

REIVINDICACIONES

1. Un método para crear un nuevo gen en una célula de un organismo caracterizado por comprender las siguientes etapas:

generar simultáneamente rupturas de ADN en dos o más sitios específicos diferentes en el genoma de la célula, en donde los sitios específicos son sitios genómicos capaces de separar diferentes elementos genéticos o diferentes dominios proteicos, y las rupturas de ADN se ligan entre sí mediante una unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación homóloga, generando una nueva combinación de los diferentes elementos genéticos o diferentes dominios proteicos diferente de la secuencia genómica original, creando de ese modo el nuevo gen;

donde el organismo es un animal, planta, hongo, bacteria o similares

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que dichos dos o más sitios específicos diferentes están localizados en el mismo cromosoma o en cromosomas diferentes, pueden ser sitios específicos en al menos dos genes diferentes, o pueden ser al menos dos sitios específicos diferentes en el mismo gen, en donde dichos al menos dos genes diferentes pueden tener direcciones de transcripción iguales o diferentes.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que dichas rupturas de ADN se consiguen administrando una nucleasa con propiedad de direccionamiento a una célula del organismo para contactar con los sitios específicos del ADN genómico.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que dicha nucleasa con propiedad de direccionamiento se selecciona entre el grupo que consiste en Meganucleasa, nucleasa de dedos de cinc, TALEN, y sistema CRISPR/Cas.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, caracterizado por que la nucleasa con propiedad de direccionamiento está en forma de ADN, o existe en forma de ARNm o proteína, pero no ADN.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, caracterizado por que las nucleasas con propiedad de direccionamiento se administran a la célula mediante: 1) un método de transfección celular mediada por PEG; 2) un método de transfección celular mediada por liposomas; 3) un método de transformación por shock eléctrico; 4) una microinyección; 5) un bombardeo con pistola génica; o 6) un método de transformación mediada por *Agrobacterium*.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado por que

dichos elementos génicos se seleccionan entre el grupo que consiste en un promotor, una región no traducida 5', una región codificadora o región de ARN no codificadora, una región no traducida 3', un terminador del gen, o cualquier combinación de los mismos.

8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado por que la combinación de diferentes elementos génicos es una combinación del promotor de uno de los dos genes con diferentes patrones de expresión y la región codificadora o la región de ARN no codificadora del otro gen,

una combinación de la región del promotor para 5'UTR de uno de los dos genes con diferentes patrones de expresión y la CDS o región de ARN no codificadora del otro gen, o

una combinación de elementos génicos adyacentes del mismo gen.

9. El método de la reivindicación 8, caracterizado por que, en la combinación de diferentes elementos génicos, un elemento es un promotor endógeno fuerte del organismo, y el otro es la región codificadora del gen de HPPD, EPSPS, PPO o GH1.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, caracterizado por que los diferentes patrones de expresión son diferentes niveles de expresión génica, diferentes especificidades tisulares de expresión génica, o diferentes especificidades de etapa de desarrollo de expresión génica.

11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizado por que el dominio proteico es un fragmento de ADN que corresponde a un dominio funcional específico de una proteína; que incluye preferentemente, pero que no se limita a, una señal de localización nuclear, un péptido líder de cloroplasto, un péptido líder mitocondrial, un sitio de fosforilación, un sitio de metilación, un dominio transmembrana, un dominio de unión a ADN, un dominio de activación de transcripción, un dominio de activación de receptor, o un centro catalítico enzimático.

12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, caracterizado por que la combinación de diferentes dominios proteicos es una combinación de la región de señal de localización de una de dos proteínas con diferentes localizaciones subcelulares y la región codificadora de proteína madura del otro gen,

una combinación de dos dominios proteicos con diferentes funciones biológicas, o

una combinación de dominios proteicos adyacentes del mismo gen.

13. El método de la reivindicación 12, caracterizado por que las diferentes localizaciones

subcelulares se seleccionan entre el grupo que consiste en localización nuclear, localización citoplasmática, localización de membrana celular, localización de cloroplasto, localización mitocondrial, y localización de membrana de retículo endoplasmático, o

las diferentes funciones biológicas se seleccionan entre el grupo que consiste en reconocimiento de secuencia conservada de ADN o ARN específica, activación de expresión génica, unión a un ligando proteico, unión a señal molecular pequeña, unión a un ion, reacción enzimática específica, y cualquier combinación de las mismas.

14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y 11, caracterizado por que la combinación de elementos génicos y dominios proteicos es una combinación de dominios proteicos y promotores adyacentes, 5'UTR, 3'UTR o terminadores del mismo gen.
15. Un método de edición para aumentar el nivel de expresión génica de un gen endógeno blanco en un organismo, que es independiente de un fragmento de donante de ADN exógeno, que comprende las siguientes etapas:

generar simultáneamente rupturas de ADN por separado en sitios seleccionados entre el promotor y la región codificadora de cada uno del gen endógeno blanco y un gen endógeno de alta expresión opcional; ligar las rupturas de ADN entre sí por medio de unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación homóloga, generando de ese modo una fusión *in vivo* de la región codificadora del gen endógeno blanco y el promotor endógeno fuerte opcional para formar un nuevo gen endógeno de alta expresión, en donde el gen endógeno blanco y el gen endógeno de alta expresión opcional están localizados en el mismo cromosoma o diferentes cromosomas.

donde el organismo es un animal, planta, hongo, bacteria o similares.

16. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 15, donde el organismo es un animal, una planta, una bacteria o un hongo.
17. El método de edición de acuerdo con la reivindicación 15, el cual es usado para *knocking up* de la expresión de un gen de HPPD, EPSPS o PPO endógeno en una planta, que comprende fusionar la región codificadora del gen de HPPD, EPSPS o PPO con un promotor endógeno fuerte de una planta *in vivo* para formar un nuevo gen de HPPD, EPSPS o PPO endógeno de planta de alta expresión, respectivamente.
18. El método de edición de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado por que comprende las siguientes etapas: generar simultáneamente rupturas de ADN respectivamente en sitios específicos seleccionados entre el promotor y la región codificadora de cada uno de los genes de HPPD, EPSPS o PPO y un gen endógeno de alta expresión opcional, ligar las rupturas de

ADN entre sí a través de una ruta de reparación intracelular, generando *in vivo* una fusión de la región codificadora del gen de HPPD, EPSPS o PPO y el promotor endógeno fuerte opcional para formar un nuevo gen de HPPD, EPSPS o PPO de alta expresión, respectivamente.

19. El método de edición de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, caracterizado por que comprende fusionar la región codificadora del gen de HPPD con un promotor endógeno fuerte de un arroz, en donde el promotor fuerte es un promotor del gen de ubiquitina²,

comprende fusionar la región codificadora del gen de EPSPS con un promotor endógeno fuerte de un arroz, en donde el promotor fuerte es un promotor del gen de TKT, o

comprende fusionar la región codificadora del gen de PPO con un promotor endógeno fuerte de un arroz o *Arabidopsis*, en donde en el arroz, el promotor fuerte es un promotor del gen de CP12, y en *Arabidopsis*, el promotor fuerte es un promotor del gen de ubiquitina¹⁰.

20. Un gen de HPPD aislado de arroz, que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:

(1) la secuencia de ácido nucleico que se muestra en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 o una parte de la misma o una secuencia complementaria de la misma;

(2) una secuencia que tiene una identidad de al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % con una cualquiera de las secuencias que se definen en (1); o

(3) una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse con la secuencia que se muestra en (1) o (2) en condiciones rigurosas.

21. Un gen de EPSPS aislado de arroz, que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:

(1) la secuencia de ácido nucleico que se muestra en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14 o una parte de la misma o una secuencia complementaria de la misma;

(2) una secuencia que tiene una identidad de al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % con una cualquiera de las secuencias que se definen en (1); o

(3) una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse con la secuencia que se muestra en (1) o (2) en condiciones rigurosas.

22. Un gen de PPO aislado de arroz, que tiene una secuencia seleccionada entre las siguientes:

(1) la secuencia de ácido nucleico que se muestra en SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, o SEQ ID NO: 26 o una parte de la misma o una secuencia complementaria de la misma;

(2) una secuencia que tiene una identidad de al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % con una cualquiera de las secuencias que se definen en (1); o

(3) una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse con la secuencia que se muestra en (1) o (2) en condiciones rigurosas.

23. Un ADN que comprende el gen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20-22.

24. Un vector de expresión recombinante, que comprende el gen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20-22, y un promotor unido operativamente a este.

25. Un casete de expresión que comprende el gen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20-22.

26. Un método para producir una planta con un aumento de resistencia o tolerancia a un herbicida, que comprende regenerar una célula huésped de planta modificada por el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17-19 en una planta.