gel automatizada. La frecuencia de indels en el locus se puede estimar midiendo las intensidades integradas del amplicón PCR y las bandas de ADN escindidas. El paso de la digestión dura de 15-60 min, y cuando la preparación de ADN pasos y PCR son agregados, los ensayos completos pueden ser completados en < 3 h.

Dos enzimas alternativas son típicamente utilizadas en este ensayo. La endonucleasa 1 de T7 (T7E1) es un resolvase que reconoce y escinde ADN emparejado de manera imperfecta en el primer, segundo o tercer enlace fosfodiéster previo al desajuste. La sensibilidad de un ensayo basado en T7E1 es 0.55%. En contraste, la nucleasa Surveyor™ (Transgenomic Inc., Omaha, NE, EE.UU.) es un miembro de la familia CEL de nucleasas de desajuste específico derivadas del apio. Reconoce y escinde los desajustes debido a la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) o pequeñas indels, cortando ambas cadenas de ADN más adelante del desajuste. Puede detectar indels

de hasta 12 nt y es sensible a las mutaciones presentes en frecuencias tan bajas como $\sim 3\%$, *es decir*. 1 en 32 copias.

Aún otro método para validar la presencia de una edición incluso comprende el análisis de fusión de alta resolución.

5 El análisis de fusión de alta resolución (HRMA) involucra la amplificación de una secuencia de ADN que abarca el objetivo genómico (90–200 pb) mediante PCR en tiempo real con la incorporación de un tinte fluorescente, seguido del análisis de la curva de fusión de los amplicones. HRMA se basa en la pérdida de fluorescencia cuando colorantes intercalados son liberados del ADN de cadena doble durante la desnaturalización térmica. Registra el perfil de
10 desnaturalización dependiente de temperatura de los amplicones y detecta si el proceso de fusión involucra una o más especies moleculares.

Otro método más es el ensayo de movilidad heteroduplex. Las mutaciones también pueden ser detectadas analizando fragmentos de PCR re-hibridados directamente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida nativa (PAGE). Este método aprovecha la migración diferencial de ADN
15 heterodúplex y homodúplex en geles de poliacrilamida. El ángulo entre las cadenas de ADN emparejadas y no emparejadas causadas por un indel significa que el ADN heterodúplex migra a una velocidad significativamente más lenta que el ADN homodúplex bajo condiciones nativas, y se pueden distinguir fácilmente en base a su movilidad. Fragmentos de 140-170 pb pueden ser separados en un gel de poliacrilamida al 15%. La sensibilidad de tales ensayos puede acercarse al 0.5% bajo
20 condiciones óptimas, que es similar a T7E1. (Después de volver a unir los productos de PCR, el componente de electroforesis del ensayo tarda ~ 2 h.

Otros métodos para validar la presencia de eventos de edición están descritos en detalle en Zischewski 2017 Avances Biotechnol. 1 (1): 95-104.

Se apreciará que los clones positivos pueden ser homocigotos o heterocigotos para el evento
25 de edición de ADN. El experto en la técnica seleccionará el clon para su posterior cultivo/regeneración de acuerdo con el uso previsto.

Los clones que exhiben la presencia de un evento de edición de ADN según se desee se analizan adicionalmente por la presencia del agente de edición de ADN. A saber, la pérdida de secuencias de ADN que codifican para el agente de edición de ADN, apuntando a la naturaleza transitoria del método.

30 Esto puede hacerse analizando la expresión del agente de edición de ADN (p. ej., en el mRNA, proteína), por ejemplo, mediante detección fluorescente de GFP o q-PCR.

Alternativamente, o adicionalmente, las células son analizadas para detectar la presencia del constructo de ácido nucleico como se describe en el presente documento o porciones del mismo, p. ej., la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido indicador o el agente de edición de ADN.

Clones que no muestran ADN que codifique el indicador fluorescente o el agente de edición de ADN (p. ej., como es afirmado mediante microscopía fluorescente, q-PCR y cualquier otro método como Southern blot, PCR, secuenciación) aun comprendiendo el(los) evento(s) de edición de ADN [mutación(es)] según se desee, se aíslan para su posterior procesamiento.

Por lo tanto, estos clones pueden almacenarse (p. ej., crioconservado).

Alternativamente, las células (p. ej., protoplastos) pueden ser regeneradas en plantas enteras primero creciendo en un grupo de células de plantas que se convierten en callos y luego mediante la regeneración de brotes (caulogénesis) del callo utilizando métodos de cultivo de tejidos vegetales. El crecimiento de protoplastos en callos y la regeneración de brotes requiere el equilibrio adecuado de los reguladores de crecimiento de las plantas en el medio de cultivo de tejidos que debe personalizarse para cada especie de planta.

Los protoplastos también pueden usarse para el mejoramiento de plantas, utilizando una técnica llamada fusión de protoplastos. Los protoplastos de diferentes especies son inducidos a fusionarse mediante el uso de un campo eléctrico o una solución de polietilenglicol. Esta técnica puede ser utilizada para generar híbridos somáticos en cultivo de tejidos.

Métodos de regeneración de protoplastos son bien conocidos en la técnica. Varios factores afectan el aislamiento, el cultivo y la regeneración de protoplastos, a saber, el genotipo, el tejido donante y su pre-tratamiento, el tratamiento enzimático para el aislamiento de protoplastos, el método de cultivo de protoplastos, el cultivo, el medio de cultivo y el entorno físico. Para una revisión exhaustiva, ver Maheshwari et al. 1986 Diferenciación de Protoplastos y de Células vegetales transformadas: 3-36. Springer-Verlag, Berlín.

Las plantas regeneradas pueden ser sometidas a un mejoramiento adicional y selección según lo considere conveniente el artesano experto.

La planta o las células de la misma carecen de un transgen que codifique un agente de edición de ADN.

El fenotipo de las líneas finales, plantas o productos intermedios de mejoramiento pueden ser analizados como tal determinando la secuencia del gen que codifica el componente de la ruta de biosíntesis de etileno, la expresión del mismo en el nivel de mRNA o proteína, la actividad de la proteína y/o analizando propiedades de la fruta (vida útil).

Producción de etileno: la biosíntesis de etileno puede ser medida en pequeñas plántulas a través de cromatografía de gases (GC) o ensayos a base de láser (Cristescu SM, Mandon J, Arslanov D, De Pessemier J, Hermans C, Harren FJM Los métodos actuales para la detección de etileno en plantas. Ann Bot-London. 2013;111(3):347–60).

5 Como se ilustra aquí y en la sección de Ejemplos que sigue. Los presentes inventores fueron capaces de transformar el banano con un agente(s) de edición del genoma, mientras evita la transgénesis estable.

Por lo tanto, la presente metodología permite la edición del genoma sin la integración de un indicador seleccionable o filtrable.

10 Por lo tanto, las realizaciones de la invención se refieren además a plantas, células de plantas y productos procesados de plantas que comprenden el/los evento/s de edición de genes generados de acuerdo con las presentes enseñanzas.

Por lo tanto, las presentes enseñanzas también se refieren a partes de las plantas como se describe en la presente o productos procesados de las mismas.

15 La fruta de banano y los productos a base de fruta de banano, así como sus métodos de producción, son contemplados usando las plantas descritas en este documento.

También se contemplan los subproductos del banano y los métodos para producir los mismos, tales como cáscaras, hojas, seudotallo, tallo, e inflorescencia en diversas aplicaciones alimentarias y no alimentarias que sirven como agente espesante, colorante y sabor, fuente alternativa de macro y micronutrientes, nutracéuticos, alimento para el ganado, fibras naturales y fuentes de compuestos bioactivos naturales y biofertilizantes.

Según una realización específica, los productos procesados comprenden ADN.

Se espera que durante la vida de una patente que madure a partir de esta solicitud se desarrollarán muchos agentes de edición de ADN relevantes y el alcance del término agente de edición de ADN tiene la intención de incluir todas estas nuevas tecnologías *a priori*.

Como se usa en la presente, el término “aproximadamente” se refiere a $\pm 10\%$.

Los términos “comprende”, “comprendiendo”, “incluye”, “incluyendo”, “que tiene” y sus conjugados significan “incluyendo, pero no limitado a”.

El término “que consiste en” significa “incluyendo y limitado a”.

30 El término “que consiste esencialmente en” significa que la composición, método o estructura puede incluir ingredientes, pasos y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, pasos y/o partes

adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicada.

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

A lo largo de esta solicitud, varias realizaciones de esta invención pueden ser presentadas en un formato de rango. Debe entenderse que la descripción en formato de rango es meramente por conveniencia y brevedad y no debería interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la invención. En consecuencia, la descripción de un rango debería ser considerada de haber revelado específicamente todos los subrangos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese rango. Por ejemplo, la descripción de un rango como del 1 al 6 debería ser considerada de haber revelado específicamente subrangos tales como del 1 a 3, del 1 a 4, del 1 a 5, del 2 a 4, del 2 a 6, del 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese rango, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Esto aplica independientemente de la amplitud del rango.

Siempre que se indique un rango numérico en este documento, se pretende incluir cualquier número citado (fraccional o integral) dentro del rango indicado. Las frases “varía/ varía entre” un primer número de indicación y un segundo número de indicación y “varía/ varía entre” un primer número de indicación “a” un segundo número de indicación se usan aquí de manera intercambiable y están destinados a incluir el primer y el segundo número indicado y todos los números fraccionales e integrales entre ellos.

Como se usa en la presente, el término “método” se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea dada que incluye, entre otros, esos maneras, medios, técnicas y procedimientos ya sea conocidos o desarrollados fácilmente a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por profesionales de las artes químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

Cuando se hace referencia a listados de secuencias particulares, dicha referencia debe entenderse que también abarca secuencias que corresponden sustancialmente a su secuencia complementaria que incluye variaciones de secuencia menores, que resultan de, p. ej., errores de secuencia, errores de clonación u otras alteraciones resultantes en la sustitución de bases, eliminación de bases o adición de bases, siempre que la frecuencia de tales variaciones sea menor que 1 en 50 nucleótidos, alternativamente, menor que 1 en 100 nucleótidos, alternativamente, menor que 1 en 200

nucleótidos, alternativamente, menor que 1 en 500 nucleótidos, alternativamente, menor de 1 en 1000 nucleótidos, alternativamente, menor de 1 en 5,000 nucleótidos, alternativamente, menor de 1 en 10,000 nucleótidos.

Se entiende que cualquier número de identificación de secuencia (SEQ ID NO) divulgado en la solicitud instantánea puede referirse a una secuencia de ADN o una secuencia de ARN, dependiendo del contexto en donde esa SEQ ID NO es mencionada, incluso si esa SEQ ID NO se expresa solo en un formato de secuencia de ADN o un formato de secuencia de ARN. Por ejemplo, una SEQ ID NO: es expresada en un formato de secuencia de ADN (*p. ej.*, recitando T para timina), pero puede referirse ya sea a una secuencia de ADN que corresponde a una secuencia de ácido nucleico dada, o la secuencia de ARN de una secuencia de ácido nucleico de molécula de ARN. Similarmente, aunque algunas secuencias son expresadas en un formato de secuencia de ARN (*p. ej.*, recitar U para uracilo), dependiendo del tipo actual de molécula siendo descrita, puede referirse a la secuencia de una molécula de ARN que comprende un dsRNA, o la secuencia de una molécula de ADN que corresponde a la secuencia de ARN mostrada. En cualquier caso, se prevén moléculas de ADN y ARN teniendo secuencias descritas con cualquier sustituto son visualizadas.

Se aprecia que ciertas características de la invención, las cuales son, por claridad, descritas en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden ser provistas en combinación en una sola realización. Por el contrario, varias características de la invención, las cuales son, por brevedad, descritas en el contexto de una sola realización, también pueden ser provistas por separado o en cualquier sub-combinación adecuada o como sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización sea inoperante sin esos elementos.

Varias realizaciones y aspectos de la presente invención como se delinean anteriormente y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

Como se usa en la presente, el término “aproximadamente” se refiere a $\pm 10\%$.

Los términos “comprende”, “comprendiendo”, “incluye”, “incluyendo”, “que tiene” y sus conjugados significan “incluyendo, pero no limitado a”.

El término “que consiste en” significa “incluyendo y limitado a”.

El término “que consiste esencialmente en” significa que la composición, método o estructura puede incluir ingredientes, pasos y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, pasos y/o partes

adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicada.

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

A lo largo de esta solicitud, varias realizaciones de esta invención pueden ser presentadas en un formato de rango. Debe entenderse que la descripción en formato de rango es meramente por conveniencia y brevedad y no debería interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la invención. En consecuencia, la descripción de un rango debería ser considerada de haber revelado específicamente todos los subrangos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese rango. Por ejemplo, la descripción de un rango como del 1 al 6 debería ser considerada de haber revelado específicamente subrangos tales como del 1 a 3, del 1 a 4, del 1 a 5, del 2 a 4, del 2 a 6, del 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese rango, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Esto aplica independientemente de la amplitud del rango.

Siempre que se indique un rango numérico en este documento, se pretende incluir cualquier número citado (fraccional o integral) dentro del rango indicado. Las frases “varía/ varía entre” un primer número de indicación y un segundo número de indicación y “varía/ varía entre” un primer número de indicación “a” un segundo número de indicación se usan aquí de manera intercambiable y están destinados a incluir el primer y el segundo número indicado y todos los números fraccionales e integrales entre ellos.

Como se usa en la presente, el término “método” se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea dada que incluye, entre otros, esos maneras, medios, técnicas y procedimientos ya sea conocidos o desarrollados fácilmente a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por profesionales de las artes químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

Como se usa en el presente documento, el término "tratando" incluye abrogación, inhibir, retrasar o revertir sustancialmente la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

Cuando se hace referencia a listados de secuencias particulares, dicha referencia debe entenderse que también abarca secuencias que corresponden sustancialmente a su secuencia

complementaria que incluye variaciones de secuencia menores, que resultan de, p. ej., errores de secuencia, errores de clonación u otras alteraciones resultantes en la sustitución de bases, eliminación de bases o adición de bases, siempre que la frecuencia de tales variaciones sea menor que 1 en 50 nucleótidos, alternativamente, menor que 1 en 100 nucleótidos, alternativamente, menor que 1 en 200 nucleótidos, alternativamente, menor que 1 en 500 nucleótidos, alternativamente, menor de 1 en 1000 nucleótidos, alternativamente, menor de 1 en 5,000 nucleótidos, alternativamente, menor de 1 en 10,000 nucleótidos.

Se entiende que cualquier número de identificación de secuencia (SEQ ID NO) divulgado en la solicitud instantánea puede referirse a una secuencia de ADN o una secuencia de ARN, dependiendo del contexto en donde esa SEQ ID NO es mencionada, incluso si esa SEQ ID NO se expresa solo en un formato de secuencia de ADN o un formato de secuencia de ARN. Por ejemplo, una SEQ ID NO: es expresada en un formato de secuencia de ADN (*p. ej.*, recitando T para timina), pero puede referirse ya sea a una secuencia de ADN que corresponde a una secuencia de ácido nucleico dada, o la secuencia de ARN de una secuencia de ácido nucleico de molécula de ARN. Similarmente, aunque algunas secuencias son expresadas en un formato de secuencia de ARN (*p. ej.*, recitar U para uracilo), dependiendo del tipo actual de molécula siendo descrita, puede referirse a la secuencia de una molécula de ARN que comprende un dsRNA, o la secuencia de una molécula de ADN que corresponde a la secuencia de ARN mostrada. En cualquier caso, se prevén moléculas de ADN y ARN teniendo secuencias descritas con cualquier sustituto son visualizadas.

Se aprecia que ciertas características de la invención, las cuales son, por claridad, descritas en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden ser provistas en combinación en una sola realización. Por el contrario, varias características de la invención, las cuales son, por brevedad, descritas en el contexto de una sola realización, también pueden ser provistas por separado o en cualquier sub-combinación adecuada o como sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización sea inoperante sin esos elementos.

Varias realizaciones y aspectos de la presente invención como se delinean anteriormente y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, los cuales junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención de una manera no-limitante.

Generalmente, la nomenclatura utilizada aquí y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas de ADN molecular, bioquímicas, microbiológicas y recombinantes. Tales técnicas son explicadas a fondo en la literatura. Ver, por ejemplo, “Clonación molecular: un manual de laboratorio” Sambrook et al., (1989); “Protocolos actuales en biología molecular” Volúmenes I-III Ausubel, RM, ed. (1994); Ausubel et al., “Protocolos actuales en biología molecular”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “Una guía práctica para la clonación molecular”, John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., “ADN Recombinante”, Scientific American Books, Nueva York; Birren y col. (eds) “Análisis del Genoma: Una Serie de Manual de Laboratorio”, vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como están expuestas en las Patentes de EE.UU. Nos. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 y 5,272,057; “Biología Celular: Un Manual de Laboratorio Laboratory” , Volúmenes I-III Cellis, JE, ed. (1994); “Cultura de células animales - Un manual de técnica básica” por Freshney, Wiley-Liss, NY (1994), tercera edición; “Protocolos actuales en inmunología” Volúmenes I-III Coligan JE, ed. (1994); Stites et al. (eds), “Inmunología básica y clínica” (8^{va} edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), “Métodos seleccionados en inmunología celular”, WH Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles están ampliamente descritos en la patente y literatura científica, ver, p. ej., las patentes de EE.UU. Nos. 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074 ; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 y 5,281,521; “Síntesis de oligonucleótidos” Gait, MJ, ed. (1984); “Hibridación de ácidos nucleicos” Hames, BD y Higgins SJ, eds. (1985); “Transcripción y traducción” Hames, BD y Higgins SJ, eds. (1984); “Cultura de la Célula Animal” Freshney, RI, ed. (1986); “Células y enzimas inmovilizadas” IRL Press, (1986); “Una guía práctica para la clonación molecular” Perbal, B., (1984) y “Métodos en la Enzimología” Vol. 1-317, Academic Press; “Protocolos PCR : Una guía de métodos y aplicaciones”, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., “Estrategias para la purificación y caracterización de proteínas - Un manual del curso de laboratorio” CSHL Press (1996); todos los cuales están incorporados por referencia como si estuvieran completamente expuestos en la presente. Otras referencias generales son proporcionadas a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos allí descritos son

bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector. Toda la información contenida en ellas es incorporada a la presente como referencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

5 **Generación y mantenimiento de Callos Embriogénicos y suspensión celular.**

Un callo embriogénico es desarrollado a partir de un explante inicial, como ser flores masculinas inmaduras o punta de brote, según lo descrito por Ma, 1988 (Ma SS 1991 Embriogénesis somática y regeneración de plantas a partir del cultivo en suspensión de células de banano. Taipei, Taiwán, 8-9 de Marzo de 1988, págs. 181-188) y Schoofs, 1997 (Schoofs H. 1997. El origen de las
10 células embriogénicas en Musa. Tesis doctoral, KULeuven, Bélgica). Las suspensiones de células embriogénicas son iniciadas a partir de callos altamente embriogénicos recién desarrollados en medio líquido. El 80% del medio se actualiza cada 12-14 días hasta que la suspensión celular iniciada esté completamente establecida (6-9 meses).

Clonación de sgRNA

15 El plásmido de transfección utilizado estaba compuesto por 4 módulos que comprenden 1. eGFP dirigido por el promotor CaMV35s terminado por una secuencia de terminación G7; 2. Cas9 (codón humano optimizado) conducido por el promotor CaMV35s terminado por la secuencia de terminación Mas; 3. promotor AtU6 que conduce sgRNA para guía 1; 4. promotor AtU6 que conduce sgRNA para guía 2. Se puede usar un vector binario tal como pCAMBIA o ADN pRI-201-AN.

20 **Validación de sistema de edición de genes al focalizar el gen indicador exógeno GFP**

El sistema GE no-transgénico propuesto aquí fue validado y optimizado a través de la focalización del ADN del gen exógeno (GFP). Para analizar la fuerza de diferentes promotores de ARN polimerasa III (pol-III), se diseñó sgRNA para apuntar a eGFP en el complejo CRISPR Cas9 y luego el efecto de diferentes promotores en la eliminación de la expresión de eGFP en células
25 transformadas fue probado.

Específicamente, los plásmidos (p. ej. pBluescript, pUC19) contenían cuatro unidades transcripcionales conteniendo Cas9, eGFP, dsRED y sgRNA-GFP impulsadas por diferentes promotores pol-II y pol-III (p. ej. CAMV 35S, U6). Estos plásmidos fueron transfectados en cultivos de protoplastos y analizados mediante FACS después de un período de incubación de 24-72 horas. La
30 alta frecuencia en la expresión de dsRED (o mCherry, RFP) indicó una alta eficiencia de transfección, mientras que la baja frecuencia en la expresión de eGFP indicó la edición exitosa de genes a través de CRISPR-Cas9. Por lo tanto, la línea que mostró la relación de expresión eGFP:dsRED más baja fue

el promotor de pol-III elegido, ya que causó la mayor proporción de inactivación de eGFP a través de los complejos CRISPR Cas9

Diseño de plásmido final

Para la expresión transitoria, un plásmido que contenía cuatro unidades transcripcionales fue utilizado. La primera unidad transcripcional contenía la expresión conductora del promotor CaMV-35S de Cas9 y el terminador del virus del mosaico del tabaco (TMV). La siguiente unidad transcripcional consistió en otro promotor CaMV-35S que impulsaba la expresión de eGFP y el terminador nos. Las unidades transcripcionales tercera y cuarta contenían cada una el promotor Arabidopsis U6 que expresaba sgRNA a genes objetivo (como fue mencionado, cada vector comprende dos sgRNAs).

Aislamiento de Protoplastos

Los protoplastos fueron aislados incubando material de planta (p. ej., hojas, callos, suspensiones celulares) en una solución de digestión (1% de celulasa, 0.5% de macerozima, 0.5% de driselasa, 0.4 M de manitol, 154 mM de NaCl, 20 mM de KCl, 20 mM de MES pH 5.6, 10 mM de CaCl₂) durante 4-24h a temperatura ambiente y agitación suave. Después de la digestión, el material vegetal restante se lavó con solución W5 (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 2 mM MES pH 5.6) y la suspensión de protoplastos fue filtrada a través de un filtro de 40µm. Después de centrifugar a 80g durante 3 minutos a temperatura ambiente, los protoplastos se resuspendieron en 2 ml de tampón W5 y se precipitaron por gravedad en hielo. El sedimento de protoplastos final se resuspendió en 2 ml de MMg (manitol 0.4 M, 15 mM MagCl₂, 4 mM MES, pH 5.6) y se determinó la concentración de protoplastos usando un hemocitómetro. La viabilidad de los protoplastos se estimó utilizando la tinción con azul de tripano.

Transfección de plásmidos mediada por Polietilenglicol (PEG). La transfección por PEG de protoplastos de banano fue efectuada utilizando una versión modificada de la estrategia reportada por Wang et al. (2015) [Wang, H., et al., *Un eficiente sistema de expresión transitoria de genes mediado por PEG en protoplastos de uva y su aplicación en estudios de localización subcelular de enzimas de biosíntesis de flavonoides*. Scientia Horticulturae, 2015. **191**: pág. 82-89]. Los protoplastos fueron resuspendidos a una densidad de $2-5 \times 10^6$ protoplastos/ml en solución MMg. 100-200 µl de suspensión de protoplastos se añadió a un tubo que contenía el plásmido. La relación plásmido:protoplastos afecta en gran medida la eficiencia de transformación, por tanto, un

rango de concentraciones de plásmido en suspensión de protoplastos, 5-300 µg/µl, se sometió a ensayo. Solución de PEG (100-200 µl) fue agregada a la mezcla y se incubó a 23°C durante varios periodos de tiempo que van desde 10-60 minutos. La concentración PEG4000 se optimizó, un rango de 20-80% PEG4000 en 200-400 mM manitol, 100-500 mM CaCl solución fue ensayada. Entonces los protoplastos fueron lavados en W5 y centrifugados a 80g durante 3 min, resuspensión anterior en 1 ml de W5 e incubado en la oscuridad a 23°C. Después de la incubación durante 24-72 h, se detectó fluorescencia por microscopía.

Electroporación

Un plásmido conteniendo GFP/RFP dirigido por Pol2, NLS-Cas9 dirigido por Pol2 y sgRNA focalizando los genes relevantes dirigido por Pol3 fue introducido a las células mediante electroporación (BIORAD-GenePulserII; Miao y Jian 2007 Protocolos de la Naturaleza 2(10):2348 - 2,353. 500 µl de protoplastos se transfirieron a cubetas de electroporación y mezclados con 100 µl de plásmido (10-40 µg de ADN). Los protoplastos se electroporaron a 130 V y 1,000 F y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. 1 ml de medio de cultivo de protoplastos fue añadido a cada cubeta y la suspensión de protoplastos fue vertida en una pequeña placa de Petri. Después de la incubación durante 24-48 h se detectó fluorescencia por microscopía.

Clasificación FACS de células que expresan proteínas fluorescentes

48 horas después de la administración del plásmido/ARN, las células fueron recolectadas y clasificadas para la expresión de proteínas fluorescentes usando un citómetro de flujo con el fin de enriquecer las células que expresan GFP/agente de edición [Chiang, TW, et al., *CRISPR-Cas9 (D10A) Cribado genotípico y fenotípico a base de nickasa para mejorar la edición del genoma*. Sci Rep, 2016. **6**: pág. 24356]. Este paso de enriquecimiento permite evitar la selección de antibióticos y recolectar solo células que expresan transitoriamente la proteína fluorescente, Cas9 y el sgRNA. Estas células pueden probarse adicionalmente para la edición del gen objetivo mediante unión de extremo no homóloga (NHEJ) y la pérdida de la expresión génica correspondiente.

Formación de colonias

Las células positivas para proteínas fluorescentes fueron tomadas muestreadas en parte y utilizadas para las pruebas de extracción de ADN y de edición del genoma (GE) y en parte colocadas en placas a alta dilución en medio líquido para permitir la formación de colonias durante 28-35 días. Las colonias fueron recogidas, cultivadas y divididas en dos alícuotas. Se usó una alícuota para las pruebas de la extracción de ADN y de edición del genoma (GE) y las pruebas CRISPR libres de ADN (ver abajo), mientras que las otras se mantuvieron en cultivo hasta que su estado fue

verificado. Solo se seleccionaron para continuar los que muestran claramente los que son libres de GE de y CRISPR libre de ADN.

Después de 20 días en la oscuridad (desde la división para el análisis de GE, es decir, 60 días, por lo tanto, 80 días en total), las colonias fueron transferidas al mismo medio, pero con glucosa reducida (0.46 M) y agarosa al 0.4% e incubadas a baja intensidad de luz. Después de seis semanas, la agarosa se cortó en rodajas y se colocó en el medio de cultivo de protoplastos con glucosa 0.31 M y gelrita al 0.2%. Después de un mes, las protocolonias (callos) se subcultivaron en medios de regeneración (MS de concentración media + vitaminas B5, 20 g/l de sacarosa). Las plántulas regeneradas fueron colocadas en medios solidificados (agar al 0.8%) a baja intensidad de luz a 28°C. Después de 2 meses, las plántulas se transfirieron a la tierra y se colocaron en un invernadero a 80-100% de humedad.

Filtración por modificación de gen y ausencia de ADN de sistema CRISPR

De cada colonia se extrajo ADN de una alícuota de protoplastos clasificados por GFP (paso opcional) y de colonias derivadas de protoplastos y una reacción de PCR fue realizada con imprimadores que flanquean el gen objetivo. Se toman medidas para muestrear la colonia ya que se utilizarán colonias positivas para regenerar la planta. Una reacción de control de protoplastos sometidos al mismo método, pero sin Cas9-sgRNA es incluida y considerada como tipo salvaje (WT). Los productos de PCR fueron luego separados en un gel de agarosa para detectar cualquier cambio en el tamaño del producto en comparación con el WT. Los productos de reacción de PCR que varían de los productos WT fueron clonados en pBLUNT o PCR-TOPO (Invitrogen). Alternativamente, la secuenciación fue utilizada para verificar el evento de edición. Se recogieron las colonias resultantes, se aislaron y se secuenciaron los plásmidos para determinar la naturaleza de las mutaciones. Los clones (colonias o callos) que albergan mutaciones que se pronosticaron como resultado de alteración del dominio o pérdida completa de la proteína correspondiente fueron elegidos para la secuenciación del genoma completo con el fin de validar que estaban libres del ADN/ARN del sistema CRISPR y detectar las mutaciones a nivel de ADN genómico.

Los clones positivos que exhibían la GE deseada se probaron primero para la expresión de GFP vía análisis de microscopía (comparado con WT). Luego, las plantas negativas para GFP se fueron analizadas para determinar la presencia del casete Cas9 por PCR usando imprimadores específicos (o secuenciación de próxima generación, NGS) para la secuencia Cas9 o cualquier otra

secuencia del casete de expresión. Otras regiones del constructo también se pueden probar para asegurar que nada del constructo original esté en el genoma.

Regeneración de Plantas

Producción de etileno: la biosíntesis de etileno puede ser medida en pequeñas plántulas mediante cromatografía de gases (GC) o ensayos basados en láser (Cristescu et al., 2013, supra).

EJEMPLO 2

Edición de Genoma en genes ACS y ACO de banano y regeneración de planta

Tabla 1. Lista de imprimadores

ID	Secuencia/SEQ ID NO:
42	Atgaggatctacggcgaggagcac/55
44	Atggggctccacgttgatgaacac/56
46	Atggggattcccgggtgacag/57
50	Atggcgtgctccttcccgg/58
236	Gtggcactgaataggaggagt/59
237	Cgatcggctcatcctcaaacag/60
239	Gagtttcgagccttctgtaagca/61
240	Cctgaagtctcgatcgaatctgg/62
242	Gtggcagcgaataggaggagt/63
243	Gaacggggaagtgacgacgaattac/64
245	Gaggcgatcgacatcctgttgc/65
246	Ctctatctgatctccgaggtgacc/66
249	Ggtgcaccacgctctgtac/67
250	Atggattccttccggttatcgacatg/68
251	Ctcgagctggtcgccgag/69
277	Accgaagcccctctaacc/70
278	Gtatggctgacaccatcacc/71
321	Ggggtcatccaaatgggactg/72
322	Ggctatatataagtagcaacg/73
323	Acactccagatagaagcac/74

10

Los sgRNA y las secuencias objetivo se describen en la Figura 26.

Un protocolo robusto para el aislamiento eficiente de protoplastos de suspensiones de células *Musa acuminata* fue seguido de acuerdo con el Ejemplo 1 anterior, para a continuación transfectarlos con los plásmidos que portan la maquinaria CRISPR/Cas9 para apuntar a los genes de interés (genes endógenos ACS y ACO) y enriquecer para células que expresan un indicador usando la clasificación FACS. Para lograr este objetivo, los presentes inventores (i) generaron y mantuvieron material

15

embriogénico; (ii) protoplastos aislados de ese material; (iii) transfectados con plásmidos específicos dirigidos a genes ACS y/o ACO; (iv) enriquecido para células que expresan un marcador fluorescente como un sustituto de células (p. ej., mCherry) que portan el complejo CRISPR/Cas9 y los sgRNA que apuntan al gen de interés; y (v) protoplastos clasificados de forma avanzada a través de una tubería de regeneración de protoplastos para regenerar las plántulas.

Para probar si los protoplastos viables del material de planta de *Musa acuminata* podrían ser recuperados, el material de planta de banano (suspensiones celulares) fue incubado en una solución de digestión durante 4-24h a temperatura ambiente con agitación suave. Después de la digestión, el material de planta se lavó, se filtró y fue re-suspendido en 2 ml de tampón MMG (0.4 M manitol, 15 mM MagCl₂, 4 mM MES, pH 5.6)). La concentración de protoplastos fue determinada y ajustada a 1×10^6 . A continuación, el plásmido de ADN pAC2010 (portando mCherry como marcador fluorescente) fue incubado con los protoplastos derivados del banano en presencia de polietilenglicol (PEG). La expresión de mCherry en los protoplastos se detectó por microscopía de fluorescencia 3 días después de la transfección (Figura 3).

El siguiente paso en la recuperación de plantas editadas genéticamente fue suministrar el complejo CRISPR/Cas9 y los sgRNA que se apuntan a los genes de interés en los protoplastos de banano y se enriquecen para las células que portan dicho complejo mediante la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), así separando exitosamente las células de banano transfectadas que expresan transitoriamente la proteína fluorescente, Cas9 y el sgRNA. Usando FACS, protoplastos de expresión mCherry positiva fueron enriquecidos y recolectados (Figura 4 A). Se confirmó que los protoplastos clasificados todavía estaban intactos y, de hecho, expresaban el marcador fluorescente mediante microscopía de fluorescencia (Figura 4 B).

La naturaleza transitoria de la transfección del complejo CRISPR/Cas9 y los sgRNA que apuntan a genes de interés en los protoplastos de *Musa acuminata* fueron examinados a continuación. Dado que todos nuestros plásmidos consisten de un marcador fluorescente (p. ej. DsRed, mCherry), Cas9 y sgRNAs (bajo un promotor U6 y que apuntan a un gen endógeno de interés), la expresión del marcador fluorescente en los protoplastos de banano transfectados se siguió con el tiempo y se usó un número de protoplastos mCherry positivos como sustituto para obtener una indicación de cuánto tiempo podrían expresarse el complejo CRISPR/Cas9 y los sgRNA (Figuras 5 A-C). Se usó FACS para cuantificar el porcentaje de protoplastos de banano mCherry positivos a lo largo del tiempo y establecer el número total de protoplastos de banano mCherry positivos a los 3 días después de la transfección (dpt) como 100%. Se descubrió que ya a 10 dpt, los protoplastos de banano

mCherry positivos disminuyeron en un 30% del número inicial de protoplastos de banano mCherry positivos y en 25 dpt, casi el 80% de los protoplastos de banano transfectedos no mostraron fluorescencia alguna (Figura 5 C). La expresión de mCherry también fue monitoreada en protoplastos de banano no clasificados por microscopía a 3 dpt (Figura 5 A; Figura 6 A), 6 dpt (Figura 6 A) y 10 dpt (Figura 5 B; Figura 6 A), lo cual confirmó que efectivamente la expresión de mCherry disminuye con el tiempo. Además, la microscopía de fluorescencia de protoplastos de banano clasificados muestra la reducción progresiva en número e intensidad de protoplastos positivos para mCherry (Figura 6 B) como se ve por FACS (Figura 4A). Tomados en conjunto, estos resultados indican que la expresión de vectores que portan el complejo CRISPR/Cas9 y sgRNAs es transitoria y no se espera ninguna otra actividad o integración de Cas9 en el genoma de la planta.

Para reducir los niveles de etileno en plantas de banano, lo cual puede resultar en vida útil prolongada de frutas de banano, la eliminación de genes implicados en la biosíntesis de etileno, incluyendo el ACS y ACO resaltado (Figura 7 A, 7 B) fue intentado. Sin embargo, el genoma del banano contiene múltiples secuencias que son homólogas a estos genes.

Para identificar los genes dentro del genoma del banano, los cuales codifican ACS y ACO funcionales, secuencias homólogas de rutas caracterizadas en modelo o especies de cultivo se identificaron. El proceso involucra en una serie de pasos secuenciales para análisis comparativo de secuencias de ADN y proteínas que apuntan a la reconstrucción de la historia evolutiva de genes a través del análisis filogenético, filtrando candidatos mediante la validación de su expresión en el tejido general y de destino, y la secuenciación de genes candidatos para asegurar diseño de sgRNA apropiado (para evitar desajustes). Este procedimiento permitió la selección de los genes, la identificación de regiones objetivo optimizadas para la eliminación (dominios conservados y potencialmente catalíticos), y el diseño de sgRNAs apropiados.

Esta tubería está basada en la suposición que las proteínas homólogas con un ancestro en común pueden tener una función similar y al realizar una reconstrucción filogenética, las familias de genes son establecidas y evaluadas para la diversidad funcional en el contexto evolutivo. Esto es particularmente importante para las especies de plantas que han sufrido duplicaciones del genoma a gran escala y para las familias de genes expandidos. Sin embargo, los parálogos dentro de una familia de genes no necesariamente tienen la misma función y parte del proceso es apuntar a una selección de genes dentro de una familia, ya sea individualmente o en grupo, para también suponer la redundancia.

Brevemente, la síntesis de etileno involucra una reacción de tres pasos: la enzima S-adenosilmetionina sintasa (S-AdoMet) cataliza la adenosilación de la metionina. Luego, S-AdoMet se

metaboliza en el primer compuesto comprometido con la biosíntesis de etileno 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) por la enzima ACC sintasa (ACS). Finalmente, ACC es convertido en etileno por la enzima ACC oxidasa (ACO) (Figura 7 A) (Cara y Giovannoni. 2008. Ciencia de las Plantas. Vol. 175. pág. 106-113). Durante la maduración, en frutas climatéricas como el banano, tanto la ACC sintasa (ACS) como la ACC oxidasa (ACO) son inducidos y contribuyen a la regulación de la biosíntesis de etileno (Figura 7 B) (Liu et al., 1999. Fisiología de Plantas. Vol 121, pág. 1257-1265). La regulación del etileno ha sido propuesta como un proceso de dos sistemas en el que el sistema 1 es funcional durante el crecimiento vegetativo normal y el etileno tiene un papel autoinhibidor y es responsable de producir niveles basales de etileno que son detectados en todos los tejidos, incluyendo aquellos de frutos no-climatéricos mientras que el Sistema 2 funciona durante la maduración de los frutos climatéricos y quizás la senescencia (Figura s 7A-B). En la etapa de transición, los reguladores de maduración han sido identificados como ser RIN, CNR, etc., y también la inducción de un gen ACS específico (*LeACS4*) que conduce a la autocatálisis de etileno, lo que resulta en una retroalimentación negativa en el sistema 1. Además, otros genes ACS y ACO (*LeACS2*, 4 y *LeACO1*, 4) son inducidos y son responsables de la alta producción de etileno a través del sistema 2 (Figura 7 A) (Cara y Giovannoni. 2008. Ciencia de las Plantas. Vol. 175. pág. 106-113).

El análisis de secuenciación del genoma completo de *Musa acuminata* reveló duplicaciones ancestrales específicas del genoma completo (WGD) en el linaje *Musa* y su impacto en el fraccionamiento de genes (D'Hont et al, 2012. Naturaleza Vol 488; Martin et al, 2016. BMC Genomics. 17:243). Además, se ha reportado que algunas familias de genes de banano involucradas en la biosíntesis y la señalización de etileno evolucionaron a través de WGD y fueron retenidas preferentemente (Jourda et al., 2014. Nuevo Fitologista. Vol. 202. pág. 986-1000). Interesantemente, los genes principales en la ruta del etileno son expandidos y los perfiles de expresión génica sugirieron redundancia funcional para varios de esos genes derivados de WGD (Jourda et al., 2014. Nuevo Fitologista. Vol. 202. pág. 986-1000). Por lo tanto, la selección de genes candidatos requiere una evaluación cuidadosa.

La ruta de biosíntesis de etileno ha sido bien estudiada en el tomate y los genes ACS y ACO involucrados en los pasos a lo largo de los sistemas 1 y 2 han sido caracterizados. Estos genes caracterizados fueron utilizados como secuencias de consulta y están resaltados en la Figura 9 y la Figura 10 para ACS y ACO, respectivamente. Búsquedas de similitud confirmaron que tanto las familias ACS y ACO son e en banano (Figuras 8, Figura 9, respectivamente) y varios candidatos de genes ACS y ACO fueron seleccionados para estudios adicionales. La secuenciación de estos

candidatos en distintas variedades de banano permitió el diseño y selección específicos de sgRNA como se muestra en la Figura 10. Además, para obtener algunas perspectivas sobre las posibles funciones de estos genes, se recuperaron los datos de expresión disponibles públicamente de frutos de banano en maduración fueron sacados para todos los genes candidatos ACS y ACO (ACS: Ma09_g19150; Ma04_g35640; Ma04_g31490. ACO: Ma01_g11540; Ma07_g19730) (Figura 11 y Figura 12, respectivamente). Los datos RPKM de cada gen de la base de datos del transcriptoma de banano indican que ACS Ma04_g35640 y ACO Ma07_g19730 son los candidatos de genes para apuntar para reducir la biosíntesis de etileno (Figura 11 y Figura 12, respectivamente). Las realizaciones de la invención también contemplan dirigirse a otros genes ACO y/o ACS para obtener un fenotipo robusto.

Genes ACS (Ma09_g19150; Ma04_g35640; Ma04_g31490) fueron apuntados con dos pares de sgRNAs como se indica en la Figura 13A, Figura 14A, y la Figura 15A. Los sgRNAs son posicionado entre el exón 1 y el exón 3 de los genes candidatos y estas regiones fueron seleccionadas debido a que están muy conservadas entre todos los 3 genes candidatos. Similarmente, los genes ACO (Ma01_g11540; Ma07_g19730) fueron apuntados con dos pares de sgRNA como está indicado en la Figura 6A y la Figura 17A. Los sgRNA se posicionaron entre el exón 1 y el exón 4 de los dos genes candidatos y están diseñados específicamente para cada gen, pero combinado en el plásmido de transfección. Los sgRNAs fueron clonados en la transfección del plásmido s que contenía mCherry, Cas 9, y dos sgRNAs accionados por un promotor 3 U6 pol.

A continuación, el complejo CRISPR/Cas9 y los sgRNA que apuntan a los genes candidato ACS y ACO fueron transfectados en protoplastos de banano y se enriquecieron para las células que portan dicho complejo mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Usando el marcador mCherry, las células de banano transfectadas que expresan transitoriamente la proteína fluorescente, Cas9 y el sgRNA fueron separadas, clasificadas y recolectados protoplastos de banano mCherry positivos a los 3 días después de la transfección (dpt). Se extrajo ADN de 5000 protoplastos clasificados (kit de extracción Qiagen Plant Dneasy) a 6 dpt. PCR Anidado fue realizado para una mayor sensibilidad usando los imprimadores mostrados en la Figuras 13A, 14A, 15A, 16A, 17A. En las Figuras 13B, 14B, 15B, 16B, 17B muestran un gel de agarosa de la región amplificada para todos los genes candidatos de ACS y ACO. Solo para el gen ACO Ma01_g11540 se observa una eliminación clara de alrededor de 350 pb (Figura 17 B).

Para evaluar si el sgRNAs y el complejo CRISPR/Cas9 estaban activos e induciendo eventos de edición de genoma en todos los demás genes ACS y ACO, se realizó un ensayo T7E1. Se encontró que todas las combinaciones de sgRNA indujeron eventos de edición del genoma en todos los genes ACS y ACO (ACS: Ma09_g19150; Ma04_g35640; Ma04_g31490. ACO: Ma01_g11540; Ma07_g19730) Figuras 13C, 14C, 15C, 16C, 17C. Además, la clonación y la secuenciación confirmaron los resultados de T7E1 para algunos de los genes y se encontró que algunos de los sgRNAs utilizados en efecto inducían indels como es mostrado en las Figuras 13D, 15D, 18, 19, 20A, 20B. En conclusión, estos resultados demuestran que el sistema CRISPR/Cas9 se puede utilizar exitosamente para introducir mutaciones precisas en los genes endógenos ACS y ACO y que el diseño y la selección de sgRNA afectan la eficiencia de la edición del genoma.

Paralelamente, protoplastos clasificados adicionales mCherry positivos fueron avanzados en la regeneración de protoplastos. Brevemente, los protoplastos clasificados se colocaron en placas a alta dilución en medio líquido para permitir la formación de colonias durante 28-35 días. Las colonias fueron recogidas, cultivadas y divididas en dos alícuotas. Una alícuota se utilizó para la extracción de ADN y las pruebas de edición del genoma (GE) y las pruebas CRISPR libres de ADN, mientras que las otras se mantuvieron en cultivo hasta que se verificó su estado. Solo se seleccionaron los que claramente mostraron ser GE y CRISPR libre de ADN fueron seleccionados para continuar.

Después de 20 días en la oscuridad (desde la división para el análisis de GE, es decir, 60 días, por lo tanto, 80 días en total), las colonias fueron transferidas al mismo medio, pero con glucosa reducida (0.46 M) y agarosa al 0.4% e incubadas a baja intensidad de luz. Después de seis semanas, la agarosa se cortó en rodajas y se colocó en el medio de cultivo de protoplastos con 0.31 M de glucosa y gelrita al 0.2%. Después de un mes, las protocolonias (callos) se subcultivaron en medios de regeneración (MS de concentración media + vitaminas B5, 20 g/l de sacarosa). (Figuras 23A - E). Luego, los embriones maduros se pasaron al medio de germinación (GM) que contiene sales de MS y vitaminas donde los embriones comienzan a germinar 1-2 semanas después de la transferencia. 3-4 semanas después, los embriones en germinación están listos para ser transferidos al medio de proliferación para el alargamiento del brote (Figura 24 A-D).

Además, las suspensiones de células embriogénicas de banano (ECS) fueron bombardeadas con los mismos plásmidos utilizados para la transfección (pAC2007, pAC2008, pAC2010, pAC2011 y pAC2012) para extender la vida útil. ECS de 3 días después del bombardeo, las células se trasladaron a un medio de proliferación y, a medida que se desarrollen los embriones a

partir de ECS bombardeados, los embriones fueron pasados a un medio de desarrollo de embrión (EDM) y un medio de maduración (Figura 25A-E).

Aunque la invención ha sido descrita en conjunción con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. En consecuencia, se pretende abarcar todas las alternativas, modificaciones y variaciones tales que caen dentro del espíritu y el amplio alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en esta especificación se incorporan aquí en su totalidad por referencia a la especificación, al mismo grado que si cada publicación individual, patente o solicitud de patente fuera indicada específicamente e individualmente para ser incorporada aquí por referencia. Además, la cita o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no se interpretará como una admisión que dicha referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención. En la medida en que los encabezados de sección sean utilizados, no deben interpretarse como necesariamente limitantes.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2022/0001756
Recibo: 22-13172
Fecha: 18/02/2022

CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ
CC: 40.017.374
Pago PSE No: 638224
CUS: 1332928300

NC Modificación a las reivindicaciones
Request on Patente PCT NC2019/0014469

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 176,000	\$ 176,000
TOTAL					\$ 176,000



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2022/0001757
Recibo: 22-13178
Fecha: 18/02/2022

CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ
CC: 40.017.374
Pago PSE No: 638232
CUS: 1332941824

NC Modificación a las reivindicaciones
Request on Patente PCT NC2019/0014469

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 176,000	\$ 176,000
TOTAL					\$ 176,000