

APARATO Y MÉTODOS PARA HERIR TEJIDO VEGETAL

5 **Campo de la Invención**

La presente invención se refiere a aparatos y métodos para herir tejido vegetal, tales como métodos que incluyen mezclar un tejido vegetal (por ejemplo, una planta y/o parte de planta) en una licuadora para proporcionar tejido vegetal herido.

10

Antecedentes de la Invención

La propagación de plantas in vitro es un proceso laborioso que involucra muchos pasos de disección y transferencia de tejido que limitan significativamente el rendimiento, aumentan la duración del proceso de principio a fin y causan estrés ergonómico en el practicante. Para una línea de modificación genética (ya sea transgénica o de edición) donde se requieren una gran cantidad de manipulaciones de plantas para el éxito, el trabajo de cultivo de tejidos puede ser prohibitivo. Por lo tanto, se necesitan nuevos enfoques para preparar tejido vegetal.

20 **Sumario de la Invención**

Un aspecto de la presente invención está dirigido a un método de preparación de un tejido vegetal para propagación, regeneración y/o transformación, el método comprende: herir una planta o parte de una planta para proporcionar un tejido herido (por ejemplo, un tejido cortado), en donde la herida comprende mezclar la planta o parte de la planta en una licuadora, proporcionando así el tejido vegetal.

Estos y otros aspectos de la presente invención se establecen en más detalle en la descripción de la invención a continuación.

30 **Breve Descripción de las Figuras**

La Figura 1 es una ilustración de una cuchilla de corte de acuerdo con algunas modalidades de la invención.

La Figura 2 es otra ilustración de una cuchilla de corte de acuerdo con algunas modalidades de la invención.

35

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención se describirá a continuación con referencia a los dibujos y ejemplos adjuntos, en los que se muestran modalidades de la invención. Esta descripción no está destinada a ser un catálogo detallado de todas las diferentes formas en que la invención puede implementarse, ni de todas las características que pueden añadirse a la presente invención. Por ejemplo, las características ilustradas con respecto a una modalidad pueden incorporarse en otras modalidades, y las características ilustradas con respecto a una modalidad particular pueden eliminarse de esa modalidad. Por lo tanto, la invención contempla que en algunas modalidades de la invención, cualquier característica o combinación de características establecidas aquí pueden ser excluidas u omitidas. Además, numerosas variaciones y adiciones a las diversas modalidades sugeridas aquí serán aparentes para aquellos expertos en la materia a la luz de la presente descripción, que no se apartan de la presente invención. Por lo tanto, las siguientes descripciones están destinadas a ilustrar algunas modalidades particulares de la invención, y no a especificar exhaustivamente todas sus permutaciones, combinaciones y variaciones.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. La terminología utilizada en la descripción de la invención aquí es para el propósito de describir modalidades particulares solamente y no está destinada a limitar la invención.

Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias citadas aquí se incorporan por referencia en su totalidad para las enseñanzas relevantes a la oración y/o párrafo en el que la referencia se presenta. A menos que el contexto indique lo contrario, se pretende específicamente que las diversas características de la invención descritas aquí puedan usarse en cualquier combinación. Además, la presente invención también contempla que en algunas modalidades de la invención, cualquier característica o combinación de características establecidas aquí pueden ser excluidas u omitidas. Para ilustrar, si la especificación establece que una composición comprende los componentes A, B y C, se pretende específicamente que cualquiera de A, B o C, o una combinación de ellos, puedan ser omitidos y rechazados singularmente o en cualquier combinación.

Como se usa en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" están destinadas a incluir las formas plurales también, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. También, como se usa aquí, "y/o" se refiere y abarca cualquier y todas las posibles combinaciones de uno o más de los elementos asociados enumerados, así como la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa ("o").

El término "aproximadamente", como se usa aquí al referirse a un valor medible como una cantidad o concentración y similares, está destinado a abarcar variaciones de $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0.5\%$, o incluso $\pm 0.1\%$ del valor especificado así como el valor especificado. Por ejemplo,

"aproximadamente X" donde X es el valor medible, está destinado a incluir X así como variaciones de $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0.5\%$, o incluso $\pm 0.1\%$ de X. Un rango proporcionado aquí para un valor medible puede incluir cualquier otro rango y/o valor individual dentro de él.

Como se usa aquí, frases tales como "entre X y Y" y "entre aproximadamente X y Y" deben interpretarse para incluir X y Y. Como se usa aquí, frases tales como "entre aproximadamente X y Y" significan "entre aproximadamente X y aproximadamente Y" y frases tales como "de aproximadamente X a Y" significan "de aproximadamente X a aproximadamente Y".

La recitación de rangos de valores aquí está meramente destinada a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado dentro del rango, a menos que se indique lo contrario aquí, y cada valor separado se incorpora a la especificación como si se recitara individualmente aquí. Por ejemplo, si se divulga el rango de 10 a 15, entonces 11, 12, 13 y 14 también están divulgados.

El término "comprender," "comprende" y "comprendiendo" como se usa aquí, especifican la presencia de las características, enteros, pasos, operaciones, elementos y/o componentes indicados, pero no excluyen la presencia o adición de una o más otras características, enteros, pasos, operaciones, elementos, componentes y/o grupos de ellos.

Como se usa aquí, la frase transicional "consistiendo esencialmente de" significa que el alcance de una reivindicación debe interpretarse para abarcar los materiales o pasos especificados recitados en la reivindicación y aquellos que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s) de la invención reivindicada. Por lo tanto, el término "consistiendo esencialmente de" cuando se usa en una reivindicación de esta invención no está destinado a ser interpretado como equivalente a "comprendiendo".

Como se usa aquí, los términos "aumentar", "aumentando", "mejorar", "mejorando", "incrementar" e "incrementando" (y sus variaciones gramaticales) describen una elevación de al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% o más en comparación con otra propiedad o cantidad medible (por ejemplo, un valor de control).

Como se usa aquí, los términos "reducir", "reducido", "reduciendo", "reducción", "disminuir" y "disminuyendo" (y sus variaciones gramaticales), describen, por ejemplo, una disminución de al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, o 100% en comparación con otra propiedad o cantidad medible (por ejemplo, un valor de control). En algunas modalidades, la reducción puede resultar en ninguna o esencialmente ninguna (es decir, una cantidad insignificante, por ejemplo, menos de aproximadamente 10% o incluso 5%) actividad o cantidad detectable.

De acuerdo con modalidades de la presente invención se proporcionan aparatos y métodos para herir tejido vegetal (por ejemplo, una planta o parte de una planta). En algunas modalidades, un método de la presente invención comprende preparar un tejido vegetal para propagación,

regeneración y/o transformación. Un método de la presente invención puede comprender herir una planta o parte de una planta para proporcionar un tejido herido (por ejemplo, un tejido cortado), en donde la herida comprende mezclar la planta o parte de la planta en una licuadora para así proporcionar el tejido herido. En algunas modalidades, el método incluye cultivar, propagar, regenerar y/o transformar el tejido herido. En algunas modalidades, el paso de mezclar la planta o tejido vegetal en una licuadora es un paso en un método de propagación, regeneración y/o transformación de plantas. En algunas modalidades, antes de herir la planta o parte de la planta, el método comprende recolectar una parte de la planta. Por ejemplo, en algunas modalidades, un brote cultivado a partir de un tejido nodal puede recolectarse y luego mezclarse en una licuadora para proporcionar tejido vegetal herido.

Por "Licuadora" como se usa aquí, debe entenderse a un dispositivo mecánico configurado para mezclar, picar, cortar en dados y/o rebanar material como alimentos. En algunas modalidades, la licuadora es alimentada por un motor eléctrico (es decir, una licuadora eléctrica). Licuadoras eléctricas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, una licuadora de cocina que incluye una cuchilla giratoria (por ejemplo, una cuchilla de metal como una cuchilla de acero inoxidable) impulsada por un motor eléctrico y un procesador de alimentos que incluye una cuchilla (por ejemplo, una cuchilla de corte como una cuchilla de metal (por ejemplo, de acero inoxidable)) que es impulsada por un motor eléctrico. El motor eléctrico puede ser un motor de 350 vatios. En algunas modalidades, una licuadora usada en un método de la presente invención es una licuadora Cuisinart con el número de modelo CPB-300P1 o una licuadora comparable y la licuadora puede estar equipada con una cuchilla para picar. Una cuchilla para picar también puede referirse como una cuchilla en S. Cuchillas para picar ejemplares y/o cuchillas en S incluyen, pero no se limitan a, una cuchilla incluida en el ensamblaje de picado Cuisinart con el número de modelo CPB-300CHA o una cuchilla comparable. La cuchilla puede tener una configuración planar. En algunas modalidades, el ensamblaje de la cuchilla proporcionado en una licuadora comprende una única cuchilla alargada que gira alrededor de su centro de manera que proporciona un "aleta" con filo para picar y/o cortar en ambos lados de su eje de pivote, como se muestra en la Figura 1. En algunas modalidades, un ensamblaje de cuchilla proporcionado en una licuadora comprende una cuchilla con solo una "aleta" con filo (ver Figura 2); la cuchilla gira alrededor de un eje fijo y emplea solo la "aleta" para picar y/o cortar. Una licuadora de la presente invención puede estar acoplada a un recipiente asociado operativamente con la licuadora, como una taza Cuisinart con el número de modelo CTC-16. En algunas modalidades, la licuadora utilizada en un método de la presente invención es una licuadora eléctrica (por ejemplo, una licuadora de cocina y/o procesador de alimentos) que incluye y/o está equipada con una cuchilla para picar y/o una cuchilla en S con aletas de metal (por ejemplo, de acero inoxidable). Una o más partes de una licuadora utilizada en un método de la presente invención pueden ser capaces de ser esterilizadas y/o configuradas para la esterilización (por ejemplo, esterilización con alcohol y/o esterilización con vapor). En algunas modalidades, las partes de una licuadora que

contactan con una planta y/o parte de planta pueden ser esterilizadas y/o configuradas para la esterilización. Por ejemplo, una licuadora utilizada en un método de la presente invención puede tener un recipiente (por ejemplo, una taza), cuchilla y/o ensamblaje de cuchilla que pueden ser esterilizados y/o que están configurados para la esterilización.

5 En un método de la presente invención, la licuadora puede operarse a una velocidad de aproximadamente 1, 5, 10, 15 o 20 Hz a aproximadamente 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350 o 380 Hz. En algunas modalidades, la licuadora puede ajustarse y/o operarse a la velocidad más baja para la licuadora, opcionalmente ajustada y/u operada en un ajuste de picado. En algunas modalidades, mezclar comprende mezclar material vegetal (por
10 ejemplo, una planta o parte de planta) a una velocidad de aproximadamente 1, 5, 10, 15 o 20 Hz a aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45 o 50 Hz. La mezcla puede llevarse a cabo durante un período de tiempo como aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 segundos o más, opcionalmente utilizando un ajuste de pulsos. En algunas modalidades, mezclar el material vegetal comprende mezclar la planta o parte de planta en uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,
15 10 o más) intervalo(s) con cada intervalo incluyendo un período de tiempo durante el cual la licuadora se opera para mezclar el material vegetal y opcionalmente un período de tiempo durante el cual la licuadora no se opera para así proporcionar un descanso de la mezcla. En algunas modalidades, mezclar el material vegetal comprende uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) intervalo(s) con cada intervalo incluyendo aproximadamente 1 segundo a
20 aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 segundos durante los cuales la licuadora se opera para mezclar el material vegetal y opcionalmente aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 segundos durante los cuales la licuadora no se opera. En algunas modalidades, el paso de mezcla y/o el tiempo para proporcionar el tejido herido se lleva a cabo en aproximadamente 10 segundos o menos como aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1
25 segundo(s). En algunas modalidades, los parámetros y/o configuraciones de mezcla (por ejemplo, velocidad, tiempo, número de pulsos, etc.) para la licuadora pueden depender del tipo de tejido vegetal y/o del propósito de la herida (por ejemplo, herir para propagación, regeneración o transformación).

"Mezclar," "mezcla" y sus variantes gramaticales como se usan aquí se refieren a cortar
30 mecánicamente (por ejemplo, picar, cortar en dados, etc.) material (por ejemplo, material vegetal). Mezclar puede cortar el material en piezas más pequeñas que el tamaño del material antes de mezclar. En algunas modalidades, mezclar puede incluir cortar grueso y/o cortar fino el material. En algunas modalidades, mezclar está configurado para cortar grueso el material vegetal y tiene como objetivo limitar la mezcla del material vegetal a una consistencia similar a un batido. En
35 algunas modalidades, mezclar proporciona material vegetal cortado (por ejemplo, tejido vegetal herido) que tiene un tamaño de aproximadamente 0.2 o 0.3 cm a aproximadamente 0.4 o 0.5 cm medido en la parte más ancha del material vegetal. Una planta o parte de planta puede mezclarse en una licuadora. En algunas modalidades, mezclar comprende mezclar una planta entera o una

o más parte(s) de ella (por ejemplo, una porción aérea y/o una porción no aérea de la planta). En algunas modalidades, mezclar comprende mezclar una hoja, nodo, brote y/o callo. En algunas modalidades, la mezcla de material vegetal se lleva a cabo en presencia de agua y/o una composición acuosa (por ejemplo, medio de cultivo). El material vegetal y el agua y/o la composición acuosa pueden agregarse en un recipiente de una licuadora y mezclarse juntos. En algunas modalidades, material vegetal y bacterias, opcionalmente en agua y/o una composición acuosa, se mezclan juntos. Las bacterias pueden ser una cepa de *Agrobacterium* como *A. tumefaciens* y/o *A. rhizogenes*. Las bacterias pueden incluir una construcción de ácido nucleico que codifica todo o una parte de un sistema de edición (por ejemplo, un sistema de edición CRISPR-Cas) que está configurado para modificar un polinucleótido en una célula vegetal. Mezclar el material vegetal puede inocular el material vegetal con bacterias y/o introducir un polinucleótido de las bacterias en una célula del material vegetal, opcionalmente en una célula del tejido herido. Por lo tanto, un método de la presente invención puede comprender introducir un polinucleótido en una célula del tejido vegetal herido usando las bacterias mezcladas con el material vegetal. En algunas modalidades, el tejido vegetal se mezcla en agua y/o una composición acuosa que carece de bacterias para proporcionar el tejido vegetal herido y el tejido vegetal herido se pone en contacto con bacterias, opcionalmente para introducir un polinucleótido en una célula del tejido vegetal herido.

Un "sistema de edición" según se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier sistema de edición de ácidos nucleicos específico del sitio (por ejemplo, específico de la secuencia) conocido actualmente o desarrollado posteriormente, que puede introducir una modificación (por ejemplo, una mutación) en un ácido nucleico de manera específica del objetivo. Por ejemplo, un sistema de edición (por ejemplo, un sistema de edición específico del sitio y/o de la secuencia) puede incluir, entre otros, un sistema de edición CRISPR-Cas, un sistema de edición con meganucleasas, un sistema de edición con nucleasas de dedos de zinc (ZFN), un sistema de edición con nucleasas efectoras tipo activador de transcripción (TALEN), un sistema de edición de bases y/o un sistema de edición prime, cada uno de los cuales puede comprender una o más polipéptidos y/o uno o más polinucleótidos que, cuando están presentes y/o se expresan juntos (por ejemplo, como un sistema) en una composición y/o célula, pueden modificar (por ejemplo, mutar) un ácido nucleico objetivo de manera específica de la secuencia. En algunas modalidades, un sistema de edición (por ejemplo, un sistema de edición específico del sitio y/o de la secuencia) puede comprender uno o más polinucleótidos y/o uno o más polipéptidos, incluyendo, entre otros, un polipéptido de unión a ácidos nucleicos (por ejemplo, un dominio de unión a ADN), una nucleasa, otro polipéptido y/o un polinucleótido.

En algunas modalidades, un sistema de edición comprende uno o más polipéptidos de unión a ácidos nucleicos específicos de la secuencia (por ejemplo, un dominio de unión a ADN) que pueden provenir, por ejemplo, de una endonucleasa guiada por polinucleótidos, una endonucleasa CRISPR-Cas (por ejemplo, una proteína efectora CRISPR-Cas), una nucleasa de

dedos de zinc, una nucleasa efectora tipo activador de transcripción (TALEN) y/o una proteína Argonaute. En algunas modalidades, un sistema de edición comprende uno o más polipéptidos de corte (por ejemplo, nucleasas) incluyendo, entre otros, una endonucleasa (por ejemplo, Fok1), una endonucleasa guiada por polinucleótidos, una endonucleasa CRISPR-Cas (por ejemplo, una

5 proteína efectora CRISPR-Cas), una nucleasa de dedos de zinc y/o una nucleasa efectora tipo activador de transcripción (TALEN).

Un "polipéptido de unión a ácidos nucleicos" según se utiliza en el presente documento se refiere a un polipéptido o dominio que se une y/o es capaz de unirse a un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico objetivo). Un dominio de unión a ADN es un ejemplo de un polipéptido

10 de unión a ácidos nucleicos y puede ser un dominio de unión a ácidos nucleicos específico del sitio y/o de la secuencia. En algunas modalidades, un polipéptido de unión a ácidos nucleicos puede ser un polipéptido de unión a ácidos nucleicos específico de la secuencia como, entre otros, un dominio de unión específico de la secuencia proveniente, por ejemplo, de una endonucleasa guiada por polinucleótidos, una proteína efectora CRISPR-Cas (por ejemplo, una endonucleasa

15 CRISPR-Cas), una nucleasa de dedos de zinc, una nucleasa efectora tipo activador de transcripción (TALEN) y/o una proteína Argonaute. En algunas modalidades, un polipéptido de unión a ácidos nucleicos comprende un dominio de corte (por ejemplo, un dominio de nucleasa) como, entre otros, una endonucleasa (por ejemplo, Fok1), una endonucleasa guiada por polinucleótidos, una endonucleasa CRISPR-Cas, una nucleasa de dedos de zinc y/o una nucleasa

20 efectora tipo activador de transcripción (TALEN). En algunas modalidades, el polipéptido de unión a ácidos nucleicos se asocia y/o es capaz de asociarse (por ejemplo, formar un complejo) con una o más moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, formar un complejo con un ácido nucleico guía como se describe en el presente documento), lo que puede dirigir y/o guiar al polipéptido de unión a ácidos nucleicos a una secuencia nucleotídica específica del objetivo (por ejemplo, un locus

25 génico de un genoma) que es complementaria a una o más moléculas de ácido nucleico (o una porción o región de las mismas), provocando así que el polipéptido de unión a ácidos nucleicos se una a la secuencia nucleotídica en el sitio específico del objetivo. En algunas modalidades, el polipéptido de unión a ácidos nucleicos es una proteína efectora CRISPR-Cas como se describe en el presente documento.

30 En algunas modalidades, un sistema de edición comprende o es una ribonucleoproteína, como un complejo de ribonucleoproteínas ensamblado (por ejemplo, una ribonucleoproteína que comprende una proteína efectora CRISPR-Cas, un ácido nucleico guía y, opcionalmente, una transcriptasa inversa o una desaminasa). En algunas modalidades, una ribonucleoproteína de un sistema de edición puede ensamblarse juntas (por ejemplo, una ribonucleoproteína

35 preensamblada que incluye una proteína efectora CRISPR-Cas, un ácido nucleico guía y, opcionalmente, una transcriptasa inversa o una desaminasa) como cuando se contacta a un ácido nucleico objetivo o cuando se introduce en una célula (por ejemplo, una célula de mamífero o una célula vegetal). En algunas modalidades, una ribonucleoproteína de un sistema de edición puede

ensamblarse en un complejo (por ejemplo, un complejo unido de manera covalente y/o no covalente) mientras una porción de la ribonucleoproteína está en contacto con un ácido nucleico objetivo y/o puede ensamblarse después y/o durante la introducción en una célula vegetal. En algunas modalidades, un sistema de edición puede ensamblarse (por ejemplo, en un complejo

5 unido de manera covalente y/o no covalente) cuando se introduce en una célula vegetal. En algunas modalidades, una ribonucleoproteína puede comprender una proteína efectora CRISPR-Cas, un ácido nucleico guía y, opcionalmente, una transcriptasa inversa. En algunas modalidades, una ribonucleoproteína puede comprender una proteína efectora CRISPR-Cas, un ácido nucleico guía y, opcionalmente, una desaminasa.

10 En algunas modalidades, un sistema de edición de la presente invención comprende una transcriptasa inversa, un ácido nucleico guía extendido y una proteína efectora CRISPR-Cas, por ejemplo, una proteína efectora CRISPR-Cas de Tipo II o una proteína efectora CRISPR-Cas de Tipo V. En algunas modalidades, la proteína efectora CRISPR-Cas de Tipo V o la proteína efectora CRISPR-Cas de Tipo II, la transcriptasa inversa y el ácido nucleico guía extendido pueden formar

15 un complejo o pueden estar comprendidos en un complejo que es capaz de interactuar con un ácido nucleico objetivo.

En algunas modalidades, un sistema de edición de la presente invención se utiliza en la edición prime. "Edición prime" y sus variantes gramaticales según se utilizan en el presente documento se refieren a una tecnología de edición de ácidos nucleicos que utiliza una Cas9

20 nickasa fusionada a una transcriptasa inversa y modifica un ácido nucleico objetivo sin una rotura de doble cadena ni una plantilla de ADN donante. En la edición prime, la Cas9 nickasa corta la cadena no complementaria de ADN aguas arriba del sitio PAM, proporcionando así una "solapa" 3' que se extiende con la extensión incluyendo una modificación. Más detalles sobre la edición prime pueden encontrarse en Anzalone et al. (2019) Nature 576, 149-157 y/o en la Publicación de

25 Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2021/0147862, cuyo contenido se incorpora en su totalidad mediante referencia en el presente documento.

En algunas modalidades, un sistema de edición de la presente invención incorpora el sistema de edición Redraw. Más detalles sobre el sistema de edición Redraw pueden encontrarse en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2021/0130835 y/o en la Publicación de

30 Solicitud de Patente de EE. UU. No. 2022/0145334, cuyo contenido se incorpora en su totalidad mediante referencia en el presente documento.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "ácido nucleico," "molécula de ácido nucleico," "secuencia nucleotídica" y "polinucleótido" se refieren a ARN o ADN que es lineal o ramificado, monocatenario o bicatenario, o un híbrido de estos. El término también abarca

35 híbridos ARN/ADN. Cuando se produce ARN de doble cadena (dsRNA) sintéticamente, se pueden usar bases menos comunes, como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina y otras para el apareamiento de antisense, dsRNA y ribozima. Por ejemplo, se ha demostrado que los polinucleótidos que contienen análogos de uridina y citidina con propeína C-5 se unen al ARN con

alta afinidad y son potentes inhibidores antisense de la expresión génica. También se pueden realizar otras modificaciones, como modificaciones en la columna vertebral de fosfodiéster, o en el grupo 2'-hidroxilo en el azúcar ribosa del ARN.

Un "ácido nucleico guía", "ARN guía", "gRNA", "ARN/ADN CRISPR", "crRNA" o "crDNA" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un ácido nucleico que comprende al menos una secuencia espaciadora, que es complementaria a (y se hibrida con) un ácido nucleico objetivo (por ejemplo, un ADN objetivo y/o un protospaciador), y al menos una secuencia repetida (por ejemplo, una repetición de un sistema CRISPR-Cas de Tipo V Cas12a, o un fragmento o porción del mismo; una repetición de un sistema CRISPR-Cas de Tipo II Cas9, o un fragmento del mismo; una repetición de un sistema CRISPR Cas de Tipo V C2c1, o un fragmento del mismo; una repetición de un sistema CRISPR-Cas de, por ejemplo, C2c3, Cas12a (también conocido como Cpf1), Cas12b, Cas12c, Cas12d, Cas12e, Cas12f, Cas12i, Cas13a, Cas13b, Cas13c, Cas13d, Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas3', Cas3", Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (también conocido como Csn1 y Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Cse1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 (dinG), y/o Csf5, o un fragmento del mismo), donde la secuencia repetida puede estar enlazada al extremo 5' y/o al extremo 3' de la secuencia espaciadora. En algunas modalidades, el ácido nucleico guía comprende ADN. En algunas modalidades, el ácido nucleico guía comprende ARN (por ejemplo, es un ARN guía). El diseño de un gRNA de esta invención puede basarse en un sistema CRISPR-Cas de Tipo I, Tipo II, Tipo III, Tipo IV, Tipo V o Tipo VI.

En algunas modalidades, un gRNA Cas12a puede comprender, de 5' a 3', una secuencia repetida (de longitud completa o una porción de la misma ("asa"); por ejemplo, estructura similar a un pseudonudo) y una secuencia espaciadora.

En algunas modalidades, un ácido nucleico guía puede comprender más de una secuencia repetida-espaciadora (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más secuencias repetidas-espaciadoras) (por ejemplo, repetición-espaciador-repetición, por ejemplo, repetición-espaciador-repetición-espaciador-repetición-espaciador-repetición-espaciador, y similares). Los ácidos nucleicos guía de esta invención son sintéticos, creados por el ser humano y no se encuentran en la naturaleza. Un gRNA puede ser bastante largo y puede usarse como un aptámero (como en la estrategia de reclutamiento MS2) u otras estructuras de ARN que se desprenden del espaciador.

Una "secuencia repetida" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere, por ejemplo, a cualquier secuencia repetida de un locus CRISPR Cas de tipo salvaje (por ejemplo, un locus Cas9, un locus Cas12a, un locus C2c1, etc.) o una secuencia repetida de un crRNA sintético que sea funcional con la proteína efectora CRISPR-Cas codificada por las construcciones de ácido nucleico de la invención. Una secuencia repetida útil con esta invención puede ser cualquier secuencia repetida conocida o identificada posteriormente de un locus CRISPR-Cas (por ejemplo,

Tipo I, Tipo II, Tipo III, Tipo IV, Tipo V o Tipo VI) o puede ser una repetición sintética diseñada para funcionar en un sistema CRISPR-Cas de Tipo I, II, III, IV, V o VI. Una secuencia repetida puede comprender una estructura de horquilla y/o una estructura de bucle de tallo. En algunas modalidades, una secuencia repetida puede formar una estructura similar a un pseudonudo en su extremo 5' (es decir, "asa"). Por lo tanto, en algunas modalidades, una secuencia repetida puede ser idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia repetida de loci CRISPR-Cas de Tipo I, loci CRISPR-Cas de Tipo II, loci CRISPR-Cas de Tipo III, loci CRISPR-Cas de Tipo IV, loci CRISPR-Cas de Tipo V y/o loci CRISPR-Cas de Tipo VI de tipo salvaje. Se puede determinar una secuencia repetida de un locus CRISPR-Cas de tipo salvaje mediante algoritmos establecidos, como el uso de CRISPRfinder ofrecido a través de CRISPRdb (ver, Grissa et al. Nucleic Acids Res. 35(Web Server issue):W52-7). En algunas modalidades, una secuencia repetida o una porción de la misma está enlazada en su extremo 3' al extremo 5' de una secuencia espaciadora, formando así una secuencia repetida-espaciadora (por ejemplo, ácido nucleico guía, ARN/ADN guía, crRNA, crDNA).

En algunas modalidades, una secuencia repetida comprende, consiste esencialmente en, o consiste en al menos 10 nucleótidos, dependiendo de la repetición particular y si el ácido nucleico guía que comprende la repetición está procesado o no procesado (por ejemplo, alrededor de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 a 100 o más nucleótidos, o cualquier rango o valor en ese intervalo; por ejemplo, alrededor de). En algunas modalidades, una secuencia repetida comprende, consiste esencialmente en, o consiste en alrededor de 10 a alrededor de 20, alrededor de 10 a alrededor de 30, alrededor de 10 a alrededor de 45, alrededor de 10 a alrededor de 50, alrededor de 15 a alrededor de 30, alrededor de 15 a alrededor de 40, alrededor de 15 a alrededor de 45, alrededor de 15 a alrededor de 50, alrededor de 20 a alrededor de 30, alrededor de 20 a alrededor de 40, alrededor de 20 a alrededor de 50, alrededor de 30 a alrededor de 40, alrededor de 40 a alrededor de 80, alrededor de 50 a alrededor de 100 o más nucleótidos.

Una secuencia repetida enlazada al extremo 5' de una secuencia espaciadora puede comprender una porción de una secuencia repetida (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o más nucleótidos contiguos de una secuencia repetida de tipo salvaje). En algunas modalidades, una porción de una secuencia repetida enlazada al extremo 5' de una secuencia espaciadora puede tener entre cinco y diez nucleótidos consecutivos de longitud (por ejemplo, alrededor de 5, 6, 7, 8, 9, 10 nucleótidos) y tener al menos un 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos alrededor de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más) con la misma región (por ejemplo, extremo 5') de una secuencia de nucleótidos repetida de CRISPR Cas de tipo salvaje. En algunas modalidades, una porción de una secuencia repetida puede comprender una estructura similar a un pseudonudo en su extremo 5' (por ejemplo, "asa").

Una "secuencia espaciadora" tal como se utiliza en el presente documento, es una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ácido nucleico objetivo (por ejemplo, ADN objetivo) (por ejemplo, protospaciador). La secuencia espaciadora puede ser completamente complementaria o sustancialmente complementaria (por ejemplo, al menos alrededor del 70% complementaria (por ejemplo, alrededor del 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más)) a un ácido nucleico objetivo. Por lo tanto, en algunas modalidades, la secuencia espaciadora puede tener uno, dos, tres, cuatro o cinco desajustes en comparación con el ácido nucleico objetivo, siendo estos desajustes contiguos o no contiguos. En algunas modalidades, la secuencia espaciadora puede tener un 70% de complementariedad con un ácido nucleico objetivo. En otras modalidades, la secuencia de nucleótidos espaciadora puede tener un 80% de complementariedad con un ácido nucleico objetivo. En otras modalidades, la secuencia de nucleótidos espaciadora puede tener un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99.5% de complementariedad, y similares, con el ácido nucleico objetivo (protospaciador). En algunas modalidades, la secuencia espaciadora es 100% complementaria al ácido nucleico objetivo. Una secuencia espaciadora puede tener una longitud de alrededor de 15 nucleótidos a alrededor de 30 nucleótidos (por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o cualquier rango o valor en ese intervalo). Por lo tanto, en algunas modalidades, una secuencia espaciadora puede tener complementariedad completa o sustancial sobre una región de un ácido nucleico objetivo (por ejemplo, protospaciador) que tiene al menos alrededor de 15 nucleótidos a alrededor de 30 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el espaciador tiene alrededor de 20 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el espaciador tiene alrededor de 21, 22 o 23 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, la región 5' de una secuencia espaciadora de un ácido nucleico guía puede ser completamente complementaria a un ácido nucleico objetivo, mientras que la región 3' de la espaciadora puede ser sustancialmente complementaria al ácido nucleico objetivo (como para una espaciadora en un sistema CRISPR-Cas de Tipo V), o la región 3' de una secuencia espaciadora de un ácido nucleico guía puede ser completamente complementaria a un ácido nucleico objetivo, mientras que la región 5' de la espaciadora puede ser sustancialmente complementaria al ácido nucleico objetivo (como para una espaciadora en un sistema CRISPR-Cas de Tipo II), y por lo tanto, la complementariedad global de la secuencia espaciadora al ácido nucleico objetivo puede ser menor al 100%.

Así, por ejemplo, en un ácido nucleico guía para un sistema CRISPR-Cas de Tipo V, los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nucleótidos en la región 5' (es decir, la región de semilla) de, por ejemplo, una secuencia espaciadora de 20 nucleótidos, pueden ser 100% complementarios al ácido nucleico objetivo, mientras que los nucleótidos restantes en la región 3' de la secuencia espaciadora son sustancialmente complementarios (por ejemplo, al menos alrededor del 70% complementarios) al ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, los primeros 1 a 8

nucleótidos (por ejemplo, los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 nucleótidos, y cualquier rango dentro de ellos) del extremo 5' de la secuencia espaciadora pueden ser 100% complementarios al ácido nucleico objetivo, mientras que los nucleótidos restantes en la región 3' de la secuencia espaciadora son sustancialmente complementarios (por ejemplo, al menos alrededor del 50% complementarios (por ejemplo, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más)) al ácido nucleico objetivo.

Como otro ejemplo, en un ácido nucleico guía para un sistema CRISPR-Cas de Tipo II, los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nucleótidos en la región 3' (es decir, la región de semilla) de, por ejemplo, una secuencia espaciadora de 20 nucleótidos, pueden ser 100% complementarios al ácido nucleico objetivo, mientras que los nucleótidos restantes en la región 5' de la secuencia espaciadora son sustancialmente complementarios (por ejemplo, al menos alrededor del 70% complementarios) al ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, los primeros 1 a 10 nucleótidos (por ejemplo, los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nucleótidos, y cualquier rango dentro de ellos) del extremo 3' de la secuencia espaciadora pueden ser 100% complementarios al ácido nucleico objetivo, mientras que los nucleótidos restantes en la región 5' de la secuencia espaciadora son sustancialmente complementarios (por ejemplo, al menos alrededor del 50% complementarios (por ejemplo, al menos alrededor del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más o cualquier rango o valor dentro de este intervalo)) al ácido nucleico objetivo). Un ARN guía de reclutamiento comprende además uno o más motivos de reclutamiento como se describe aquí, que pueden estar enlazados al extremo 5' del guía o al extremo 3' o puede ser insertado en el ácido nucleico guía de reclutamiento (por ejemplo, dentro del bucle de horquilla).

Un "motivo de reclutamiento" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una mitad de un par de unión que puede ser utilizado para reclutar un compuesto al cual el motivo de reclutamiento está unido a otro compuesto que incluye la otra mitad del par de unión (es decir, un "motivo correspondiente"). El motivo de reclutamiento y el motivo correspondiente pueden unirse de manera covalente y/o no covalente. En algunas modalidades, un motivo de reclutamiento es un motivo de reclutamiento de ARN (por ejemplo, un motivo de reclutamiento de ARN que es capaz de unirse y/o está configurado para unirse a un polipéptido de afinidad), un polipéptido de afinidad (por ejemplo, un polipéptido de afinidad que es capaz de unirse y/o está configurado para unirse a un motivo de reclutamiento de ARN y/o a una etiqueta peptídica), o una etiqueta peptídica (por ejemplo, una etiqueta peptídica que es capaz de unirse y/o está configurada para unirse a un polipéptido de afinidad). Por ejemplo, cuando un motivo de reclutamiento es un motivo de reclutamiento de ARN, el motivo correspondiente para el motivo de reclutamiento de ARN puede ser un polipéptido de afinidad que se une al motivo de reclutamiento de ARN. Otro ejemplo es que cuando un motivo de reclutamiento es una etiqueta peptídica, el motivo correspondiente para la

etiqueta peptídica puede ser un polipéptido de afinidad que se une a la etiqueta peptídica. Así, un compuesto que comprende un motivo de reclutamiento (por ejemplo, un polipéptido de afinidad) puede ser reclutado a otro compuesto (por ejemplo, un ácido nucleico guía) que comprende un motivo correspondiente para el motivo de reclutamiento (por ejemplo, un motivo de reclutamiento de ARN). Ejemplos de etiquetas peptídicas (por ejemplo, epítopo) incluyen, pero no se limitan a, una etiqueta peptídica GCN4 (por ejemplo, Sun-Tag), una etiqueta de afinidad c-Myc, una etiqueta de afinidad HA, una etiqueta de afinidad His, una etiqueta de afinidad S, una etiqueta de afinidad metionina-His, una etiqueta de afinidad RGD-His, un octapéptido FLAG, una etiqueta strep o etiqueta strep II, una etiqueta V5, y/o un epítopo VSV-G.

En algunas modalidades, una región de semilla de una espaciadora puede tener una longitud de alrededor de 8 a alrededor de 10 nucleótidos, alrededor de 5 a alrededor de 6 nucleótidos, o alrededor de 6 nucleótidos.

Un "ácido nucleico objetivo", "ADN objetivo", "secuencia de nucleótidos objetivo", "región objetivo" y "región objetivo en el genoma" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a una región del genoma de un organismo (por ejemplo, el genoma de una planta) que comprende una secuencia que es completamente complementaria (100% complementaria) o sustancialmente complementaria (por ejemplo, al menos un 70% complementaria (por ejemplo, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más)) a una secuencia espaciadora en un ácido nucleico guía como se define aquí. Un ácido nucleico objetivo es objetivo de un sistema de edición (o un componente del mismo) como se describe aquí. Una región objetivo útil para un sistema CRISPR-Cas puede estar ubicada inmediatamente 3' (por ejemplo, sistema CRISPR-Cas de Tipo V) o inmediatamente 5' (por ejemplo, sistema CRISPR-Cas de Tipo II) a una secuencia PAM en el genoma del organismo (por ejemplo, un genoma de planta o un genoma de mamífero (por ejemplo, humano)). Una región objetivo puede ser seleccionada de cualquier región de al menos 15 nucleótidos consecutivos (por ejemplo, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos, y similares) ubicada inmediatamente adyacente a una secuencia PAM.

Una "secuencia protospaciadora" o "protospaciadora" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una secuencia que es completamente o sustancialmente complementaria a (y puede hibridarse con) una secuencia espaciadora de un ácido nucleico guía. En algunas modalidades, la protospaciadora es toda o una porción de un ácido nucleico objetivo como se define aquí que es completamente o sustancialmente complementaria (y se hibrida) con la secuencia espaciadora de las secuencias CRISPR repetición-espaciadora (por ejemplo, ácidos nucleicos guía, matrices CRISPR, crRNAs).

En el caso de los sistemas CRISPR-Cas de Tipo V (por ejemplo, Cas12a) y sistemas CRISPR-Cas de Tipo II (Cas9), la secuencia protospaciadora está flanqueada por (por ejemplo, inmediatamente adyacente a) un motivo adyacente a la protospaciadora (PAM). Para los sistemas

CRISPR-Cas de Tipo IV, el PAM está ubicado en el extremo 5' en la cadena no objetivo y en el extremo 3' de la cadena objetivo (ver a continuación, como ejemplo).

5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3' ARN Espaciador

5 | | | | | | | | | | | | | | |
 3'AAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5' Cadena objetivo
 | | | |
 5'TTTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3' Cadena no objetivo

10 En los sistemas CRISPR-Cas de Tipo II (por ejemplo, Cas9), el motivo adyacente a la protospaciadora (PAM) está ubicado inmediatamente 3' de la región objetivo. El PAM para los sistemas CRISPR-Cas de Tipo I está ubicado 5' de la cadena objetivo. No se conoce PAM para los sistemas CRISPR-Cas de Tipo III. Makarova et al. describe la nomenclatura para todas las clases, tipos y subtipos de sistemas CRISPR (Nature Reviews Microbiology 13:722–736 (2015)).
 15 Las estructuras guía y los PAMs están descritos por R. Barrangou (Genome Biol. 16:247 (2015)).

Los PAMs canónicos de Cas12a son ricos en T. En algunas modalidades, una secuencia PAM canónica de Cas12a puede ser 5'-TTN, 5'-TTTN, o 5'-TTTV. En algunas modalidades, los PAMs canónicos de Cas9 (por ejemplo, *S. pyogenes*) pueden ser 5'-NGG-3'. Se pueden usar PAMs no canónicos en algunas modalidades, pero pueden ser menos eficientes.

20 Se pueden determinar secuencias adicionales de PAM mediante enfoques experimentales y computacionales establecidos por expertos en el campo. Por ejemplo, enfoques experimentales incluyen el objetivo de una secuencia flanqueada por todas las posibles secuencias de nucleótidos e identificando miembros de secuencia que no se someten a orientación, como a través de la transformación de ADN de plásmido objetivo (Esvelt et al. 2013. Nat. Methods 10:1116-1121;
 25 Jiang et al. 2013. Nat. Biotechnol. 31:233-239). En algunos aspectos, un enfoque computacional puede incluir realizar búsquedas BLAST de espaciadores naturales para identificar secuencias de ADN objetivo originales en bacteriófagos o plásmidos y alinear estas secuencias para determinar secuencias conservadas adyacentes a la secuencia objetivo (Briner and Barrangou. 2014. Appl. Environ. Microbiol. 80:994-1001; Mojica et al. 2009. Microbiology 155:733-740).

30 En algunas modalidades, un ácido nucleico guía además comprende una plantilla de transcriptasa inversa y puede ser referido como un ácido nucleico guía extendido. Un "ácido nucleico guía extendido", como se usa aquí, es un ácido nucleico guía según se describe aquí que además comprende una plantilla de transcriptasa inversa (RTT) y/o un sitio de unión de cebador (PBS). En algunas modalidades, un ácido nucleico guía extendido es un ARN guía de edición
 35 primaria diseñado (pegRNA). Un ácido nucleico guía extendido puede ser un ARN guía de alelo objetivo (tagRNA) o un ARN guía de alelo objetivo estabilizado (stagRNA). Un "tagRNA", como se usa aquí, se refiere a un ácido nucleico guía extendido que comprende un PBS y un RTT y tiene complementariedad con la cadena objetivo. Un "stagRNA", como se usa aquí, se refiere a un

tagRNA que comprende un motivo de estabilización. Un motivo de estabilización puede estar presente en el extremo 3' y/o 5' de un tagRNA. En algunas modalidades, un motivo de estabilización está presente en el extremo 3' de un tagRNA. Ejemplos de motivos de estabilización incluyen, pero no se limitan a, motivos de reclutamiento, horquillas de ARN, secuencias de pseudonudos y/o motivos PP7 (por ejemplo, una secuencia de horquilla de ARN PP7).

En algunos casos, un stagRNA es un tagRNA que incluye una secuencia de horquilla de ARN PP7. En ciertas modalidades, una proteína efectora CRISPR-Cas (por ejemplo, una proteína efectora de Tipo II o Tipo V CRISPR-Cas), una transcriptasa inversa y un ácido nucleico guía extendido pueden formar un complejo o estar comprendidos en un complejo.

Un ácido nucleico guía extendido puede incluir una porción extendida que contiene un sitio de unión de cebador y una plantilla de transcriptasa inversa, donde la plantilla de transcriptasa inversa contiene la modificación (por ejemplo, una edición) que se incorporará en un ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, un ácido nucleico guía extendido incluye, en su extremo 3', un sitio de unión de cebador y una modificación (por ejemplo, una edición) que se incorporará en el ácido nucleico objetivo (por ejemplo, una plantilla de transcriptasa inversa).

Un ácido nucleico guía extendido puede estructurarse de diferentes maneras, como se describe en Anzalone et al., *Nature*, 2019 Dec; 576(7785): 149–157. Puede incluir un sitio de unión de cebador (PBS) opcionalmente con una secuencia de 1 a 15 nucleótidos y una secuencia de plantilla de transcriptasa inversa (RT template) de al menos 65 nucleótidos. El PBS puede tener una secuencia de menos de 15 nucleótidos, por ejemplo, de 1 a 14 nucleótidos. La secuencia de RT template puede seguir a la secuencia de PBS en dirección 5' a 3' y tener más de 65 nucleótidos, con al menos 50 nucleótidos de heterología en relación con el sitio objetivo seguidos de al menos 15 nucleótidos de homología al sitio objetivo.

Cuando el ácido nucleico guía extendido se transcribe inversamente, la secuencia recién transcrita puede hibridarse con la hebra no cortada del sitio objetivo, creando así un ADN heterodúplex con una gran inserción en la hebra recién sintetizada. La reparación de este ADN emparejado incorrectamente puede resultar en una gran inserción (por ejemplo, mayor a 50 nucleótidos) o una gran delección (por ejemplo, mayor a 50 nucleótidos) de secuencia de ADN.

En algunas modalidades, el PBS y los 15 o más nucleótidos de homología al sitio objetivo pueden formar brazos de homología, que pueden facilitar la inserción de la heterología en el sitio objetivo mediante reparación dirigida por homología. La secuencia de ADN insertada puede corresponder a cualquier secuencia funcional de ADN, como un transgen funcional, un fragmento de ADN que produce un ARN de horquilla suficiente para silenciar genes homólogos a través de ARNi, o sitios de recombinación específica del sitio funcional, como lox, frt, que luego podrían ser utilizados en procesos de recombinación específica del sitio mediados por Cre o Flp.

En algunos casos, un ácido nucleico guía extendido puede ser demasiado grande para producirse utilizando un promotor PolIII in vivo, por lo que puede estar operativamente asociado y/o producido usando un promotor PolII.

Una polipéptido de unión al ADN (por ejemplo, un dominio de unión al ADN) y/o una endonucleasa de ADN pueden tener una estructura y/o estar diseñados según se describe en Anzalone et al., *Nature*, 2019 Dec; 576(7785): 149–157. Esto incluye polipéptidos de unión al ADN y/o endonucleasas de CRISPR-Cas como Cas9 nickasa, una variante de nicking de otro polipéptido de CRISPR-Cas, o Cas12a.

En algunas modalidades, pueden utilizarse dos ácidos nucleicos guía extendidos (por ejemplo, pegRNA) (por ejemplo, un sistema de edición puede comprender dos ácidos nucleicos guía extendidos). Uno o ambos de los dos ácidos nucleicos guía extendidos pueden tener una estructura y/o estar diseñados según se describe en Anzalone et al., *Nature*, 2019 Dic; 576(7785): 149–157. Los dos ácidos nucleicos guía extendidos pueden comprender un sitio de unión de cebador (PBS) opcionalmente con una secuencia de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos y una secuencia de plantilla de transcriptasa inversa (RT) opcionalmente con una secuencia de 50 nucleótidos o más. Las secuencias RT de los dos ácidos nucleicos guía extendidos pueden ser complementarias entre sí y como tal, los polinucleótidos que se transcriben inversamente desde cada una de las plantillas RT serán complementarios entre sí y podrán hibridarse entre sí. Esto puede permitir que los intermediarios producidos por este sistema y/o método unan dos secciones de ADN que de otro modo estarían separadas por más de 50 nucleótidos, por ejemplo, dentro de un cromosoma, o que estén posicionadas en dos piezas separadas de ADN, por ejemplo, en dos cromosomas diferentes. Después de la reparación de los intermediarios, los productos resultantes pueden producir, dependiendo del diseño de la plantilla RT, grandes deleciones, inversiones grandes o recombinaciones intercromosómicas. Dado que todos estos productos son producidos por reparación dirigida por homología, los productos pueden ser predeciblemente precisos y/o reproducibles. En algunas modalidades, un polipéptido de unión al ADN (por ejemplo, un dominio de unión al ADN) y/o una endonucleasa de ADN pueden tener una estructura y/o estar diseñados según se describe en Anzalone et al., *Nature*, 2019 Dic; 576(7785): 149–157. En algunas modalidades, un polipéptido de unión al ADN y/o una endonucleasa de ADN es un polipéptido CRISPR Cas como una nucleasa Cas9, una variante de corte similar de otro polipéptido CRISPR Cas, o Cas12a. En algunas modalidades, un polipéptido de unión al ADN y/o una endonucleasa de ADN es una nucleasa Cas9, una nucleasa similar de otro polipéptido CRISPR Cas, o Cas12a. El uso de una nucleasa (en lugar de un nickasa) puede facilitar los procesos de recombinación intra- o intercromosómica a través del apareamiento de hebras sencillas de los voladizos de más de 50 nucleótidos que se producirían en cada uno de los dos sitios objetivo correspondientes a los dos ácidos nucleicos guía pegRNA. En algunas modalidades, un sistema de edición comprende un ácido nucleico guía extendido y un ácido nucleico guía que carece de una plantilla de transcriptasa inversa y/o un sitio de unión de cebador.

Un ácido nucleico guía extendido puede comprender un ácido nucleico CRISPR (por ejemplo, ARN CRISPR, ADN CRISPR, crRNA, crDNA) y/o un ácido nucleico CRISPR y un ácido nucleico tracr; y (b) una porción extendida que comprende un sitio de unión de cebador y una

plantilla de transcriptasa inversa (RT), donde la plantilla RT codifica una modificación que se incorporará en el ácido nucleico objetivo. El ácido nucleico CRISPR puede ser un ácido nucleico CRISPR de Tipo II o Tipo V y/o el ácido nucleico tracr puede ser cualquier tracr correspondiente al ácido nucleico CRISPR de Tipo II o Tipo V apropiado. En algunas modalidades, un ácido

5 nucleico guía extendido comprende: (i) un ácido nucleico CRISPR de Tipo V o un ácido nucleico CRISPR de Tipo II (por ejemplo, un ARN CRISPR de Tipo II o Tipo V, ADN CRISPR de Tipo II o Tipo V, crRNA de Tipo II o Tipo V, o crDNA de Tipo II o Tipo V) y/o un ácido nucleico CRISPR y un ácido nucleico tracr (por ejemplo, un tracrRNA de Tipo II o Tipo V, tracrDNA de Tipo II o Tipo V); y (ii) una porción extendida que comprende un sitio de unión de cebador y una plantilla de

10 transcriptasa inversa (RT), donde el ácido nucleico CRISPR de Tipo V o el ácido nucleico CRISPR de Tipo II comprende un espaciador que se une a una primera hebra (por ejemplo, la hebra objetivo) de un ácido nucleico objetivo (por ejemplo, el espaciador es complementario a una porción de nucleótidos consecutivos en la primera hebra del ácido nucleico objetivo) y el sitio de unión de cebador se une a la primera hebra (por ejemplo, hebra objetivo). En algunas

15 modalidades, la porción extendida puede fusionarse con el extremo 5' o 3' del ácido nucleico CRISPR (por ejemplo, de 5' a 3': repetir-espaciador-porción extendida o porción extendida-repetir-espaciador) y/o con el extremo 5' o 3' del ácido nucleico tracr. En algunas modalidades, la porción extendida de un ácido nucleico guía extendido comprende, de 5' a 3', una plantilla de transcriptasa inversa (RTT) y un sitio de unión de cebador (PBS) (por ejemplo, 5'-crRNA-espaciador-RTT(edit

20 codificado)-PBS-3') o comprende de 5' a 3' un PBS y RTT, dependiendo de la ubicación de la porción extendida en relación con el ácido nucleico CRISPR del ácido nucleico guía extendido (por ejemplo, 5'-crRNA-espaciador-PBS-RTT(edit codificado)-3'). Por ejemplo, en algunas modalidades, una porción extendida del ácido nucleico guía extendido puede comprender, de 5' a 3', una plantilla de transcriptasa inversa y un sitio de unión de cebador (cuando el guía extendido

25 está vinculado al extremo 3' del ácido nucleico CRISPR). En algunas modalidades, una porción extendida del guía extendido puede comprender, de 5' a 3', un sitio de unión de cebador y una plantilla de transcriptasa inversa (cuando el guía extendido está vinculado al extremo 5' del ácido nucleico CRISPR).

En algunas modalidades, un ácido nucleico objetivo es de doble hebra y comprende una

30 primera hebra y una segunda hebra y un sitio de unión de cebador de un ácido nucleico guía extendido se une a la segunda hebra (por ejemplo, la hebra no objetivo, superior) del ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, un ácido nucleico objetivo es de doble hebra y comprende una primera hebra y una segunda hebra y un sitio de unión de cebador de un ácido nucleico guía extendido se une a la primera hebra (por ejemplo, se une a la hebra objetivo,

35 opcionalmente la misma hebra a la que se recluta una proteína efectora CRISPR-Cas, hebra inferior) del ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, un ácido nucleico objetivo es de doble hebra y comprende una primera hebra y una segunda hebra y el sitio de unión de cebador de un ácido nucleico guía extendido se une a la segunda hebra (por ejemplo, la hebra no objetivo,

opcionalmente la hebra opuesta a la que se recluta la proteína efectora CRISPR-Cas) del ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, una transcriptasa inversa (RT) puede añadirse a la hebra objetivo de un ácido nucleico objetivo (por ejemplo, la hebra a la que es complementario el espaciador del ácido nucleico CRISPR del ácido nucleico guía extendido y a la que se recluta la proteína efectora CRISPR-Cas). En algunas modalidades, la transcriptasa inversa (RT) se añade a la hebra no objetivo de un ácido nucleico objetivo (por ejemplo, la hebra que es complementaria a la hebra a la que es complementario el espaciador del ácido nucleico CRISPR y a la que se recluta la proteína efectora CRISPR-Cas). Se describen métodos ejemplares y sistemas de edición en la Publicación de Patente Internacional No. WO 2021/092130, Publicación de Patente Internacional No. WO 2022/098993, y Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. Nos. 2021/0147862, 2021/0130835, 2021/0147862, y 2022/0145334, cada una de las cuales se incorpora aquí en su totalidad por referencia.

El modelo de RT de un ácido nucleico guía extendido puede codificar uno o más modificaciones (por ejemplo, ediciones) para ser incorporadas en un ácido nucleico objetivo. Una o más modificaciones pueden estar ubicadas en cualquier posición dentro de un modelo de RT (por ejemplo, donde la ubicación de la posición puede ser relativa a la posición de un motivo adyacente al protospacer (PAM) del ácido nucleico objetivo). En algunas modalidades, un modelo de RT tiene una modificación en una o más posiciones desde -1 hasta 23 (por ejemplo, -1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23) en relación con la posición de un motivo adyacente al protospacer (PAM) (por ejemplo, TTTG) en un ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, un modelo de RT puede comprender una modificación ubicada en la posición nucleotídica -1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23. En algunas modalidades, un modelo de RT puede comprender una modificación ubicada en la posición nucleotídica 4 a la posición nucleotídica 17 (por ejemplo, posición 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17) del modelo de RT en relación con la posición de un PAM de un ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, un modelo de RT puede comprender una modificación ubicada en la posición nucleotídica 10 a la posición nucleotídica 17 (por ejemplo, posición 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17) del modelo de RT en relación con la posición de un PAM de un ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, un modelo de RT puede comprender una modificación ubicada en la posición nucleotídica 12 a la posición nucleotídica 15 (por ejemplo, posición 12, 13, 14 o 15) del modelo de RT en relación con la posición de un PAM de un ácido nucleico objetivo.

En algunas modalidades, una porción extendida de un ácido nucleico guía extendido puede comprender, de 5' a 3', un modelo de RT y un sitio de unión de iniciador (por ejemplo, cuando la porción extendida está ligada al extremo 3' de un ácido nucleico CRISPR). En algunas modalidades, una porción extendida de un ácido nucleico guía extendido puede comprender, de 5' a 3', un sitio de unión de iniciador y un modelo de RT (RTT) (por ejemplo, cuando la porción extendida está ligada al extremo 5' del ácido nucleico CRISPR). En algunas modalidades, un modelo de RT puede tener una longitud de aproximadamente 1 nucleótido a aproximadamente

100 nucleótidos (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o más nucleótidos, y cualquier rango o valor dentro de ellos), por ejemplo, aproximadamente 1 nucleótido a aproximadamente 10 nucleótidos, aproximadamente 1 nucleótido a aproximadamente 15 nucleótidos, aproximadamente 1 nucleótido a aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 1 nucleótido a aproximadamente 25 nucleótidos, aproximadamente 1 nucleótido a aproximadamente 30 nucleótidos, aproximadamente 1 nucleótido a aproximadamente 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos, aproximadamente 1 nucleótido a aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 15 nucleótidos, aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 25 nucleótidos, aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos, aproximadamente 5 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 8 nucleótidos a aproximadamente 15 nucleótidos, aproximadamente 8 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 8 nucleótidos a aproximadamente 25 nucleótidos, aproximadamente 8 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, aproximadamente 8 nucleótidos a aproximadamente 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos, aproximadamente 8 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, aproximadamente 8 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 15 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 25 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 30 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 36 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 40 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud y cualquier rango o valor dentro de ellos.

En algunas modalidades, la longitud de un modelo de RT puede ser de al menos 8 nucleótidos, opcionalmente aproximadamente 8 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos. En algunas modalidades, la longitud de un modelo de RT es de 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos o menos (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos de longitud, o cualquier valor o rango dentro de ellos (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 nucleótidos de longitud a aproximadamente 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos de longitud). En algunas modalidades, la longitud de un modelo de RT puede ser de al menos 30 nucleótidos,

opcionalmente aproximadamente 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos de longitud a aproximadamente 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 o 80 nucleótidos de longitud, o cualquier rango o valor dentro de ellos. En algunas modalidades, la longitud de un modelo de RT puede ser de aproximadamente 36, 40, 44, 47, 50, 52, 55, 63, 72 o 74 nucleótidos. Dentro de la longitud del RTT puede haber una o más modificaciones presentes.

Aquí está la traducción fiel al español (México) del texto proporcionado, siguiendo todas las reglas establecidas:

Una o más modificaciones pueden estar ubicadas en cualquier parte del RTT, donde la posición de la modificación puede describirse en relación con la posición de un motivo adyacente al protospacer (PAM) de un ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, una plantilla de RTT puede comprender una modificación ubicada en la posición del nucleótido -1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23. En algunas modalidades, una plantilla de RTT puede comprender una modificación ubicada en la posición del nucleótido 4 a la posición del nucleótido 17 (por ejemplo, posiciones 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17) de la plantilla de RTT en relación con la posición de un motivo adyacente al protospacer (PAM) de un ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, una plantilla de RTT puede comprender una modificación ubicada en la posición del nucleótido 10 a la posición del nucleótido 17 (por ejemplo, posiciones 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17) de la plantilla de RTT en relación con la posición de un motivo adyacente al protospacer (PAM) de un ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, una plantilla de RTT puede comprender una modificación ubicada en la posición del nucleótido 12 a la posición del nucleótido 15 (por ejemplo, posiciones 12, 13, 14 o 15) de la plantilla de RTT en relación con la posición de un motivo adyacente al protospacer (PAM) de un ácido nucleico objetivo.

Según se usa aquí, un "sitio de unión de cebador" (PBS) de una porción extendida de un ácido nucleico guía extendido (por ejemplo, un tagARN) se refiere a una secuencia de nucleótidos consecutivos que pueden unirse a una región o "cebador" en un ácido nucleico objetivo, es decir, que es complementario al cebador del ácido nucleico objetivo. Como ejemplo, una proteína efectora CRISPR Cas (por ejemplo, de Tipo II o Tipo V, por ejemplo, Cas 9 o Cas12a) puede cortar el ADN y el extremo 3' del ADN cortado actúa como cebador para la porción PBS del ácido nucleico guía extendido. El PBS puede ser complementario al extremo 3' de una hebra del ácido nucleico objetivo y puede unirse y/o estar configurado para unirse tanto a la hebra objetivo como a la hebra no objetivo. Un sitio de unión de cebador puede ser completamente complementario al cebador o puede ser sustancialmente complementario (por ejemplo, al menos un 70% complementario (por ejemplo, 70% o alrededor de 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% o más)) al cebador de un ácido nucleico objetivo. En algunas modalidades, la longitud de un sitio de unión de cebador de una porción extendida puede ser de

aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o más nucleótidos, o cualquier valor o rango dentro de este); o aproximadamente 4 nucleótidos a aproximadamente 85 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 25 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 30 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 40 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 45 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 45 nucleótidos a aproximadamente 75 nucleótidos, o aproximadamente 45 nucleótidos a aproximadamente 60 nucleótidos, o cualquier rango o valor dentro de ellos. En algunas modalidades, la longitud de un PBS puede ser de al menos 30 nucleótidos, opcionalmente de aproximadamente 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40 nucleótidos a aproximadamente 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, o 80 nucleótidos de longitud, o cualquier rango o valor dentro de ellos. En algunas modalidades, la longitud de un PBS puede ser de aproximadamente 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72 o 80 nucleótidos.

En algunas modalidades, un RTT puede tener una longitud de aproximadamente 35 nucleótidos a aproximadamente 75 nucleótidos y un PBS puede tener una longitud de aproximadamente 30 nucleótidos a aproximadamente 80 nucleótidos, opcionalmente donde el PBS puede tener una longitud de aproximadamente 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72 o 80 nucleótidos y el RTT puede tener una longitud de aproximadamente 36, 40, 44, 47, 50, 52, 55, 63, 72 o 74 nucleótidos, o cualquier combinación de longitud de RTT y/o longitud de PBS.

En algunas modalidades, una porción extendida de un ácido nucleico guía extendido puede estar fusionada tanto al extremo 5' como al 3' de un ácido nucleico CRISPR de Tipo II o Tipo V (por ejemplo, de 5' a 3': repetición-espaciador-porción extendida, o porción extendida-repetición-espaciador) y/o al extremo 5' o 3' del ácido nucleico tracr. En algunas modalidades, cuando una porción extendida está ubicada en el 5' del crRNA, se modifica una proteína efectora CRISPR-Cas de Tipo V para reducir (o eliminar) la actividad de RNAasa autoprocetadora.

En algunas modalidades, la porción extendida de un ácido nucleico guía extendido puede estar unida al ácido nucleico CRISPR de Tipo II o Tipo V y/o al tracrRNA de Tipo II o Tipo V mediante un enlace. En algunas modalidades, un enlace tiene una longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nucleótidos o más (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86,

87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o más nucleótidos de longitud, y cualquier rango dentro de ellos (por ejemplo, aproximadamente 2 a aproximadamente 40, aproximadamente 2 a aproximadamente 50, aproximadamente 2 a aproximadamente 60, aproximadamente 4 a aproximadamente 40, aproximadamente 4 a aproximadamente 50, aproximadamente 4 a aproximadamente 60, aproximadamente 5 a aproximadamente 40, aproximadamente 5 a aproximadamente 50, aproximadamente 5 a aproximadamente 60, aproximadamente 9 a aproximadamente 40, aproximadamente 9 a aproximadamente 50, aproximadamente 9 a aproximadamente 60, aproximadamente 10 a aproximadamente 40, aproximadamente 10 a aproximadamente 50, aproximadamente 10 a aproximadamente 60, aproximadamente 40 a aproximadamente 100, aproximadamente 50 a aproximadamente 100, o aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 nucleótidos a aproximadamente 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o más nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 105, 110, 115, 120, 130, 140, 150 o más nucleótidos de longitud).

Un ácido nucleico guía y/o un ácido nucleico guía extendido pueden comprender uno o más motivos reclutadores como se describe aquí, los cuales pueden estar vinculados al extremo 5' y/o al extremo 3' del ácido nucleico guía y/o pueden ser insertados en el ácido nucleico guía (por ejemplo, dentro de un bucle de horquilla del ácido nucleico guía). En algunas modalidades, un ácido nucleico guía extendido puede estar vinculado a un motivo reclutador de ARN. Un ácido nucleico guía extendido y/o ácido nucleico guía puede estar vinculado a uno o a dos o más motivos reclutadores de ARN (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más motivos; por ejemplo, al menos 10 a aproximadamente 25 motivos), opcionalmente donde los dos o más motivos reclutadores de ARN pueden ser el mismo motivo reclutador de ARN o diferentes motivos reclutadores de ARN. En algunas modalidades, un motivo reclutador de ARN puede estar ubicado en el extremo 3' de la porción extendida de un ácido nucleico guía extendido (por ejemplo, 5'-3', repetición - espaciador - porción extendida (sitio de unión de cebador de plantilla de RT) - motivo reclutador de ARN). En algunas modalidades, un motivo reclutador de ARN puede estar incrustado en la porción extendida de un ácido nucleico guía extendido.

En algunas modalidades, un sistema de edición comprende un ácido nucleico guía extendido que está vinculado a un motivo reclutador de ARN y una transcriptasa inversa que es una proteína de fusión de transcriptasa inversa, donde la proteína de fusión de transcriptasa inversa comprende un polipéptido de transcriptasa inversa fusionado a un polipéptido de afinidad que se une al motivo reclutador de ARN, donde el ácido nucleico guía extendido se une a un ácido nucleico objetivo y el motivo reclutador de ARN se une al polipéptido de afinidad, reclutando así la proteína de fusión de transcriptasa inversa al ácido nucleico guía extendido y poniendo en contacto el ácido nucleico objetivo con la transcriptasa inversa. En algunas modalidades, se

pueden reclutar dos o más proteínas de fusión de transcriptasa inversa a un ácido nucleico guía extendido, poniendo así en contacto el ácido nucleico objetivo con dos o más proteínas de fusión de transcriptasa inversa.

Los términos "transgen" o "transgénico", según se utiliza aquí, se refieren al menos a una
 5 secuencia de ácido nucleico que se toma del genoma de un organismo o se produce sintéticamente, y que luego se introduce en una célula huésped (por ejemplo, una célula vegetal) u organismo o tejido de interés y que posteriormente se integra en el genoma del huésped mediante enfoques de transformación o transfección "estables". En contraste, el término "transformación" o "transfección" o introducción "transitoria" se refiere a una forma de introducir
 10 herramientas moleculares que incluyen al menos un ácido nucleico (ADN, ARN, de cadena simple o doble o una mezcla de los mismos) y/o al menos una secuencia de aminoácidos, opcionalmente que comprende agentes químicos o biológicos adecuados, para lograr una transferencia a al menos un compartimento de interés de una célula, incluyendo, pero no limitado a, el citoplasma, un organelo, incluyendo el núcleo, una mitocondria, una vacuola, un cloroplasto, o en una
 15 membrana, lo que resulta en la transcripción y/o traducción y/o asociación y/o actividad del al menos una molécula introducida sin lograr una integración estable o incorporación en el genoma y por lo tanto sin herencia de la respectiva al menos una molécula introducida en el genoma de una célula. El término "libre de transgén" se refiere a una condición en la que un transgén no está presente o se encuentra en el genoma de una célula huésped o tejido u organismo de interés.

Según se usa aquí, una "proteína efectora CRISPR-Cas" es una proteína o polipéptido que
 20 escinde, corta o hace muescas en un ácido nucleico; se une a un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico objetivo y/o un ácido nucleico guía); y/o que identifica, reconoce o se une a un ácido nucleico guía según se define aquí. En algunas modalidades, una proteína efectora CRISPR-Cas puede ser una enzima (por ejemplo, una nucleasa, endonucleasa, nickasa, etc.) y/o
 25 puede funcionar como una enzima. En algunas modalidades, una proteína efectora CRISPR-Cas se refiere a una nucleasa CRISPR-Cas. En algunas modalidades, una proteína efectora CRISPR-Cas comprende actividad de nucleasa y/o actividad de nickasa, comprende un dominio de nucleasa cuya actividad de nucleasa y/o actividad de nickasa ha sido reducida o eliminada, comprende actividad de clivaje de ADN de cadena simple (actividad de ss DNase) o que tiene
 30 actividad de ss DNase que ha sido reducida o eliminada, y/o comprende actividad de RNase de auto procesamiento o que tiene actividad de RNase de auto procesamiento que ha sido reducida o eliminada. Una proteína efectora CRISPR-Cas puede unirse a un ácido nucleico objetivo. Una proteína efectora CRISPR-Cas puede ser una proteína efectora CRISPR-Cas de Tipo I, II, III, IV, V o VI. En algunas modalidades, una proteína efectora CRISPR-Cas puede ser de un sistema
 35 CRISPR-Cas de Tipo I, un sistema CRISPR-Cas de Tipo II, un sistema CRISPR-Cas de Tipo III, un sistema CRISPR-Cas de Tipo IV, un sistema CRISPR-Cas de Tipo V o un sistema CRISPR-Cas de Tipo VI. En algunas modalidades, una proteína efectora CRISPR-Cas de la invención puede ser de un sistema CRISPR-Cas de Tipo II o un sistema CRISPR-Cas de Tipo V. En algunas

modalidades, una proteína efectora CRISPR-Cas puede ser una proteína efectora CRISPR-Cas de Tipo II, por ejemplo, una proteína efectora Cas9. En algunas modalidades, una proteína efectora CRISPR-Cas puede ser una proteína efectora CRISPR-Cas de Tipo V, por ejemplo, una proteína efectora Cas12.

5 Proteínas efectoras CRISPR-Cas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, Cas9, C2c1, C2c3, Cas12a (también conocido como Cpf1), Cas12b, Cas12c, Cas12d, Cas12e, Cas13a, Cas13b, Cas13c, Cas13d, Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas3', Cas3'', Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (también conocido como Csn1 y Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Cse3, Cse4, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, 10 Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 (dinG), y/o Csf5 nucleasa, opcionalmente donde la proteína efectora CRISPR-Cas puede ser una Cas9, Cas12a (Cpf1), Cas12b, Cas12c (C2c3), Cas12d (CasY), Cas12e (CasX), Cas12g, Cas12h, Cas12i, C2c4, C2c5, C2c8, C2c9, C2c10, Cas14a, Cas14b y/o proteína efectora Cas14c.

En algunas modalidades, una proteína efectora CRISPR-Cas útil con la invención puede 15 comprender una mutación en su sitio activo de nucleasa y/o dominio de nucleasa (por ejemplo, un sitio RuvC, HNH, por ejemplo, un sitio RuvC de un dominio de nucleasa Cas12a; por ejemplo, un sitio RuvC y/o sitio HNH de un dominio de nucleasa Cas9). Una proteína efectora CRISPR-Cas que tiene una mutación en su sitio activo de nucleasa y/o dominio de nucleasa y, por lo tanto, ya no tiene actividad nucleasa, se conoce comúnmente como "inactiva" o "muerta", por ejemplo, 20 dCas9. En algunas modalidades, una proteína efectora CRISPR-Cas que tiene una mutación en su sitio activo de nucleasa y/o dominio de nucleasa puede tener actividad deteriorada o reducida (por ejemplo, actividad nickasa) en comparación con la misma proteína efectora CRISPR-Cas sin la mutación.

Una proteína efectora CRISPR Cas9 o Cas9 útil con esta invención puede ser cualquier 25 nucleasa Cas9 conocida o identificada posteriormente. En algunas modalidades, una Cas9 de la presente invención puede ser una proteína de, por ejemplo, *Streptococcus* spp. (por ejemplo, *S. pyogenes*, *S. thermophilus*), *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Kandleria* spp., *Leuconostoc* spp., *Oenococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Weissella* spp., y/o *Olsenella* spp.

En algunas modalidades, la proteína efectora CRISPR-Cas puede ser una Cas9 derivada 30 de *Streptococcus pyogenes* y/o puede reconocer el motivo de secuencia PAM NGG, NAG, NGA (Mali et al, Science 2013; 339(6121): 823-826). En algunas modalidades, la proteína efectora CRISPR-Cas puede ser una Cas9 derivada de *Streptococcus thermophilus* y/o puede reconocer el motivo de secuencia PAM NGGNG y/o NNAGAAW (W = A o T) (Ver, por ejemplo, Horvath et al, Science, 2010; 327(5962): 167-170, y Deveau et al, J Bacteriol 2008; 190(4): 1390-1400). En 35 algunas modalidades, la proteína efectora CRISPR-Cas puede ser una Cas9 derivada de *Streptococcus mutans* y/o puede reconocer el motivo de secuencia PAM NGG y/o NAAR (R = A o G) (Ver, por ejemplo, Deveau et al, J BACTERIOL 2008; 190(4): 1390-1400). En algunas modalidades, la proteína efectora CRISPR-Cas puede ser una Cas9 derivada de *Streptococcus*

aureus y/o puede reconocer el motivo de secuencia PAM NNGRR (R = A o G). En algunas modalidades, la proteína efectora CRISPR-Cas puede ser una Cas9 derivada de *S. aureus* y/o puede reconocer el motivo de secuencia PAM N GRRT (R = A o G). En algunas modalidades, la proteína efectora CRISPR-Cas puede ser una Cas9 derivada de *S. aureus* y/o puede reconocer el motivo de secuencia PAM N GRRV (R = A o G). En algunas modalidades, la proteína efectora CRISPR-Cas puede ser una Cas9 que se deriva de *Neisseria meningitidis* y/o puede reconocer el motivo de secuencia PAM N GATT o N GCTT (R = A o G, V = A, G o C) (Ver, por ejemplo, Hou et al, PNAS 2013, 1-6). En las modalidades mencionadas anteriormente en este párrafo, N en el motivo de secuencia PAM puede ser cualquier residuo de nucleótido, por ejemplo, cualquiera de A, G, C o T. En algunas modalidades, la proteína efectora CRISPR-Cas puede ser una Cas13a derivada de *Leptotrichia shahii* y/o puede reconocer una secuencia flanqueante del protospacer (PFS) (o secuencia motivo PAM de ARN (rPAM)) de un único 3' A, U, o C, que puede estar localizada dentro del ácido nucleico objetivo.

Una proteína efectora CRISPR-Cas Tipo V útil con las modalidades de la invención puede ser cualquier nucleasa CRISPR-Cas Tipo V. Las proteínas efectoras CRISPR-Cas Tipo V ejemplares incluyen, pero no se limitan a, Cas12a (Cpf1), Cas12b, Cas12c (C2c3), Cas12d (CasY), Cas12e (CasX), Cas12g, Cas12h, Cas12i, C2c1, C2c4, C2c5, C2c8, C2c9, C2c10, Cas14a, Cas14b, y/o nucleasa Cas14c. En algunas modalidades, una proteína efectora CRISPR-Cas Tipo V puede ser una Cas12a. En algunas modalidades, una proteína efectora CRISPR-Cas Tipo V puede ser una nickasa, opcionalmente, una nickasa Cas12a.

En algunas modalidades, la proteína efectora CRISPR-Cas puede ser una nucleasa CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas regularmente interespaciadas)-Cas Tipo V. Cas12a difiere en varios aspectos de la nucleasa CRISPR Cas9 Tipo II más conocida. Por ejemplo, Cas9 reconoce un motivo PAM rico en G que está 3' de su sitio de unión a ARN guía (gRNA, sgRNA, crRNA, crDNA, matriz CRISPR) (3'-NGG), mientras que Cas12a reconoce un PAM rico en T que se encuentra 5' del ácido nucleico objetivo (5'-TTN, 5'-TTTN). De hecho, las orientaciones en las que Cas9 y Cas12a se unen a sus ARN guía están casi revertidas en relación con sus extremos N y C. Además, las enzimas Cas12a utilizan un solo ARN guía (gRNA, matriz CRISPR, crRNA) en lugar del ARN guía dual (sgRNA (por ejemplo, crRNA y tracrRNA)) que se encuentra en los sistemas Cas9 naturales, y Cas12a procesa sus propios ARN guía. Además, la actividad nucleasa de Cas12a produce roturas escalonadas de doble hebra de ADN en lugar de extremos romos producidos por la actividad nucleasa de Cas9, y Cas12a se basa en un solo dominio RuvC para cortar ambas hebras de ADN, mientras que Cas9 utiliza un dominio HNH y un dominio RuvC para el corte.

Una proteína efectora CRISPR Cas12a útil con esta invención puede ser cualquier Cas12a conocida o identificada posteriormente (anteriormente conocida como Cpf1) (ver, por ejemplo, Patente de EE. UU. No. 9,790,490, que se incorpora por referencia para sus divulgaciones de secuencias de Cpf1 (Cas12a)). El término "Cas12a" se refiere a una proteína guiada por ARN que

puede tener actividad nucleasa, la proteína que comprende un dominio de unión a ácido nucleico guía y un dominio de corte de ADN activo, inactivo o parcialmente activo, de modo que la actividad nucleasa guiada por ARN de Cas12a puede ser activa, inactiva o parcialmente activa, respectivamente. En algunas modalidades, una Cas12a útil con la invención puede comprender una mutación en el sitio activo de la nucleasa (por ejemplo, un sitio RuvC del dominio Cas12a). Una Cas12a que tiene una mutación en su dominio de nucleasa y/o sitio activo de nucleasa, y por lo tanto, ya no tiene actividad nucleasa, se conoce comúnmente como deadCas12a (por ejemplo, dCas12a). En algunas modalidades, una Cas12a que tiene una mutación en su dominio de nucleasa y/o sitio activo de nucleasa puede tener actividad deteriorada, por ejemplo, puede tener actividad nickasa reducida.

En algunas modalidades, una proteína efectora CRISPR-Cas puede optimizarse para su expresión en un organismo, por ejemplo, en un animal (por ejemplo, un mamífero como un humano), una planta, un hongo, una arquea o una bacteria. En algunas modalidades, una proteína efectora CRISPR-Cas (por ejemplo, polipéptido/dominio Cas12a o polipéptido/dominio Cas9) puede optimizarse para su expresión en una planta.

En algunas modalidades, una proteína efectora CRISPR-Cas que comprende un dominio Cas9 (o una construcción de ácido nucleico que codifica lo mismo) puede usarse en combinación con un ácido nucleico guía Cas9 para modificar un ácido nucleico objetivo, y puede estar en o puede formar un complejo.

Asimismo, una proteína efectora CRISPR-Cas puede comprender un dominio Cas12a (u otra nucleasa CRISPR-Cas seleccionada, por ejemplo, C2c1, C2c3, Cas12b, Cas12c, Cas12d, Cas12f, Cas12i, Cas12e, Cas13a, Cas13b, Cas13c, Cas13d, CasI, CasIB, Cas2, Cas3, Cas3', Cas3", Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (también conocido como CsnI y Csx12), Cas10, CsyI, Csy2, Csy3, CseI, Cse2, CseI, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, CmrI, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, CsbI, Csb2, Csb3, CsxI7, CsxI4, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, CsxI, CsxI5, CsfI, Csf2, Csf3, Csf4 (dinG) y/o Csf5), que puede ser utilizada en combinación con un ácido nucleico guía Cas12a (o el ácido nucleico guía para la otra nucleasa CRISPR-Cas seleccionada) para modificar un ácido nucleico objetivo, editando así el ácido nucleico objetivo.

Como se usa en la presente invención, "modificar" o "modificación" en referencia a un ácido nucleico objetivo incluye editar (por ejemplo, mutar), modificación covalente, intercambiar/sustituir ácidos nucleicos/bases de nucleótidos, eliminar, cortar y/o hacer una muesca en un ácido nucleico objetivo para proporcionar un ácido nucleico modificado y/o alterar el control transcripcional de un ácido nucleico objetivo para proporcionar un ácido nucleico modificado. En algunas modalidades, una modificación puede incluir una inserción y/o eliminación de cualquier tamaño y/o un cambio de una sola base (SNP) de cualquier tipo. En algunas modalidades, una modificación comprende un SNP. En algunas modalidades, una modificación comprende intercambiar y/o sustituir uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o más) nucleótidos. En algunas modalidades, una inserción o eliminación puede ser de aproximadamente 1 base a aproximadamente 30,000 bases o más de

longitud (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10,000, 10,500, 11,000, 11,500, 12,000, 12,500, 13,000, 13,500, 14,000, 14,500, 15,000, 15,500, 16,000, 16,500, 17,000, 17,500, 18,000, 18,500, 19,000, 19,500, 20,000, 20,500, 21,000, 21,500, 22,000, 22,500, 23,000, 23,500, 24,000, 24,500, 25,000, 25,500, 26,000, 26,500, 27,000, 27,500, 28,000, 28,500, 29,000, 29,500, 30,000 bases de longitud o más, o cualquier valor o rango dentro de ello). Así, en algunas modalidades, una inserción o eliminación puede ser de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 a aproximadamente 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000 bases de longitud, o cualquier rango o valor dentro de ello; aproximadamente 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 bases de aproximadamente 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000 bases o más de longitud, o cualquier rango o valor dentro de ello; aproximadamente 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000 bases a aproximadamente 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000,

7500, 8000, 8500, 9000, 9500, o 10,000 bases o más de longitud, o cualquier rango o valor dentro de ello; o aproximadamente 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, o 700 bases a aproximadamente 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, o 5000 bases o más de longitud, o cualquier rango o valor dentro de ello. En algunas modalidades, una inserción o eliminación puede ser de aproximadamente 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, o 10,000 bases de aproximadamente 10,500, 11,000, 11,500, 12,000, 12,500, 13,000, 13,500, 14,000, 14,500, 15,000, 15,500, 16,000, 16,500, 17,000, 17,500, 18,000, 18,500, 19,000, 19,500, 20,000, 20,500, 21,000, 21,500, 22,000, 22,500, 23,000, 23,500, 24,000, 24,500, 25,000, 25,500, 26,000, 26,500, 27,000, 27,500, 28,000, 28,500, 29,000, 29,500, o 30,000 bases o más de longitud, o cualquier rango o valor dentro de ello.

"Introduciendo," "introducir," "introducido" (y sus variaciones gramaticales y derivados) en el contexto de un polinucleótido o sistema de edición significa presentar una secuencia de nucleótidos de interés (por ejemplo, polinucleótido, un constructo de ácido nucleico y/o un ácido nucleico guía) y/o sistema de edición (por ejemplo, un polinucleótido, polipéptido y/o ribonucleoproteína) a un organismo huésped o célula de dicho organismo (por ejemplo, célula huésped; por ejemplo, una célula vegetal) de tal manera que la secuencia de nucleótidos y/o sistema de edición acceda al interior de una célula. Así, por ejemplo, un polinucleótido de una cepa de *Agrobacterium*, como *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes*, (que puede codificar o comprender al menos una parte de un sistema de edición) puede ser introducido en una célula de un organismo, transformando así la célula con el polinucleótido. En algunas modalidades, un constructo de ácido nucleico de la invención que codifica una proteína efectora CRISPR-Cas, un ácido nucleico guía, transcriptasa inversa y/o una desaminasa (por ejemplo, una desaminasa de citosina y/o desaminasa de adenina) puede ser introducido en una célula de un organismo, transformando así la célula con la proteína efectora CRISPR-Cas, ácido nucleico guía, transcriptasa inversa y/o desaminasa. En algunas modalidades, una proteína efectora CRISPR-Cas y un ácido nucleico guía pueden ser introducidos en una célula de un organismo, opcionalmente en donde la proteína efectora CRISPR-Cas y el ácido nucleico guía pueden estar comprendidos en un complejo (por ejemplo, una ribonucleoproteína). En algunas modalidades, el organismo es un eucariote (por ejemplo, una planta o mamífero como un humano).

El término "transformación" tal como se usa en el presente documento se refiere a la introducción de un ácido nucleico, polipéptido y/o ribonucleoproteína (por ejemplo, un ácido nucleico, polipéptido y/o ribonucleoproteína heteróloga) en una célula. La transformación de una célula puede ser estable o transitoria. Así, en algunas modalidades, una célula huésped u organismo huésped puede ser transformado de manera estable con un polinucleótido/molécula

de ácido nucleico de la invención. En algunas modalidades, una célula huésped u organismo huésped puede ser transformado de manera transitoria con un constructo de ácido nucleico, un polipéptido y/o una ribonucleoproteína de la invención.

5 "Transformación transitoria" en el contexto de un polinucleótido significa que un polinucleótido es introducido en una célula (por ejemplo, mediante un enfoque de transformación y/o transfección) y no se integra en el genoma de la célula; por lo tanto, la célula es transformada de manera transitoria con el polinucleótido. Un ácido nucleico que es "expresado transitoriamente" como se usa en el presente documento se refiere a un ácido nucleico que ha sido introducido en una célula y el ácido nucleico no está integrado en el genoma de la célula, por lo tanto, la célula
10 es transformada de manera transitoria con el ácido nucleico.

Por "introducir de manera estable" o "introducido de manera estable" en el contexto de un polinucleótido introducido en una célula (por ejemplo, mediante un enfoque de transformación y/o transfección) se entiende que el polinucleótido introducido se incorpora de manera estable en el genoma de la célula, y así la célula es transformada de manera estable con el polinucleótido. Un
15 ácido nucleico que es "expresado de manera estable" tal como se usa en el presente documento se refiere a un ácido nucleico que ha sido introducido en una célula y el ácido nucleico está integrado en el genoma de la célula, por lo tanto, la célula es transformada de manera estable con el ácido nucleico.

"Transformación estable" o "transformado de manera estable" tal como se usa en el
20 presente documento significa que una molécula de ácido nucleico se introduce en una célula (por ejemplo, mediante un enfoque de transformación y/o transfección) y se integra en el genoma de la célula. Como tal, la molécula de ácido nucleico integrada es capaz de ser heredada por la progenie de dicha célula, más particularmente, por la progenie de múltiples generaciones sucesivas. "Genoma" tal como se usa en el presente documento incluye el genoma nuclear y el
25 genoma de los plastidios, y por lo tanto incluye la integración del ácido nucleico en, por ejemplo, el genoma del cloroplasto o el genoma mitocondrial. La transformación estable como se usa en el presente documento también puede referirse a un transgén que se mantiene de manera extracromosómica, por ejemplo, como un minicromosoma o un plásmido.

La transformación transitoria puede detectarse, por ejemplo, mediante un ensayo
30 inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o Western blot, que puede detectar la presencia de un péptido o polipéptido codificado por uno o más transgenes introducidos en un organismo. La transformación estable de una célula puede detectarse, por ejemplo, mediante un ensayo de hibridación Southern blot del ADN genómico de la célula con secuencias de ácido nucleico que hibridan específicamente con una secuencia de nucleótidos de un transgén introducido en un
35 organismo (por ejemplo, un mamífero, planta, etc.). La transformación estable de una célula puede detectarse, por ejemplo, mediante un ensayo de hibridación Northern blot del ARN de la célula con secuencias de ácido nucleico que hibridan específicamente con una secuencia de nucleótidos de un transgén introducido en un organismo huésped. La transformación estable de una célula

también puede detectarse, por ejemplo, mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otras reacciones de amplificación como son bien conocidas en la técnica, empleando secuencias de iniciadores específicos que hibridan con secuencias objetivo de un transgén, lo que resulta en la amplificación de la secuencia del transgén, que puede detectarse según los métodos estándar.

5 La transformación también puede detectarse mediante protocolos de secuenciación directa y/o hibridación bien conocidos en la técnica.

Un método de la presente invención y/o paso de mezcla puede procesar alrededor de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 onzas a alrededor de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, o 32 onzas de material vegetal para proporcionar tejido herido en aproximadamente
10 10 segundos o menos, como aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 segundo(s). En algunas modalidades, un método de la presente invención y/o paso de mezcla puede procesar alrededor de 35 o 40 a alrededor de 45 o 50 grupos de material vegetal (por ejemplo, brotes de plantas de aproximadamente 6 semanas de edad) para proporcionar tejido herido en aproximadamente 10 segundos o menos, como aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 segundo(s). En algunas
15 modalidades, un método de la presente invención y/o paso de mezcla puede procesar alrededor de 35, 40, 45, o 50 grupos de material vegetal (por ejemplo, brotes de plantas de aproximadamente 6 semanas de edad) para proporcionar tejido herido en aproximadamente 10 segundos o menos, como aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 segundo(s). En algunas modalidades, un método de la presente invención y/o paso de mezcla puede procesar alrededor de 5 gramos a alrededor
20 de 250 gramos de material vegetal para proporcionar tejido herido en aproximadamente 10 segundos o menos, como aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 segundo(s).

En algunas modalidades, se mezclan aproximadamente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 onzas hasta aproximadamente 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, o 32 onzas de material vegetal con aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, o 10 onzas hasta aproximadamente 11,
25 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, o 32 onzas de líquido (por ejemplo, agua y/o una composición acuosa opcionalmente que incluye una bacteria). En algunas modalidades, se mezclan aproximadamente 50 grupos de material vegetal (por ejemplo, brotes de plantas como brotes de plantas de aproximadamente 6 semanas) con aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, o 10 onzas hasta aproximadamente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23,
30 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, o 32 onzas de líquido (por ejemplo, agua y/o una composición acuosa opcionalmente que incluye una bacteria). En algunas modalidades, se mezclan aproximadamente 50 grupos de material vegetal (por ejemplo, brotes de plantas como brotes de plantas de aproximadamente 6 semanas) con aproximadamente 300 mL de líquido (por ejemplo, agua y/o una composición acuosa opcionalmente que incluye una bacteria). En algunas
35 modalidades, se mezclan aproximadamente 5 gramos hasta aproximadamente 250 gramos de material vegetal con aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, o 10 onzas hasta aproximadamente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, o 32 onzas de líquido (por ejemplo, agua y/o una composición acuosa opcionalmente que incluye una bacteria).

Un método de la presente invención puede comprender un paso de cultivo utilizando métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, el cultivo de un material vegetal puede incluir exponer un material vegetal, opcionalmente un tejido vegetal herido, a ciertas condiciones (por ejemplo, luz, oscuridad, nutrientes, humedad, etc.) durante un período de tiempo (por ejemplo, 5 aproximadamente 1, 2, 3, 4, o 5 día(s) hasta aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o más días). En algunas modalidades, el cultivo de un material vegetal comprende proporcionar condiciones de temperatura y/o luz suficientes para mantener y/o hacer crecer el material vegetal. En algunas modalidades, el cultivo de un material vegetal se lleva a cabo antes y/o después de un paso de mezclado. En algunas modalidades, un método de la presente invención comprende 10 el cultivo de un tejido vegetal herido. Un material vegetal y/o tejido herido puede ser cultivado en presencia y/o en medios que pueden incluir un antibiótico y/o una hormona de crecimiento (por ejemplo, una hormona de crecimiento vegetal y/o un nutriente).

En algunas modalidades, un método de la presente invención comprende la recolección de uno o más nodos de una planta (por ejemplo, una planta de zarzamora, frambuesa, o cereza) 15 opcionalmente una planta cultivada en invernadero, opcionalmente esterilizando el o los nodos, cortando el o los nodos esterilizados a mano o mezclándolos en una licuadora para proporcionar tejido de nodo cortado opcionalmente de tamaño más pequeño que el o los nodos esterilizados, y cultivando el tejido de nodo cortado opcionalmente en medios sólidos durante aproximadamente 1 semana hasta aproximadamente 6 semanas o más. Durante el paso de cultivo, el tejido de nodo 20 cortado puede producir múltiples brotes (por ejemplo, aproximadamente 10-20 brotes por nodo cortado). En algunas modalidades, un método de la presente invención puede comprender la recolección de los brotes y la mezcla de los brotes en una licuadora. En algunas modalidades, se elimina un callo de los brotes antes de mezclar los brotes. En algunas modalidades, no se elimina un callo de los brotes antes de mezclar los brotes y se mezclan los brotes con el callo. En algunas 25 modalidades, aproximadamente 10, 15, 20, o 25 grupos hasta aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 grupos de brotes (por ejemplo, brotes de zarzamora o cereza) pueden ser mezclados en una licuadora según las modalidades de la presente invención. En algunas modalidades, en contraste con un método donde cierto material vegetal puede ser seleccionado y/o aislado si se proporciona tejido herido mediante procesamiento 30 manual, en un método de la presente invención este paso de selección y/o aislamiento no se realiza y el material vegetal deseado se mezcla con material vegetal no deseado. Por ejemplo, en un método que apunta a tejido de tallo cortado, un método que proporciona el tejido de tallo cortado mediante procesamiento manual cortaría cualquier hoja (por ejemplo, material vegetal no deseado), pero en un método de la presente invención se podría mezclar todo el tallo con las 35 hojas para proporcionar el tejido de tallo cortado.

Preparar tejido herido a mano es un proceso laborioso. En algunas modalidades, un método de la presente invención y/o paso de preparación de tejido herido está libre de manipulación manual (por ejemplo, cortar tejido vegetal a mano) para obtener el tejido herido. En

algunas modalidades, un método de la presente invención y/o paso de preparación de tejido herido está libre de (por ejemplo, no implica) manipulación manual aparte de un paso de provisión (por ejemplo, cosecha y/o recolección del tejido vegetal). En algunas modalidades, un método de la presente invención y/o paso de preparación de tejido herido está libre de (por ejemplo, no implica) cortar tejido vegetal a mano para obtener tejido vegetal herido aparte de un paso de provisión (por ejemplo, cosecha y/o recolección del tejido vegetal).

Por ejemplo, en algunas modalidades, se recolecta una planta o parte de planta, opcionalmente a mano, para proporcionar tejido vegetal recolectado y el tejido vegetal recolectado se lesiona mediante un método que no involucra manipulación manual (por ejemplo, cortar tejido vegetal a mano).

Un método de la presente invención puede aumentar la cantidad de material vegetal preparado en un período de tiempo en comparación con la cantidad de tejido vegetal preparado con un método que carece de mezclado mediante licuadora (por ejemplo, un método donde la lesión consiste en tejido herido proporcionado mediante procesamiento manual y/o manipulación) en el mismo período de tiempo para el mismo tejido vegetal. En algunas modalidades, un método de la presente invención incrementa la cantidad de tejido vegetal preparado en un período de tiempo en comparación con la cantidad de tejido vegetal preparado con un método que prepara tejido herido a mano. Por ejemplo, un método de la presente invención puede proporcionar un volumen de tejido vegetal herido de aproximadamente 8 onzas hasta aproximadamente 32 onzas en aproximadamente 5 segundos o menos (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 segundos), mientras que un método de preparación de tejido herido que carece de mezclado mediante licuadora prepara aproximadamente 8 onzas hasta aproximadamente 32 onzas en aproximadamente 2 a aproximadamente 4 horas. En algunas modalidades, un método de la presente invención puede lesionar aproximadamente 50 grupos de material vegetal (por ejemplo, brotes de plantas como brotes de plantas de aproximadamente 6 semanas) en aproximadamente 5 segundos o menos (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 segundos), mientras que un método de preparación de tejido herido que carece de mezclado mediante licuadora prepara aproximadamente 50 grupos de material vegetal (por ejemplo, brotes de plantas como brotes de plantas de aproximadamente 6 semanas) en aproximadamente 2 a aproximadamente 4 horas. En algunas modalidades, un método de la presente invención puede proporcionar tejido vegetal herido en una cantidad de aproximadamente 5 gramos hasta aproximadamente 250 gramos en aproximadamente 5 segundos o menos (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 segundos), mientras que un método de preparación de tejido herido que carece de mezclado mediante licuadora prepara aproximadamente 5 gramos hasta aproximadamente 250 gramos en aproximadamente 2 a aproximadamente 4 horas.

En algunas modalidades, un método de la presente invención reduce el daño tisular de un tejido vegetal (por ejemplo, un tejido vegetal herido) en comparación con un método de preparación del mismo tejido vegetal que carece de mezclado mediante licuadora (por ejemplo,

un método donde la lesión consiste en tejido herido proporcionado mediante procesamiento manual y/o manipulación). En algunas modalidades, un método de la presente invención reduce el daño tisular de un tejido vegetal en comparación con la cantidad de daño tisular proporcionada por un método que prepara tejido herido a mano. Por ejemplo, un método de la presente invención
5 puede reducir el empapamiento de agua y/o el oscurecimiento del tejido vegetal herido. En algunas modalidades, el tejido vegetal herido preparado según un método de la presente invención tiene una tasa de supervivencia aumentada y/o una salud aumentada en comparación con la tasa de supervivencia y/o salud del tejido vegetal herido preparado según un método que carece de mezclado mediante licuadora (por ejemplo, un método donde la lesión consiste en tejido
10 herido proporcionado mediante procesamiento manual y/o manipulación). Un método de la presente invención y/o tejido vegetal herido preparado según un método de la presente invención puede tener una tasa reducida de mortalidad en comparación con la tasa de mortalidad del tejido vegetal herido preparado según un método que carece de mezclado mediante licuadora (por ejemplo, un método donde la lesión consiste en tejido herido proporcionado mediante
15 procesamiento manual y/o manipulación).

Un método de la presente invención y/o tejido vegetal herido puede proporcionar un número aumentado de brotes que se propagan in vitro en comparación con el número de brotes que se propagan in vitro a partir de tejido vegetal preparado mediante un método que carece de mezclado mediante licuadora (por ejemplo, un método donde la lesión consiste en tejido herido
20 proporcionado mediante procesamiento manual y/o manipulación).

Un método de la presente invención puede proporcionar tejido vegetal que tiene una tasa de transformación aumentada en comparación con la tasa de transformación de tejido vegetal preparado mediante un método que carece de mezclado mediante licuadora (por ejemplo, un método donde la lesión consiste en tejido herido proporcionado mediante procesamiento manual y/o manipulación). Por ejemplo, el tejido herido preparado según un método de la presente
25 invención puede tener una tasa de transformación aumentada en comparación con la tasa de transformación para tejido herido preparado mediante procesamiento y/o manipulación manual.

Un constructo de ácido nucleico, polipéptido y/o ribonucleoproteína de la invención puede ser introducido en una célula por cualquier método conocido por aquellos versados en el arte. En
30 algunas modalidades, los métodos de transformación incluyen, pero no se limitan a, la entrega de ácido nucleico mediada por bacterias (por ejemplo, a través de Agrobacterias), la entrega de ácido nucleico mediada por virus, la entrega de ácido nucleico mediada por carburo de silicio y/o por mechones de ácido nucleico, la entrega de ácido nucleico mediada por liposomas, la microinyección, la bombardeo de micropartículas, la transformación mediada por fosfato de calcio,
35 la transformación mediada por ciclodextrina, la electroporación, la transformación mediada por nanopartículas, la sonicación, la infiltración, la captación de ácido nucleico mediada por PEG, así como cualquier otro mecanismo eléctrico, químico, físico (mecánico) y/o biológico que resulte en la introducción de ácido nucleico en la célula (por ejemplo, una célula vegetal o una célula animal),

incluyendo cualquier combinación de estos. En algunas modalidades de la invención, la transformación de una célula comprende la transformación nuclear. En algunas modalidades, la transformación de una célula comprende la transformación de plastos (por ejemplo, transformación de cloroplastos). En algunas modalidades, un constructo de ácido nucleico recombinate de la invención puede ser introducido en una célula mediante técnicas de cría convencionales.

Los procedimientos para transformar organismos eucarióticos y procarióticos son bien conocidos y rutinarios en el arte y se describen en la literatura (Ver, por ejemplo, Jiang et al., 2013. Nat. Biotechnol. 31:233-239; Ran et al., Nature Protocols 8:2281–2308 (2013)). Las guías generales para varios métodos de transformación vegetal conocidos en el arte incluyen a Miki et al. ("Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" en Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, B. R. and Thompson, J. E., Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993), páginas 67-88) y Rakowoczy-Trojanowska (Cell. Mol. Biol. Lett. 7:849-858 (2002)).

Una secuencia de nucleótidos, polipéptido y/o ribonucleoproteína puede ser introducida en un organismo huésped o en una de sus células de cualquier manera conocida en el arte. Los métodos de la invención no dependen de un método particular para introducir una o más secuencias de nucleótidos, polipéptidos y/o ribonucleoproteínas en el organismo, sino solo que estas ganen acceso al interior de al menos una célula del organismo. Cuando se desea introducir más de una secuencia de nucleótidos, polipéptidos y/o ribonucleoproteínas, estas pueden ser ensambladas como parte de un solo constructo de ácido nucleico, o como constructos de ácido nucleico separados, y pueden estar ubicadas en el mismo o en diferentes constructos de ácido nucleico. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos, polipéptido y/o ribonucleoproteína puede ser introducida en la célula de interés en un solo evento de transformación, y/o en eventos de transformación separados, o, alternativamente, cuando sea relevante, una secuencia de nucleótidos puede ser incorporada en una planta, por ejemplo, como parte de un protocolo de crianza. En algunas modalidades, la célula es una célula eucariota (por ejemplo, una célula vegetal o una célula mamífera como una célula humana).

Ejemplos no limitantes de plantas y/o partes de las mismas (por ejemplo, explantos) útiles en la presente invención incluyen céspedes (por ejemplo, césped azul, césped agrostis, césped raigrás, césped festuca), hierba de plumas, hierba de cabellera, miscanthus, arundo, pastos de switch, cultivos de hortalizas como alcachofas, colinabos, rúcula, puerros, espárragos, lechugas (por ejemplo, de cabeza, hoja, romana), malanga, melones (por ejemplo, melón cantalupo, melón de agua, crenshaw, melón dulce, cantalupo), cultivos de coles (por ejemplo, coles de Bruselas, repollo, coliflor, brócoli, berzas, kale, col china, bok choy), cardón, zanahorias, napa, okra, cebollas, apio, perejil, garbanzos, chirivía, achicoria, pimientos, papas, cucurbitáceas (por ejemplo, calabaza, pepino, calabacín, zapallo, calabaza, melón de agua, cantalupo), rábanos, cebollas de bulbo seco, colinabos, berenjenas, salsifí, escarola, chalotas, endivia, ajo, espinacas, cebollas verdes, calabaza, verduras, remolacha (remolacha azucarera y forrajera), camote,

acelga, rábano picante, tomates, nabos y especias; un cultivo de frutas como manzanas, albaricoques, cerezas, nectarinas, duraznos, peras, ciruelas, ciruelas pasas, cereza, membrillo, higos, nueces (por ejemplo, castañas, nueces pecanas, pistachos, avellanas, pistachos, cacahuates, nueces, nueces de macadamia, almendras, y similares), cítricos (por ejemplo, 5 clementina, kumquat, naranja, pomelo, mandarina, limón, lima, y similares), arándanos, frambuesas negras, moras, arándanos, frambuesas, fresas, moras, uvas (viníferas y de mesa), aguacates, plátanos, kiwi, caquis, granadas, piñas, frutas tropicales, pomos, melones, mango, papaya, litchi, un cultivo de campo como trébol, alfalfa, timothy, onagra, espuma de pradera, maíz (de campo, dulce, palomitas), lúpulo, jojoba, alforfón, cártamo, quinua, trigo, arroz, cebada, 10 centeno, mijo, sorgo, avena, triticale, sorgo, tabaco, kapok, una planta leguminosa (frijoles, lentejas, guisantes, soya), una planta oleaginosa (colza, canola, mostaza, adormidera, olivo, girasol, coco, ricino, cacao, cacahuete, palma aceitera), lentejas de agua, Arabidopsis, una planta de fibra (algodón, lino, cáñamo, yute), Cannabis (por ejemplo, Cannabis sativa, Cannabis indica y Cannabis ruderalis), lauráceas (canela, alcanfor), o una planta como café, caña de azúcar, té y 15 plantas de caucho natural; y/o una planta ornamental como una planta con flores, un cactus, una suculenta y/o una planta ornamental (por ejemplo, rosas, tulipanes, violetas), así como árboles como árboles forestales (de hoja ancha y perennes, como coníferas; por ejemplo, olmo, fresno, roble, arce, abeto, pino, abedul, ciprés, eucalipto, sauce), así como arbustos y otros cultivos de vivero. En algunas modalidades, un método y/o sistema de la presente invención puede ser 20 utilizado en un método de modificación (por ejemplo, edición) de una planta y/o su célula (por ejemplo, una planta y/o su célula de maíz, soya, trigo, colza, arroz, tomate, pimiento, girasol, frambuesa, mora y/o cereza). En algunas modalidades, el material vegetal es material vegetal de zarzamora, frambuesa (por ejemplo, frambuesa roja o frambuesa negra), zarza ártica o cerezo. En algunas modalidades, el material vegetal es de una planta de la familia Rubus. En algunas 25 modalidades, el material vegetal es de una planta de la familia Prunus.

Se describirá la invención a continuación con referencia a los siguientes ejemplos. Se debe apreciar que estos ejemplos no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones de la invención, sino que más bien están destinados a ser ejemplares de ciertas modalidades. Cualquier variación en los métodos ejemplificados que ocurra al artesano experto está destinada a caer dentro del 30 alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Heridas y fragmentación

35 Aproximadamente 50 grupos de material de zarzamora in vitro se combinaron con aproximadamente 300 mL de medio líquido para plantas y se colocaron en una licuadora Cuisinart con número de modelo CPB-300P1. Después de 1 pulso de la licuadora, la mayoría de los tejidos tenían aproximadamente 0.5 cm en la parte más ancha del tejido y aunque la mayoría de los

tejidos estaban heridos, quedó un número significativo de tejidos que no estaban heridos. Después de 2 pulsos de la licuadora, los fragmentos en el rango de 0.2 a 0.4 cm (medidos en la parte más ancha del tejido) se hicieron más prevalentes y casi todos los tejidos estaban heridos. Después de 3 pulsos de la licuadora, los fragmentos en el rango de 0.2 a 0.4 cm (medidos en la parte más ancha del tejido) fueron la mayoría de los tamaños de tejido en la mezcla. Se determinó que para generar tejido herido para la transformación, 2 pulsos eran suficientes. También se determinó que para desarrollar un sistema de cribado de callos utilizando el mismo tejido inicial, el proceso de 3 pulsos era más ventajoso ya que los fragmentos más pequeños conducían a un extenso crecimiento de callos.

Ejemplo 2: Daño al tejido vegetal

Usando una licuadora, explantes de plantas de cereza cultivadas in vitro fueron mezclados en agua usando una proporción de aproximadamente 50 brotes de cerezo y 300 mL de agua. El tejido de cerezo mezclado fue retirado del agua y colocado en una superficie de medio sólido y comparado con tejido que fue cortado a mano y también colocado en una superficie de medio sólido. Durante las próximas semanas se observó que los explantes de la licuadora no mostraron pardeamiento mientras que los explantes cortados a mano mostraron pardeamiento en el corte y pardeamiento donde el explante fue manipulado con pinzas. En repeticiones de este experimento, se observó que el pardeamiento no siempre ocurre en los tejidos cortados a mano. Sin embargo, si hay desgarro o ruptura del tejido, como debido al desafilado de un bisturí para los tejidos cortados a mano, habrá pardeamiento.

Se realizó un segundo experimento esencialmente como se describe en el párrafo anterior excepto que, para el tejido de cerezo mezclado, el líquido en la licuadora también contenía una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* y, para los explantes de cerezo cortados a mano, los explantes heridos fueron puestos en contacto con la suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* antes de colocar los explantes heridos en el medio sólido. El segundo experimento fue un experimento de transformación donde se esperaba que *Agrobacterium tumefaciens* transfiriera ADN a algunas de las células de la planta de cerezo en el explante. Una comparación de explantes mezclados con la solución de *Agrobacterium* y explantes cortados a mano inoculados con la solución de *Agrobacterium* también demostró que no hubo pardeamiento de los explantes del método de la licuadora mientras que hubo pardeamiento de algunos de los explantes cortados a mano.

Ejemplo 3: Transformación

Brotes de cerezo cultivados in vitro fueron mezclados en una solución de inóculo de *Agrobacterium tumefaciens* que contenía *Agrobacterium* resuspendido en medio de crecimiento vegetal. Los explantes mezclados fueron sembrados y distribuidos uniformemente en medio semisólido para la co-cultura. La cepa de *Agrobacterium* contenía un plásmido de transformación

que incluía el marcador fluorescente ZsGreen. Para determinar la eficiencia de transformación, los explantes inoculados en la licuadora fueron evaluados por fluorescencia y se observó que aproximadamente el 90% de los explantes presentaban una fluorescencia alta después de una semana. Eventualmente, se formó tejido calloso transgénico fluorescente. Se realizó un experimento similar al descrito en el Ejemplo 2, excepto que la licuadora fue reemplazada por el corte manual de los brotes de cerezo para proporcionar tejido herido y posteriormente se puso en contacto el tejido herido con una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens*. En el experimento de corte manual, aproximadamente el 10% de los explantes presentaron fluorescencia, lo cual fue considerablemente menor en comparación con los explantes procesados en la licuadora.

Ejemplo 4: Regeneración y propagación en zarzamora

Hojas y pecíolos de aproximadamente 50 grupos de brotes de zarzamora propagados in vitro fueron excisados usando tijeras estériles en una campana de flujo laminar. Los tejidos excisados fueron colocados en aproximadamente 300 mL de agua estéril en una licuadora Cuisinart modelo CPB-300P1 antes de ser mezclados usando 2 pulsos, filtrados y luego secados hasta quedar secos utilizando toallas de papel estériles. Los tejidos secos fueron distribuidos uniformemente en placas que contenían un medio adecuado para la inducción de brotes. Después de 3-6 semanas de crecimiento, se observaron brotes de novo regenerando a partir de los tejidos de hojas y pecíolos mezclados. Los brotes crecieron hasta aproximadamente 1-1.5 cm de altura después de varias semanas más de cultivo y luego fueron excisados y enraizados en un medio de enraizamiento adecuado durante un período de 2-3 semanas para producir plántulas que fueron trasplantadas a medio de crecimiento y trasladadas al invernadero.

Similar al método anterior, los brotes enteros fueron mezclados y cultivados para propagar brotes in vitro. Los brotes fueron mezclados, secados y distribuidos como se describió en el párrafo anterior pero fueron colocados en un medio de propagación adecuado. Los tejidos fragmentados que contenían nodos regeneraron después de 3-6 semanas de cultivo en forma de pequeños racimos de brotes que fueron utilizados posteriormente en cultivo estéril.