

REIVINDICACIONES

1. Un método para crear un nuevo gen en un organismo **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
generar simultáneamente rupturas de ADN a dos o más sitios específicos diferentes en el genoma del organismo, en donde los sitios específicos son sitios genómicos capaces de separar diferentes elementos genéticos o diferentes dominios de proteína, y las rupturas de ADN se ligan entre sí mediante un unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación homóloga, generar una nueva combinación de los diferentes elementos genéticos o diferentes dominios de proteína diferentes de la secuencia genómica original, de este modo se crea un nuevo gen.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque dichos dos o más sitios específicos diferentes se ubican en el mismo cromosoma o en cromosomas diferentes.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado** porque dichos dos o más sitios específicos diferentes pueden ser sitios específicos en al menos dos genes diferentes, o pueden ser al menos dos sitios específicos diferentes en el mismo gen.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado** porque dichos al menos dos genes diferentes pueden tener direcciones de transcripción iguales o diferentes.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones

1 a 4, **caracterizado** porque dichas rupturas de ADN se obtienen mediante la administración de una nucleasa con propiedad de direccionamiento en una célula del organismo para ponerse en contacto con los sitios específicos del ADN genómico.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado** porque dicha nucleasa con propiedad de direccionamiento se selecciona del grupo que consiste en Meganucleasa, nucleasa de dedos de cinc, TALEN, y sistema CRISPR/Cas.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, **caracterizado** porque la nucleasa con propiedad de direccionamiento" está en forma de ADN.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, **caracterizado** porque dicha nucleasa con propiedad de direccionamiento existe en la forma de ARNm o proteína, pero no ADN.
9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-8, **caracterizado** porque las nucleasas con propiedad de direccionamiento se administran a la célula mediante: 1) un método de transfección celular mediada por PEG; 2) un método de transfección celular mediada por liposomas; 3) un método de transformación por shock eléctrico; 4) una microinyección; 5) un bombardeo con pistola genética; o un método de transformación mediada por *Agrobacterium*.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones

1-9, **caracterizado** porque dichos elementos genéticos se seleccionan del grupo que consiste en un promotor, una región no traducida 5', una región codificadora o región de ARN no codificadora, una región no traducida 3', un terminador del gen o cualquier combinación de estos.

11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, **caracterizado** porque la combinación de diferentes elementos genéticos es una combinación del promotor de uno de los dos genes con diferentes patrones de expresión y la región codificadora o la región de ARN no codificadora del otro gen.
12. El método de la reivindicación 11, **caracterizado** porque, en la combinación de diferentes elementos genéticos, un elemento es un promotor endógeno fuerte del organismo, y el otro es la región codificadora del gen de HPPD, EPSPS, PPO o GH1.
13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, **caracterizado** porque la combinación de diferentes elementos genéticos es una combinación de la región del promotor de 5'UTR de uno de los dos genes con diferentes patrones de expresión y la CDS o región de ARN no codificadora del otro gen.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 11 o 13, **caracterizado** porque los diferentes patrones de expresión son diferentes niveles de expresión génica.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 11 o 13, **caracterizado** porque los diferentes patrones de expresión son diferentes especificidades de tejido de expresión génica.
16. El método de acuerdo con la reivindicación 11 o 13, **caracterizado** porque los diferentes patrones de expresión son diferentes especificidades de etapa de desarrollo de expresión génica.
17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, **caracterizado** porque la combinación de diferentes elementos genéticos es una combinación de elementos genéticos adyacentes del mismo gen.
18. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-17, **caracterizado** porque el dominio de la proteína es un fragmento de ADN correspondiente a un dominio funcional específico de una proteína; con preferencia que incluye, pero sin limitación una señal de localización nuclear, un péptido líder de cloroplasto, un péptido líder mitocondrial, un sitio de fosforilación, un sitio de metilación, un dominio transmembrana, un dominio de unión al ADN, un dominio de activación de transcripción, un dominio de activación del receptor, o un centro catalítico enzimático.
19. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, **caracterizado** porque la combinación de diferentes dominios de proteína es una combinación de la región de la

señal de localización de una de dos proteínas con diferentes localizaciones subcelulares y la región codificadora de la proteína madura del otro gen.

20. El método de la reivindicación 19, **caracterizado** porque las diferentes localizaciones subcelulares se seleccionan del grupo que consiste en localización nuclear, localización citoplásmica, localización de la membrana celular, localización del cloroplasto, localización mitocondrial y localización de la membrana del retículo endoplásmico.
21. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, **caracterizado** porque la combinación de diferentes dominios de proteína es una combinación de dos dominios de proteína con diferentes funciones biológicas.
22. El método de acuerdo con la reivindicación 21, **caracterizado** porque las diferentes funciones biológicas se seleccionan del grupo que consiste en reconocimiento de secuencia conservada de ADN o ARN específico, activación de expresión génica, unión a un ligando de proteína, unión a señal molecular pequeña, unión a un ión, reacción enzimática específica, y cualquier combinación de estos.
23. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-18, **caracterizado** porque la combinación de diferentes dominios de proteína es una combinación de dominios de proteína adyacentes del mismo gen.
24. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones

1-10 y 18, **caracterizado** porque la combinación de elementos genéticos y dominios de proteína son una combinación de dominios de proteína y promotores, 5'UTR, 3'UTR o terminadores adyacentes del mismo gen.

25. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-24, **caracterizado** porque el organismo es un animal, una planta o un hongo.
26. Un nuevo gen **caracterizado** porque es obtenible por el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-25.
27. El nuevo gen de acuerdo con la reivindicación 26, **caracterizado** porque en comparación con el gen original, el nuevo gen tiene un promotor diferente y en consecuencia se expresa con diferentes características espacio-temporales o diferentes características de intensidad o diferentes características de etapa de desarrollo, o tiene una nueva secuencia de aminoácidos; con preferencia, la "nueva secuencia de aminoácidos" puede ser una fusión integral de dos o más regiones codificadoras del gen, o una fusión parcial de las regiones codificadoras o una duplicación de una parte de la región codificadora de la proteína del mismo gen.
28. El nuevo gen de acuerdo con la reivindicación 26 o 27, **caracterizado** porque el nuevo gen es un gen de HPPD, EPSPS, PPO o GH1 endógeno altamente expresado en el organismo.
29. Un ADN **caracterizado** porque contiene el gen de acuerdo con

cualquiera de las reivindicaciones 26-28.

30. Una proteína **caracterizada** porque es codificada por el gen de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26-28, o un fragmento biológicamente activo de este.
31. Un vector de expresión recombinante, **caracterizado** porque comprende el gen de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26-28 y un promotor unido operativamente a este.
32. Un casete de expresión **caracterizado** porque comprende el gen de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26-28.
33. Una célula huésped, **caracterizada** porque comprende el casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 32; que con preferencia es una célula de planta, célula animal o célula fúngica.
34. Un organismo **caracterizado** porque es regenerado de la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 33.
35. Uso del gen de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26-28 **caracterizado** porque confiere o mejora un rasgo de resistencia/tolerancia o un rasgo de ventaja de crecimiento en un organismo.
36. Una composición, **caracterizada** porque comprende:
 - (a) un promotor de uno de dos genes con diferentes patrones de expresión y una región codificadora o región de ARN no codificadora del otro gen;
 - (b) un promotor a una región no traducida 5' de uno de dos genes

- con diferentes patrones de expresión y una región codificadora o región de ARN no codificadora del otro gen;
- (c) elementos genéticos adyacentes dentro del mismo gen;
 - (d) una región de la señal de localización de uno de los dos genes codificadores de proteína con diferentes localizaciones subcelulares y una región codificadora de la proteína madura del otro gen;
 - (e) dos dominios de proteína con diferentes funciones biológicas;
 - (f) dominios de proteína adyacentes en el mismo gen; o,
 - (g) un dominio de proteína y un promotor, región no traducida 5', región no codificadora 3' o terminador adyacente en el mismo gen.
37. La composición de acuerdo con la reivindicación 36, **caracterizada** porque los diferentes patrones de expresión son diferentes niveles de expresión génica.
38. La composición de acuerdo con la reivindicación 36, **caracterizada** porque los diferentes patrones de expresión se refieren a diferentes especificidades tejido de expresión génica.
39. La composición de acuerdo con la reivindicación 36, **caracterizada** porque los diferentes patrones de expresión son diferentes especificidades de etapa de desarrollo de la expresión génica.
40. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 36-39, **caracterizada** porque las

diferentes localizaciones subcelulares se seleccionan del grupo que consiste en localización nuclear, localización citoplásmica, localización de la membrana celular, localización del cloroplasto, localización mitocondrial, localización de la membrana del retículo endoplásmico y cualquier combinación de estos.

41. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 36-40, **caracterizada** porque las diferentes funciones biológicas se seleccionan del grupo que consiste en el reconocimiento de secuencias conservadas de ADN o ARN específico, activación de expresión génica, unión a ligando de proteína, unión a señal molecular pequeña, unión a un ión, reacción enzimática específica, y cualquiera de sus combinaciones.
42. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 36-41, **caracterizado** porque que está fusionada in vivo.
43. Un método de edición para aumentar el nivel de expresión génica de un gen endógeno blanco en un organismo, que es independiente de un fragmento de donante de ADN exógeno, que comprende las siguientes etapas:
generar simultáneamente las rupturas de ADN por separado en sitios seleccionados entre el promotor y la región codificadora de cada uno del gen endógeno blanco y un gen endógeno de alta expresión opcional; ligar las rupturas de

ADN entre sí por medio de unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación homóloga, de este se genera una fusión in vivo de la región codificadora del gen endógeno blanco y el promotor endógeno fuerte opcional para formar un nuevo gen endógeno de alta expresión.

44. El método de edición de acuerdo con la reivindicación 43, **caracterizado** porque el gen endógeno blanco y el gen endógeno de alta expresión opcional se ubican en el mismo cromosoma.
45. El método de edición de acuerdo con la reivindicación 43, **caracterizado** porque el gen endógeno blanco y el gen endógeno de alta expresión opcional se ubican en cromosomas diferentes.
46. Un método de edición para knocking up la expresión del gen de HPPD endógeno en una planta, **caracterizado** porque comprende fusionar la región codificadora del gen de HPPD con un promotor endógeno fuerte de una planta in vivo para formar un nuevo gen HPPD endógeno de planta de alta expresión.
47. El método de edición de acuerdo con la reivindicación 46, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas: generar simultáneamente rupturas de ADN respectivamente en sitios específicos seleccionados entre el promotor y la región codificadora de cada uno del gen de HPPD y un gen endógeno de alta expresión opcional, ligar las rupturas de

ADN entre sí a través de una vía de reparación intracelular, generar in vivo una fusión de la región codificadora del gen de HPPD y el promotor endógeno fuerte opcional para formar un nuevo gen de HPPD de alta expresión.

48. El método de edición de acuerdo con la reivindicación 46 o 47, **caracterizado** porque la planta es un arroz, y con preferencia, el promotor fuerte es un promotor del gen de ubiquitina2.
49. Un gen HPPD endógeno de planta de alta expresión **caracterizado** porque es obtenible por el método de edición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 46-48.
50. Un gen HPPD endógeno de arroz de alta expresión, **caracterizado** porque tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
 - (1) la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 o una porción de esta o una secuencia complementaria de esta;
 - (2) una secuencia que tiene una identidad de al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% con cualquiera de las secuencias definidas en (1); o
 - (3) una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridar a la secuencia mostrada en (1) o (2) en una condición rigurosa.
51. Un método de edición para knocking up la expresión de un gen de EPSPS endógeno en una planta, **caracterizado** porque

comprende fusionar la región codificadora del gen EPSPS con un promotor endógeno de planta fuerte in vivo para formar un nuevo gen de EPSPS endógeno de planta de alta expresión.

52. El método de edición de acuerdo con la reivindicación 51, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas: generar simultáneamente rupturas de ADN respectivamente en sitios específicos seleccionados entre el promotor y la región codificadora de cada uno del gen EPSPS y un gen endógeno de alta expresión opcional, ligar las rupturas de ADN entre sí a través de una vía de reparación intracelular, generar in vivo una fusión de la región codificadora del gen EPSPS y el promotor endógeno fuerte opcional para formar un nuevo gen EPSPS de alta expresión.
53. El método de edición de acuerdo con la reivindicación 51 o 52, **caracterizado** porque la planta es un arroz, y con preferencia, el promotor fuerte es un promotor del gen TKT.
54. Un gen de EPSPS endógeno de planta de alta expresión obtenible por el método de edición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 51-53.
55. Un gen de EPSPS endógeno de arroz de alta expresión, **caracterizado** porque tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
 - (1) la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14 o una porción de esta o una secuencia complementaria de esta;

- (2) una secuencia que tiene una identidad de al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% con cualquiera de las secuencias definidas en (1); o
 - (3) una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse con la secuencia mostrada en (1) o (2) en una condición rigurosa.
56. Un método de edición para knocking up la expresión de un gen de PPO endógeno en una planta, **caracterizado** porque comprende la fusión de la región codificadora del gen PPO con un promotor endógeno de planta fuerte in vivo para formar un nuevo gen de PPO endógeno de planta de alta expresión.
57. El método de edición de acuerdo con la reivindicación 56, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas: generar simultáneamente rupturas de ADN respectivamente en sitios específicos seleccionados entre el promotor y la región codificadora de cada uno del gen de PPO y un gen endógeno de alta expresión opcional, ligar las rupturas de ADN entre sí a través de una vía de reparación intracelular, generar in vivo una fusión de la región codificadora del gen de PPO y el promotor endógeno fuerte opcional para formar un nuevo gen de PPO de alta expresión.
58. El método de edición de acuerdo con la reivindicación 56 o 57, **caracterizado** porque la planta es un arroz o un *Arabidopsis*, y con preferencia, en arroz, el promotor fuerte es un promotor del gen CP12; y en *Arabidopsis*, el promotor

fuerte es un promotor del gen de ubiquitin¹⁰.

59. Un gen de PPO endógeno de planta de alta expresión **caracterizado** porque es obtenible por el método de edición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 56-58.
60. Un gen de PPO endógeno de arroz de alta expresión, **caracterizado** porque tiene una secuencia seleccionada de las siguientes:
 - (1) la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, o SEQ ID NO: 26 o una porción de esta o una secuencia complementaria de esta;
 - (2) una secuencia que tiene una identidad de al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% con cualquiera de las secuencias definidas en (1); o
 - (3) una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse con la secuencia mostrada en (1) o (2) en una condición rigurosa.
61. Un ADN que comprende el gen de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 49, 50, 54, 55, 59 y 60.
62. Una proteína o fragmento biológicamente activo de esta **caracterizada** porque es codificada por el gen de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 49, 50, 54, 55, 59 y 60.
63. Un vector de expresión recombinante, **caracterizado** porque

comprende el gen de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 49, 50, 54, 55, 59 y 60, y un promotor unido operativamente a este.

64. Un casete de expresión **caracterizado** porque comprende el gen de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 49, 50, 54, 55, 59 y 60.
65. Una célula huésped de planta, **caracterizada** porque comprende el casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 64.
66. Una planta **caracterizada** porque es regenerada de la célula huésped de planta de acuerdo con la reivindicación 65.
67. Un método para producir una planta con un aumento de resistencia o tolerancia a un herbicida, **caracterizado** porque comprende regenerar la célula huésped de planta de acuerdo con la reivindicación 65 en una planta y una progenie derivada de esta.
68. El método de acuerdo con la reivindicación 67, **caracterizado** porque la planta un aumento de resistencia o tolerancia a un herbicida es una cepa no transgénica obtenible mediante el cruzamiento de una planta regenerada de una célula huésped de planta con una planta tipo salvaje para eliminar los componentes transgénicos exógenos a través de la segregación genética.
69. Un arroz resistente a un herbicida, **caracterizado** porque comprende uno o una combinación de dos o más del gen HPPD

endógeno de arroz de alta expresión de acuerdo con la reivindicación 50, el gen de EPSPS endógeno de arroz de alta expresión de acuerdo con la reivindicación 55, y el gen de PPO endógeno de arroz de alta expresión de acuerdo con la reivindicación 60.

70. El arroz de acuerdo con la reivindicación 69, **caracterizado** porque es no transgénico.
71. Uso del gen de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 49, 50, 54, 55, 59 y 60 **caracterizado** porque es para la mejora de la resistencia o tolerancia a un herbicida inhibidor correspondiente en una célula de planta, tejido de planta, parte de una planta o una planta.

72. Un método para controlar una maleza en un sitio de cultivo de una planta, **caracterizado** porque la planta se selecciona del grupo que consiste en la planta de acuerdo con la reivindicación 66, una planta preparada por el método de acuerdo con la reivindicación 67 o 68, o el arroz de acuerdo con la reivindicación 69 o 70, en donde el método comprende la aplicación en el sitio de cultivo de uno o más herbicidas inhibidores de HPPD, EPSPS o PPO en una cantidad para controlar efectivamente la maleza.

Es TRADUCCIÓN fiel al idioma español del documento en idioma inglés que he tenido a la vista y al que me remito en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, a los 16 días del mes de noviembre del año 2020.