Señora
Sandra Isabel Calderón Rodríguez
Directora de Nuevas Creaciones
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Referencia: Solicitud de Patente de Invención PCT denominada **"UN MÉTODO PARA EDITAR UN GEN EN UNA CÉLULA DE UN ORGANISMO."**

Asunto: Respuesta al oficio No. 18929 de 23 de octubre de 2024

Expediente No. **NC2022/0007902**

Juan Carlos Cuesta Quintero, mayor de edad, identificado como aparece al pie de mí firma, obrando en mi calidad de apoderado de **QINGDAO KINGAGROOT CHEMICAL COMPOUND CO., LTD** doy respuesta al Oficio No. 18929 de 23 de octubre de 2024, bajo los siguientes términos:

1. Modificaciones

(1) A las reivindicaciones

(1) Las reivindicaciones pendientes 1-42 se sustituirán por las reivindicaciones 1-26 modificadas, en las que:

(2) Se modifican las reivindicaciones 1 y 26 introduciendo una limitación "en la que el organismo es un animal, plata, hongo, bacteria o similares";

(3) Se eliminan las reivindicaciones 15-25 y la reivindicación 26 se renumera como reivindicación 15;

(4) Se añade una nueva reivindicación 16, que especifica el organismo como “donde el organismo es un animal, planta, hongo, bacteria o similares”;

(5) Se modifican las reivindicaciones 27-29 para hacer referencia a la nueva reivindicación 15, y el error tipográfico “por que” en la reivindicación 27 se corrige a “porque”;

(6) Se eliminan las reivindicaciones 30, 35, 38-39 y 41-42; (6) Se modifican las reivindicaciones 31 a 33 para intentar proteger un gen HPPD, EPSPS o PPO aislado que se define por las secuencias de ácidos nucleicos enumeradas;

(7) Se modifica la reivindicación 40 limitando la célula huésped vegetal a una “modificada por el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19”; y

(8) Se reformulan y numeran las reivindicaciones de manera adaptativa.

(2) A la descripción, figuras y nueva lista de secuencias

(1) Se cambia el título de la invención por “Un método para editar un gen en una célula de un organismo”, y se introducen los números de identificación de las secuencias.

(2) Se modifican las figuras 1 y 15 como se sugiere.

(3) Se presenta una nueva lista de secuencias según se requiere, con la adición de algunas secuencias enumeradas en la descripción.

Las modificaciones anteriores no introducen ningún asunto nuevo, por lo que cumplen lo establecido en el artículo 34 de la Decisión 486 de 2000. El Solicitante solicita respetuosamente al Examinador que introduzca las modificaciones.

2. No es una invención

(1) Reivindicaciones 15 a 19, 30, 34 y 35

En el oficio, el examinador opina que las soluciones técnicas de las reivindicaciones 15 a 19, 30, 34 y 35 no identifican las características estructurales técnicas de la materia

reivindicada, por lo que cubrirán materiales que se encuentran en la naturaleza y que no son patentables según la Ley de Patentes.

Con el único fin de acelerar la tramitación de esta solicitud, se eliminan las reivindicaciones 15 a 19, 30, 34 y 35. Por lo tanto, los rechazos del Examinador a estas reivindicaciones quedan sin efecto.

(2) Reivindicaciones 31 a 33

El examinador opina además que las reivindicaciones 31 a 33 buscan proteger los genes HPPD, EPSPS y PPO endógenos, que son materia en la naturaleza o están aislados de ella y que en este sentido, el objeto de las reivindicaciones 31 a 33 no es una invención. El examinador alinea además las secuencias de SEQ ID NO: 13, 18 y 22 con tres secuencias recuperadas de GenBank e identifica su naturaleza idéntica.

En relación con la materia no patentable, las reivindicaciones 31 a 33 se modifican para buscar proteger los genes HPPD/EPSPS/PPO aislados del arroz, con las secuencias enumeradas en las nuevas reivindicaciones 20 a 22.

Adicionalmente, el solicitante respetuosamente sostiene que estos genes son productos de ingeniería genética en estado aislado. Las secuencias de consulta enumeradas en el oficio fueron realmente cargadas por el solicitante, y esto no significa que las secuencias se produzcan de forma natural en las plantas.

Así pues, dado que los genes de las reivindicaciones 20 a 22 se encuentran en formas aisladas y se han preparado mediante ingeniería genética, la materia de estas reivindicaciones es patentable. El solicitante solicita respetuosamente al examinador que retire este rechazo.

(Nota: Por favor identifique las fuentes de las secuencias consultadas y sus componentes)

3. Excepción de Patentabilidad

(1) Reivindicaciones 1-14 y 26

El examinador opina que las soluciones técnicas de las reivindicaciones 1 a 14 y 26 cubren los métodos de edición que se practican en cualquier organismo, lo que es contrario a la moralidad y, por lo tanto, estas reivindicaciones no son patentables.

Con el único fin de acelerar la tramitación de esta solicitud, las reivindicaciones 1 y 26 se modifican introduciendo una limitación "*donde el organismo es un animal, planta, hongo, bacteria o similares*", y se ajusta ligeramente la redacción de la reivindicación 1. Por lo tanto, las reivindicaciones 1 a 14 y 15 recientemente modificadas buscan proteger los métodos para editar un gen en un organismo que no es un ser humano, sino un animal, planta, hongo, bacteria o similares. La materia objeto es patentable.

(2) Reivindicaciones 22, 23, 38, 39 and 41

En el caso de las reivindicaciones 22, 23, 38, 39 y 41, el examinador también considera que su objeto no es patentable.

Con el único fin de acelerar la tramitación de esta solicitud, se eliminan las reivindicaciones 22, 23, 38, 39 y 41. Por lo tanto, los rechazos del examinador a estas reivindicaciones quedan sin efecto.

(3) Reivindicación 40

El examinador opina que la reivindicación 40 pretende proteger un método para producir una planta, que abarca esencialmente procesos biológicos como la reproducción sexual en plantas, por lo que el objeto de la reivindicación 40 cae dentro de una excepción de patentabilidad y no es patentable.

El solicitante discrepa respetuosamente. Con el único fin de acelerar la tramitación de esta solicitud, se elimina la expresión "una progenie derivada de la misma" de la reivindicación

40. Por lo tanto, el método de la reivindicación 25 recientemente modificada se relaciona en realidad con la regeneración de una planta a partir de una célula huésped vegetal modificada por el método de esta invención, que no implica ninguna reproducción sexual en plantas. Por lo tanto, la reivindicación 25 recientemente modificada es patentable.

4. Reivindicaciones relativas a un uso

El examinador opina que la reivindicación 24 pretende proteger el uso de la composición y, por lo tanto, no es patentable. El examinador alega además que la reivindicación 42 se relaciona inherentemente con un uso de la planta resistente a los herbicidas y, por lo tanto, tampoco es patentable.

Con el único fin de acelerar la tramitación de esta solicitud, se eliminan las reivindicaciones 24 y 42. Por lo tanto, los rechazos del examinador a estas reivindicaciones quedan sin efecto.

5. De la solicitud de patente

5.1. Título

En referencia al título de la solicitud, el Solicitante desea resaltar que la naturaleza de la invención es la edición de un gen endógeno, el cual no está limitado a los genes HPPD, EPSPS y PPO. Por lo tanto, el título de la invención se modifica como sigue:

"UN MÉTODO PARA EDITAR UN GEN EN UNA CÉLULA DE UN ORGANISMO."

5.2. Reivindicaciones

El examinador opina que las reivindicaciones 20, 21, 36 y 37 no son claras y no están respaldadas por la descripción de esta solicitud. Con el único fin de acelerar la tramitación de esta solicitud, se eliminan las reivindicaciones 20 y 21. En el caso de las reivindicaciones 36 y 37, se modifican para hacer referencia a las reivindicaciones 31 a 33 (las nuevas reivindicaciones 20 a 22), por lo que las secuencias de ácidos nucleicos de los genes HPPD,

EPSPS y PPO son limitadas, lo que es suficiente para diferenciar las estructuras del vector de expresión y del casete de expresión reivindicados de las conocidas en el campo. En cuanto a los demás elementos necesarios para la construcción del vector de expresión y del casete de expresión, ya se conocen en el campo y el experto en la materia puede determinar fácilmente cómo elegir. Por lo tanto, las nuevas reivindicaciones 24 y 25 son claras en sus alcances de protección y encuentran apoyo suficiente en la descripción de esta solicitud.

En cuanto a la reivindicación 25, se elimina en el nuevo conjunto de reivindicaciones.

En lo que respecta a las reivindicaciones 27 a 29, la reivindicación 27 se modifica haciendo referencia a la nueva reivindicación 15 (la reivindicación original 26), y las reivindicaciones 28 y 29 se modifican de forma adaptativa. Como en la nueva reivindicación 15 se especifican los pasos para editar un gen endógeno diana, y el experto en la materia puede seleccionar fácilmente un gen endógeno de alta expresión de interés, la nueva reivindicación 15 es clara en su alcance de protección y encuentra apoyo en la descripción de esta solicitud. En consecuencia, las nuevas reivindicaciones 17 a 19 también son claras y encuentran apoyo en la descripción de esta solicitud.

En lo que respecta a la objeción del examinador a la reivindicación 27 debido al error tipográfico “por que”, corríjalo a “porque”.

5.3. Descripción

La descripción se modifica además incorporando los números de secuencia de las secuencias que faltan en la lista de secuencias original, para mayor claridad.

El examinador opina que la descripción de esta solicitud no divulga de manera suficiente y completa las invenciones relacionadas con un vector y un casete de expresión con cualquier

gen HPPD, EPSPS o GH1, o relacionadas con una composición como se reivindica en la reivindicación 25.

Dado que se ha eliminado la reivindicación 25 relacionada con la composición, y que las reivindicaciones 36 y 37 relacionadas con el vector de expresión y el casete de expresión están limitadas en términos de las secuencias de ácidos nucleicos de los genes HPPD, EPSPS y PPO, y que el experto en la materia sabe cómo seleccionar elementos adecuados para construir el vector de expresión y el casete de expresión recientemente reivindicados, creemos que la descripción ahora está suficientemente divulgada con respecto a las invenciones reivindicadas. El solicitante solicita respetuosamente al examinador que retire las objeciones a la descripción.

5.4. Dibujos

El examinador opina que la figura 1 está presentada de forma incorrecta y que la figura 15 no es clara.

En las nuevas figuras, las figuras 1 y 15 se modifican para eliminar los supuestos defectos, por lo que las objeciones pertinentes quedan sin efecto.

5.5. Listado de secuencias

En referencia a este asunto, se proporciona el listado de secuencias según lo solicitado.

6. Examen de Patentabilidad

6.1. Novedad

(1) Reivindicaciones 20, 21 y 25

El examinador opina que las reivindicaciones 20, 21, 36 y 37 no son novedosas con respecto a D1, la reivindicación 25 no es novedosa con respecto a D2 y las reivindicaciones 27 a 29 no son inventivas con respecto a D3 en combinación con D1.

En el nuevo conjunto de reivindicaciones modificadas, se eliminan las reivindicaciones originales 20, 21 y 25. Por lo tanto, los rechazos de estas reivindicaciones son irrelevantes.

(2) Reivindicaciones 27-29

La reivindicación 27 se modifica haciendo referencia a la nueva reivindicación 15 (la reivindicación original 26) sin perjuicio, y las reivindicaciones 28 y 29 se modifican de forma adaptativa.

El solicitante respetuosamente sostiene que la nueva reivindicación 15 es inventiva con respecto a D1 y D3, ya que busca proteger un método de edición para aumentar el nivel de expresión génica de un gen endógeno objetivo en un organismo independientemente de un fragmento de ADN donante exógeno, mientras que D1-D3 no divulgan ni sugieren dicho método ni individualmente ni en combinación.

En primer lugar, D3 se relaciona con la inducción de la reorganización cromosómica in vivo mediante la introducción de un vector de expresión, con el objetivo de destruir los loci cromosómicos relevantes para generar así modelos animales de enfermedades humanas. Sin embargo, D3 no se pronuncia sobre la producción de un organismo normal con una mayor expresión de un gen de interés, por ejemplo, una planta, que puede funcionar correctamente. Al enfrentarse al problema técnico de producir un organismo normal con una mayor expresión de un gen diana endógeno de interés, el experto en la materia no concebiría la D3.

D1 no soluciona este defecto. D1 se refiere a la preparación de plantas mediante la transformación de polinucleótidos que codifican HPPD. En el Ejemplo 6 de D1, como cita el Examinador, se elaboró un constructo de vector que contenía una secuencia que codifica HPPD y se introdujo en células de soja. D1 no enseña ni sugiere que el nivel de expresión

del gen HPPD endógeno se pueda aumentar sin la transformación de un gen HPPD exógeno.

Teniendo en cuenta lo anterior, el experto en la materia no está motivado para combinar la D3 con D1. Incluso si se va a combinar la D3 con D1, el experto en la materia no concebiría ajustar el método de D3 para producir organismos normales para llegar a la solución técnica de la nueva reivindicación 15.

El solicitante respetuosamente sostiene que la nueva reivindicación 15 es inventiva. Por razones similares, sus reivindicaciones dependientes 16 a 19 también son inventivas.

(3) Reivindicaciones 36-37

En cuanto a las reivindicaciones 36 y 37, el examinador opina que no son novedosas con respecto a D1.

En el nuevo conjunto de reivindicaciones, se elimina la reivindicación 30 y se modifican las reivindicaciones 36-37 para hacer referencia a las nuevas reivindicaciones 20-22 (que corresponden a las reivindicaciones originales 31-33). Dado que D1 no divulga ninguna de las secuencias específicas enumeradas en las nuevas reivindicaciones 20-22, debe reconocerse la novedad de las nuevas reivindicaciones 24 y 25 correspondientes.

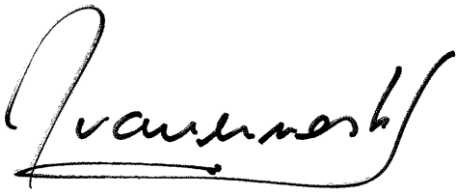
En vista de lo anterior, los rechazos/objeciones planteados en el oficio se consideran irrelevantes.

Conclusiones

Con las enmiendas realizadas a las reivindicaciones y los argumentos proporcionados anteriormente, el solicitante considera subsanadas las objeciones del examinador.

En consecuencia y luego de haber presentado los argumentos necesarios y haber realizado las modificaciones pertinentes en el capítulo reivindicatorio de la presente invención, queda evidenciado que la invención cumple con los requisitos de patentabilidad definidos en la Decisión 486 de 2000.

Cordialmente,



Juan Carlos Cuesta Quintero
C.C. 79.339.809 de Bogotá
T.P. 43.273 del C.S. de la J.

Anexos: Comprobante de pago por modificación de la solicitud.
Capitulo reivindicatorio modificado con control de cambios.
Capitulo reivindicatorio modificado en limpio.
Capitulo descriptivo modificado con control de cambios.
Capitulo descriptivo modificado en limpio.

TRADUCCIÓN PÚBLICA

UN MÉTODO PARA EDITAR UN GEN EN UNA CÉLULA DE UN ORGANISMO ~~MÉTODO PARA GENERAR UN NUEVO GEN EN UN ORGANISMO Y SU USO~~

Campo técnico

La presente invención se refiere a los campos técnicos de ingeniería genética y bioinformática, y en particular, un método para crear un nuevo gen en un organismo en ausencia de un molde de ADN artificial y su uso.

Arte previo

En términos generales, un casete de expresión génica completo en un organismo comprende un promotor, región no traducida 5' (5' UTR), región codificadora (CDS) o región de ARN no codificadora (ARN no codificadora), región no traducida 3' (3' UTR), un terminador y muchos otros elementos. El ARN no codificadora puede realizar sus funciones biológicas a nivel de ARN, que incluye ARNr, ARNt, ARNsn, ARNsno y microARN. La región CDS contiene exones e intrones. Una vez que el ARN transcripto se traduce en una proteína, los aminoácidos de diferentes segmentos usualmente forman dominios diferentes. Los dominios específicos determinan la localización intracelular y la función de la proteína (tal como la señal de localización nuclear, péptido líder del cloroplasto, péptido líder mitocondrial, dominio de unión al ADN, dominio de activación de transcripción, centro catalítico enzimático,

etc.). Para el ARN no codificadora, diferentes segmentos también tienen diferentes funciones. Cuando uno o varios elementos de un gen cambian, se formará un nuevo gen, que puede tener nuevas funciones. Por ejemplo, un evento de inversión de un fragmento de cromosoma de 1,7 Mb ocurrido corriente arriba del gen PpOFP1 del durazno plano puede producir un nuevo promotor, que aumentará significativamente la expresión de PpOFP1 en frutos de durazno con forma plana en la etapa S2 del desarrollo del fruto en comparación con el de la fruta durazno con forma redonda, inhibe así el desarrollo vertical de la fruta de durazno y da como resultado el fenotipo de forma plana en durazno plano (Zhou et al. 2018. A 1,7–Mb chromosomal inversion downstream of a PpOFP1 gene is responsible for flat fruit shape in peach. Plant Biotechnol. J. DOI: 10,1111/pbi,13455).

La generación natural de nuevos genes en genomas biológicos requiere un largo proceso evolutivo. Según el trabajo de investigación, los mecanismos moleculares para la generación de nuevos genes incluyen reordenamiento de exones, duplicación de genes, retrotransposición e integración de elementos móviles (transposones, retrotransposones), transferencia horizontal de genes, división por fusión de genes, origen de novo y muchos otros mecanismos y los nuevos genes se pueden conservar en las especies bajo la acción de la selección natural a través de la derivación y evolución

funcional. Los nuevos genes relativamente jóvenes que se han identificado en la mosca de la fruta, *Arabidopsis thaliana* y primates tienen una historia de cientos de miles a millones de años de acuerdo con un un cálculo ((Long et al. 2012. The origin and evolution of new genes. Methods Mol Biol. DOI: 10,1007/978-1-61779-585-5_7). Por lo tanto, en el campo de la ingeniería genética y el mejoramiento biológico, tomando como ejemplo las plantas, si se desea introducir un nuevo gen en una planta (incluso si todos los elementos genéticos del nuevo gen se derivan de diferentes genes de la propia especie), solo se puede lograr a través de la tecnología transgénica. Es decir, los elementos de diferentes genes se ensamblan entre sí in vitro para formar un nuevo gen, que luego se transfiere a la planta mediante tecnología transgénica. Se caracteriza porque el ensamblaje de un nuevo gen se debe realizar in vitro, lo que produce resultado cultivos transgénicos.

Las herramientas de edición de genes representadas por CRISPR/Cas9 y similares pueden generar rupturas de cadena doble (DSB) de manera eficiente y precisa en sitios específicos del genoma de un organismo, y luego las rupturas de cadena doble (DSB) se reparan a través de mecanismos de reparación de extremos no homólogos de la propia célula o de recombinación homóloga, de este modo se generan mutaciones específicas del sitio. Las aplicaciones actuales de la técnica de edición de genes se centran principalmente en la edición

de los elementos internos de un gen único, principalmente la edición de un exón regio CDS. La edición de un exón generalmente da como resultado mutaciones de cambio de marco en el gen, lo que lleva a la pérdida de la función del gen. Por este motivo, las herramientas de edición de genes tal como CRISPR/Cas9 también se conocen como herramientas de inactivación de genes (es decir, destrucción de genes). Además de la región CDS, el promotor, 5'UTR y otras regiones también se pueden inactivar para afectar el nivel de expresión de un gen. Todos estos métodos mutan genes existentes sin generar nuevos genes, por lo que es difícil satisfacer algunas necesidades de producción. Por ejemplo, en la mayoría de los genes, a la tecnología de edición de genes existente se le hace difícil lograr la regulación por aumento de la expresión génica y también es difícil cambiar la localización subcelular de una proteína o cambiar el dominio funcional de la proteína. También hay informes en la bibliografía sobre la inserción de una secuencia promotora o potenciadora corriente arriba de un gen existente para cambiar el patrón de expresión del gen a fin de producir nuevos rasgos (Lu et al. 2020. Targeted, efficient sequence insertion and replacement in rice. Nat Biotechnol. DOI: 10,1038/s41587-020-0581-5), pero este método requiere la provisión de moldes de ADN extraño, por lo que se aplican procedimientos regulatorios estrictos similares a los cultivos genéticamente modificados, y la aplicación está

restringida.

Síntesis de la invención

Para resolver los problemas mencionados anteriormente en la técnica anterior, la presente invención proporciona un método para crear un nuevo gen en un organismo en ausencia de un molde de ADN artificial al generar simultáneamente dos o más rupturas de cadena doble de ADN en una combinación de sitios específicos en el genoma del organismo y su uso.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para crear un nuevo gen en un organismo, que comprende las siguientes etapas:

generar simultáneamente rupturas de ADN en dos o más sitios específicos diferentes en el genoma del organismo, en donde los sitios específicos son sitios genómicos capaces de separar diferentes elementos genéticos o diferentes dominios de proteínas, ligar las rupturas de ADN entre sí mediante una unión de extremos no homólogos (NHEJ o reparación homóloga, lo que genera una nueva combinación de los diferentes elementos génicos o diferentes dominios de proteínas que son diferentes de la secuencia del genoma original, de este modo se crea el nuevo gen.

En una forma de realización específica, los "dos o más sitios específicos diferentes" pueden estar ubicados en el mismo cromosoma o en cromosomas diferentes. Cuando se

localizan en el mismo cromosoma, el fragmento cromosómico resultante de las rupturas del ADN que ocurren simultáneamente en dos sitios específicos se puede suprimir, invertir o duplicar después de la reparación; cuando se localizan en diferentes cromosomas, las rupturas de ADN generadas en dos sitios específicos se pueden ligar entre sí después de la reparación para producir un evento de cruzamiento de los brazos cromosómicos. Estos eventos se pueden identificar y analizar mediante secuenciación por PCR con cebadores diseñados específicamente.

En una forma de realización específica, los "dos o más sitios específicos diferentes" pueden ser sitios específicos en al menos dos genes diferentes, o pueden ser al menos dos sitios específicos diferentes en el mismo gen.

En una forma de realización específica, las direcciones de transcripción de "al menos dos genes diferentes" pueden ser iguales o diferentes (opuestas o una hacia la otra).

En una forma de realización específica, las "rupturas del ADN" se producen mediante la administración de una nucleasa con propiedad de direccionamiento a una célula del organismo para que entre en contacto con los sitios específicos del ADN genómico. No existe una diferencia esencial entre este tipo de rupturas de ADN y las rupturas de ADN producidas por técnicas tradicionales (tales como radiación o mutagénesis química).

En una forma de realización específica, la "nuclease con propiedad de direccionamiento" se selecciona de la Meganucleasa, nucleasa de dedos de cinc (ZFN), TALEN, y el sistema CRISPR/Cas.

Entre ellos, el sistema CRISPR/Cas puede generar dos o más rupturas de cadena doble de ADN en diferentes sitios del genoma a través de dos o más ARN líder dirigidos a diferentes secuencias; al diseñar por separado la proteína ZFN o la proteína TALEN en dos o más secuencias de sitios específicos, los sistemas de nucleasa de dedo de zinc y TALEN pueden generar simultáneamente rupturas de cadena doble de ADN en dos o más sitios. Cuando dos rupturas se ubican en el mismo cromosoma, se pueden producir resultados de reparación tal como supresión, inversión y duplicación; y cuando dos rupturas se ubican en dos cromosomas diferentes, puede ocurrir un cruzamiento de brazos cromosómicos. La supresión, inversión, duplicación e intercambio de segmentos cromosómicos en dos rupturas de ADN pueden recombinar diferentes elementos de genes o dominios de proteínas, de este modo se crea un nuevo gen funcional.

En una forma de realización específica, la "nucleasa con propiedad de direccionamiento" existe en la forma de ADN.

En otra forma de realización específica, la "nucleasa con propiedad de dirección" existe en forma de ARNm o proteína, en lugar de en forma de ADN.

En una forma de realización específica, el método para administrar las nucleasas con propiedad de direccionamiento en la célula se selecciona de un grupo que consiste en: 1) transfección celular mediada por PEG; 2) transfección celular mediada por liposomas; 3) transformación por shock eléctrico; 4) microinyección; 5) bombardeo con pistola genética; o 6) transformación mediada por *Agrobacterium.*

Los "elementos del gen" comprenden un promotor, una región no traducida 5 '(5'UTR), una región codificadora (CDS) o una región de ARN no codificadora (ARN no codificadora), una región no traducida 3' (3'UTR) y un terminador del gen.

En una forma de realización específica, la combinación de diferentes elementos genéticos se refiere a una combinación del promotor de uno de los dos genes con diferentes patrones de expresión y la CDS o región de ARN no codificadora del otro gen.

En una forma de realización específica, una de las combinaciones de diferentes elementos genéticos se refiere a un promotor endógeno fuerte e el organismo, y el otro es una región codificadora del gen de HPPD, EPSPS, PPO o GH1.

En otra forma de realización específica, la combinación de diferentes elementos genéticos se refiere a una combinación de una región del promotor a la 5'UTR de uno de dos genes con diferentes patrones de expresión y la CDS o región de ARN no codificadora del otro gen.

En una forma de realización específica, los “diferentes patrones de expresión” se refieren a diferentes niveles de expresión génica.

En otra forma de realización específica, los “diferentes patrones de expresión” se refieren a diferentes especificidades de tejido de la expresión génica.

En otra forma de realización específica, los “diferentes patrones de expresión” se refieren a diferentes especificidades de etapa de desarrollo de la expresión génica.

En otra forma de realización específica, la combinación de diferentes elementos genéticos es una combinación de elementos genéticos adyacentes dentro del mismo gen.

Los “dominios de proteína” se refieren a un fragmento de ADN correspondiente a un dominio funcional específico de una proteína; incluye, pero sin limitación, señal de localización nuclear, péptido líder del cloroplasto, péptido líder mitocondrial, sitio de fosforilación, sitio de metilación, dominio de transmembrana, dominio de unión al ADN, dominio de activación de la transcripción, dominio de activación del receptor, centro catalítico de enzimas, etc.

En una forma de realización específica, la combinación de diferentes dominios de proteína se refiere a una combinación de una región de la señal de localización de uno de dos genes codificadores de proteína con diferentes localizaciones subcelulares y una región codificadora de la proteína madura

del otro gen.

En una forma de realización específica, las “diferentes localizaciones subcelulares” incluyen, pero no se limitan a, una localización nuclear, una localización citoplásmica, una localización de la membrana celular, una localización de cloroplasto, una localización mitocondrial o una localización de la membrana del retículo endoplásmico.

En otra forma de realización específica, la combinación de diferentes dominios de proteína se refiere a una combinación de dos dominios de proteína con diferentes funciones biológicas.

En una forma de realización específica, las “diferentes funciones biológicas” incluyen, pero sin limitación, el reconocimiento de una secuencia conservada de ADN o ARN específico, activación de la expresión génica, unión al ligando de proteína, unión a la señal de molécula pequeña, unión de iones o reacción enzimática específica.

En otra forma de realización específica, la combinación de diferentes dominios de proteína se refiere a una combinación de dominios de proteína adyacentes en el mismo gen.

En otra forma de realización específica, la combinación de elementos genéticos y dominios de proteína se refiere a una combinación de dominios de proteína y promotores, 5’UTR, 3’UTR o terminadores adyacentes en el mismo gen.

Específicamente, el intercambio de promotores de diferentes genes se puede lograr mediante la inversión de fragmentos cromosómicos: cuando dos genes ubicados en el mismo cromosoma tienen direcciones diferentes, se pueden generar rupturas de ADN en sitios específicos entre el promotor y el CDS de cada uno de los dos genes, la región entre las rupturas se puede invertir, por lo que los promotores de estos dos genes se pueden intercambiar y se pueden generar dos genes nuevos en ambos extremos del segmento cromosómico invertido. Las diferentes direcciones de los dos genes pueden ser que sus extremos 5’ sean internos, es decir, ambos genes estén en direcciones opuestas, o que sus extremos 5’ sean externos, es decir, ambos genes estén uno hacia el otro. Cuando los genes están en direcciones opuestas, los promotores de los genes se pueden invertir, como se muestra en el Esquema 1 de la Figura 2; donde los genes están uno hacia el otro, las regiones CDS de los genes se puede invertir, como se muestra en el Esquema 1 de la Figura 4. La región invertida puede ser tan corta como menor de 10 kb de longitud, sin otros genes entre ellos; o la región invertida puede ser muy larga, alcanzando hasta 300 kb–3 Mb y contener cientos de genes.

También es posible crear un nuevo gen mediante la duplicación de un fragmento cromosómico: cuando dos genes ubicados en el mismo cromosoma están en la misma dirección, se pueden generar rupturas de ADN en sitios específicos entre

el promotor y la CDS de cada uno de los dos genes, la región entre las rupturas se puede duplicar por duplicación, y se puede crear un nuevo gen en la unión del segmento duplicado mediante la fusión del promotor del gen corriente abajo con la región CDS del gen corriente arriba, como se muestra en la Figura 1 Esquema 1 y Figura 3. La longitud de la región duplicada puede estar en el rango de 500 pb a 5 Mb, que puede ser muy corta sin otros genes entre ellos, o puede ser muy larga para contener cientos de genes. Aunque este método inducirá mutaciones puntuales en las regiones entre los promotores y la región CDS de los dos genes originales, tales mutaciones puntuales a pequeña escala generalmente tienen poco efecto sobre las propiedades de la expresión génica, mientras que los nuevos genes creados por el reemplazo del promotor tendrán nuevas propiedades de expresión. O alternativamente, se pueden generar rupturas de ADN en posiciones específicas en ambos lados de un dominio de proteína de un mismo gen, y la región entre las rupturas se puede duplicar, de este modo se crea un nuevo gen con dominios funcionales específicos duplicados.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para crear un nuevo gen en un organismo, que comprende las siguientes etapas:

generar rupturas de ADN en sitios específicos en al menos dos genes diferentes al nivel del genoma o cromosoma del

organismo, inducir la transferencia, duplicación, inversión o supresión del ADN, de modo que un elemento genético específico de un gen endógeno y un elemento genético en otro gen endógeno se puede ligar mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación homóloga, de este modo se crea un nuevo gen.

La presente invención también proporciona un nuevo gen que se puede obtener mediante el presente método.

En comparación con los genes originales, el nuevo gen puede tener un promotor diferente y por lo tanto tener características de expresión en términos de tejidos o intensidades o etapas de desarrollo, o tener nuevas secuencias de aminoácidos.

La "nueva secuencia de aminoácidos" puede ser una fusión de las regiones codificadoras completas o parciales de dos o más genes, o una duplicación de una región codificadora de proteína parcial del mismo gen.

En una forma de realización específica, el nuevo gen es un gen HPPD, EPSPS, PPO o GH1 endógeno de alta expresión en un organismo.

La presente invención también proporciona un gen que contiene el ADN.

La presente invención también proporciona una proteína codifica por el gen, o fragmento biológicamente activo de este.

La presente invención también proporciona a vector de expresión recombinante, que comprende el gen y un promotor unido operativamente de este.

La presente invención también proporciona un casete de expresión que contiene el gen.

La presente invención también proporciona a célula huésped, que comprende el casete de expresión. Con preferencia, la célula huésped es una célula de planta, una célula animal o una célula fúngica.

La presente invención además proporciona un organismo regenerado a partir de la célula huésped.

La presente invención además proporciona el uso del gen para conferir o mejorar un rasgo de resistencia/tolerancia o rasgo de ventaja de crecimiento en un organismo.

La presente invención además proporciona una composición, que comprende:

(a) el promotor de uno de dos genes con diferentes patrones de expresión y una región codificadora o región de ARN no codificadora del otro gen;

(b) una región entre el promotor y la región no traducida 5’ de uno de dos genes con diferentes patrones de expresión y una región codificadora o región de ARN no codificadora del otro gen;

(c) elementos genéticos adyacentes dentro del mismo gen;

(d) una región de la señal de localización de uno de los

dos genes codificadores de proteína con diferentes localizaciones subcelulares y una región codificadora de la proteína madura del otro gen;

(e) dos dominios de proteína con diferentes funciones biológicas;

(f) dominios de proteína adyacentes en el mismo gen; o,

(g) un dominio de proteína y un promotor, región no traducida 5', región no codificadora 3' o terminador adyacente en el mismo gen.

En una forma de realización específica, los "diferentes patrones de expresión" se refieren a diferentes niveles de expresión génica.

En otra forma de realización específica, los "diferentes patrones de expresión" se refieren a diferentes especificidades de tejido de la expresión génica.

En otra forma de realización específica, los "diferentes patrones de expresión" se refieren a diferentes especificidades de etapa de desarrollo de la expresión génica.

En una forma de realización específica, las "diferentes localizaciones subcelulares" incluyen, pero sin limitación, localización nuclear, localización citoplásmica, localización de la membrana celular, localización del cloroplasto, localización mitocondrial o localización de la membrana del retículo endoplásmico.

En una forma de realización específica, los "diferentes

funciones biológicas" incluyen, pero sin limitación, reconocimiento de secuencia conservada de ADN o ARN específico, activación de la expresión génica, unión a ligando de proteína, unión a señal de molécula pequeña, unión de iones o reacción enzimática específica.

En una forma de realización específica, la composición se fusiona in vivo.

En particular, la presente invención también proporciona un método de edición de aumento del nivel de expresión de un gen endógeno blanco en un organismo independiente de un fragmento de donante de ADN exógeno, que comprende las siguientes etapas: generar simultáneamente rupturas de ADN en sitio específicos entre el promotor y la CDS 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 la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación homóloga para formar la fusión in vivo de la región codificadora del gen endógeno blanco y el promotor endógeno fuerte opcional, de este modo se crea un nuevo gen endógeno de alta expresión. Este método se denomina como un método de edición para knocking-up un gen endógeno.

En una forma de realización específica, el gen endógeno blanco y el gen endógeno de alta expresión opcional se ubican en el mismo cromosoma.

En otra forma de realización específica, el gen endógeno

blanco y el gen endógeno de alta expresión opcional se ubican en cromosomas diferentes.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de edición para knocking up la expresión del gen de HPPD endógeno en una planta, que comprende fusionar la región codificadora del gen de HPPD con un promotor endógeno de planta fuerte in vivo para formar un nuevo gen HPPD endógeno vegetal de alta expresión. Es decir, se generan simultáneamente rupturas de ADN en los sitios específicos entre el promotor y la CDS de cada uno del gen de HPPD y un gen endógeno de alta expresión opcional, se ligan las rupturas de ADN entre sí a través de una vía de reparación intracelular para formar la fusión in vivo de la región codificadora del gen de HPPD y el promotor fuerte endógeno opcional, de este modo se crea un nuevo gen de HPPD de alta expresión. En el arroz, el promotor fuerte con preferencia es un promotor del gen de ubiquitina2.

La presente invención también proporciona un gen HPPD endógeno vegetal de alta expresión que se puede obtener por el método de edición anterior.

La presente invención también proporciona un gen HPPD endógeno de arroz de alta expresión que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

(1) una secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 o una

secuencia parcial de este, o una secuencia complementaria de esta;

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

(3) una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse con la secuencia mostrada en (1) o (2) en una condición rigurosa.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de edición para knocking up la expresión de un gen de EPSPS endógeno en una planta, que comprende la fusión de la región codificadora de un gen EPSPS con un promotor endógeno de planta fuerte in vivo para formar un nuevo gen de EPSPS endógeno de planta de alta expresión. Es decir, se generan simultáneamente rupturas de ADN en los sitios específicos entre el promotor y la CDS de cada uno del gen EPSPS y un gen endógeno de alta expresión opcional, se ligan las rupturas de ADN entre sí a través de una vía de reparación intracelular para formar la fusión in vivo de la región codificadora del gen EPSPS y el promotor endógeno fuerte opcional, de este modo se crea un nuevo gen EPSPS de alta expresión. En el arroz, el promotor fuerte con preferencia es un promotor del gen de TKT.

La presente invención también proporciona un gen de EPSPS endógeno de planta de alta expresión que se puede obtener por

el método de edición anterior.

La presente invención también proporciona un gen de EPSPS endógeno de arroz de alta expresión que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

(1) la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14 o una secuencia parcial de esta, o una secuencia complementaria de esta;

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

(3) una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse con la secuencia mostrada en (1) o (2) en una condición rigurosa.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de edición para knocking up la expresión de un gen de PPO (PPOX) endógeno en una planta, que comprende fusionar la región codificadora del gen de PPO con un promotor endógeno de planta fuerte in vivo para formar un nuevo gen de PPO endógeno de planta de alta expresión. Es decir, se generan simultáneamente rupturas de ADN en los sitios específicos entre el promotor y la CDS de cada uno del gen de PPO y un gen endógeno de alta expresión opcional, se ligan las rupturas de ADN entre sí a través de una vía de reparación intracelular

para formar la fusión in vivo de la región codificadora del gen de PPO y el promotor endógeno fuerte opcional, de este modo se crea un nuevo gen de PPO de alta expresión. En el arroz, el promotor fuerte con preferencia es un promotor del gen de CP12. En *Arabidopsis thaliana*, el promotor fuerte con preferencia es un promotor del gen de ubiquitina 10.

La presente invención también proporciona un gen de PPO endógeno de planta de alta expresión que se puede obtener por el método de edición anterior.

La presente invención también proporciona un gen de PPO endógeno de arroz de alta expresión que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

(1) la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, o SEQ ID NO: 26 o una secuencia parcial de esta, o una secuencia complementaria de esta;

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

(3) una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse con la secuencia mostrada en (1) o (2) en una condición rigurosa.

La presente invención también proporciona un ADN que

contiene el gen de HPPD, EPSPS o PPO.

La presente invención también proporciona una proteína codificada por el gen de HPPD, EPSPS o PPO o un fragmento biológicamente activo de este.

La presente invención también proporciona un vector de expresión recombinante, que comprende el gen de HPPD, EPSPS o PPO, y un promotor unido operativamente a este.

La presente invención además proporciona un casete de expresión que comprende el gen de HPPD, EPSPS o PPO.

La presente invención además proporciona a célula huésped de planta, que comprende el casete de expresión.

La presente invención además proporciona una planta regenerada a partir de la célula huésped de planta.

La presente invención también proporciona un método para producir una planta con un aumento de resistencia o tolerancia a un herbicida, que comprende regenerar la célula huésped de planta en una planta y/o progenie de esta.

En una forma de realización específica, la planta con aumento de resistencia o tolerancia a herbicidas es una línea no transgénica que se puede obtener mediante el cruzamiento de una planta regenerada de la célula huésped de planta de la invención con una planta de tipo salvaje para eliminar el componente transgénico exógeno a través de la segregación genética.

La presente invención también proporciona un arroz

resistente a herbicidas, que comprende cualquiera de los anteriormente mencionados gen de HPPD endógeno de arroz de alta expresión, gen de EPSPS endógeno de arroz de alta expresión, gen de PPO endógeno de arroz de alta expresión o cualquiera de sus combinaciones.

En una forma de realización específica, el arroz resistente a herbicidas es no transgénico.

La presente invención además proporciona el uso del gen de HPPD, EPSPS o PPO endógeno de planta de alta expresión para mejorar la resistencia o tolerancia a un herbicida inhibidora en una célula de planta, tejido de planta, parte de una planta o una planta.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para controlar una maleza en un sitio de cultivo de plantas, en donde la planta comprende la planta mencionada anteriormente o una planta preparada mediante el método mencionado anteriormente, que comprende aplicar al sitio de cultivo uno o más herbicidas inhibidores de HPPD, EPSPS o PPO en una cantidad para controlar eficazmente la maleza.

En el trabajo de investigación de los inventores, se descubrió que en las células que se someten simultáneamente a la edición de genes de doble blanco o múltiples blancos, una cierta proporción de los extremos de las rupturas de cadena doble del ADN en diferentes blancos se ligaron espontáneamente entre sí, lo que produce eventos de supresión,

inversión o duplicación: duplicación de los fragmentos entre los blancos del mismo cromosoma y/o intercambio de fragmentos cromosómicos entre los blancos en diferentes cromosomas. Se ha informado en la bibliografía que este fenómeno comúnmente existe en plantas y animales (Puchta et al. 2020. Changing local recombination patterns in Arabidopsis by CRISPR/Cas mediated chromosome engineering. Nat Commun. DOI: 10,1038/s41467-020- 18277-z; Li et al. 2015. Efficient inversions and duplications of mammalian regulatory DNA elements and gene clusters by CRISPR/Cas9. J Mol Cell Biol. DOI: 10,1093/jmcb/mjv016).

Los presentes inventores descubrieron sorprendentemente que, mediante la inducción de las rupturas de cadena doble de ADN en una combinación de blancos de edición de genes cerca de elementos específicos de un gen de interés, que causa el ligamiento de reparación espontánea, se puede lograr una combinación dirigida de diferentes elementos genéticos en el nivel del genoma sin la necesidad proporcionar un molde de ADN extraño, y es posible producir a partir del mismo un nuevo gen funcional. Esta estrategia acelera enormemente la creación de nuevos genes y tiene un gran potencial en el mejoramiento genético de animales y plantas y la investigación de la función genética.

Descripción detallada de la invención

En la presente invención, a menos que se especifique lo contrario, los términos científicos y técnicos utilizados en la presente tienen los significados comúnmente entendidos por los expertos en la técnica. Además, la química de proteínas y ácidos nucleicos, biología molecular, cultivo de células y tejidos, microbiología, los términos relacionados con la inmunología y los procedimientos de laboratorio usados en la presente son todos términos y procedimientos de rutina ampliamente usados en los campos correspondientes. Por ejemplo, el ADN recombinante estándar y las técnicas de clonación molecular utilizadas en la presente invención son bien conocidas por los expertos en la técnica y se describen completamente en los siguientes documentos: Sambrook, J., Fritsch, EF and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989. Para una mejor comprensión de la presente invención, a continuación se proporcionan definiciones y explicaciones de términos relacionados.

El término “genoma”, como se usa en la presente, se refiere a todos los complementos de material genético (genes y secuencias no codificadoras) presentes en cada célula, virus u organela de un organismo, y/o genoma completo heredado de un padre como una unidad (haploide).

El término “edición de genes” se refiere a estrategias y técnicas para la modificación específica dirigida de

cualquier información genética o genoma de organismos vivos. Por tanto, el término incluye la edición de regiones codificadoras de genes, pero también incluye la edición de regiones distintas de las regiones codificadoras de genes del genoma. También incluye editar o modificar otra información genética de núcleos (si están presentes) y células.

El término "nucleasa CRISPR/Cas" puede ser una nucleasa basada en CRISPR o una secuencia de ácido nucleico que codifica la misma, que incluye pero sin limitación: 1) Cas9, que incluye SpCas9, ScCas9, SaCas9, xCas9, VRER-Cas9, EQR-Cas9, SpG-Cas9, SpRY-Cas9, SpCas9-NG, NG-Cas9, NGA-Cas9 (VQR), etc.; 2) Cas12, que incluye LbCpf1, FnCpf1, AsCpf1, MAD7, etc., o cualquier variante o derivado de la nucleasa basada en CRISPR mencionada anteriormente; con preferencia, en donde la al menos una nucleasa basada en CRISPR comprende una mutación en comparación con la secuencia de tipo salvaje correspondiente, de modo que la nucleasa basada en CRISPR obtenida reconoce una secuencia de PAM diferente. Como se usa en la presente, "nucleasa basada en CRISPR" es cualquier nucleasa que se ha identificado en un sistema CRISPR natural, que posteriormente se aísla de su contexto natural, y que con preferencia se ha modificado o combinado en un constructo recombinante de interés, adecuada como herramienta para la ingeniería del genoma dirigida. Siempre que la nucleasa basada en CRISPR de tipo salvaje original proporcione reconocimiento

de ADN, es decir, propiedades de unión, se puede usar cualquier nucleasa basada en CRISPR y, opcionalmente, reprogramar o mutar de otro modo para que sea adecuada para diversas realizaciones de la invención.

El término "CRISPR" se refiere a una técnica de manipulación genética específica de secuencia que se basa en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, que es diferente de la interferencia de ARN que regula la expresión génica a nivel transcripcional.

"Cas9 nucleasa" y "Cas9" se usan indistintamente en la presente y se refieren a nucleasa guiada por ARN que comprende la proteína Cas9 o un fragmento de esta (por ejemplo, una proteína que contiene el dominio de escisión de ADN activo de Cas9 y/o el dominio de unión de ARNg de Cas9). Cas9 es un componente del sistema de edición del genoma CRISPR/Cas (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas y sistemas asociadas). Puede dirigir y cortar secuencias blanco de ADN bajo la guía de ARN guía para formar rupturas de cadena doble de ADN (DSB).

"Proteína Cas" o "polipéptido Cas" se refiere a un polipéptido codificado por el gen Cas (asociado a CRISPR). La proteína Cas incluye la endonucleasa Cas. La proteína Cas puede ser una proteína bacteriana o arqueal. Por ejemplo, las proteínas CRISPR Cas de tipos I a III de la presente generalmente se originan a partir de procariotas; las

proteínas Cas de tipo I y tipo III se pueden derivare de especies de bacterias o arqueas, y la proteína Cas de tipo II (es decir, Cas9) se pueden derivar de especies bacterianas. Las "proteínas Cas" incluyen proteína Cas9, proteína Cpf1, proteína C2c1, proteína C2c2, proteína C2c3, Cas3, Cas3-HD, Cas5, Cas7, Cas8, Cas10, Cas12a, Cas12b, o una combinación o complejo de estos.

"Variante Cas9" o "variante de endonucleasa Cas9" se refiere a una variante de la endonucleasa Cas9 original, en donde cuando se asocia con ARNcr y ARNtrac o con ARNsg, la variante de endonucleasa Cas9 conserva la capacidad de reconocer, unirse a todo o parte de una secuencia de ADN blanco y, opcionalmente, desenrollar todo o parte de una secuencia blanco de ADN, mellar toda o parte de una secuencia blanco de ADN, o cortar toda o parte de una secuencia blanco de ADN. Las variantes de endonucleasa Cas9 incluyen las variantes de endonucleasa Cas9 descritas en la presente, en donde las variantes de endonucleasa Cas9 son diferentes de la endonucleasa Cas9 original de la siguiente manera: las variantes de endonucleasa Cas9 (cuando se complejan con ARNg para formar un complejo de endonucleasa dirigido por polinucleótidos capaz de modificar un sitio blanco) tienen al menos una propiedad mejorada, tal como, pero sin limitación, aumento de eficiencia de transformación, aumento de eficiencia de edición de ADN, disminución del corte fuera del

blanco o cualquiera de sus combinaciones, en comparación con la endonucleasa Cas9 original (complejada con el mismo ARNg para formar un complejo de endonucleasa guiado por polinucleótidos capaz de modificar el mismo sitio blanco).

Las variantes de endonucleasa Cas9 descritas en la presente incluyen variantes que se pueden unir y mellar sitios blanco de ADN de cadena doble cuando se asocian con ARNcr y ARNtracr o con ARNsg, mientras que la endonucleasa Cas original se puede unir al sitio blanco y producir una ruptura (escisión) de cadena doble cuando se asocia con ARNcr y ARNtracr o con ARNsg.

"ARN guía" y "ARNg" se usan indistintamente en la presente y se refieren a una secuencia de ARN guía que se usa para dirigir un gen específico para la corrección usando tecnología CRISPR, que generalmente consiste en moléculas de ARNcr y ARNtracr que son parcialmente complementarias para formar un complejo, en donde el ARNcr contiene una secuencia que tiene suficiente complementariedad con la secuencia blanco para hibridar con la secuencia blanco y dirigir el complejo CRISPR (Cas9 + ARNcr + ARNtracr) para unirse específicamente a la secuencia blanco. Sin embargo, se sabe en la técnica que se puede diseñar un ARN guía único (ARNg), que contiene tanto las propiedades del ARNcr como del ARNtracr.

Los términos "ARN guía único" y "ARNsg" se usan indistintamente en la presente y se refieren a la fusión

sintética de dos moléculas de ARN, que comprende una fusión de un ARNcr (ARN CRISPR) de un dominio de direccionamiento variable (unido a una secuencia de apareamiento de tracr hibridada con ARNtracr) y un ARNtracr (ARN CRISPR trans-activador). El ARNsg puede comprender ARNcr o fragmentos de ARNcr y ARNtracr o fragmentos de ARNtracr del sistema CRISPR/Cas de tipo II que pueden formar un complejo con la endonucleasa Cas de tipo II, donde el complejo de ARN guía/endonucleasa Cas puede guiar la endonucleasa Cas hacia un sitio blanco de ADN para que la endonucleasa Cas pueda reconocer, unirse opcionalmente al sitio blanco del ADN y, opcionalmente, mellar el sitio blanco del ADN o cortar (introducir una ruptura de cadena simple o doble) el sitio blanco del ADN.

En ciertas realizaciones, el ARN guía y Cas9 se pueden administrar a una célula como un complejo de ribonucleoproteína (RNP). La RNP está compuesta de proteína Cas9 purificada complejada con ARNg y es bien sabido en la técnica que la RNP se puede administrar eficazmente a muchos tipos de células, que incluyen, pero sin limitación, las células madre y las células inmunitarias (Addgene, Cambridge, MA, Mirus Bio LLC, Madison, WI).

El motivo adyacente del protoespaciador (PAM) en la presente se refiere a una secuencia de nucleótidos corta adyacente a una secuencia blanco (dirigida) (preespaciador)

reconocida por el sistema de ARNg/endonucleasa Cas. Si la secuencia de ADN blanco no es adyacente a una secuencia PAM apropiada, es posible que la endonucleasa Cas no pueda reconocer con éxito la secuencia de ADN blanco. La secuencia y longitud de PAM en la presente pueden ser diferentes de acuerdo con la proteína Cas o del complejo de proteína Cas en uso. La secuencia PAM puede tener cualquier longitud, pero normalmente tiene una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos.

Como se usa en la presente, el término "organismo" incluye animales, plantas, hongos, bacterias y similares.

Como se usa en la presente, el término "célula huésped" incluye células de planta, células animales, células fúngicas, células bacterianas y similares.

En la presente invención, se debe entender por "planta" cualquier organismo multicelular diferenciado capaz de realizar la fotosíntesis, en particular plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas, por ejemplo, (1) cultivos alimenticios: Oryza spp., like Oryza sativa, Oryza latifolia, Oryza sativa, Oryza glaberrima; Triticum spp., como Triticum aestivum, T. Turgidumssp. durum; Hordeum spp., como Hordeum vulgare, Hordeum arizonicum; Secale cereale; Avena spp., como Avena sativa, Avena fatua, Avena byzantine, Avena fatua var.sativa, Avena hybrida; Echinochloa spp., como Pennisetum glaucum, Sorghum, Sorghum bicolor, Sorghum vulgare, Triticale,

Zea mays o Maize, Millet, Rice, Foxtail millet, Proso millet, Sorghum bicolor, Panicum, Fagopyrum spp., Panicum miliaceum, Setaria italica, Zizania palustris, Eragrostis tef, Panicum miliaceum, Eleusine coracana; (2) cultivos de leguminosas: Glycine spp. like Glycine max, Soja hispida, Soja max, Vicia spp., Vigna spp., Pisum spp., poroto, Lupinus spp., Vicia, Tamarindus indica, Lens culinaris, Lathyrus spp., Lablab, haba, poroto mungo, poroto rojo, garbanzo; (3) cultivos oleaginosos: Arachis hypogaea, Arachis spp, Sesamum spp., Helianthus spp. como Helianthus annuus, Elaeis like Eiaeis guineensis, Elaeis oleifera, soja, Brassicanapus, Brassica oleracea, Sesamum orientale, Brassica juncea, colza oleaginosa, Camellia oleifera, palma oleaginosa, oliva, ricino, Brassica napus L., canola; (4) cultivos de fibra: Agave sisalana, Gossypium spp. like Gossypium, Gossypium barbadense, Gossypium hirsutum, Hibiscus cannabinus, Agave sisalana, Musa textilis Nee, Linum usitatissimum, Corchorus capsularis L, Boehmeria nivea (L.), Cannabis sativa, Cannabis sativa; (5) cultivos de frutass: Ziziphus spp., Cucumis spp., Passiflora edulis, Vitis spp., Vaccinium spp., Pyrus communis, Prunus spp., Psidium spp., Punica granatum, Malus spp., Citrullus lanatus, Citrus spp., Ficus carica, Fortunella spp., Fragaria spp., Crataegus spp., Dospyros spp., Eugenia unifora, Eriobotrya japonica, Dimocarpus longan, Carica papaya, Cocos spp., Averrhoa carambola, Actinidia spp., Prunus amygdalus,

Musa spp. (musa acuminate), Persea spp. (Persea Americana), Psidium guajava, Mammea Americana, Mangifera indica, Canarium album (Oleaeuropaea), Caricapapaya, Cocos nucifera, Malpighia emarginata, Manilkara zapota, Ananas comosus, Annona spp., Citrus reticulate (Citrus spp.), Artocarpus spp., Litchi chinensis, Ribes spp., Rubus spp., pera, durazno, damasco, ciruela, arándano rojo, limón, kumquat, durian, naranja, frutilla, arándano, melón hami, melón, palmera datilera, nogal, cerezo; (6) cultivos de rizoma: Manihot spp., Ipomoea batatas, Colocasia esculenta, mostaza de tubérculo, Allium cepa (cebolla), eleocharis tuberose (castaña de agua), Cyperus rotundus, Rhizoma doscoreae; (7) cultivos de hortalizas: Spinacia spp., Phaseolus spp., Lactuca sativa, Momordica spp, Petroselinum crispum, Capsicum spp., Solanum spp. (tales como Solanum tuberosum, Solanum integrifolium, Solanum lycopersicum), Lycopersicon spp. (tales como Lycopersicon esculentum, Lycopersicon lycopersicum, Lycopersicon pyriforme), Macrotyloma spp., Kale, Luffa acutangula, lentejas, quimbombó, cebolla, papa, alcaucil, espárragos, brócoli, repollitos de Bruselas, repollo, zanahoria, coliflor, apio, berza, calabaza Benincasa hispida, Asparagus officinalis, Apium graveolens, Amaranthus spp., Allium spp., Abelmoschus spp., Cichorium endivia, Cucurbita spp., Coriandrum sativum, B.carinata, Rapbanus sativus, Brassica spp. (tales como Brassica napus, Brassica rapa ssp.,

canola, colza, colza oleaginosa, colza, mostaza de hoja, repollo, mostaza negra, canola (colza), repollitos de Bruselas, Solanaceae (berenjena), Capsicum annuum (pimiento dulce), pepino, luffa, repollo chino, canola, repollo, calabaza, cebollino chino, loto, raíz de loto, lechuga; (8) cultivos de flores: Tropaeolum minus, Tropaeolum majus, Canna indica, Opuntia spp., Tagetes spp., Cymbidium (orchid), Crinum asiaticum L., Clivia, Hippeastrum rutilum, Rosa rugosa, Rosa Chinensis, Jasminum sambac, Tulipa gesneriana L., Cerasus sp., Pharbitis nil (L.) Choisy, Calendula officinalis L., Nelumbo sp., Bellis perennis L., Dianthus caryophyllus, Petunia hybrida, Tulipa gesneriana L., Lilium brownie, Prunus mume, Narcissus tazetta L., Jasminum nudiflorum Lindl., Primula malacoides, Daphne odora, Camellia japonica, Michelia alba, Magnolia liliiflora, Viburnum macrocephalum, Clivia miniata, Malus spectabilis, Paeonia suffruticosa, Paeonia lactiflora, Syzygium aromaticum, Rhododendron simsii, Rhododendron hybridum, Michelia figo (Lour.) Spreng., Cercis chinensis, Kerria japonica, Weigela florida, Fructus forsythiae, Jasminum mesnyi, Parochetus communis, Cyclamen persicum Mill., Phalaenophsis hybrid, Dendrobium nobile, Hyacinthus orientalis, Iris tectorum Maxim, Zantedeschia aethiopica, Calendula officinalis, Hippeastrum rutilum, Begonia semperflorenshybr, Fuchsia hybrida, Begonia maculataRaddi, Geranium, Epipremnum aureum; (9) cultivos

medicinales: Carthamus tinctorius, Mentha spp., Rheum rhabarbarum, Crocus sativus, Lycium chinense, Polygonatum odoratum, Polygonatum Kingianum, Anemarrhena asphodeloides Bunge, Radix ophiopogonis, Fritillaria cirrhosa, Curcuma aromatica, Amomum villosum Lour., Polygonum multiflorum, Rheum officinale, Glycyrrhiza uralensis Fisch, Astragalus membranaceus, Panax ginseng, Panax notoginseng, Acanthopanax gracilistylus, Angelica sinensis, Ligusticum wallichii, Bupleurum sinenses DC., Datura stramonium Linn., Datura metel L., Mentha haplocalyx, Leonurus sibiricus L., Agastache rugosus, Scutellaria baicalensis, Prunella vulgaris L., Pyrethrum carneum, Ginkgo biloba L., Cinchona ledgeriana, Hevea brasiliensis (salvaje), Medicago sativa Linn, Piper Nigrum L., Radix Isatidis, Atractylodes macrocephala Koidz; (10) cultivos de materia prima: Hevea brasiliensis, Ricinus communis, Vernicia fordii, Morus alba L., Hops Humulus lupulus, Betula, Alnus cremastogyne Burk., Rhus verniciflua stokes; (11) cultivos de pastura: Agropyron spp., Trifolium spp., Miscanthus sinensis, Pennisetum sp., Phalaris arundinacea, Panicum virgatum, prairiegrasses, Indiangrass, Big bluestem grass, Phleum pratense, turf, cyperaceae (Kobresia pygmaea, Carex pediformis, Carex humilis), Medicago sativa Linn, Phleum pratense L., Medicago sativa, Melilotus suavcolen, Astragalus sinicus, Crotalaria juncea, Sesbania cannabina, Azolla imbircata, Eichhornia crassipes, Amorpha fruticosa,

Lupinus micranthus, Trifolium, Astragalus adsurgens pall, Pistia stratiotes linn, Alternanthera philoxeroides, Lolium; (12) cultivos de azúcar: Saccharum spp., Beta vulgaris; (13) cultivos de bebidas: Camellia sinensis, Camellia Sinensis, té, café (Coffea spp.), Theobroma cacao, Humulus lupulus Linn.; (14) cultivos de césped: Ammophila arenaria, Poa spp.(Poa pratensis (pasto azul)), Agrostis spp. (Agrostis matsumurae, Agrostis palustris), Lolium spp. (Lolium), Festuca spp. (Festuca ovina L.), Zoysia spp. (Zoysiajaponica), Cynodon spp. (Cynodon dactylon/bermudagras) , Stenotaphrum secunda tum (Stenotaphrum secundatum), Paspalum spp., Eremochloa ophiuroides (pasto ciempiés), Axonopus spp. (alfombra), Bouteloua dactyloides (pasto búfalo), Bouteloua var. spp. (Bouteloua gracilis), Digitaria sanguinalis, Cyperusrotundus, Kyllingabrevifolia, Cyperusamuricus, Erigeron canadensis, Hydrocotylesibthorpioides, Kummerowiastriata, Euphorbia humifusa, Viola arvensis, Carex rigescens, Carex heterostachya, césped; (15) cultivos de árboles: Pinus spp., Salix spp., Acer spp., Hibiscus spp., Eucalyptus spp., Ginkgo biloba, Bambusa sp., Populus spp., Prosopis spp., Quercus spp., Phoenix spp., Fagus spp., Ceiba pentandra, Cinnamomum spp., Corchorus spp., Phragmites australis, Physalis spp., Desmodium spp., Populus, Hedera helix, Populus tomentosa Carr, Viburnum odoratissinum, Ginkgo biloba L., Quercus, Ailanthus altissima, Schima superba, Ilex pur-purea, Platanus

acerifolia, ligustrum lucidum, Buxus megistophylla Levl., Dahurian larch, Acacia mearnsii, Pinus massoniana, Pinus khasys, Pinus yunnanensis, Pinus finlaysoniana, Pinus tabuliformis, Pinus koraiensis, Juglans nigra, Citrus limon, Platanus acerifolia, Syzygium jambos, Davidia involucrate, Bombax malabarica L., Ceiba pentandra (L.), Bauhinia blakeana, Albizia saman, Albizzia julibrissin, Erythrina corallodendron, Erythrina indica, Magnolia gradiflora, Cycas revolute, Lagerstroemia indica, coniferous, macrophanerophytes, Frutex; (16) cultivos de nueces: Bertholletia excelsea, Castanea spp., Corylus spp., Carya spp., Juglans spp., Pistacia vera, Anacardium occidentale, Macadamia (Macadamia integrifolia), Carya illinoensis Koch, Macadamia, Pistachio, Badam, otras plantas que producen nueces; (17) otros: arabidopsis thaliana, Bra chiaria eruciformis, Cenchrus echinatus, Setaria faberi, eleusine indica, Cadaba farinose, algas, Carex elata, plantas ornamentales, Carissa macrocarpa, Cynara spp., Daucus carota, Doscorea spp., Erianthus sp., Festuca arundinacea, Hemerocallis fulva, Lotus spp., Luzula sylvatica, Medicago sativa, Melilotus spp., Morus nigra, Nicotiana spp., Olea spp., Ornithopus spp., Pastinaca sativa, Sambucus spp., Sinapis sp., Syzygium spp., Tripsacum dactyloides, Triticosecale rimpaui, Viola odorata, y similares.

En una forma de realización específica, la planta se selecciona de arroz, maíz, trigo, soja, girasol, sorgo, colza,

alfalfa, algodón, cebada, mijo, caña de azúcar, tomate, tabaco, mandioca, papa, banana, repollo chino, repollo, pepino, rosa china, *Scindapsus aureus*, sandía, melón, frutilla, arándano, uva, manzana, cítricos, durazno, pera, banana, etc.

Como se usa en la presente, el término "planta" incluye una planta completa y cualquier progenie, célula, tejido o parte de la planta. El término "parte de la planta" incluye cualquier parte de una planta, que incluye, por ejemplo, pero sin limitación: semilla (que incluye semilla madura, embrión inmaduro sin cubierta de semilla y semilla inmadura); corte de plantas; célula de planta; cultivo de células de planta; órgano de planta (por ejemplo, polen, embrión, flor, fruto, yema, hoja, raíz, tallo y explante relacionado). El tejido de planta o el órgano de planta pueden ser semillas, tejido calloso o cualquier otra población de células de plantas organizadas en una unidad estructural o funcional. Algunas células de plantas o cultivos de tejidos pueden regenerar una planta que tiene las características fisiológicas y morfológicas de la planta de la que se deriva la célula o tejido, y pueden regenerar una planta que tiene sustancialmente el mismo genotipo que la planta. Por el contrario, algunas células de plantas no pueden regenerar plantas. Las células regenerables en las células de plantas o cultivos de tejidos pueden ser embriones, protoplastos, células meristemáticas, callos, polen, hojas, anteras, raíces,

puntas de las raíces, estigmas, flores, granos, espigas, mazorcas, cáscaras o tallos.

Las partes de la planta comprenden partes cosechables y partes que se pueden usar para propagar plantas descendientes. Las partes de la planta que se pueden usar para la propagación incluyen, por ejemplo, pero sin limitación: semillas; frutas; esquejes; plántulas; tubérculos y portainjertos. Las partes cosechables de las plantas pueden ser cualquiera de las partes útiles de las plantas, que incluyen, por ejemplo, pero sin limitación: flores; polen; plántulas; tubérculos hojas; tallos; frutas; semillas y raíces.

Las células de planta son las unidades estructurales y fisiológicas de las plantas. Como se usa en la presente, las células de planta incluyen protoplastos y protoplastos con paredes celulares parciales. Las células de planta pueden estar en forma de células individuales aisladas o agregados celulares (por ejemplo, callos sueltos y células cultivadas), y pueden ser parte de unidades de tejido de orden superior (por ejemplo, tejidos de planta, órganos de planta y plantas intactas). Por lo tanto, las células de planta pueden ser protoplastos, células productoras de gametas, o células o colección de células capaces de regenerar una planta completa. Por lo tanto, en las realizaciones de la presente, una semilla que contiene una pluralidad de células de planta y que se puede regenerar en una planta completa se considera como una

“parte de la planta”.

Como se usa en la presente, el término “protoplasto” se refiere a una célula de planta cuya pared celular está completamente o parcialmente eliminada y cuya membrana de bicapa lipídica está expuesta. Normalmente, el protoplasto es una célula de planta aislada sin pared celular, que tiene el potencial de regenerar un cultivo celular o una planta completa.

La “descendencia” de la planta incluye cualquier generación posterior de la planta.

Los términos “tolerancia a herbicidas inhibidores” y “resistencia a herbicidas inhibidores” se pueden usar indistintamente, y ambos se refieren a tolerancia y resistencia a un herbicida inhibidor. “Mejora en la tolerancia al herbicida inhibidor” y “mejora en la resistencia al herbicida inhibidor” significan que la tolerancia o resistencia al herbicida inhibidor se mejora en comparación con una planta que contiene el gen de tipo salvaje.

El término “tipo salvaje” se refiere a una molécula de ácido nucleico o proteína que se puede encontrar en la naturaleza.

En la presente invención, el término “sitio de cultivo” comprende un sitio donde se cultiva la planta de la presente invención, tal como suelo, y también comprende, por ejemplo, semillas de plantas, plántulas de plantas y plantas cultivadas.

El término “cantidad efectiva para el control de malezas” se refiere a una cantidad de herbicida que es suficiente para afectar el crecimiento o desarrollo de la maleza blanco, por ejemplo, para prevenir o inhibir el crecimiento o desarrollo de la maleza blanco o matar la maleza. Ventajosamente, la cantidad efectiva para el control de malezas no afecta significativamente al crecimiento y/o desarrollo de las semillas de plantas, plántulas de plantas o plantas de la presente invención. Los expertos en la técnica pueden determinar dicha cantidad efectiva para el control de malezas mediante experimentos de rutina.

El término “gen” comprende un fragmento de ácido nucleico que expresa una molécula funcional (tal como, pero sin limitación, una proteína específica), incluidas las secuencias reguladoras antes (secuencias no codificadoras 5’) y después (secuencias no codificadoras 3’) a secuencia codificadoras.

La secuencia de ADN que “codifica” un ARN específico es una secuencia de ácido nucleico de ADN que se puede transcribir en ARN. Los polinucleótidos de ADN pueden codificar un ARN (ARNm) que se puede traducir a una proteína, o los polinucleótidos de ADN pueden codificar un ARN que no se puede traducir a una proteína (por ejemplo, ARNt, ARNr o ARN dirigido al ADN; conocido como ARN “no codificadora” o “ARNnc”).

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente en la presente invención y se refieren a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son análogos químicos artificiales de los aminoácidos correspondientes y naturales, así como a polímeros de aminoácidos naturales. Los términos “polipéptido”, “péptido”, “secuencia de aminoácidos” y “proteína” también pueden incluir sus formas de modificación, que incluyen pero sin limitación, glicosilación, enlace lipídico, sulfatación, γ–carboxilación de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP– ribosilación.

El término “fragmento biológicamente activo” se refiere a un fragmento que tiene uno o más residuos de aminoácidos suprimidos del extremo N y/o C–terminal de una proteína mientras que aún conserva su actividad funcional.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan indistintamente y comprenden ADN, ARN o híbridos de estos, que pueden ser de cadena doble o cadena simple.

Los términos “secuencia de nucleótidos” y “secuencia de ácido nucleico” se refieren a la secuencia de bases en el ADN o ARN.

Los expertos en la técnica pueden usar fácilmente métodos conocidos, tales como métodos de evolución dirigida y mutación puntual, para mutar los fragmentos de ADN como se muestra en

la SEQ ID No. 9 a SEQ ID No. 17 de la presente invención. Aquellas secuencias de nucleótidos modificadas artificialmente que tienen al menos un 75% de identidad con cualquiera de las secuencias anteriores de la presente invención y exhiben la misma función se consideran derivados de la secuencia de nucleótidos de la presente invención y equivalentes a las secuencias de la presente invención.

El término "identidad" se refiere a la similitud de secuencia con una secuencia de ácido nucleico natural. La identidad de la secuencia se puede evaluar mediante observación o software de computadora. Usando un software de alineamiento de secuencias de computadora, la identidad entre dos o más secuencias se puede expresar como un porcentaje (%), que se puede usar para evaluar la identidad entre secuencias relacionadas. "Secuencia parcial" significa al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de una secuencia dada.

La condición rigurosa puede ser la siguiente: hibridación a 50 ℃ en una solución mixta de dodecilsulkfato de sodio 7% (SDS), $NaPO_4$ 0,5 M, y EDTA 1 mM, y lavado a 50 °C en 2× SSC y SDS 0,1%; o alternativamente: hibridación a 50 °C en una solución mixta de SDS 7%, $NaPO_4$ 0,5 M y EDTA 1 mM, y lavado a 50 °C en 1× SSC y SDS 0,1%; o alternativamente: hibridación a 50 °C en una solución mixta de SDS 7%, $NaPO_4$ 0,5 M y EDTA 1 mM, y lavado a 50 °C en 0,5× SSC y SDS 0,1%; o alternativamente:

hibridación a 50 °C en una solución mixta de SDS 7%, $NaPO_4$ 0,5 M y EDTA 1 mM, y lavado a 50 °C en 0,1× SSC y SDS 0,1%; o alternativamente: hibridación a 50 °C en una solución mixta de SDS 7%, $NaPO_4$ 0,5 M y EDTA 1 mM, y lavado a 65 ℃ en 0,1× SSC y SDS 0,1%; o alternativamente: hibridación a 65 ℃ en una solución de 6× SSC, 0,5% SDS, y luego el lavado de membrana con 2× SSC, SDS 0,1% y 1× SSC, SDS 0,1% cada vez; o alternativamente: hibridación y lavado de membrana dos veces en una solución de 2× SSC, SDS 0,1% a 68 ℃, 5 min cada vez, y luego hibridación y lavado de membrana dos veces en una solución de 0,5× SSC, SDS 0,1% a 68 °C, 15 min cada vez; o alternativamente: hibridación y lavado de membrana en una solución de 0,1× SSPE (o 0,1× SSC), SDS 0,1% a 65 ℃.

Como se usa en la presente invención, "casete de expresión", "vector de expresión" y "constructo de expresión" se refieren a un vector tal como un vector recombinante adecuado para la expresión de una secuencia de nucleótidos de interés en una planta. El término "expresión" se refiere a la producción de un producto funcional. Por ejemplo, la expresión de una secuencia de nucleótidos se puede referir a la transcripción de la secuencia de nucleótidos (tal como la transcripción para generar ARNm o ARN funcional) y/o la traducción de ARN en una proteína precursora o madura.

El "constructo de expresión" de la presente invención puede ser un fragmento de ácido nucleico lineal, un plásmido

circular, un vector viral o, en algunas realizaciones, puede ser un ARN (tal como ARNm) que se puede traducir.

El "constructo de expresión" de la presente invención puede comprender secuencias reguladoras y secuencias de nucleótidos de interés de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias de nucleótidos de interés de la misma fuente pero dispuestas de una manera diferente de las que ocurren normalmente en la naturaleza.

El "gen de alta expresión" en la presente invención se refiere a un gen cuyo nivel de expresión es más alto que el de un gen común en un tejido específico.

Los términos "vector de expresión recombinante" o "constructo de ADN" se usan indistintamente en la presente y se refieren a una molécula de ADN que comprende un vector y al menos un inserto. Los vectores de expresión recombinantes se producen habitualmente con el propósito de expresión y/o propagación del inserto o para la construcción de otras secuencias de nucleótidos recombinantes. El inserto puede estar unido de forma operativa o no operativa a una secuencia promotora y puede estar unido de forma operativa o no operativa a una secuencia reguladora de ADN.

Los términos "secuencia reguladora" y "elemento regulador" se pueden usar indistintamente y se refieren a una secuencia de nucleótidos que se ubica en la corriente arriba (secuencia no codificadora 5'), media o corriente abajo (secuencia no

codificadora 3') de una secuencia codificadora y afecta la transcripción, procesamiento de ARN, estabilidad o traducción de una secuencia codificadora relacionada. Los elementos reguladores de la expresión de plantas se refieren a secuencias de nucleótidos que pueden controlar la transcripción, el procesamiento del ARN o la estabilidad o traducción de una secuencia de nucleótidos de interés en plantas.

Las secuencias reguladoras pueden incluir, pero sin limitación, promotores, secuencias líder de traducción, intrones y secuencias de reconocimiento de poliA.

El término "promotor" se refiere a un fragmento de ácido nucleico capaz de controlar la transcripción de otro fragmento de ácido nucleico. En algunas realizaciones de la presente invención, el promotor es un promotor capaz de controlar la transcripción génica en células de planta, independientemente de si se deriva de células de planta. El promotor puede ser un promotor constitutivo o un promotor específico de tejido o un promotor regulado por el desarrollo o un promotor inducible.

El término "promotor fuerte" es un término bien conocido y ampliamente utilizado en la técnica. Se conocen en la técnica muchos promotores fuertes o se pueden identificar mediante experimentos de rutina. La actividad del promotor fuerte es mayor que la actividad del promotor unido

operativamente a la molécula de ácido nucleico que se va a sobreexpresar en un organismo de tipo salvaje, por ejemplo, un promotor con una actividad mayor que la del promotor de un gen endógeno. Con preferencia, la actividad del promotor fuerte es mayor en aproximadamente 2%, 5%, 8%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más del 1000% que la actividad del promotor unido operativamente a la molécula de ácido nucleico para sobreexpresarse en el organismo de tipo salvaje. Los expertos en la técnica saben cómo medir la actividad de un promotor y comparar las actividades de diferentes promotores.

El término "promotor constitutivo" se refiere a un promotor que generalmente producirá la expresión génica en la mayoría de los tipos de células en la mayoría de los casos. "Promotor específico de tejido" y "promotor preferido de tejido" se usan indistintamente y se refieren a un promotor que se expresa principalmente pero no en forma necesariamente exclusiva en un tejido u órgano, y también se expresa en una célula o tipo celular específico. "Promotor regulado por el desarrollo" se refiere a un promotor cuya actividad está determinada por un evento del desarrollo. El "promotor inducible" responde a un estímulo endógeno o exógeno (ambiente, hormona, señal química, etc.) para expresar selectivamente una secuencia de ADN operativamente unida.

Como se usa en la presente, el término "operativamente unido" se refiere a una conexión de un elemento regulador (por ejemplo, pero sin limitación, secuencia promotora, secuencia de terminación de la transcripción, etc.) a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia codificadora o marco de lectura abierto) de manera que la transcripción de la secuencia de nucleótidos esté controlada y regulada por el elemento regulador de la transcripción. Las técnicas para unir operativamente la región del elemento regulador a la molécula de ácido nucleico son conocidas en la técnica.

La "introducción" de una molécula de ácido nucleico (tal como un plásmido, fragmento de ácido nucleico lineal, ARN, etc.) o proteína en una planta se refiere a transformar una célula de la planta con el ácido nucleico o la proteína para que el ácido nucleico o la proteína puede funcionar en la célula de planta. El término "transformación" usado en la presente invención comprende transformación estable y transformación transitoria.

El término "transformación estable" se refiere a que la introducción de una secuencia de nucleótidos exógena en el genoma de una planta produce una herencia estable del gen exógeno. Una vez transformada de manera estable, la secuencia de ácido nucleico exógeno se integra de manera estable en el genoma de la planta y cualquier generación sucesiva de la misma.

El término “transformación transitoria” se refiere a que la introducción de una molécula de ácido nucleico o proteína en una célula de planta para realizar la función no produce una herencia estable del gen extraño. En la transformación transitoria, la secuencia de ácido nucleico exógeno no se integra en el genoma de la planta.

El cambio de la expresión de genes endógenos en organismos incluye dos aspectos: características de intensidad y espacio-temporales. El cambio de intensidad incluye el aumento (knock-up), la disminución (knock-down) y/o eliminación de la expresión del gen (knock-out); la especificidad espacio-temporal incluye la especificidad temporal (etapa de crecimiento y desarrollo) y la especificidad espacial (tejido), así como la capacidad de inducción. Además, incluye el cambio del direccionamiento de una proteína, por ejemplo, el cambio de la característica de localización citoplásmica de una proteína en una característica de localización de cloroplasto o localización nuclear.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente también se puede usar en la práctica

o ensayo de la presente invención, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en esta descripción se incorporan en la presente como referencia como si cada publicación o patente individual estuviera indicada exacta e individualmente para ser incorporada como referencia, y se incorpora en la presente como referencia para divulgar y describir métodos y/o materiales relacionados con las publicaciones citadas. La mención de cualquier publicación que haya sido publicada antes de la fecha de presentación no se debe interpretar como una admisión de que la presente invención no sea elegible para preceder a la publicación de la invención existente. Además, la fecha de publicación proporcionada puede ser diferente de la fecha de publicación real, lo que puede requerir una verificación independiente.

A menos que se indique o implique específicamente, como se usa en la presente, los términos “un”, “una” y “el/la” significan “al menos uno”. Todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones mencionadas o citadas en la presente se incorporan aquí como referencia en su totalidad, con el mismo grado de citación que si se citaran individualmente.

La presente invención tiene los siguientes efectos técnicos ventajosos:

La presente invención usa de manera integral la información de los siguientes dos campos profesionales

diferentes para desarrollar un método para crear directamente nuevos genes en organismos, cambiar por completo el uso convencional de las herramientas de edición de genes originales (es decir, konck out de genes), realizar un nuevo uso de ellas para crear nuevos genes, en particular, realizar un método de edición para knocking up genes endógenos mediante el uso de tecnología de edición de genes para aumentar la expresión de genes blanco. La primera es la información en el campo de la edición de genes, es decir, cuando dos o más sitios blanco diferentes y Cas9 se dirigen simultáneamente al genoma u organismo, pueden ocurrir diferentes situaciones como tales como supresión, inversión, duplicación o inversión-duplicación. La segunda es la información en el campo de la genómica, es decir, la información sobre la ubicación y distancia de diferentes genes en el genoma, y ubicaciones, direcciones y funciones específicas de diferentes elementos (promotor, 5'UTR, región codificadora (CDS), diferentes regiones de dominio, terminador, etc.) en genes, y especificidad de expresión de diferentes genes, etc. Mediante la combinación de la información en estos dos campos diferentes, se inducen rupturas de ADN en sitios específicos de dos o más genes diferentes o en dos o más sitios específicos dentro de un gen único (los sitios específicos se pueden determinar en el campo de la genómica), se puede formar una nueva combinación de diferentes elementos genéticos o

dominios funcionales mediante supresión, inversión, duplicación e inversión-duplicación o intercambio de brazos cromosómicos, etc. (las situaciones específicas se pueden proporcionar en el campo de la edición de genes), de este modo se crea específicamente un nuevo gen en el organismo.

Los nuevos genes creados por la presente invención están formados por la fusión o recombinación de diferentes elementos de dos o más genes bajo la acción del mecanismo de reparación espontánea del ADN en el organismo para cambiar la intensidad de expresión, especificidad espacio-temporal, dominios funcionales especiales y similares del gen original sin un transgén exógeno o elementos génicos sintéticos. Debido a que el nuevo gen tiene la fusión de dos o más elementos genéticos diferentes, esto amplía enormemente el alcance de la mutación genética y producirá funciones más abundantes y diversas, por lo que tiene una amplia gama de perspectivas de aplicación. Al mismo tiempo, estos nuevos genes no están unidos a los vectores de edición de genes, por lo que los elementos del vector se pueden eliminar mediante la segregación genética y, por lo tanto, se produce materiales biológicos no transgénicos que contienen los nuevos genes para el mejoramiento genético de animales y plantas. Alternativamente, la edición transitoria no integrada se puede realizar mediante la administración de ARNm o complejo proteico de ácido ribonucleico (RNP) para crear materiales biológicos no

modificados genéticamente que contienen los nuevos genes. Este proceso no es transgénico y los materiales editados resultantes tampoco contendrían transgén. En teoría y en efecto, estos nuevos genes también se pueden obtener mediante técnicas de mejoramiento genético tradicionales (tales como radiación o mutagénesis química). La diferencia es que la detección con técnicas tradicionales requiere la creación de bibliotecas que contengan una gran cantidad de mutantes aleatorias y, por lo tanto, la detección de nuevos genes funcionales requiere mucho tiempo y es costosa. Si bien en la presente invención, se pueden crear nuevos genes funcionales mediante análisis bioinformático combinado con tecnología de edición de genes, la duración del mejoramiento genético se puede acortar en gran medida. El método de la presente invención no está obligado a las regulaciones actuales sobre organismos de edición de genes en muchos países.

Además, la tecnología de creación de nuevos genes de la presente invención se puede usar para cambiar muchos rasgos en organismos, incluido el crecimiento, desarrollo, resistencia, rendimiento, etc., y tiene un gran valor de aplicación. Los nuevos genes creados pueden tener nuevos elementos reguladores (tales como promotores), que cambiarán la intensidad de expresión y/o las características espacio-temporales de los genes originales, o tendrán nuevas secuencias de aminoácidos y por tanto tendrán nuevas funciones.

Tomando los cultivos como ejemplo, el cambio de la expresión de genes específicos puede aumentar la resistencia de los cultivos a organismos nocivos tales como plagas y malezas y estreses abióticos tales como sequía, anegamiento y salinidad, y también puede aumentar el rendimiento y mejorar la calidad. Tomando el pescado como ejemplo, el cambio de las características de expresión de la hormona del crecimiento en los peces puede cambiar significativamente su velocidad de crecimiento y desarrollo.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un diagrama esquemático de creación de un nuevo gen de HPPD en el arroz.

La Figura 2 muestra un diagrama esquemático de creación de un nuevo gen EPSPS en el arroz.

La Figura 3 muestra un diagrama esquemático de creación de un nuevo gen de PPOX en *Arabidopsis thaliana*.

La Figura 4 muestra un diagrama esquemático de creación de un nuevo gen de PPOX en el arroz.

La Figura 5 muestra los resultados de la secuenciación para el esquema de duplicación HPPD analizado con protoplasto de arroz

La Figura 6 muestra el mapa del vector de transformación de *Agrobacterium* pQY2091 para arroz.

La Figura 7 7 muestra los resultados de la electroforesis

de los productos de PCR para la detección de nuevos fragmentos de genes en callos de arroz resistentes a higromicina transformados con pQY2091. La flecha indica la banda de PCR del nuevo gen creado por la fusión del promotor del gen UBI2 con la región codificadora del HPPD. Los números son los números de las diferentes muestras de callos. M representa el marcador de ADN y los tamaños de banda son 100 pb, 250 pb, 500 pb, 750 pb, 1000 pb, 2000 pb, 2500 pb, 5000 pb, 7500 pb en orden.

La Figura 8 muestra los resultados de la electroforesis de los productos de PCR para la detección de nuevos fragmentos de genes en plántulas de arroz T0 transformadas con pQY2091. La flecha indica la banda de PCR del nuevo gen creado por la fusión del promotor del gen UBI2 con la región codificadora del HPPD. Los números son los números de serie de las diferentes plántulas T0. M representa el marcador de ADN, y los tamaños de banda son secuencialmente 100 pb, 250 pb, 500 pb, 750 pb, 1000 pb, 2000 pb, 2500 pb, 5000 pb, 7500 pb.

La Figura 9 muestra los resultados de la prueba para la resistencia a Shuangzuocaotong de la generación T0 QY2091 de la cepa duplicadora del gen HPPD. En la misma maceta, la Jinjing 818 de tipo salvaje está a la izquierda y la cepa duplicadora HPPD está a la derecha.

La Figura 10 muestra los niveles de expresión relativa de los genes HPPD y UBI2 en la generación T0 QY2091 de la cepa

duplicadora del gen HPPD. 818CK1 y 818CK3 representan dos plantas de control del Jinjing 818 de tipo salvaje; 13M y 20M representan las muestras de hojas de macollos primarios de las plantas T0 QY2091-13 y QY2091-20; 13L y 20L representan las muestras de hojas secundarias de macollos de las plantas QY2091-13 y QY2091-20 T0 utilizadas en la prueba de resistencia a herbicidas.

La Figura 11 muestra un diagrama esquemático de los posibles genotipos de la generación T1 QY2091 y los sitios de unión de los cebadores de detección molecular.

La Figura 12 muestra la comparación de los resultados de secuenciación que detectan la duplicación de HPPD y las secuencias duplicadas predichas para QY2091-13 y QY2091-20.

La Figura 13 muestra los resultados de la prueba de resistencia a herbicidas para la generación T1 de la cepa duplicadora QY2091 HPPD en la etapa de plántula.

La Figura 14 muestra un diagrama esquemático de los tipos de posibles eventos de edición de la inversión del fragmento cromosómico del gen PPO1 de arroz y los sitios de unión de los cebadores de detección molecular.

La Figura 15 muestra los resultados de secuenciación de la detección de inversión EPSPS.

La Figura 16 muestra el mapa del vector de transformación de arroz *Agrobacterium* pQY2234.

La Figura 17 muestra los resultados de la electroforesis

de los productos de PCR para la detección de nuevos fragmentos de genes de callos de arroz resistentes a higromicina transformados con pQY2234. La flecha indica la banda de PCR del nuevo gen creado por la fusión del promotor del gen CP12 con la región codificadora del PPO1. Los números son los números de serie de diferentes muestras de callos. M representa el marcador de ADN, y los tamaños de banda son secuencialmente 100 pb, 250 pb, 500 pb, 750 pb, 1000 pb, 2000 pb, 2500 pb, 5 pb, 7500 pb.

La Figura 18 muestra los resultados de la prueba de resistencia de la cepa 2081 de inversión del gen PPO1 de la generación T0 QY2234. Con la misma dosis de tratamiento, la maceta de la izquierda es el control Huaidao N.° 5 de tipo salvaje, y la derecha es la cepa de inversión PPO1.

La Figura 19 muestra los niveles de expresión relativa de los genes PPO1 y CP12 en la cepa de inversión de PPO1 de generación T0 QY2234. H5CK1 y H5CK2 representan dos plantas de control Huaidao No. 5 de tipo salvaje; 252M, 304M y 329M representan las muestras de hojas de macollos primarios de las plantas T0 QY2234-252, QY2234-304 y QY2234-329; 252L, 304L y 329L representan muestras de hojas secundarias de macollos.

La Figura 20 muestra la comparación del resultado de secuenciación de la inversión de PPO1 con la secuencia de inversión predicha en el fondo de Huaidao 5.

La Figura 21 muestra la comparación del resultado de

secuenciación de la inversión de PPO1 con la secuencia de inversión predicha en el fondo de Jinjing 818.

La Figura 22 muestra los resultados de la prueba de resistencia a herbicidas para la generación T1 de la cepa de inversión QY2234 PPO1 en la etapa de plántula.

Modelos específicos para llevar a cabo la invención

La presente invención se describe adicionalmente junto con los ejemplos siguientes. La siguiente descripción es solo ilustrativa y el alcance de protección de la presente invención no debe limitarse a esto.

Ejemplo 1: Un método de edición para knocking up la expresión del gen de HPPD endógeno mediante la inducción de la duplicación del fragmento cromosómico en planta – prueba de protoplastos de arroz

El HPPD era una enzima clave en la vía de la síntesis de clorofila en las plantas, y la inhibición de la actividad del HPPD finalmente puede llevar a la clorosis albina y la muerte de las plantas. Muchos herbicidas, tales como mesotriona y topramezona, fueron inhibidores con la HPPD como proteína blanco y, por lo tanto, el aumento del nivel de expresión del gen HPPD endógeno en las plantas podría mejorar la tolerancia de las plantas a estos herbicidas. El gen HPPD de arroz (como se muestra en SEQ ID NO: 6, en el que 1–1067 pb es el promotor y el resto es la región de expresión) se localiza en el cromosoma 2 del arroz. Mediante análisis bioinformático, se

encontró que la Ubiquitina2 del arroz (en adelante denominada como UBI2) (como se muestra en SEQ ID NO: 5, en el que 1–2107 pb fue el promotor, y el resto fue la región de expresión) se ubica aproximadamente 338 kb corriente abajo del gen HPPD, y el gen de UBI2 y el gen de HPPD fueron en la misma dirección en el cromosoma. De acuerdo con los datos del perfil de expresión génica del arroz proporcionados por el Proyecto Internacional de Secuenciación del Genoma del Arroz (http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml), la intensidad de expresión del gen de UBI2 en las hojas de arroz fue de 3 a 10 veces mayor que el del gen de HPPD, y el promotor del gen UBI2 era un promotor fuerte expresado constitutivamente.

Como se muestra en la Figura 1, el Esquema 1 muestra que las rupturas de cadena doble se generaron simultáneamente en los sitios entre los promotores y la región CDS de los genes de HPPD y UBI2 respectivamente, el evento de duplicar la región entre las dos rupturas se obtuvo después de la detección e identificación, y se podría formar un nuevo gen mediante la fusión del promotor de UBI2 y la región codificadora de HPPD. Además, de acuerdo con el Esquema 2, como se muestra en la Figura 1, un nuevo gen en el que el promotor de UBI2 y la región codificadora de HPPD se fusionaron también se podría formar mediante dos inversiones consecutivas. Primero, los esquemas que se muestran en la

Figura 1 se probaron en el sistema de protoplasto de arroz de la siguiente manera:

1. En cebador lugar, las secuencias de ADN genómico de los genes de HPPD y UBI2 de arroz se introdujeron en la herramienta en línea CRISPOR (http://crispor.tefor.net/) para buscar sitios blanco de edición disponibles. Después de la puntuación en línea, se seleccionaron para las pruebas los siguientes sitios blanco entre los promotores y las regiones CDS de los genes de HPPD y UBI2:

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO
OsHPPD-ARN guía 1	GTGCTGGTTGCCTTGGCTGC	27
OsHPPD-ARN guía 2	CACAAATTCACCAGCAGCCA	28
OsHPPD-ARN guía 3	TAAGAACTAGCACAAGATTA	29
OsHPPD-ARN guía 4	GAAATAATCACCAAACAGAT	30

El ARN guía 1 y el ARN guía 2 ubicados entre el promotor y la región CDS del gen de HPPD, cerca del codón de inicio de la proteína HPPD, y el ARN guía 3 y el ARN guía 4 ubicados entre el promotor y la región CDS del gen UBI2, cerca del

codón de inicio de la proteína UBI2.

El vector pHUE411 (https://www.addgene.org/62203/) se utiliza como esqueleto, y los siguientes cebadores se diseñaron para que los sitios blanco mencionados anteriormente realicen la construcción del vector como se describe en "Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ. A CRISPR/Cas9 Toolkit for multiplex genome editing in plants. BMC Plant Biol. 2014 Nov 29; 14(1): 327",

Cebador N.°	Secuencia de ADN (5' ao 3')	SEQ ID NO
OsHPPD-sgRNA1-F	ATATGGTCTCGGGCGGTGCTGGTTGCCTTGG CTGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	31
OsHPPD-sgRNA2-F	ATATGGTCTCGGGCGCACAAATTCACCAGCA GCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	32
OsHPPD-sgRNA3-R	TATTGGTCTCTAAACTAATCTTGTGCTAGTT CTTAGCTTCTTGGTGCCGCGC	33
OsHPPD-sgRNA4-R	TATTGGTCTCTAAACATCTGTTTGGTGATTA TTTCGCTTCTTGGTGCCGCGC	34

Se construyeron vectores de edición de genes para la siguiente combinación de doble blanco siguiendo el método proporcionado en la bibliografía mencionada anteriormente. Específicamente, con el plásmido pCBC-MT1T2 (https://www.addgene.org/50593/) como molde, se amplificaron los fragmentos de doble blanco sgRNA1 + 3, sgRNA1 + 4, sgRNA2

+ 3 y sgRNA2 + 4 respectivamente para construir los casetes de expresión de ARNsg. El esqueleto del vector de pHUE411 se digirió con BsaI y se recuperó del gel, y el fragmento blanco se digirió y se usó directamente para la reacción de ligación. Se usó ADN ligasa T4 para ligar el esqueleto del vector y el fragmento blanco, y el producto de ligación se transformó en células competentes Trans5α. Se eligieron y secuenciaron diferentes monoclones. Se utilizó el mini kit de extracción de plásmidos de alta pureza Sparkjade para extraer plásmidos de los clones con secuencias correctas, de este modo se obtiene los plásmidos recombinantes, denominados respectivamente pQY002065, pQY002066, pQY002067 y pQY002068, de la siguiente manera:

Combinación pQY002065 pHUE411-HPPD-sgRNA1+3 de OsHPPD-ARN guía 1, ARN guía 3

Combinación pQY002066 pHUE411-HPPD-sgRNA1+4 de OsHPPD-ARN guía 1, ARN guía4

Combinación pQY002067 pHUE411-HPPD-sgRNA2+3 de OsHPPD-ARN guía 2, ARN guía 3

Combinación pQY002068 pHUE411-HPPD-sgRNA2+4 de OsHPPD-ARN guía 2, ARN guía4

2. Se prepararon plásmidos de alta pureza y alta concentración para los vectores pQY002065-002068 mencionados anteriormente de la siguiente manera:

Los plásmidos se extrajeron con el kit de extracción de

plásmidos de medio Promega (Midipreps DNA Purification System, Promega, A7640) de acuerdo con las instrucciones. Las etapas específicas fueron:

(1) Agregar 5 ml de *Escherichia coli* a 300 ml de medio líquido LB que contiene kanamicina y agitar a 200 rpm, 37 °C durante 12 a 16 horas;

(2) Colocar la solución de bacterias anterior en un tubo de centrífuga de 500 ml y centrifugar a 5,000 g durante 10 minutos, descartar el sobrenadante;

(3) Agregar 3 ml de solución de resuspensión celular (CRS) para resuspender el sedimento celular y agitar con vórtex para mezclar bien;

(4) Agregar 3 ml de solución de lisis celular (CLS) y mezclar lentamente durante no más de 5 minutos;

(5) Agregar 3 ml de solución de Neutralización y mezclar bien volcando hasta que el color se vuelva claro y transparente;

(6) Centrifugar a 14,000 g durante 15 minutos y centrifugar adicionalmente durante 15 minutos si el precipitado no se formó compacto;

(7) Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de centrífuga de 50 ml, evitando aspirar precipitado blanco en el tubo de centrífuga;

(8) Agregar 10 ml de resina de purificación de ADN (Resina de purificación, agitar vigorosamente antes de usar) y mezclar

bien;

(9) Verter la mezcla de resina/ADN en una columna de filtro y tratar mediante el método de presión negativa de bomba de vacío (0,05 MPa);

(10) Agregar 15 ml de solución de lavado de columna (CWS) a la columna de filtro y someter al vacío.

(11) Agregar 15 ml de CWS y repetir el vacío una vez; extender el vacío durante 30 s después de que toda la solución pasara a través de la columna de filtrado;

(12) Cortar la columna de filtro, transferir a un tubo de centrífuga de 1,5 ml, centrifugar a 12,000 g durante 2 minutos, eliminar el líquido residual y transferir la columna de filtro a un nuevo tubo de centrífuga de 1,5 ml;

(13) Agregar 200 µL de agua esterilizada precalentada a 70 °C y mantener el reposo durante 2 minutos;

(14) Centrifugar a 12,000 g durante 2 minutos para eluir el ADN plasmídico; y la concentración fue generalmente de aproximadamente 1 µg/µL.

3. Preparar protoplastos de arroz y realizar la transformación mediada por PEG:

Primero, se prepararon plántulas de arroz para protoplastos, que es de la variedad Nipponbare. Las semillas fueron proporcionadas por el Department of the School of Plant Protection, China Agricultural University y se expandieron en forma interna. Las semillas de arroz se descascaron primero

y las semillas descascaradas se enjuagaron con etanol 75% durante 1 minuto, se trataron con hipoclorito de sodio 5% (v/v) durante 20 minutos, luego se lavaron con agua estéril durante más de 5 veces. Después de secarlos con secador en una mesa ultra limpia, se colocaron en una botella de cultivo de tejidos que contiene 1/2 medio MS, 20 semillas por cada botella. Los protoplastos se prepararon mediante la incubación a 26 °C durante aproximadamente 10 días con 12 horas de luz.

Los métodos para la preparación de protoplastos de arroz y la transformación mediada por PEG se llevaron a cabo de acuerdo con "Lin et al., 2018 Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. Plant Biotechnology

(1) se seleccionó la vaina de la hoja de las plántulas, se cortó en trozos de aproximadamente 1 mm con una cuchilla de afeitar Geely afilada y se colocó en manitol 0,6 M y medio de cultivo MES (formulación: manitol 0,6 M, MES 0,4 M, pH 5,7) para uso posterior. Todos los materiales se cortaron y se transfirieron a 20 ml de solución de hidrólisis enzimática (formulación: Celulasa R10/RS 1,5% (YaKult Honsha), Mecerozima R10 0,5% (YaKult Honsha), manitol 0,5 M, KCl 20 mM, MES 20 mM, pH 5,7, $CaCl_2$ 10 mM, BSA 0,1%, β-mercaptoetanol 5 mM), envuelto en papel de aluminio y colocado en un agitador

a 28 °C, hidrolizado enzimáticamente a 50 rpm en la oscuridad durante aproximadamente 4 horas, y la velocidad se incrementó a 100 rpm en el último 2 minutos;

(2) después de la lisis enzimática, se agregó un volumen igual de solución W5 (formulación: NaCl 154 mM, $CaCl_2$ 125 mM, KCl 5 mM, MES 15 mM), se agitó horizontalmente durante 10 segundos para liberar los protoplastos. Las células después de la lisis enzimática se filtraron a través de un tamiz de malla 300 y se centrifugaron a 150 g durante 5 minutos para recoger los protoplastos;

(3) las células se enjuagaron dos veces con la solución W5 y los protoplastos se recogieron mediante centrifugación a 150 g durante 5 minutos;

(4) los protoplastos se resuspendieron con una cantidad apropiada de solución de MMG (formulación: $MgCl_2$ 3,05 g/l, MES 1 g/l, manitol 91,2 g/l) y la concentración de los protoplastos fue de aproximadamente 2 x 10^6 células/ml.

La transformación de protoplastos se llevó a cabo:

(1) a 200 µl de los protoplastos resuspendidos de MMG mencionados anteriormente, se agregó ADN plasmídico sin endotoxina de alta calidad (10–20 µg) y se golpeó suavemente para mezclar bien;

(2) se agregó un volumen igual de solución de PEG 40% (p/v) (formulación: PEG 40% (p/v), manitol 0,5 M, $CaCl_2$ 100 mM), se golpeó suavemente para mezclar bien y se mantuvo en reposo a

28 °C en la oscuridad durante 15 minutos;

(3) después de la inducción de la transformación, se añadieron lentamente 1,5 ml de solución W5 y se golpearon para mezclar bien las células. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 150 g durante 3 minutos. Esta etapa se repitió una vez;

(4) Se añadieron 1,5 ml de solución W5 para resuspender las células, se colocaron en una incubadora a 28 °C y se cultivaron en la oscuridad durante 12–16 horas. Para extraer ADN genómico de protoplastos, el cultivo se debe realizar durante 48–60 horas.

4. Direccionamiento genómico y detección del nuevo gen:

(1) En cebador lugar, los ADN de protoplastos se extrajeron mediante el método CTAB con algunas modificaciones. El método específico fue el siguiente: se centrifugaron los protoplastos, luego se descartó el sobrenadante. Se agregaron 500 µL de solución de extracción de ADN (formulación: CTAB 20 g/L, NaCl 81,82 g/L, Tris–HCl 100 mM (pH 8,0), EDTA 20 mM, β–mercaptoetanol 0,2%), se agitó para mezclar bien y se incubó en un baño de agua a 65 °C durante 1 hora; cuando la muestra incubada se enfrió, se agregaron 500 µL de cloroformo y se mezclaron por inversión y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos; se transfirieron 400 µl del sobrenadante a un nuevo tubo de centrífuga de 1,5 ml, se agregó 1 ml de etanol 70% (v/v) y la mezcla se mantuvo a –20 °C para

precipitar durante 20 minutos; la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos para precipitar el ADN; después de que el precipitado se secó al aire, se agregaron 50 µL de agua ultrapura y se almacenaron a −20 °C para su uso posterior.

(2) Los cebadores de detección de la siguiente tabla se utilizaron para amplificar los fragmentos que contienen los sitios blanco en ambos lados o los fragmentos predichos resultantes de la fusión del promotor UBI2 y la región codificadora de HPPD. Las longitudes de los productos de la PCR estaban entre 300–1000 pb, en los que se usó la combinación cebador8–F + cebador6–R para detectar el fragmento de fusión en la unión media después de duplicar el fragmento cromosómico, y se esperaba que la longitud del producto sea de 630 pb.

Cebador	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO
OsHPPD cebador duplicado1–F	CACTACCATCCATCCATTTGC	35
OsHPPD cebador duplicado6–R	GAGTTCCCCGTGGAGAGGT	36
OsHPPD cebador duplicado3–F	TCCATTACTACTCTCCCCGATT	37

OsHPPD cebador duplicado7-R	GTGTGGGGGAGTGGATGAC	38
OsHPPD cebador duplicado5-F	TGTAGCTTGTGCGTTTCGAT	39
OsHPPD cebador duplicado2-R	GGGATGCCCTCTTTGTCC	40
OsHPPD cebador duplicado8-F	TCTGTGTGAAGATTATTGCCACT	41
OsHPPD cebador duplicado4-R	GGGATGCCCTCCTTATCTTG	42

El sistema de reacción de PCR fue el siguiente:

Componentes	Volumen
2 × I5 solución buffer	5 µL
Cebador directo (10 µM)	2 µL
Cebador inverso (10 µM)	2 µL
ADN molde	2 µL
Agua ultrapura	Añadido a 50 µL

(3) Se realizó una reacción de PCR en las siguientes condiciones generales de reacción:

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	98 °C	30 s
Amplificación para 30-35 cicles	98 °C	15 s
	58 °C	15 s
	72 °C	30 s
Extensión final	72 °C	3 min

Terminado	16 °C	5 min

(4) Los productos de la reacción de PCR se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Los resultados mostraron que la banda positiva de 630 pb para el fragmento de fusión predicho del promotor UBI2 y la región codificadora de HPPD se puede detectar en las muestras transformadas pQY002066 y pQY002068.

5. Las muestras positivas del fragmento de fusión del promotor UBI2 y la región codificadora de HPPD se secuenciaron para verificación, y los cebadores OsHPPDcebadores duplicados8-F y OsHPPDcebadores duplicados6-R se usaron para secuenciar desde ambos extremos. Como se muestra en la Figura 5, el promotor del gen UBI2 y la región de expresión del gen HPPD se pueden ligar directamente, y se puede detectar el evento de edición de la fusión del promotor del gen UBI2 del arroz y la región de expresión del gen HPPD en el ADN genómico del protoplasto del arroz transformado con los plásmidos pQY002066 y pQY002068, lo que indica que el esquema de duplicación de los fragmentos cromosómicos para formar un nuevo gen HPPD era factible, se puede crear un nuevo gen HPPD cuya expresión fuera dirigida por un promotor fuerte, y esto se definió como un evento de duplicación de HPPD. El resultado de la secuenciación del protoplasto transformado con el vector pQY002066 para analizar el evento de duplicación de HPPD se mostró en la SEQ ID NO: 9; y el resultado de la secuenciación

del protoplasto transformado con vector pQY002068 para probar el evento de duplicación de HPPD se mostró en la SEQ ID NO: 10.

Ejemplo 2: Creación de arroz resistente a herbicidas con expresión knock-up del gen de HPPD endógeno mediante la duplicación del fragmento cromosómico a través de la transformación mediada por *Agrobacterium*n

1. Construcción del vector de edición knock-up: Sobre la base de los resultados de la prueba de protoplastos en el Ejemplo 1, se seleccionó la combinación de doble blanco OsHPPD-ARN guía 1: 5'GTGCTGGTTGCCTTGGCTGC3 (SEQ ID NO: 27) 'y OsHPPD-ARN guía 4: 5'GAAATAATCACCAAACAGAT3' (SEQ ID NO: 30) con una alta eficiencia de edición. El vector de transformación de *Agrobacterium* pQY2091 se construyó de acuerdo con el Ejemplo 1. Se usó pHUE411 como el esqueleto del vector y se sometió a optimización de codones de arroz. El mapa del vector se mostró en la FIG. 6.

2. Transformación con *Agrobacterium* del callo de arroz:

1) Transformación con *Agrobacterium*: Se agregó 1 µg del plásmido pQY2091 de vector de edición de knock-up de arroz a 10 µl de células competentes de choque térmico *Agrobacterium* EHA105 (Angyu Biotech, número de catálogo G6040), se colocó en hielo durante 5 minutos, se sumergió en nitrógeno líquido para congelación rápida durante 5 minutos, luego se retiró y se calentó a 37 °C durante 5 minutos, y finalmente se colocó

en hielo durante 5 minutos. Se añadieron 500 µl de medio líquido YEB (formulación: extracto de levadura 1 g/L, peptona 5 g/L, extracto de carne de vacuno 5 g/L, sacarosa 5 g/L, sulfato de magnesio 0,5 g/L). La mezcla se colocó en un agitador y se incubó a 28 °C, 200 rpm durante 2 ~ 3 horas; las bacterias se recolectaron por centrifugación a 3500 rpm durante 30 segundos, las bacterias recolectadas se extendieron en placa YEB (kanamicina 50 mg/L + rifampicina 25 mg/L) y se incubaron durante 2 días en una incubadora a 28 °C; las colonias únicas se recogieron y se colocaron en un medio de cultivo líquido, y las bacterias se almacenaron a −80 °C.

2) Cultivo de *Agrobacterium*: Se recogieron las colonias únicas de *Agrobacterium* transformado en la placa YEB, se agregaron a 20 ml de medio líquido YEB (kanamicina 50 mg/L + rifampicina 25 mg/L) y se cultivaron mientras se agita a 28 °C hasta que la OD600 fue 0,5, luego las células bacterianas se recolectaron por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos, se agregaron 20–40 ml de medio líquido AAM (Solarbio, número de lote LA8580) para resuspender las células bacterianas para alcanzar una OD600 de 0,2–0,3, y luego se agregó acetosiringona (Solarbio, número de artículo A8110) para alcanzar la concentración final de 200 µM para infectar el callo.

3) Inducción del callo de arroz: Las variedades del arroz

receptor de la transformación fueron Huaidao 5 y Jinjing 818, compradas en el mercado de semillas de Huai'an, Jiangsu, y expandidas internamente. Se descascarillaron 800–2000 semillas de arroz limpias, luego se lavaron con agua esterilizada hasta que el agua estuvo clara después del lavado. Luego se desinfectaron las semillas con alcohol 70% durante 30 segundos, luego se agregaron 30 ml de hipoclorito de sodio 5% y la mezcla se colocó en un agitador horizontal y se agitó a 50 rpm durante 20 minutos, luego se lavó con agua esterilizada por 5 veces. Las semillas se colocaron sobre papel absorbente estéril, se secaron al aire para eliminar el agua en la superficie de las semillas, se inocularon en un medio de inducción y se cultivaron a 28 °C para obtener callos.

La formulación del medio de inducción: 4,1 g/L de polvo de N6 + 0,3 g/L de caseína hidrolizada + 2,878 g/L de prolina + 2 mg/L de 2,4–D + sacarosa al 3% + 0,1 g/L de inositol + 0,5 g de glutamina + 0,45% de fitagel, pH 5,8.

4) Infección del callo de arroz con *Agrobacterium*: Se seleccionó el callo de Huaidao No. 5 o Jinjing 818 subcultivado durante 10 días con un diámetro de 3 mm y se recogió en un tubo de centrífuga de 50 ml; la solución de resuspensión de AAM *Agrobacterium* con la OD600 ajustada a 0,2–0,3 se vertió en el tubo de centrífuga que contiene el callo, se colocó en un agitador a 28 °C a una velocidad de 200 rpm para realizar la infección durante 20 minutos; cuando se

completó la infección, se descartó la solución bacteriana, se colocó el callo en papel de filtro estéril y se secó al aire durante aproximadamente 20 minutos, luego se colocó en una placa que contiene medio de co-cultivo para realizar el co-cultivo, sobre el cual la placa se cubrió con un papel de filtro estéril sumergido con medio líquido AAM que contiene acetosiringona 100 µM; después de 3 días de co-cultivo, se eliminó el *Agrobacterium* mediante lavado (primero lavado con agua estéril 5 veces, luego lavado con antibiótico cefalosporina 500 mg/L durante 20 minutos) y se cultivó selectivamente en medio de selección higromicina 50 mg/L.

La formulación del medio de cocultivo: 4,1 g/L de polvo N6 + 0,3 g/L de caseína hidrolizada + 0,5 g/L de prolina + 2 mg/L de 2,4-D + 200 µM de AS + 10 g/L de glucosa + sacarosa 3% + fitagel 0,45%, pH 5,5.

3. Identificación molecular y diferenciación en plántulas del callo resistente a higromicina:

A diferencia del proceso de selección de la transformación de arroz convencional, con cebadores específicos de los fragmentos de fusión generados después de la duplicación del fragmento cromosómico, se pudo identificar molecularmente el callo resistente a la higromicina durante la etapa de selección y cultivo del callo en la presente invención, se pudieron determinar eventos de duplicación positivos, y se seleccionaron callos que contienen nuevos genes resultantes

de la fusión de diferentes elementos genéticos para el cultivo de diferenciación y se indujeron a que emergieran plántulas. Las etapas específicas fueron las siguientes:

1) El callo cocultivado se transfirió al medio de selección para la primera ronda de selección (2 semanas). La formulación del medio de selección es: 4,1 g/L de polvo N6 + 0,3 g/L de caseína hidrolizada + 2,878 g/L de prolina + 2 mg/L de 2,4-D + sacarosa 3% + 0,5 g de glutamina + 30 mg/L de higromicina (HYG) + 500 mg/L de cefalosporina (cef) + 0,1 g/L de inositol + fitagel 0,45%, pH 5,8.

2) Después de completar la primera ronda de selección, el callo recién cultivado se transfirió a un nuevo medio de selección para la segunda ronda de selección (2 semanas). En esta etapa, el callo recién crecido con un diámetro mayor de 3 mm se sujetó con pinzas para tomar una pequeña cantidad de muestra, el ADN del mismo se extrajo con el método CTAB descrito en el Ejemplo 1 para la primera ronda de identificación molecular. En este ejemplo, se seleccionó el par de cebadores OsHPPDcebador duplicado8-F (8F) y OsHPPDcebador duplicado6-R (6R) para realizar la identificación por PCR del callo transformado con el vector pQY2091, en el que el sistema de reacción y las condiciones de reacción eran similares a los del Ejemplo 1. Entre el total de 350 callos analizados, no se detectó ninguna muestra positiva en los callos de Huaidao 5, mientras que se

detectaron 28 muestras positivas en los callos de Jinjing 818. Los resultados de detección de PCR de algunos callos se muestran en la Figura 7.

3) Los callos identificados como positivos por PCR se transfirieron a un nuevo medio de selección para la tercera ronda de cultivo de selección y expansión; después de que el diámetro de los callos fue mayor de 5 mm, el callo en el cultivo en expansión se sometió a la segunda ronda de identificación molecular usando el par de cebadores 8F + 6R, el callo amarillo-blanco en buen estado de crecimiento que se identificó como positivo en el la segunda ronda se transfirió a un medio de diferenciación para realizar la diferenciación, y las plántulas de aproximadamente 1 cm se pudieron obtener después de 3 a 4 semanas; las plántulas diferenciadas se transfirieron a un medio de enraizamiento para cultivo de enraizamiento; después de que las plántulas del cultivo de enraizamiento se sometieron a endurecimiento, se transfirieron a una maceta con tierra y se colocaron en un invernadero para su cultivo. La formulación del medio de diferenciación es: 4,42 g/L de polvo MS + 0,5 g/L de caseína hidrolizada + 0,2 mg/L de NAA + 2 mg/L de KT + sacarosa 3% + sorbitol 3% + 30 mg/L de higromicina + 0,1 g/L de inositol + fitagel 0,45%, pH 5,8. La formulación del medio de enraizamiento es: 2,3 g/L de polvo de MS + sacarosa 3% + fitagel 0,45%.

4. Detección molecular de plántulas de duplicación de HPPD (generación T0):

Después de la segunda ronda de identificación molecular, se co-diferenciaron 29 callos positivos de evento duplicado para obtener 403 plántulas de generación T0, y el par de cebadores 8F + 6R se utilizó para la tercera ronda de identificación molecular de las 403 plántulas, entre las cuales 56 tenía bandas positivas. Las plántulas positivas se trasladaron a un invernadero para su cultivo. Los resultados de la detección por PCR de algunas plántulas T0 se muestran en la Figura 8.

5. Prueba de resistencia a herbicidas inhibidores de HPPD para plántulas duplicadas de HPPD (generación T0):

Las plántulas de transformación de la generación T0 identificadas como positivas para el evento de duplicación se trasplantaron en grandes cubos de plástico en el invernadero para expandir la propagación y obtener semillas de la generación T1. Después de que las plántulas comenzaron a producir macollos, los macollos se tomaron de cepas de crecimiento vigoroso y se plantaron en las mismas macetas con los macollos de las variedades de control de tipo salvaje en el mismo período de crecimiento. Después de que la altura de la planta alcanzó aproximadamente 20 cm, se llevó a cabo la prueba de resistencia a herbicidas. El herbicida utilizado fue Shuangzuocaotong (CAS No. 1622908-18-2) producido por la

empresa, y su dosis de campo fue usualmente de 4 gramos de ingredientes activos por mu (4 g a.i./mu). En este experimento, se aplicó Shuangzuocaotong a un gradiente de dosis de 2 g a.i./mu, 4 g a.i./mu, 8 g a.i./mu y 32 g a.i./mu con una torre de rociado de entrada.

Los resultados de la prueba de resistencia se muestran en la Figura 9. Después de 5–7 días de la aplicación, las plántulas de arroz de control de tipo salvaje comenzaron a mostrarse albinas, mientras que las cepas de los eventos de duplicación de HPPD permanecieron todas normalmente verdes. Después de 4 semanas de la aplicación, las plántulas de arroz de tipo salvaje estaban cerca de la muerte, mientras que las cepas de los eventos de duplicación continuaron permaneciendo verdes y crecieron normalmente. Los resultados de la prueba mostraron que las cepas de genes duplicados de HPPD tenían una tolerancia significativamente mejorada a Shuangzuocaotong.

6. Detección cuantitativa de la expresión relativa del gen de HPPD en las plántulas duplicadas de HPPD (generación T0):

Se especuló que la mejora de la resistencia de la cepa duplicada del gen de HPPD a Shuangzuocaotong se debió a la fusión del promotor fuerte de UBI2 y la CDS del gen de HPPD que aumentó la expresión de HPPD, por lo que las cepas de generación T0 QY2091–13 y QY2091 –20 se utilizaron para tomar muestras de los macollos primarios y de los macollos secundarios utilizados para la prueba de resistencia a

herbicidas para detectar el nivel de expresión de los genes HPPD y UBI2, respectivamente, con el Jinjing 818 de tipo salvaje como control. Las etapas específicas fueron las siguientes:

1) Extracción del ARN total (método Trizol):

Se tomaron 0,1–0,3 g de hojas frescas y se molieron en polvo en nitrógeno líquido. Se agregó 1 ml de reactivo Trizol por cada 50–100 mg de tejido para lisis; el lisado de Trizol del tejido anterior se transfirió a un tubo de centrífuga de 1,5 ml, se dejó a temperatura ambiente (15–30 °C) durante 5 minutos; se agregó cloroformo en una cantidad de 0,2 ml por 1 ml de Trizol; el tubo de centrífuga se tapó, se agitó vigorosamente a mano durante 15 segundos, se mantuvo a temperatura ambiente (15–30 °C) durante 2–3 minutos, luego se centrifugó a 12000 g (4 l) durante 15 minutos; la fase acuosa superior se retiró y se colocó en un nuevo tubo de centrífuga, se agregó isopropanol en una cantidad de 0,5 ml por 1 ml de Trizol, la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente (15–30 °C) durante 10 minutos, luego se centrifugó a 12000 g (2–8 °C) durante 10 minutos; se descartó el sobrenadante y se agregó etanol al 75% al sedimento en una cantidad de 1 ml por 1 ml de Trizol para lavar. La mezcla se agitó con vórtex y se centrifugó a 7500 g (2–8 °C) durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante; el ARN precipitado se secó naturalmente a temperatura ambiente durante 30 minutos; el precipitado de

ARN se disolvió en 50 µl de agua libre de ARNasa y se almacenó en el frigorífico a −80 °C después del análisis de electroforesis y la determinación de la concentración.

2) Análisis de electroforesis de ARN:

Se preparó un gel de agarosa a una concentración del 1%, luego se tomó 1 µl del ARN y se mezcló con 1 µl de buffer de carga 2X. La mezcla se cargó sobre el gel. El voltaje se fijó en 180 V y el tiempo de electroforesis fue de 12 minutos. Una vez completada la electroforesis, se extrajo el gel de agarosa y se observaron las ubicaciones y el brillo de los fragmentos con un sistema de formación de imágenes de gel UV.

3) Detección de pureza del ARN:

La concentración de ARN se midió con un analizador de ácido nucleico de microproteínas. El ARN con una buena pureza tenía un valor de OD260/OD280 entre 1,8–2,1. El valor menor que 1,8 indica una contaminación proteica grave y valor mayor que 2,1 indica una degradación del ARN grave

4) PCR cuantitativa de fluorescencia en tiempo real

El ARN total extraído se transcribió de forma inversa a ADNc con un kit especial de transcripción inversa. El procedimiento principal consistió en: primero determinar la concentración del ARN total extraído, y se usó una porción de 1–4 µg de ARN para sintetizar el ADNc por síntesis de transcriptasa inversa. El ADNc resultante se almacenó a −20 °C.

① Se preparó una solución del molde de ARN en hielo como se expone en la siguiente tabla y se sometió a una reacción de desnaturalización y apareamiento en un instrumento de PCR. Este proceso condujo a la desnaturalización del molde de ARN y el apareamiento específico de cebadores y moldes, de este modo mejora la eficiencia de la transcripción inversa.

Tabla 1: Transcripción inversa, desnaturalización y sistema de reacción de apareamiento

Componente	Cantidades (µl)
Cebador oligo dT (50 µM)	1 µl
mezcla dNTP (10 mM cada uno)	1 µl
Molde de ARN	1–4 µg
Agua libre de ARNasa	Agregado a 10 µL
Condiciones de reacción para desnaturalización y apareamiento:	
65 ℃	5 min
4 ℃	5 min

②El sistema de reacción de transcripción inversa se preparó como se indica en la Tabla 2 para sintetizar ADNc.:

Tabla 2: Sistema de reacción de transcripción inversa

Componente	Cantidad (µl)
Solución de reacción después de la desnaturalización y el apareamiento	10 µl

anteriores	
Buffer de reacción 5X RTase Plus	4 µl
Inhibidor de ARnasa	0,5 µl
Evo M-MLV Plus RTasa (200 U/µl)	1 µl
Agua libre de ARNsa	Agregado a 20 µL

Condiciones de reacción para la síntesis de ADNc:	
42 ℃	60 min
95 ℃	5 min

③Se seleccionó el gen UBQ5 del arroz como gen de referencia interno y se utilizó el ADNc sintetizado como molde para realizar la PCR cuantitativa de fluorescencia. Los cebadores enumerados en la Tabla 3 se utilizaron para preparar la solución de reacción de acuerdo con la Tabla 4.

Tabla 3: Secuencia 5'-3' del cebador para PCR cuantitativa por fluorescencia

CEBADOR	SECUENCIA	SEQ ID NO
UBQ5-F	ACCACTTCGACCGCCACTACT	43
UBQ5-R	ACGCCTAAGCCTGCTGGTT	44
RT-OsHPPD-F	CAGATCTTCACCAAGCCAGTAG	45
RT-OsHPPD-R	GAGAAGTTGCCCTTCCCAAA	46
RT-OsUbi2-F	CCTCCGTGGTGGTCAGTAAT	47
RT-OsUbi2-R	GAACAGAGGCTCGGGACG	48

Tabla 4: Solución de reacción para PCR cuantitativa en

tiempo real (PCR de tiempo real)

Componentes de la mezcla	Cantidad (µl)
Premezcla SYBR ExTaq II	5 µl
Cebador directo (10 µM)	0,2 µl
Cebador inverso (10 µM)	0,2 µl
ADNc	1 µl
Rox II	0,2 µl
Agua ultrapura	3,4 µl
En total	10 µl

④La reacción se realizó siguiendo las etapas de reacción de PCR cuantitativa en tiempo real de la Tabla 5. La reacción se llevó a cabo durante 40 ciclos.

Tabla 5: Etapas de la reacción de PCR cuantitativa en tiempo real

Temperatura (℃)	Tiempo
50 °C	2 min
95℃	10 min
95℃	15 s
60℃	20 s
95℃	15 s
60℃	20 s
95℃	15 s

5) Procesamiento de datos y resultados experimentales

Como se muestra en la Tabla 6, se usó UBQ5 como referencia

interna, ΔCt se calculó restando el valor Ct de UBQ5 del valor Ct del gen blanco, y luego se calculó $2^{-\Delta Ct}$, que representaba el nivel de expresión relativo del gen blanco. La 818CK1 y la 818CK3 eran dos plantas de control Jinjing 818 de tipo salvaje; 13M y 20M representaron las muestras de hojas de macollo primarias de las plantas QY2091-13 y QY2091-20 T0; 13L y 20L representaron las muestras de hojas de macollos secundarios de las plantas QY2091-13 y QY2091-20 T0 utilizadas para las pruebas de resistencia a herbicidas.

Tabla 6: Valores de Ct y niveles de expresión relativa de diferentes genes

	UBQ5	Media	UBI2	ΔCt	$2^{-\Delta Ct}$	Media	HPPD	ΔCt	$2^{-\Delta Ct}$	Media
	23,27		17,56	-5,88	58,95		20,81	-2,63	6,20	
	23,55		17,71	-5,73	53,09		21,01	-2,43	5,40	
818CK1	23,51	23,44	17,66	-5,78	55,06	55,70	20,98	-2,47	5,52	5,71
	23,45		17,88	-5,50	45,20		20,93	-2,44	5,43	
	23,19		17,94	-5,44	43,41		21,13	-2,24	4,74	
818CK3	23,49	23,37	17,72	-5,65	50,26	46,29	21,14	-2,24	4,72	4,96
	24,61		19,56	-4,92	30,32		20,23	-4,25	19,07	
	24,27		19,52	-4,96	31,05		20,29	-4,19	18,28	
13M	24,56	24,48	19,16	-5,32	39,97	33,78	20,48	-4,00	15,99	17,78
	23,98		18,76	-5,20	36,70		19,02	-4,94	30,64	
	23,89		18,52	-5,43	43,19		19,07	-4,89	29,56	
13L	24,00	23,96	18,81	-5,14	35,34	38,41	19,07	-4,88	29,45	29,88
	24,34		19,01	-5,40	42,30		19,37	-5,04	32,98	

	24,41		19,07	-5,34	40,64		19,33	-5,09	34,05	
20M	24,49	24,41	19,29	-5,13	35,00	39,32	19,26	-5,16	35,65	34,22
	24,63		19,46	-5,11	34,52		19,88	-4,69	25,83	
	24,67		19,38	-5,19	36,48		19,91	-4,66	25,31	
20L	24,41	24,57	19,42	-5,15	35,61	35,54	19,86	-4,71	26,16	25,77

Los resultados se muestran en la Figura 10. El arroz UBQ5 se usó como un gen de referencia interno para calcular los niveles de expresión relativa de los genes OsHPPD y UBI2. Los resultados mostraron que el nivel de expresión de HPPD de la cepa duplicada de HPPD era significativamente más alto que el del tipo salvaje, lo que indica que el promotor fuerte UBI2 fusionado aumentó el nivel de expresión de HPPD, de este modo se crea un gen de HPPD de alta expresión, con el gen de HPPD knocked up. La ligera disminución en el nivel de expresión de UBI2 se puede deber a las mutaciones a pequeña escala resultantes de la edición de la región promotora, y en efecto los autores habían detectado inserciones de bases, supresiones o supresiones de pequeños fragmentos en el sitio blanco de UBI2. En comparación con el tipo salvaje, los niveles de expresión de UBI2 y HPPD tendieron significativamente a ser constantes y cumplieron las expectativas teóricas; entre ellas, el nivel de expresión de HPPD de la muestra 20M fue aproximadamente 6 veces mayor que el del grupo CK3 de tipo salvaje.

Los resultados anteriores demostraron que, siguiendo el

programa eficaz de duplicación de fragmentos cromosómicos probado en protoplastos, los callos y plántulas transformados con eventos de duplicación se pueden seleccionar mediante múltiples rondas de identificación molecular durante la transformación de *Agrobacterium* y el cultivo de tejidos, y el promotor fuerte de UBI2 en la fusión del nuevo gen de HPPD generado en las plántulas transformadas sí aumentó el nivel de expresión del gen HPPD, lo que hace que las plantas adquieran resistencia al herbicida inhibidor de HPPD Shuangzuocaotong, hasta 8 veces la dosis de campo, y por lo tanto se creó un arroz resistente a herbicidas con gen de HPPD endógeno knock-up. Tomando esto como ejemplo, usando la solución técnica de duplicación de fragmentos de cromosoma del Ejemplo 1 y del Ejemplo 2, también se puede introducir un promotor deseado en un gen endógeno, cuyo patrón de expresión génica se debería cambiar para crear un nuevo gen y se puede crear una nueva variedad de plantas con el patrón de expresión génica deseado mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

Ejemplo 3: Detección molecular y prueba de resistencia a herbicidas de generación T1 de cepa de arroz resistente a herbicidas con expresión knock-up del gen de HPPD endógeno causada por la duplicación del fragmento cromosómico

La distancia física entre el gen HPPD y el gen de UBI2 en el genoma del arroz de tipo salvaje fue de 338 kb, como se

muestra en el Esquema 1 de la Figura 1. La longitud del cromosoma aumentó en 338 kb después de que el fragmento cromosómico entre ellos se duplicó por duplicación, y se generó un nuevo gen HPPD de alta expresión con un promotor UBI2 en la unión del fragmento duplicado para dirigir la expresión de la región CDS de HPPD. Para determinar si el nuevo gen se puede heredar de forma estable y el efecto del fragmento de cromosoma duplicado sobre la estabilidad genética, se llevó a cabo una prueba de detección molecular y resistencia a herbicidas para la generación T1 de las cepas duplicadas de HPPD.

En cebador lugar, se observó que el evento de duplicación no tuvo un efecto significativo sobre la fertilidad de las plantas de generación T0, ya que todas las cepas T0 positivas pudieron producir semillas normales. Se realizaron además pruebas de siembra de plántulas de la generación T1 para las cepas QY2091-13 y QY2091-20.

1. Preparación de muestras:

Para QY2091-13 se plantaron un total de 36 plántulas T1, de las cuales 27 crecieron normalmente y 9 eran albinas. Se seleccionaron 32 para la extracción y detección de ADN, donde los números 1-24 eran plántulas normales y los números 25-32 eran plántulas albinas.

Para QY2091-20 se plantaron un total de 44 plántulas T1, de las cuales 33 crecieron normalmente y 11 eran albinas. Se

seleccionaron 40 para la extracción y detección de ADN, donde los números 1-32 eran plántulas normales y los números 33-40 eran plántulas albinas.

Se observaron plántulas de albino en las plantas de generación T1. Se especuló que, debido a que HPPD era una enzima clave en la vía de síntesis de clorofila de las plantas, y las plantas de generación T0 resultantes de la edición de blanco doble posiblemente podrían ser quimeras de muchos genotipos tales como duplicación, supresión, inversión de fragmentos de cromosomas o mutación de fragmento pequeño en el sitio blanco editado. El fenotipo albino se puede generar en las plantas donde se destruyó el gen HPPD, por ejemplo, se suprimió la región CDS HPPD. Se diseñaron diferentes pares de cebadores para PCR para determinar posibles genotipos.

2. Identificación molecular de PCR:

1) Secuencias de los cebadores de detección: secuencia 5'-3'

Cebador 8F: TCTGTGTGAAGATTATTGCCACTAGTTC (SEQ ID NO:49)

Cebador 6R: GAGTTCCCCGTGGAGAGGT (SEQ ID NO:36)

Prueba 141-F: CCCCTTCCCTCTAAAAATCAGAACAG (SEQ ID NO:50)

Cebador 4R: GGGATGCCCTCCTTATCTTGGATC (SEQ ID NO:51)

Cebador 3F: CCTCCATTACTACTCTCCCCGATTC (SEQ ID NO:52)

Cebador 7R: GTGTGGGGGAGTGGATGACAG (SEQ ID NO:53)

pg-Hyg-R1: TCGTCCATCACAGTTTGCCA (SEQ ID NO:54)

pg-35S-F: TGACGTAAGGGATGACGCAC (SEQ ID NO:55)

2) Los sitios de unión de los cebadores anteriores se muestran en la Figura 11. Entre ellos, el Cebador 8F + Cebador 6R se usaron para detectar el fragmento de fusión del promotor UBI2 y la CDS de HPPD después de la duplicación del fragmento cromosómico, y la longitud del producto fue 630 pb; se usaron las pruebas 141-F + Cebador 4R para detectar el evento de supresión de fragmentos cromosómicos, y la longitud del producto fue 222 pb; y pg-Hyg-R1 + pg-35S-F se usaron para detectar el fragmento de ADN-T del vector de edición, y la longitud del producto fue de 660 pb.

3) El sistema de reacción de PCR, el procedimiento de reacción y la detección de electroforesis en gel se realizaron de acuerdo con el Ejemplo 1.

3. Resultados de la detección molecular:

Los resultados de detección de los eventos de duplicación y supresión se muestran en la Tabla 7. Se pudo observar que los eventos de duplicación y supresión de fragmentos cromosómicos se observaron en las plantas de generación T1, con diferentes relaciones entre diferentes líneas. Los eventos de duplicación en el QY2091-13 (29/32) fueron mayores que en el QY2091-20 (21/40), posiblemente debido a las diferentes relaciones quiméricas en las plantas de generación T0. Los resultados de la prueba indicaron que el gen de fusión generado por la duplicación era heredable.

Tabla 7: Resultados de detección de eventos duplicación y

supresión

QY2091-20	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Duplicación	+	−	−	−	+	+	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−	+	+	+	−
Supresión	−	−	−	−	−	+	−	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Duplicación	−	+	−	−	+	−	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−
Supresión	−	−	+	+	−	+	−	−	−	+	+	−	+	−	+	−	−	−	−	+

QY2091-13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Duplicación	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Supresión	−	+	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32								
Duplicación	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+								
Supresión	−	−	+	−	−	+	−	−	+	+	−	+								

Los cebadores pg-Hyg-R1 + pg-35S-F se usaron para detectar el fragmento de T-ADN del vector de edición para las plántulas T1 anteriores. Los resultados de la electroforesis de los productos de PCR de QY2091-20-17 y QY2091-13-7 fueron negativos para el fragmento de ADN-T, lo que indica que era una duplicación homocigótica. Se pudo observar que las cepas no transgénicas homocigóticas con duplicación se pueden segregar de la generación T1 de los eventos de duplicación.

4. Detección de eventos de edición por secuenciación:

Los fragmentos de fusión duplicados se secuenciaron para las muestras de generación T1 positivas duplicadoras

homocigotas 1, 5, 7, 11, 18 y 19 para QY2091-20 y para las muestras T1 positivas duplicadoras homocigotas 1, 3, 7, 9, 10 y 12 para QY2091-13. El sitio blanco izquierdo del gen de HPPD y el sitio blanco derecho del UBI2 se amplificaron al mismo tiempo para la secuenciación para detectar los eventos de edición en los sitios blanco. Entre ellos, se usaron el Cebador 3F + Cebador 7R para detectar el evento de edición del sitio blanco HPPD izquierdo, donde el producto de control de tipo salvaje tenía 481 pb de longitud; se usaron el Cebador 8F + Primer 4R para detectar el evento de edición del sitio blanco UBI2 derecho, donde el producto de control de tipo salvaje tenía 329 pb de longitud.

1) Genotipo de los eventos de duplicación:

El resultado de secuenciación de la duplicación de HPPD en QY2091-13 se mostró en la SEQ ID NO: 18, y el resultado de secuenciación de la duplicación de HPPD en QY2091-20 se mostró en SEQ ID NO: 19, ver Figura 12. En comparación con las secuencias ligadoras predichas de la duplicación, se insertó una base T en el ligador en QY2091-13, se suprimieron 19 bases del ligador en QY2091-20, y tanto la inserción como la supresión se produjeron en la región promotora de UBI2 y no tuvieron ningún efecto sobre la región codificadora de la proteína HPPD. A partir de los resultados de detección de los niveles de expresión del gen de HPPD en el Ejemplo 2, se puede ver que los niveles de expresión de estos nuevos genes de HPPD

donde los promotores UBI2 se fusionaron con la región CDS de HPPD aumentaron significativamente.

2) Eventos de edición en los sitios blando de HPPD y UBI2 originales en ambos lados:

Hubo más tipos de eventos de edición en los sitios blanco en ambos lados. En dos líneas, se produjeron tres tipos de edición en la región promotora de HPPD, a saber, inserción de base única, supresión de 17 bases, y supresión de 16 bases; y se produjeron dos tipos de edición en la región promotora de UBI2, a saber, inserción de 7 bases y supresión de 3 bases. Las plantas T1 utilizadas para las pruebas y el muestreo eran todas plántulas verdes y crecieron normalmente, lo que indica que las mutaciones a pequeña escala en estas regiones promotoras no tuvieron un efecto significativo sobre la función genética, y se pudieron seleccionar variedades de arroz resistentes a herbicidas a partir de su descendencia.

5. Ensayo de resistencia a herbicidas en plántulas de generación T1:

La resistencia a herbicidas de la generación T1 de la cepa doble QY2091 HPPD se probó en la etapa de plántula. Después de que las semillas de la generación T1 se sometieron a desinfección de la superficie, germinaron en medio 1/2 MS que contiene Shuangzuocaotong 1,2 μM y se cultivaron a 28 16, 16 horas de luz/8 horas de oscuridad, en el que se usó Jinjing 818 de tipo salvaje como control.

Los resultados de la prueba de resistencia se muestran en la Figura 13. Después de 10 días de cultivo a la luz, las plántulas de arroz de control de tipo salvaje mostraron fenotipos de albinismo y eran casi todas albinas, mientras que las líneas de los eventos de duplicación de HPPD QY2091-7, 13, 20, 22 mostraron segregación fenotípica de clorosis y plántulas verdes. De acuerdo con los resultados de detección molecular mencionados anteriormente, hubo segregación de genotipo en la generación T1. Las plántulas albinas aparecieron en ausencia de tratamiento con herbicidas, mientras que las plántulas verdes continuaron siendo verdes y crecieron normalmente después de la adición de 1,2 µM de Shuangzuocaotong. Los resultados de la prueba indicaron que la alta resistencia a Shuangzuocaotong de las líneas de genes de HPPD duplicados se puede heredar de forma estable a la generación T1.

Ejemplo 4: Un método de edición para knocking up la expresión del gen de PPO endógeno mediante la inducción de la inversión del fragmento cromosómico – prueba de protoplastos de arroz

El gen PPO1 del arroz (también conocido como PPOX1) (como se muestra en SEQ ID NO: 7, en el que 1-1065 pb era el promotor, el resto era la región codificadora) se localizó en el cromosoma 1, y el gen de CP12 de la proteína del ciclo de calvin (como se muestra en SEQ ID NO: ID NO: 8, en el que 1-

2088 pb era el promotor y el resto era la región codificadora) se localizó 911 kb corriente abajo del gen de PPO1 con direcciones opuestas. Según los datos del perfil de expresión génica del arroz proporcionados por el Proyecto Internacional de Secuenciación del Genoma del Arroz (http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml), la intensidad de expresión del gen de CP12 en las hojas de arroz era 50 veces mayor que la del gen de PPO1 y el promotor del gen CP12 era un promotor fuerte de alta expresión en las hojas.

Como se muestra en el Esquema 1 de la Figura 4, mediante la inducción simultánea y la detección de rupturas de cadena doble entre los respectivos promotores y la región CDS de los dos genes, la región entre las dos rupturas se puede revertir, con el promotor del gen PPO1 reemplazado con el promotor del gen CP12, aumenta el nivel de expresión del gen PPO1 y se obtiene la resistencia a herbicidas inhibidores de PPO, por lo que se podrían seleccionar líneas resistentes a herbicidas. Además, como se muestra en el Esquema 2 de la Figura 4, también se puede crear un nuevo gen de PPO1 dirigido por el promotor del gen CP12 primero por inversión y luego duplicación.

1. Primero, las secuencias de ADN genómico de arroz PPO1 y CP12 se introdujeron en la herramienta en línea CRISPOR (http://crispor.tefor.net/) para buscar sitios de edición blanco disponibles. Después de la puntuación en línea, se seleccionaron los siguientes sitios blanco entre los

promotores y las regiones CDS de los genes PPO1 y CP12 para la prueba:

Nombre del ARNsg blanco	Secuencia (5' a 3)	SEQ ID NO
OsPPO-ARN guía 1	CCATGTCCGTCGCTGACGAG	56
OsPPO-ARN guía 2	CCGCTCGTCAGCGACGGACA	57
OsPPO-ARN guía 3	GCCATGGCTGGCTGTTGATG	58
OsPPO-ARN guía 4	CGGATTTCTGCGTGTGATGT	598

El ARN guía 1 y el ARN guía 2 se ubican entre el promotor y la región CDS del gen PPO1, cerca del codón de inicio PPO1, y el ARN guía 3 y el ARN guía 4 se ubican entre el promotor y la región CDS del gen CP12, cerca del CP12 codón de inicio.

Como se describe en el Ejemplo 1, los cebadores se diseñaron para los sitios blanco anteriores para construir vectores de doble blanco, con pHUE411 como esqueleto:

Cebador N.°	Secuencia de ADN (5' a 3')	SEQ ID NO
OsPPO1-sgRNA1-F	ATATGGTCTCGGGCGCCATGTCCGTCGCTGACG AGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	60

OsPPO1-sgRNA2-F	ATATGGTCTCGGGCGCCGCTCGTCAGCGACGGA CAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	61
OsPPO1-sgRNA3-R	TATTGGTCTCTAAACCATCAACAGCCAGCCATG GCGCTTCTTGGTGCCGCGCCTC	62
OsPPO1-sgRNA4-R	TATTGGTCTCTAAACACATCACACGCAGAAATC CGGCTTCTTGGTGCCGCGCCTC	63

Específicamente, el plásmido pCBC-MT1T2 (https://www.addgene.org/50593/) se usó como molde para amplificar los fragmentos de doble blanco sgRNA1 + 3, sgRNA1 + 4, sgRNA2 + 3, sgRNA2 + 4 y los casetes de expresión de ARnsg del constructo, respectivamente. El esqueleto del vector pHUE411 se digirió con BsaI y se recuperó del gel, y el fragmento blanco se usó directamente para la reacción de ligación después de la digestión. Se usó ADN ligasa T4 para ligar el esqueleto del vector y el fragmento blanco, el producto de ligación se transformó en células competentes Trans5α, se seleccionaron y secuenciaron diferentes monoclones. Se usó el kit de extracción mini de plásmidos de alta pureza Sparkjade se utilizó para extraer plásmidos con resultados de secuenciación correctos, de este modo se obtienen plásmidos recombinantes, denominados respectivamente pQY002095, pQY002096, pQY002097, pQY002098, como se muestra a continuación:

pQY002095 pHUE411-PPO-sgRNA1+3 que contiene la combinación de OsPPO-ARN guía 1, ARN guía 3

pQY002096 pHUE411-PPO-sgRNA2+3 que contiene la combinación de OsPPO-ARN guía 2, ARN guía 3

pQY002097 pHUE411-PPO-sgRNA1+4 que contiene la combinación de OsPPO-ARN guía 1, ARN guía 4

pQY002098 pHUE411-PPO-sgRNA2+4 que contiene la combinación de OsPPO-ARN guía 2, ARN guía 4

2. Se prepararon plásmidos de alta pureza y alta concentración para los vectores pQY002095-002098 mencionados anteriormente como se describe en la etapa 2 del Ejemplo 1.

3. Se prepararon protoplastos de arroz y se sometieron a transformación mediada por PEG con los vectores mencionados anteriormente como se describe en la etapa 3 del Ejemplo.

4. Direccionamiento genómico y detección de nuevo gen con los cebadores de detección que se muestran en la siguiente tabla para la detección por PCR como se describe en la etapa 4 del Ejemplo 1.

Cebador	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO
OsPPOinversion-checkF1 (PPO-F1)	GCTATGCCGTCGCTCTTTCTC	64
OsPPOinversion-checkF2 (PPO-F2)	CGGACTTATTCCCACCAGAA	65
OsPPOinversion-checkR1 (PPO-R1)	GAGAAGGGGAGCAAGAAGACGT	66

OsPPOinversion-checkR2 (PPO-R2)	AAGGCTGGAAGCTGTTGGG	67
OsCPinversion-checkF1 (CP-F1)	CATTCCACCAAACTCCCCTCTG	68
OsCPinversion-checkF2 (CP-F2)	AGGTCTCCTTGAGCTTGTCG	69
OsCPinversion-checkR1 (CP-R1)	GTCATCTGCTCATGTTTTCACGGTC	70
OsCPinversion-checkR2 (CP-R2)	CTGAGGAGGCGATAAGAAACGA	71

Entre ellos, la combinación de PPO-R2 y CP-R2 se utilizó para amplificar el nuevo fragmento de gen de CDS PPO1 dirigido por el promotor CP12 que se generó en el lado derecho después de la inversión del fragmento cromosómico, y la combinación de PPO-F2 y CP-F2 se utilizó para amplificar el nuevo fragmento de gen CDS CP12 dirigido por el promotor PPO1 que se generó en el lado izquierdo después de la inversión. Los posibles genotipos resultantes de la edición de doble blanco y los sitios de unión de los cebadores de detección molecular se muestran en la Figura 14.

5. Los resultados de la PCR y la secuenciación mostraron que el nuevo gen esperado en el que el promotor CP12 dirigía la expresión de PPO1 se creó a partir de la transformación de protoplastos de arroz. El evento de edición en el que el promotor del gen CP12 de arroz se fusionó con la región de

expresión del gen PPO1 se pudo detectar en el ADN genómico de los protoplastos de arroz transformados. Esto indicó que el esquema para formar un nuevo gen PPO a través de la inversión de fragmentos cromosómicos era factible, y se puede crear un nuevo gen PPO dirigido por un promotor fuerte, que se definió como un evento de inversión de PPO1. Los resultados de la secuenciación para la inversión de los fragmentos cromosómicos en protoplastos transformados con el vector pQY002095 se mostraron en la SEQ ID NO: 15; los resultados de la secuenciación para la supresión del fragmento cromosómico en protoplastos transformados con el vector pQY002095 se mostraron en la SEQ ID NO: 16; y los resultados de la secuenciación para la inversión de los fragmentos cromosómicos en protoplastos transformados con el vector pQY002098 se muestran en la SEQ ID NO: 17.

Ejemplo 5: Creación de arroz resistente a herbicidas con la expresión de knock-up del gen de PPO endógeno causado por la inversión del fragmento cromosómico a través de la transformación mediada por *Agrobacterium*

1. Construcción del vector de edición de knock-up: sobre la base de los resultados de las pruebas de protoplastos, se seleccionó la combinación de doble blanco de OsPPO-ARN guía 1: 5'CCATGTCCGTCGCTGACGAG3' (SEQ ID NO: 56) y OsPPO-ARN guía 4: 5'CGGATTTCTGCGT-GTGATGT3' (SEQ ID NO: 59) con alta eficiencia de edición para construir el vector de

transformación de *Agrobacterium* pQY2234. Se usó pHUE411 como el esqueleto del vector y se realizó la optimización del codón de arroz. El mapa del vector se muestra en la Figura 16.

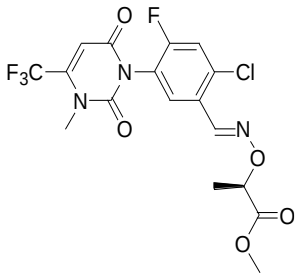
2. Callo de arroz transformado por *Agrobacterium* y dos ronda de identificación molecular:

El plásmido pQY2234 se utilizó para transformar callos de arroz de acuerdo con el método descripto en la etapa 2 del Ejemplo 2. Las variedades receptoras fueron Huaidao N.° 5 y Jinjing 818. En la etapa de selección de callos, se realizaron dos rondas de identificación molecular en callos resistentes a higromicina y se diferenciaron callos positivos en evento de inversión. Durante la detección molecular del callo, la amplificación del nuevo fragmento de gen de CDS PPO1 dirigido por el promotor CP12 generado en el lado derecho después de la inversión del fragmento cromosómico por la combinación de PPO-R2 y CP-R2 se consideró como el estándar positivo para el evento de inversión, mientras que el nuevo gen CP12 generado en el lado izquierdo después de la inversión se consideró después de la diferenciación y la emergencia de plántulas del callo. Se analizaron un total de 734 callos de Huaidao N.° 5, de los que 24 callos resultaron positivos para el evento de inversión, y se analizaron 259 callos de Jinjing 818, de los que 29 callos fueron positivos para el evento de inversión. La Figura 17 mostró los resultados de la detección por PCR de los callos Jinjing 818 N.° 192-259.

3. Un total de 53 callos con eventos de inversión positivos se sometieron a dos rondas de identificación molecular y luego se co-diferenciaron, y se identificaron 9 callos con eventos de duplicación positivos, que se sometieron a dos rondas de identificación molecular y luego se co-diferenciaron para producir 1,875 plántulas T0, de las que 768 cepas eran del fondo Huaidao N.°5 y 1107 cepas eran del fondo Jinjing 818. Estas 1875 plántulas se sometieron además a la tercera ronda de identificación molecular con el par de cebadores PPO-R2 y CP-R2, en la que 184 líneas del fondo Huaidao N.° 5 mostraron bandas de inversión positiva, 350 cepas del fondo Jinjing 818 mostraron bandas de inversión positiva. Las plántulas positivas se trasladaron al invernadero para su cultivo.

4. Prueba de resistencia a herbicidas inhibidores de PPO de plántulas de inversión de PPO1 (generación T0):

Las plántulas de transformación de la generación T0 QY2234 identificadas como positivas para el evento de inversión se trasplantaron en grandes cubos de plástico en el invernadero para cultivar semillas de la generación T1. Hubo una gran cantidad de plántulas positivas, por lo que se seleccionaron algunas plántulas T0 y líneas de control de tipo salvaje con un período y estado de crecimiento similar. Cuando la altura de la planta alcanzó unos 20 cm, se llevó a cabo directamente la prueba de resistencia a herbicidas. El herbicida utilizado fue un herbicida inhibidor de PPO de alta eficacia.



producido por la empresa (código 2081, ver la Solicitud de patente de China para la invención n.° 202010281666,4). En este experimento, el herbicida se aplicó en los gradientes de tres niveles, a saber, 0,18, 0,4 y 0,6 g a.i./mu, mediante una torre de rociado de tipo de entrada.

Los resultados de la prueba de resistencia se muestran en la Figura 18. 3-5 días después de la aplicación, las plántulas de arroz de control de tipo salvaje comenzaron a marchitarse desde la punta de la hoja, aparecieron manchas necróticas en las hojas y las plantas se marchitaron gradualmente, mientras que la mayoría de las líneas del evento de inversión de PPO1 mantuvieron un crecimiento normal, las hojas no tenían fitotoxicidad evidente. Además, algunas líneas mostraron fitotoxicidad, probablemente debido al mosaicismo poligenotípico de los eventos de edición y al bajo nivel de expresión de PPO1 en las líneas de generación T0. Dos semanas después de la aplicación, las plántulas de arroz de tipo salvaje murieron y la mayoría de las cepas del evento de inversión continuaron permaneciendo verdes y crecieron normalmente. Los resultados de la prueba mostraron que las líneas con inversión de PPO1 podrían mejorar

significativamente la tolerancia de las plantas a 2081.

5. Detección cuantitativa del nivel de expresión relativa del gen de PPO1 en plántulas de inversión de PPO1 (generación T0):

Se especuló que el aumento de la resistencia de las líneas de inversión del gen PPO1 a 2081 se debió a la fusión del promotor de CP12 fuerte y la CDS del gen de PPO1 que puede aumentar el nivel de expresión de PPO1. Por lo tanto, se seleccionaron las líneas de generación T0 QY2234-252, QY2234-304 y QY2234-329 del fondo Huaidao N.° 5, se muestrearon sus macollos primarios y secundarios y se sometieron a la detección de niveles de expresión de genes PPO1 y CP12. Como control se utilizó el Huaidao N.° 5 de tipo salvaje. Los protocolos específicos siguieron la etapa 6 del Ejemplo 2, con el gen UBQ5 del arroz como gen de referencia interno, los cebadores cuantitativos de fluorescencia fueron los siguientes: 5'-3'

CEBADOR	SEQUENCE	SEQ ID NO
UBQ5-F	ACCACTTCGACCGCCACTACT	43
UBQ5-R	ACGCCTAAGCCTGCTGGTT	44
RT-OsPPO1-F	GCAGCAGATGCTCTGTCAATA	72
RT-OsPPO1-R	CTGGAGCTCTCCGTCAATTAAG	73
RT-OsCP12-F1	CCGGACATCTCGGACAA	74
RT-OsCP12-R1	CTCAGCTCCTCCACCTC	75

Se utilizó el UBQ5 como referencia interna. ΔCt se calcula restando el valor Ct de UBQ5 del valor Ct del gen blanco. Luego se calculó $2^{-\Delta Ct}$, que representaba el nivel de expresión relativo del gen blanco. La H5CK1 y H5CK2 eran dos plantas de control de tipo salvaje de Huaidao N.° 5, las 252M, 304M y 329M representaban las muestras de hojas de macollos primarios de las plantas QY2234-252, QY2234-304 y QY2234-329 T0, y las 252L, 304L, y 329L representaron sus muestras de hojas de macollos secundarios. Los resultados se muestran en la Tabla 8 a continuación:

Tabla 8: Valores de Ct y niveles de expresión relativa de diferentes genes

	UBQ5	Media	PPO1	ΔCt	$2^{-\Delta Ct}$	Media	CP12	ΔCt	$2^{-\Delta Ct}$	Media
	28,18		25,83	-2,43	5,39		22,28	-3,98	15,77	
	28,37		25,98	-2,28	4,85		22,06	-4,20	18,44	
H5CK1	28,23	28,26	25,93	-2,33	5,03	5,09	22,11	-4,15	17,76	17,32
	28,23		25,73	-2,36	5,15		21,63	-6,47	88,58	
	27,98		26,02	-2,07	4,20		21,53	-6,57	94,87	
H5CK2	28,07	28,09	25,92	-2,18	4,52	4,62	21,54	-6,55	93,83	92,43
	25,51		25,17	-0,54	1,45		22,26	-3,45	10,95	
	25,82		25,22	-0,49	1,41		22,36	-3,36	10,23	
252M	25,80	25,71	25,22	-0,49	1,41	1,42	22,43	-3,29	9,76	10,31
	26,41		23,36	-3,14	8,84		22,30	-4,21	18,49	
	26,64		23,41	-3,10	8,56		21,95	-4,56	23,55	
252L	26,47	26,51	23,46	-3,05	8,28	8,56	21,78	-4,73	26,47	22,84

	25,74		24,55	-1,29	2,44		22,51	-3,32	10,02	
	25,99		24,53	-1,31	2,48		22,45	-3,39	10,47	
304M	25,78	25,84	24,48	-1,36	2,57	2,50	22,56	-3,28	9,71	10,07
	25,97		23,63	-2,36	5,14		21,60	-4,39	20,97	
	26,00		23,75	-2,25	4,74		21,43	-4,56	23,55	
304L	26,00	25,99	23,56	-2,43	5,39	5,09	22,32	-3,68	12,78	19,10
	26,94		23,11	-3,89	14,84		22,23	-4,76	27,16	
	26,99		23,25	-3,75	13,42		21,85	-5,15	35,39	
329M	27,07	27,00	23,22	-3,78	13,71	13,99	21,82	-5,18	36,29	32,95
	26,50		23,64	-2,63	6,19		22,00	-4,27	19,30	
	26,52		23,74	-2,53	5,79		21,97	-4,30	19,71	
329L	25,79	26,27	23,77	-2,50	5,65	5,87	22,15	-4,12	17,42	18,81

Los niveles de expresión relativa de PPO1 y CP12 en diferentes cepas se muestran en la Figura 19. Como mostraron los resultados, a diferencia del evento de duplicación en el Ejemplo 2, los niveles de expresión génica de estas cepas de eventos de inversión fueron significativamente diferentes. Los niveles de expresión de CP12 son muy diferentes entre los dos grupos CK de Huaidao N.° 5, posiblemente debido a las diferentes tasas de crecimiento de las plántulas. En comparación con el grupo de control H5CK2, los niveles de expresión de CP12 en los grupos experimentales mostraron todos una tendencia a la disminución, mientras que los niveles de expresión de PPO1 para 252L y 329M aumentaron significativamente y los niveles de expresión de PPO1 para

304L y 329L aumentaron modestamente, y los niveles de expresión de PPO1 para 252M y 304M disminuyeron. A diferencia de la duplicación de los fragmentos de cromosomas que aumentaron principalmente el nivel de expresión génica, la inversión de los fragmentos de cromosomas generó nuevos genes en ambos lados, por lo que podrían ocurrir varios eventos de edición en los blancos de ambos lados, y los cambios en la dirección de la transcripción también podrían afectar nivel de expresión génica al mismo tiempo. Es decir, las plantas de generación T0 eran quimeras complejas. También puede haber diferencias significativas en los niveles de expresión génica entre macollos primarios y secundarios de la misma planta. Se puede observar a partir de los resultados de la PCR cuantitativa que los eventos de inversión de PPO1 mostraron una mayor probabilidad de aumentar el nivel de expresión del gen de PPO1 y, por lo tanto, se pueden seleccionar las cepas resistentes a herbicidas con un alto nivel de expresión de PPO1 mediante la selección de resistencia a herbicidas por los eventos de inversión.

Los resultados anteriores demostraron que, siguiendo el esquema de detección de inversión efectiva de fragmentos cromosómicos en protoplastos, los callos y las plántulas transformadas con eventos de inversión se pueden seleccionar a través de múltiples rondas de identificación molecular durante la transformación de *Agrobacterium* y el cultivo de

tejidos, y el promotor de CP12 fuerte fusionado con el nuevo gen PPO1 generado en las plántulas transformantes podría aumentar en efecto el nivel de expresión del gen PPO1, lo que puede conferir a las plantas resistencia al herbicida inhibidor de PPO 2081, de este modo se creó arroz resistente a herbicidas con gen de PPO endógeno knock-up. Tomando esto como ejemplo, el protocolo de inversión de fragmentos cromosómicos del Ejemplo 4 y el Ejemplo 5 también se aplicó a otros genes endógenos cuyo patrón de expresión génica se necesitaba cambiar mediante la introducción y fusión con un promotor requerido, de ese modo se puede crear un nuevo gen, y se pueden crear nuevas variedades con un patrón de expresión génica deseado mediante la transformación en plantas mediada por *Agrobacterium*.

Ejemplo 6: Detección molecular y prueba de resistencia a herbicidas de las plantas de generación T1 de líneas de arroz resistentes a herbicidas con expresión knock-up del gen de PPO1 endógeno a través de la inversión de fragmento cromosómico

La distancia física entre el gen PPO1 del genoma del arroz de tipo salvaje y el gen CP12 fue de 911 kb. Como se muestra en la Figura 14, se generó un gen PPO1 de alta expresión con una región CDS de PPO1 dirigida por el promotor CP12 en el lado derecho después de la inversión del fragmento cromosómico entre los dos genes. También se puede producir una supresión

de un fragmento cromosómico. Para probar si el nuevo gen se puede heredar de manera estable y la influencia de la inversión de los fragmentos cromosómicos en la estabilidad genética, se llevó a cabo una prueba de detección molecular y resistencia a herbicidas en la generación T1 de la cepa de inversión PPO1.

En primer lugar, se observó que el evento de inversión no tuvo un efecto significativo sobre la fertilidad de las plantas de generación T0, ya que todas las cepas T0 positivas pudieron producir semillas normalmente. Se seleccionaron para la detección las generaciones T1 de las cepas QY2234/H5-851 con el fondo Huaidao N.°,5

1. Preparación de muestras:

Para QY2234/H5-851, se plantó un total de 48 plántulas T1. Todas las plantas crecieron normalmente.

2. Identificación molecular por PCR:

1) Detección de la secuencia del cebador: 5'-3'

PPO-R2: AAGGCTGGAAGCTGTTGGG (SEQ ID NO: 67)

CP-R2: CTGAGGAGGCGATAAGAAACGA (SEQ ID NO: 71)

PPO-F2: CGGACTTATTTCCCACCAGAA (SEQ ID NO: 76)

CP-F2: AGGTCTCCTTGAGCTTGTCG (SEQ ID NO: 69)

pg-Hyg-R1: TCGTCCATCACAGTTTGCCA (SEQ ID NO: 54)

pg-35S-F: TGACGTAAGGGATGACGCAC (SEQ ID NO: 55)

2) Los sitios de unión de los cebadores anteriores se muestran en la Figura 14, en donde PPO-R2 + CP-R2 se utilizó

para detectar el fragmento de fusión del promotor CP12 derecho y la región codificadora de PPO1 después de la inversión del fragmento cromosómico, y la longitud del producto fue 507 pb; se usó PPO-F2 + CP-F2 para detectar el fragmento de fusión del promotor PPO1 izquierdo y la región codificadora de CP12 después de la inversión del fragmento cromosómico, y la longitud del producto fue de 560 pb; se usó PPO-F2 + PPO-R2 para detectar el sitio blanco de PPO izquierdo antes de la inversión, y la longitud del producto en el control de tipo salvaje fue de 586 pb; se usó CP-F2 + CP-R2 para detectar el sitio blanco CP12 correcto antes de la inversión, y la longitud del producto en el control de tipo salvaje fue de 481 pb. Se usó pg-Hyg-R1 + pg-35S-F para detectar el fragmento de ADN-T del vector de edición, y la longitud del producto fue de 660 pb.

3) Sistema de reacción de PCR y condiciones de reacción:

Sistema de reacción (sistema de 10 µL):

Buffer 2*KOD	5 µL
dNTP 2 mM	2 µL
Enzima KOD	0,2 µL
Cebador F	0,2 µL
Cebador R	0,2 µL
Agua	2,1 µL
Muestra	0,3 µL

Condiciones de reacción:

94 °C	2 minutos	
98 °C	20 segundos	40 ciclos
60 °C	20 segundos	
68 °C	20 segundos	
68 °C	2 minutos	
12 °C	5 minutos	

Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa 1% con un voltaje de 180 V durante 10 minutos.

3. Resultados de la detección molecular:

Los resultados de detección se muestran en la Tabla 9. Se detectaron un total de 48 plantas, de las cuales 12 plantas (2/7/11/16/26/36/37/40/41/44/46/47) fueron homocigotas en inversión, 21 plantas (1/3/4/5/6/8/9/15/17/20/22/23/24/27/30/31/33/34/39/42/43) fueron heterocigotas en inversión y 15 plantas (10/12/13/14/18/19/21/25/28/29/32/35/38/45/48) fueron homocigotas en no inversión. La relación de inversión homocigótica: inversión heterocigótica: no inversión

homocigótica fue 1: 1,75: 1,25, aproximadamente 1: 2: 1. Por lo tanto, los resultados de la detección cumplieron con la ley de herencia de Mendel, lo que indica que el nuevo gen PPO1 generado por inversión era heredable.

Tabla 9: Resultados de la detección molecular

QY2234-851	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Lado derecho de la inversión	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	+	+	+	−	−	+
Lado izquierdo de la inversión	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	+	+	+	−	−	+
PPO WT	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+
CP12 WT	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+
QY2234-851	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Lado derecho de la inversión	−	+	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	+	+	−	+	+	−	+	+
Lado izquierdo	−	+	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	+	+	−	+	+	−	+	+

de la inversión																				
PPO WT	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	−
CP12 WT	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	−

QY2234-851	41	42	43	44	45	46	47	48
Lado derecho de la inversión	+	+	+	+	−	+	+	−
Lado izquierdo de la inversión	+	+	+	+	−	+	+	−
PPO WT	−	+	+	−	+	−	−	+
CP12 WT	−	+	+	−	+	−	−	+

Para las plántulas T1 anteriores, se usaron los cebadores Pg-Hyg-R1 + pg-35S-F para detectar el fragmento de ADN-T del vector de edición. Los resultados de la electroforesis de 16 y 41 fueron negativos para el fragmento de ADN-T, lo que indica una inversión homocigótica. Se puede observar que las cepas no transgénicas de inversión homocigótica se pueden segregar de la generación T1 del evento de inversión.

4. Detección de secuenciación de los eventos de edición:

La detección del genotipo de los eventos de inversión se

centró en los eventos de edición del nuevo gen PPO en el lado derecho. Se conservaron los eventos de mutación con el marco de codificación de proteínas completo del gen PPO1. Se conservaron los eventos de edición del sitio CP12 en el lado izquierdo que no afectaron el crecimiento normal de las plantas a través de la observación del fenotipo en el invernadero y en el campo. Los genotipos de los eventos de edición detectados en las líneas positivas del evento de inversión se enumeran a continuación, en los que sin fisuras indica idéntico a la secuencia de fragmentos de fusión predicha después de la inversión. Los genotipos de los eventos de inversión QY2234 exitosos en el fondo Huaidao N.°5 fueron los siguientes:

N.°	Genotipo	No.	Genotipo
2234/H5-295	Lado derecho -1bp; lado izquierdo -32bp	2234/H5-650	Sin fisuras lado derecho; lado izquierdo +1bp (G)
2234/H5-381	Lado derecho +18bp	2234/H5-263	Sin fisuras lado derecho; sin fisuras lado izquierdo
2234/H5-410	Lado derecho -1bp; lado izquierdo +1bp	2234/H5-555	Lado derecho -23bp
2234/H5-	Lado derecho -	2234/H5-	Lado derecho -5bp,

159	16bp	645	+20bp,
2234/H5-232	Lado derecho -4bp		

Algunos de los mapas de picos de secuenciación y los resultados de la comparación de secuencias se muestran en la Figura 20.

Los genotipos de la exitosa inversión QY2234 en el fondo Jinjing818 fueron los siguientes:

N.°	Genotipo de PPO del lado derecho	N.°	Genotipo de PPO del lado derecho
2234/818-5	Sin fisuras lado derecho	2234/818-144	Lado derecho +1bp
2234/818-42	Lado derecho -16bp	2234/818-151	Lado derecho +2bp, -26bp, pico puro
2234/818-108	Lado derecho -15bp	2234/818-257	Lado derecho +1bp
2234/818-134	Lado derecho +5bp, -15bp		

Algunos de los mapas de picos de secuenciación y los resultados de la comparación de secuencias se muestran en la Figura 21.

Los resultados de secuenciación de los diferentes nuevos genes de PPO1 anteriores con el promotor CP12 fusionado a la

región codificadora de PPO1 se muestran en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26.

5. Prueba de resistencia a herbicidas de plántulas de la generación T1:

La prueba de resistencia a herbicidas se realizó en la generación T1 de las líneas de inversión de PPO1 QY2234/H5-851 en la etapa de plántula. El Huaidao N. °5 de tipo salvaje se utilizó como control y se plantó simultáneamente con las semillas de la generación T1 de las líneas de inversión. Cuando las plántulas alcanzaron una altura de planta de 15 cm, se aplicó 2081 mediante pulverización a cuatro niveles de 0,3, 0,6, 0,9 y 1,2 g a.i./mu. Las condiciones de cultivo fueron 28 °C, con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Los resultados de la prueba de resistencia se muestran en la Figura 22. Después de 5 días de la aplicación, las plántulas de arroz de control de tipo salvaje mostraron una fitotoxicidad evidente a una dosis de 0,3 g a.i./mu. Comenzaron a marchitarse desde la punta de la hoja y aparecieron manchas necróticas en las hojas; a una dosis de 0,6 g a.i./mu, las plantas murieron rápidamente. Sin embargo, las plántulas de T1 QY2234/H5-851 pudieron mantener un crecimiento normal a una dosis de 0,3 g a.i./mu, y no se pudo observar fitotoxicidad evidente en las hojas; a dosis de 0,6 y 0,9 g a.i./mu, algunas plántulas T1 mostraron puntas de

hojas secas, pero la mayoría de las plántulas T1 pudieron mantenerse verdes y continuar creciendo, mientras que el control murió sustancialmente. A una dosis de 1,2 g a.i./mu, las plantas de control estaban todas muertas, mientras que algunas de las plántulas T1 podían mantenerse verdes y continuar creciendo. Los resultados de la prueba indicaron que la resistencia de las líneas de inversión del gen PPO1 a 2081 se puede heredar de forma estable a su generación T1.

Ejemplo 7: Un método de edición para knocking up la expresión del gen de EPSPS endógeno en plantas

EPSPS fue una enzima clave en la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos en plantas y el sitio blanco del herbicida glifosato biocida. El alto nivel de expresión del gen de EPSPS podría dotar a las plantas de resistencia al glifosato. El gen de EPSPS (como se muestra en la SEQ ID NO: 4, en el que 1–1897 pb era el promotor y el resto era la región de expresión) se localizó en el cromosoma 6 en arroz. El gen corriente arriba era transcetolasa (TKT, como se muestra en SEQ ID NO: 3, en el que 1–2091 pb era el promotor y el resto era la región de expresión) con una dirección opuesta. La intensidad de expresión del gen de TKT en las hojas fue de 20 a 50 veces mayor que la del gen de EPSPS. Como se muestra en la Figura 2, al inducir simultáneamente rupturas de cadena doble entre el promotor y la región CDS de los dos genes respectivamente, la inversión (Esquema 1) o la

duplicación de inversión (Esquema 2) de la región entre las dos rupturas se puede obtener después de las pruebas. En ambos casos, el promotor del gen de EPSPS se puede reemplazar con el promotor del gen de TKT, de este modo aumenta el nivel de expresión del gen EPSPS y se obtiene la resistencia al glifosato. Además, los Esquemas 3, 4 y 5, como se muestra en la Figura 2, también podrían crear nuevos genes de EPSPS dirigidos por el promotor del gen de TKT. La estructura génica de EPSPS adyacente y opuesta en dirección con relación a TKT se conservó en plantas monocotiledóneas (Tabla 10). Mientras que en plantas dicotiledóneas, ambos genes también eran adyacentes pero en la misma dirección; por tanto, este método fue universal en las plantas.

Tabla 10: Distancia entre el gen EPSPS y el gen de TKT adyacente en diferentes plantas

Especies	Ubicación (cromosoma)	Distancia del sitio de inicio de la región CD (kb)	Dirección
Arroz	6	4	Inversa <TKT-EPSPS>
Trigo	7A	35	Inversa <TKT-EPSPS>
	7D	15	Inversa <TKT-

			EPSPS>
	4A?	50	Inversa <TKT-EPSPS>
Maíz	9	22	Inversa <TKT-EPSPS>
Brachypodium distachyon	1	5	Inversa <TKT-EPSPS>
Sorgo	10	15	Inversa <TKT-EPSPS>
Mijo	4	5	Inversa <TKT-EPSPS>
Poroto de soja	3	6	Directo TKT>EPSPS>
Tomate	5	6	Directo TKT>EPSPS>
Maní	2	6	Directo TKT>EPSPS>
	12	5	Directo TKT>EPSPS>
Algodón	9	22	Directo TKT>EPSPS>
Alfalfa	4	8	Directo TKT>EPSPS>
Arabidopsis	2	5	Directo TKT>EPSPS>

Uva	15	17	Directo TKT>EPSPS>

Para este fin, se usó pHUE411 como el esqueleto, y los siguientes como blancos:

Nombre del ARN sg	Secuencia (5' a 3)	SEQ ID NO
OsEPSPS-ARN guía 1	CCACACCACTCCTCTCGCCA	77
OsEPSPS-ARN guía 2	CCATGGCGAGAGGAGTGGTG	78
OsEPSPS-ARN guía 3	ATGGTCGCCGCCATTGCCGG	79
OsEPSPS-ARN guía 4	GACCTCCACGCCGCCGGCAA	80
OsEPSPS-ARN guía 5	TAGTCATGTGACCATCCCTG	81
OsEPSPS-ARN guía 6	TTGACTCTTTGGTTCATGCT	82

Se han construido varios vectores de doble blanco diferentes:

pQY002061 pHUE411-EPSPS-sgRNA1+3

pQY002062 pHUE411-EPSPS-sgRNA2+3

pQY002063 pHUE411-EPSPS-sgRNA1+4

pQY002064 pHUE411-EPSPS-sgRNA2+4

pQY002093 pHUE411-EPSPS-sgRNA2+5

pQY002094 pHUE411-EPSPS-sgRNA2+6

(2) Con los cebadores de detección relevantes que se muestran en la siguiente tabla, se amplificaron los fragmentos que contienen los sitios blanco en ambos lados o los fragmentos predichos generados por la fusión del promotor UBI2 y la región codificadora de HPPD, y la longitud de los productos está entre 300 1000 pb.

Cebador	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO
EPSPSinversion checkF1	ATCCAAGTTACCCCCTCTGC	83
EPSPSinversion checkR1	CACAAACACAGCCACCTCAC	84
EPSPSinversion check-nestF2	ATGTCCACGTCCACACCATA	85
EPSPSinversion check-nestR2	AATGGAATTCACGCAAGAGG	86
EPSPSinversion checkF3	GTAGGGGTTCTTGGGGTTGT	87

EPSPSinversion checkR3	CGCATGCTAACTTGAGACGA	88
EPSPSinversion check-nestF4	GGATCGTGTTCACCGACTTC	89
EPSPSinversion check-nestR4	CCGGTACAACGCACGAGTAT	90
EPSPSinversion checkF5	GGCGTCATTCCATGGTTGATTGT	91
EPSPSinversion checknestF6	GATAGACCCAGATGGGCATAGAATC	92
EPSPSinversion checkR5	TGCATGCATTGATGGTTGGTGC	93
EPSPSinversion checknestR6	CCGGCCCTTAGAATAAAGGTAGTAG	94

Después de la transformación de protoplastos, los resultados de la detección mostraron que se obtuvieron los eventos de inversión esperados. Como se muestra en la Figura 15, el resultado de la secuenciación de la detección de inversión del protoplasto transformado con el vector pQY002062 se mostró en la SEQ ID NO: 11; el resultado de la

secuenciación de la detección por supresión del protoplasto transformado con vector pQY002062 se mostró en SEQ ID NO: 12; el resultado de la secuenciación de la detección de inversión del protoplasto transformado con el vector pQY002093 se mostró en SEQ ID NO: 13; y el resultado de la secuenciación de la detección por supresión del protoplasto transformado con el vector pQY002093 se mostró en SEQ ID NO: 14.

Estos vectores se transfirieron a *Agrobacterium* para transformar callos de arroz. Se obtuvieron plantas que contienen el nuevo gen de EPSPS. Los resultados del bioensayo de herbicidas mostraron que las plantas tenían una resistencia evidente al herbicida glifosato.

Ejemplo 8: Un método de edición para knocking up la expresión de el gen de PPO endógeno en *Arabidopsis*

La protoporfirinógeno oxidasa (PPO) fue uno de los principales blancos de los herbicidas. Mediante la PPO endógena de plantas de alta expresión, la resistencia a los herbicidas inhibidores de la PPO se puede incrementar significativamente. El gen de PPO de *Arabidopsis* (como se muestra en SEQ ID NO: 1, en el que 1–2058bp fue el promotor y el resto fue la región de expresión) ubicado en el cromosoma 4, y el gen ubiquitina10 (como se muestra en SEQ ID NO: 2, en el que 1–2078 pb era el promotor y el resto era la región de expresión) ubicado 1,9 M corriente abajo con la misma dirección que el gen PPO.

Como se muestra en el Esquema ilustrado en la Figura 3, se generan simultáneamente rupturas de cadena doble en los sitios entre el promotor y la región CDS de los genes de PPO y ubiquitina10 respectivamente. Los eventos de duplicación de la región entre las dos rupturas se pueden obtener mediante pruebas, es decir, un nuevo gen generado mediante la fusión del promotor de ubiquitina10 y la región codificadora de PPO. Además, siguiendo el Esquema 2 como se muestra en la Figura 1, también se puede crear un nuevo gen en el que el promotor de ubiquitina10 y la región codificadora de PPO se fusionaron.

Con este fin, se utilizó pHEE401E como esqueleto (https://www.addgene.org/71287/), y se utilizaron las siguientes ubicaciones como sitios blanco:

Nombre del ARNsg blanco	Secuencia (5' a 3)	SEQ ID NO
AtPPO-ARN guía 1	CAAACCAAAGAAAAAGTATA	95
AtPPO-ARN guía 2	GGTAATCTTCTTCAGAAGAA	96
AtPPO-ARN guía 3	ATCATCTTAATTCTCGATTA	97
AtPPO-ARN guía4	TTGTGATTTCTATCTAGATC	98

Los vectores de blanco doble se construyeron siguiendo el método descripto por "Wang ZP, Xing HL, Dong L, Zhang HY, Han

CY, Wang XC, Chen QJ. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in Arabidopsis in a single generation. Genome Biol. 2015 Jul 21;16:144.":

pQY002076	pHEE401E-AtPPO-sgRNA1+3
pQY002077	pHEE401E-AtPPO-sgRNA1+4
pQY002078	pHEE401E-AtPPO-sgRNA2+3
pQY002079	pHEE401E-AtPPO-sgRNA2+4

Arabidopsis se transformó de acuerdo con el método de la siguiente manera:

(1) Transformación con *Agrobacterium*

Las células competentes de *Agrobacterium* GV3101 se transformaron con los plásmidos recombinantes para obtener *Agrobacterium* recombinante

(2) Preparación de la solución de infección con *Agrobacterium*

1) Se transformaron células competentes *Agrobacterium* GV3101 con los plásmidos recombinantes para obtener *Agrobacterium* recombinante.

(2) Preparación de la solución de infección por *Agrobacterium*

1) Se inoculó *Agrobacterium* activado en 30 ml de medio líquido YEP (que contiene 25 mg/L de Rif y 50 mg/L de Kan), se cultivó a 28 °C con agitación a 200 rpm durante la noche hasta que el valor de OD600 fue de aproximadamente 1,0-1,5.

2) Las bacterias se recolectaron por centrifugación a 6000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante.

3) Las bacterias se resuspendieron en la solución de infección (sin necesidad de ajustar el pH) para alcanzar una OD600 = 0,8 para su uso posterior.

(3) Transformación de *Arabidopsis*

1) Antes de la transformación de la planta, las plantas deben crecer bien con una inflorescencia exuberante y sin respuesta al estrés. La primera transformación se puede realizar siempre que la altura de la planta alcance los 20 cm. Cuando el suelo estuvo seco, se realizó el riego según corresponda. El día antes de la transformación, las silicuas crecidas se cortaron con tijeras.

2) La inflorescencia de la planta para transformar se sumergió en la solución anterior durante 30 segundos a 1 minuto con agitación suave. La planta infiltrada debe tener una capa de película líquida sobre ella.

3) Después de la transformación, la planta se cultivó en la oscuridad durante 24 horas y luego se llevó a un ambiente de luz normal para el cultivo.

4) Después de una semana, se realizó la segunda transformación de la misma forma.

(4) Recolección de semillas

Las semillas se recolectaron cuando estaban maduras. Las semillas recolectadas se secaron en un horno a 37 °C durante

aproximadamente una semana.

(5) Selección de plantas transgénicas

Las semillas se trataron con desinfectante durante 5 minutos, se lavaron con ddH_2O 5 veces y luego se esparcieron uniformemente en medio de selección MS (que contiene 30 µg/ml de Hyg, 100 µg/ml de Cef). Luego se colocó el medio en una incubadora de luz (a una temperatura de 22 ℃, 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, intensidad de luz 100–150 µmol/m^2/s y una humedad del 75%) para el cultivo. Se seleccionaron las plántulas positivas y se trasplantaron al suelo después de una semana.

(6) Detección de plantas mutantes T1

(6,1) Extracción de ADN genómico

1) Se cortaron aproximadamente 200 mg de hojas de Arabidopsis y se colocaron en un tubo de centrífuga de 2 ml. Se agregaron bolas de acero y las hojas se trituraron con un disruptor tisular de alto rendimiento.

2) Después de triturar a fondo, se agregaron 400 µL de buffer de extracción SDS y se mezclaron por inversión. La mezcla se incubó en un baño de agua a 65 ℃ durante 15 minutos y se mezcló por inversión cada 5 minutos durante el período.

3) La mezcla se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos.

4) Se retiraron 300 µl de sobrenadante y se transfirieron a un nuevo tubo de centrífuga de 1,5 ml, se agregó un volumen igual de isopropanol preenfriado a −20 °C en el tubo de

centrífuga y luego el tubo de centrífuga se mantuvo a −20 °C durante 1 hora o toda la noche.

5) La mezcla se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante.

6) Se añadieron 500 µl de etanol 70% al tubo de centrífuga para lavar el precipitado, la solución de lavado se descartó después de la centrifugación (sin descartar cuidadosamente el precipitado). Después de que el precipitado se secó a temperatura ambiente, se agregaron 30 µl de ddH_2O para disolver el ADN y luego se almacenó a −20 °C.

(6,2) Amplificación por PCR

Con el genoma extraído de la planta T1 como molde, se amplificó el fragmento blanco con los cebadores de detección. Se tomaron 5 µl del producto de amplificación y se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, y luego se obtuvieron imágenes mediante un generador de imágenes en gel. El producto restante fue secuenciado directamente por una empresa de secuenciación.

Los resultados de la secuenciación mostraron que la duplicación del gen AtPPO1 se logró con éxito en Arabidopsis, y la prueba de resistencia a herbicidas mostró que la planta con duplicación tenía resistencia al herbicida PPO.

Ejemplo 9: Creación del gen GH1 con nuevas características de expresión en pez cebra

Los genes de la hormona del crecimiento (GH) en los peces

controlaron su velocidad de crecimiento y desarrollo. En la actualidad, la alta expresión del gen GH en los salmones del Atlántico a través de la tecnología transgénica podría aumentar significativamente sus tasas de crecimiento. La técnica fue de gran valor económico, pero solo fue aprobada para su comercialización después de décadas. El gen GH1 era el gen de la hormona del crecimiento en el pez cebra. En la presente invención, los promotores adecuados en el pez cebra (adecuados en términos de expresión continua, intensidad y especificidad tisular) se fusionaron in vivo mediante supresión, inversión, duplicación, duplicación de inversión, transferencia de cromosomas, etc., para crear una variedad de pescado de crecimiento rápido.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la descripción se incorporan en la presente como referencia, como si cada publicación o solicitud de patente se incorporara individual y específicamente en la presente como referencia.

Aunque la invención anterior se ha descrito con más detalle por medio de ejemplos y realizaciones para una comprensión clara, es obvio que ciertos cambios y modificaciones se pueden implementar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, tales cambios y modificaciones están dentro del alcance de la presente invención.

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 ~~organismo~~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 nuevo gen obtenible mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14.~~

~~16. El nuevo gen de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado por que, en comparación con el gen original, el nuevo gen tiene un promotor diferente y por tanto se expresa con diferentes características espaciotemporales o diferentes características de intensidad o diferentes características de etapa de desarrollo, o tiene una nueva secuencia de aminoácidos; preferentemente, la "nueva secuencia de aminoácidos" puede ser una fusión integral de dos o más regiones codificadoras génicas, o una fusión parcial de regiones codificadoras o una duplicación de una parte de región codificadora proteica del mismo gen.~~

~~17. El nuevo gen de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, caracterizado por que el nuevo gen es un gen de HPPD, EPSPS, PPO o GH1 endógeno altamente expresado en el organismo.~~

~~18. Un ADN que contiene el gen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-17.~~

~~19. Una proteína codificada por el gen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-17, o un fragmento biológicamente activo de la misma.~~

~~20. Un vector de expresión recombinante, que comprende el gen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-17 y un promotor unido operativamente a este.~~

~~21. Un casete de expresión que comprende el gen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-17.~~

~~22. Una célula huésped, que comprende el casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 21.~~

~~23. Un organismo regenerado de la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 22.~~

~~24. Uso del gen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-17 para conferir o mejorar un rasgo de resistencia/tolerancia o un rasgo de ventaja de crecimiento en un organismo.~~

~~25. Una composición, que comprende:~~

~~(a) un promotor de uno de dos genes con diferentes patrones de expresión y una región codificadora o región de ARN no codificadora del otro gen;~~

~~(b) un promotor para una región no traducida 5' de uno de dos genes con diferentes patrones de expresión y una región codificadora o región de ARN no codificadora del otro gen;~~

~~(c) elementos génicos adyacentes en el mismo gen;~~

~~(d) una región de señal de localización de uno de los dos genes codificadores proteicos con diferentes localizaciones subcelulares y una región codificadora de proteína madura del otro gen;~~

~~(e) dos dominios proteicos con diferentes funciones biológicas;~~

~~(f) dominios proteicos adyacentes en el mismo gen; o,~~

~~(g) un dominio proteico y un promotor adyacente, región no traducida 5', región no codificadora 3' o terminador en el mismo gen.~~

~~26.~~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.

~~27.~~17. ~~Un~~ 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, ~~caracterizado por~~ 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.

~~28.~~18. El método de edición de acuerdo con la reivindicación ~~2~~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.

~~29.~~19. El método de edición de acuerdo con la reivindicación 17 o 18~~27 o 28~~, 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.

~~30. Un gen de HPPD, EPSPS o PPO endógeno de planta de alta expresión obtenible mediante el método de edición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27-29.~~

~~31.~~20. Un gen de HPPD aislado ~~endógeno~~ de arroz ~~de alta expresión~~, 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.

~~32.~~21. Un gen de EPSPS aislado ~~endógeno~~ de arroz ~~de alta expresión~~, 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.

~~33.~~22. Un gen de PPO aislado ~~endógeno~~ de arroz ~~de alta expresión~~, 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.

~~34.~~23. Un ADN que comprende el gen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones ~~30-33~~20-22.

~~35. Una proteína o un fragmento biológicamente activo de la misma codificada por el gen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 30-33.~~

~~36.~~24. Un vector de expresión recombinante, que comprende el gen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones ~~30-33~~20-22, y un promotor unido operativamente a este.

~~37.~~25. Un casete de expresión que comprende el gen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones ~~30-33~~20-22.

~~38. Una célula huésped de planta, que comprende el casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 37.~~

~~39. Una planta regenerada de la célula huésped de planta de acuerdo con la reivindicación 38.~~

~~40.~~26. Un método para producir una planta con un aumento de resistencia o tolerancia a un herbicida, que comprende regenerar ~~la~~ una célula huésped de planta modificada por el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaci~~ó~~ones ~~38~~17-19 en una planta ~~y una progenie derivada de la misma~~.

~~41. Un arroz resistente a un herbicida, que comprende uno o una combinación de dos o más del gen de HPPD endógeno de arroz de alta expresión de acuerdo con la reivindicación 31, el gen de EPSPS endógeno de arroz de alta expresión de acuerdo con la reivindicación 32, y el gen de PPO endógeno de arroz de alta expresión de acuerdo con la reivindicación 33.~~

~~Un método para controlar una maleza en un sitio de cultivo de una planta, en donde la planta se selecciona entre el grupo que consiste en la planta de acuerdo con la reivindicación 39, una planta preparada mediante el método de acuerdo con la reivindicación 40, o el arroz de acuerdo con la reivindicación 41, en donde el método comprende aplicar al sitio de cultivo uno o más herbicidas inhibidores de HPPD, EPSPS o PPO en una cantidad para controlar de forma eficaz la maleza.~~

TRADUCCIÓN PÚBLICA

UN MÉTODO PARA EDITAR UN GEN EN UNA CÉLULA DE UN ORGANISMO

Campo técnico

La presente invención se refiere a los campos técnicos de ingeniería genética y bioinformática, y en particular, un método para crear un nuevo gen en un organismo en ausencia de un molde de ADN artificial y su uso.

Arte previo

En términos generales, un casete de expresión génica completo en un organismo comprende un promotor, región no traducida 5′ (5′ UTR), región codificadora (CDS) o región de ARN no codificadora (ARN no codificadora), región no traducida 3′ (3′ UTR), un terminador y muchos otros elementos. El ARN no codificadora puede realizar sus funciones biológicas a nivel de ARN, que incluye ARNr, ARNt, ARNsn, ARNsno y microARN. La región CDS contiene exones e intrones. Una vez que el ARN transcripto se traduce en una proteína, los aminoácidos de diferentes segmentos usualmente forman dominios diferentes. Los dominios específicos determinan la localización intracelular y la función de la proteína (tal como la señal de localización nuclear, péptido líder del cloroplasto, péptido líder mitocondrial, dominio de unión al ADN, dominio de activación de transcripción, centro catalítico enzimático, etc.). Para el ARN no codificadora, diferentes segmentos también tienen diferentes funciones. Cuando uno o varios

elementos de un gen cambian, se formará un nuevo gen, que puede tener nuevas funciones. Por ejemplo, un evento de inversión de un fragmento de cromosoma de 1,7 Mb ocurrido corriente arriba del gen PpOFP1 del durazno plano puede producir un nuevo promotor, que aumentará significativamente la expresión de PpOFP1 en frutos de durazno con forma plana en la etapa S2 del desarrollo del fruto en comparación con el de la fruta durazno con forma redonda, inhibe así el desarrollo vertical de la fruta de durazno y da como resultado el fenotipo de forma plana en durazno plano (Zhou et al. 2018. A 1,7–Mb chromosomal inversion downstream of a PpOFP1 gene is responsible for flat fruit shape in peach. Plant Biotechnol. J. DOI: 10,1111/pbi,13455).

La generación natural de nuevos genes en genomas biológicos requiere un largo proceso evolutivo. Según el trabajo de investigación, los mecanismos moleculares para la generación de nuevos genes incluyen reordenamiento de exones, duplicación de genes, retrotransposición e integración de elementos móviles (transposones, retrotransposones), transferencia horizontal de genes, división por fusión de genes, origen de novo y muchos otros mecanismos y los nuevos genes se pueden conservar en las especies bajo la acción de la selección natural a través de la derivación y evolución funcional. Los nuevos genes relativamente jóvenes que se han identificado en la mosca de la fruta, *Arabidopsis thaliana* y

primates tienen una historia de cientos de miles a millones de años de acuerdo con un un cálculo ((Long et al. 2012. The origin and evolution of new genes. Methods Mol Biol. DOI: 10,1007/978-1-61779-585-5_7). Por lo tanto, en el campo de la ingeniería genética y el mejoramiento biológico, tomando como ejemplo las plantas, si se desea introducir un nuevo gen en una planta (incluso si todos los elementos genéticos del nuevo gen se derivan de diferentes genes de la propia especie), solo se puede lograr a través de la tecnología transgénica. Es decir, los elementos de diferentes genes se ensamblan entre sí in vitro para formar un nuevo gen, que luego se transfiere a la planta mediante tecnología transgénica. Se caracteriza porque el ensamblaje de un nuevo gen se debe realizar in vitro, lo que produce resultado cultivos transgénicos.

Las herramientas de edición de genes representadas por CRISPR/Cas9 y similares pueden generar rupturas de cadena doble (DSB) de manera eficiente y precisa en sitios específicos del genoma de un organismo, y luego las rupturas de cadena doble (DSB) se reparan a través de mecanismos de reparación de extremos no homólogos de la propia célula o de recombinación homóloga, de este modo se generan mutaciones específicas del sitio. Las aplicaciones actuales de la técnica de edición de genes se centran principalmente en la edición de los elementos internos de un gen único, principalmente la edición de un exón regio CDS. La edición de un exón

generalmente da como resultado mutaciones de cambio de marco en el gen, lo que lleva a la pérdida de la función del gen. Por este motivo, las herramientas de edición de genes tal como CRISPR/Cas9 también se conocen como herramientas de inactivación de genes (es decir, destrucción de genes). Además de la región CDS, el promotor, 5'UTR y otras regiones también se pueden inactivar para afectar el nivel de expresión de un gen. Todos estos métodos mutan genes existentes sin generar nuevos genes, por lo que es difícil satisfacer algunas necesidades de producción. Por ejemplo, en la mayoría de los genes, a la tecnología de edición de genes existente se le hace difícil lograr la regulación por aumento de la expresión génica y también es difícil cambiar la localización subcelular de una proteína o cambiar el dominio funcional de la proteína. También hay informes en la bibliografía sobre la inserción de una secuencia promotora o potenciadora corriente arriba de un gen existente para cambiar el patrón de expresión del gen a fin de producir nuevos rasgos (Lu et al. 2020. Targeted, efficient sequence insertion and replacement in rice. Nat Biotechnol. DOI: 10,1038/s41587-020-0581-5), pero este método requiere la provisión de moldes de ADN extraño, por lo que se aplican procedimientos regulatorios estrictos similares a los cultivos genéticamente modificados, y la aplicación está restringida.

Síntesis de la invención

Para resolver los problemas mencionados anteriormente en la técnica anterior, la presente invención proporciona un método para crear un nuevo gen en un organismo en ausencia de un molde de ADN artificial al generar simultáneamente dos o más rupturas de cadena doble de ADN en una combinación de sitios específicos en el genoma del organismo y su uso.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para crear un nuevo gen en un organismo, que comprende las siguientes etapas:

generar simultáneamente rupturas de ADN en dos o más sitios específicos diferentes en el genoma del organismo, en donde los sitios específicos son sitios genómicos capaces de separar diferentes elementos genéticos o diferentes dominios de proteínas, ligar las rupturas de ADN entre sí mediante una unión de extremos no homólogos (NHEJ o reparación homóloga, lo que genera una nueva combinación de los diferentes elementos génicos o diferentes dominios de proteínas que son diferentes de la secuencia del genoma original, de este modo se crea el nuevo gen.

En una forma de realización específica, los "dos o más sitios específicos diferentes" pueden estar ubicados en el mismo cromosoma o en cromosomas diferentes. Cuando se localizan en el mismo cromosoma, el fragmento cromosómico resultante de las rupturas del ADN que ocurren simultáneamente

en dos sitios específicos se puede suprimir, invertir o duplicar después de la reparación; cuando se localizan en diferentes cromosomas, las rupturas de ADN generadas en dos sitios específicos se pueden ligar entre sí después de la reparación para producir un evento de cruzamiento de los brazos cromosómicos. Estos eventos se pueden identificar y analizar mediante secuenciación por PCR con cebadores diseñados específicamente.

En una forma de realización específica, los "dos o más sitios específicos diferentes" pueden ser sitios específicos en al menos dos genes diferentes, o pueden ser al menos dos sitios específicos diferentes en el mismo gen.

En una forma de realización específica, las direcciones de transcripción de "al menos dos genes diferentes" pueden ser iguales o diferentes (opuestas o una hacia la otra).

En una forma de realización específica, las "rupturas del ADN" se producen mediante la administración de una nucleasa con propiedad de direccionamiento a una célula del organismo para que entre en contacto con los sitios específicos del ADN genómico. No existe una diferencia esencial entre este tipo de rupturas de ADN y las rupturas de ADN producidas por técnicas tradicionales (tales como radiación o mutagénesis química).

En una forma de realización específica, la "nuclease con propiedad de direccionamiento" se selecciona de la

Meganucleasa, nucleasa de dedos de cinc (ZFN), TALEN, y el sistema CRISPR/Cas.

Entre ellos, el sistema CRISPR/Cas puede generar dos o más rupturas de cadena doble de ADN en diferentes sitios del genoma a través de dos o más ARN líder dirigidos a diferentes secuencias; al diseñar por separado la proteína ZFN o la proteína TALEN en dos o más secuencias de sitios específicos, los sistemas de nucleasa de dedo de zinc y TALEN pueden generar simultáneamente rupturas de cadena doble de ADN en dos o más sitios. Cuando dos rupturas se ubican en el mismo cromosoma, se pueden producir resultados de reparación tal como supresión, inversión y duplicación; y cuando dos rupturas se ubican en dos cromosomas diferentes, puede ocurrir un cruzamiento de brazos cromosómicos. La supresión, inversión, duplicación e intercambio de segmentos cromosómicos en dos rupturas de ADN pueden recombinar diferentes elementos de genes o dominios de proteínas, de este modo se crea un nuevo gen funcional.

En una forma de realización específica, la "nucleasa con propiedad de direccionamiento" existe en la forma de ADN.

En otra forma de realización específica, la "nucleasa con propiedad de dirección" existe en forma de ARNm o proteína, en lugar de en forma de ADN.

En una forma de realización específica, el método para administrar las nucleasas con propiedad de direccionamiento

en la célula se selecciona de un grupo que consiste en: 1) transfección celular mediada por PEG; 2) transfección celular mediada por liposomas; 3) transformación por shock eléctrico; 4) microinyección; 5) bombardeo con pistola genética; o 6) transformación mediada por *Agrobacterium.*

Los "elementos del gen" comprenden un promotor, una región no traducida 5 '(5'UTR), una región codificadora (CDS) o una región de ARN no codificadora (ARN no codificadora), una región no traducida 3' (3'UTR) y un terminador del gen.

En una forma de realización específica, la combinación de diferentes elementos genéticos se refiere a una combinación del promotor de uno de los dos genes con diferentes patrones de expresión y la CDS o región de ARN no codificadora del otro gen.

En una forma de realización específica, una de las combinaciones de diferentes elementos genéticos se refiere a un promotor endógeno fuerte e el organismo, y el otro es una región codificadora del gen de HPPD, EPSPS, PPO o GH1.

En otra forma de realización específica, la combinación de diferentes elementos genéticos se refiere a una combinación de una región del promotor a la 5'UTR de uno de dos genes con diferentes patrones de expresión y la CDS o región de ARN no codificadora del otro gen.

En una forma de realización específica, los "diferentes patrones de expresión" se refieren a diferentes niveles de

expresión génica.

En otra forma de realización específica, los “diferentes patrones de expresión” se refieren a diferentes especificidades de tejido de la expresión génica.

En otra forma de realización específica, los “diferentes patrones de expresión” se refieren a diferentes especificidades de etapa de desarrollo de la expresión génica.

En otra forma de realización específica, la combinación de diferentes elementos genéticos es una combinación de elementos genéticos adyacentes dentro del mismo gen.

Los “dominios de proteína” se refieren a un fragmento de ADN correspondiente a un dominio funcional específico de una proteína; incluye, pero sin limitación, señal de localización nuclear, péptido líder del cloroplasto, péptido líder mitocondrial, sitio de fosforilación, sitio de metilación, dominio de transmembrana, dominio de unión al ADN, dominio de activación de la transcripción, dominio de activación del receptor, centro catalítico de enzimas, etc.

En una forma de realización específica, la combinación de diferentes dominios de proteína se refiere a una combinación de una región de la señal de localización de uno de dos genes codificadores de proteína con diferentes localizaciones subcelulares y una región codificadora de la proteína madura del otro gen.

En una forma de realización específica, las “diferentes

localizaciones subcelulares” incluyen, pero no se limitan a, una localización nuclear, una localización citoplásmica, una localización de la membrana celular, una localización de cloroplasto, una localización mitocondrial o una localización de la membrana del retículo endoplásmico.

En otra forma de realización específica, la combinación de diferentes dominios de proteína se refiere a una combinación de dos dominios de proteína con diferentes funciones biológicas.

En una forma de realización específica, las “diferentes funciones biológicas” incluyen, pero sin limitación, el reconocimiento de una secuencia conservada de ADN o ARN específico, activación de la expresión génica, unión al ligando de proteína, unión a la señal de molécula pequeña, unión de iones o reacción enzimática específica.

En otra forma de realización específica, la combinación de diferentes dominios de proteína se refiere a una combinación de dominios de proteína adyacentes en el mismo gen.

En otra forma de realización específica, la combinación de elementos genéticos y dominios de proteína se refiere a una combinación de dominios de proteína y promotores, 5’UTR, 3’UTR o terminadores adyacentes en el mismo gen.

Específicamente, el intercambio de promotores de diferentes genes se puede lograr mediante la inversión de

fragmentos cromosómicos: cuando dos genes ubicados en el mismo cromosoma tienen direcciones diferentes, se pueden generar rupturas de ADN en sitios específicos entre el promotor y el CDS de cada uno de los dos genes, la región entre las rupturas se puede invertir, por lo que los promotores de estos dos genes se pueden intercambiar y se pueden generar dos genes nuevos en ambos extremos del segmento cromosómico invertido. Las diferentes direcciones de los dos genes pueden ser que sus extremos 5’ sean internos, es decir, ambos genes estén en direcciones opuestas, o que sus extremos 5’ sean externos, es decir, ambos genes estén uno hacia el otro. Cuando los genes están en direcciones opuestas, los promotores de los genes se pueden invertir, como se muestra en el Esquema 1 de la Figura 2; donde los genes están uno hacia el otro, las regiones CDS de los genes se puede invertir, como se muestra en el Esquema 1 de la Figura 4. La región invertida puede ser tan corta como menor de 10 kb de longitud, sin otros genes entre ellos; o la región invertida puede ser muy larga, alcanzando hasta 300 kb–3 Mb y contener cientos de genes.

También es posible crear un nuevo gen mediante la duplicación de un fragmento cromosómico: cuando dos genes ubicados en el mismo cromosoma están en la misma dirección, se pueden generar rupturas de ADN en sitios específicos entre el promotor y la CDS de cada uno de los dos genes, la región entre las rupturas se puede duplicar por duplicación, y se

puede crear un nuevo gen en la unión del segmento duplicado mediante la fusión del promotor del gen corriente abajo con la región CDS del gen corriente arriba, como se muestra en la Figura 1 Esquema 1 y Figura 3. La longitud de la región duplicada puede estar en el rango de 500 pb a 5 Mb, que puede ser muy corta sin otros genes entre ellos, o puede ser muy larga para contener cientos de genes. Aunque este método inducirá mutaciones puntuales en las regiones entre los promotores y la región CDS de los dos genes originales, tales mutaciones puntuales a pequeña escala generalmente tienen poco efecto sobre las propiedades de la expresión génica, mientras que los nuevos genes creados por el reemplazo del promotor tendrán nuevas propiedades de expresión. O alternativamente, se pueden generar rupturas de ADN en posiciones específicas en ambos lados de un dominio de proteína de un mismo gen, y la región entre las rupturas se puede duplicar, de este modo se crea un nuevo gen con dominios funcionales específicos duplicados.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para crear un nuevo gen en un organismo, que comprende las siguientes etapas:

generar rupturas de ADN en sitios específicos en al menos dos genes diferentes al nivel del genoma o cromosoma del organismo, inducir la transferencia, duplicación, inversión o supresión del ADN, de modo que un elemento genético

específico de un gen endógeno y un elemento genético en otro gen endógeno se puede ligar mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación homóloga, de este modo se crea un nuevo gen.

La presente invención también proporciona un nuevo gen que se puede obtener mediante el presente método.

En comparación con los genes originales, el nuevo gen puede tener un promotor diferente y por lo tanto tener características de expresión en términos de tejidos o intensidades o etapas de desarrollo, o tener nuevas secuencias de aminoácidos.

La "nueva secuencia de aminoácidos" puede ser una fusión de las regiones codificadoras completas o parciales de dos o más genes, o una duplicación de una región codificadora de proteína parcial del mismo gen.

En una forma de realización específica, el nuevo gen es un gen HPPD, EPSPS, PPO o GH1 endógeno de alta expresión en un organismo.

La presente invención también proporciona un gen que contiene el ADN.

La presente invención también proporciona una proteína codifica por el gen, o fragmento biológicamente activo de este.

La presente invención también proporciona a vector de expresión recombinante, que comprende el gen y un promotor

unido operativamente de este.

La presente invención también proporciona un casete de expresión que contiene el gen.

La presente invención también proporciona a célula huésped, que comprende el casete de expresión. Con preferencia, la célula huésped es una célula de planta, una célula animal o una célula fúngica.

La presente invención además proporciona un organismo regenerado a partir de la célula huésped.

La presente invención además proporciona el uso del gen para conferir o mejorar un rasgo de resistencia/tolerancia o rasgo de ventaja de crecimiento en un organismo.

La presente invención además proporciona una composición, que comprende:

(a) el promotor de uno de dos genes con diferentes patrones de expresión y una región codificadora o región de ARN no codificadora del otro gen;

(b) una región entre el promotor y la región no traducida 5’ de uno de dos genes con diferentes patrones de expresión y una región codificadora o región de ARN no codificadora del otro gen;

(c) elementos genéticos adyacentes dentro del mismo gen;

(d) una región de la señal de localización de uno de los dos genes codificadores de proteína con diferentes localizaciones subcelulares y una región codificadora de la

proteína madura del otro gen;

(e) dos dominios de proteína con diferentes funciones biológicas;

(f) dominios de proteína adyacentes en el mismo gen; o,

(g) un dominio de proteína y un promotor, región no traducida 5', región no codificadora 3' o terminador adyacente en el mismo gen.

En una forma de realización específica, los "diferentes patrones de expresión" se refieren a diferentes niveles de expresión génica.

En otra forma de realización específica, los "diferentes patrones de expresión" se refieren a diferentes especificidades de tejido de la expresión génica.

En otra forma de realización específica, los "diferentes patrones de expresión" se refieren a diferentes especificidades de etapa de desarrollo de la expresión génica.

En una forma de realización específica, las "diferentes localizaciones subcelulares" incluyen, pero sin limitación, localización nuclear, localización citoplásmica, localización de la membrana celular, localización del cloroplasto, localización mitocondrial o localización de la membrana del retículo endoplásmico.

En una forma de realización específica, los "diferentes funciones biológicas" incluyen, pero sin limitación, reconocimiento de secuencia conservada de ADN o ARN específico,

activación de la expresión génica, unión a ligando de proteína, unión a señal de molécula pequeña, unión de iones o reacción enzimática específica.

En una forma de realización específica, la composición se fusiona in vivo.

En particular, la presente invención también proporciona un método de edición de aumento del nivel de expresión de un gen endógeno blanco en un organismo independiente de un fragmento de donante de ADN exógeno, que comprende las siguientes etapas: generar simultáneamente rupturas de ADN en sitio específicos entre el promotor y la CDS 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 la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación homóloga para formar la fusión in vivo de la región codificadora del gen endógeno blanco y el promotor endógeno fuerte opcional, de este modo se crea un nuevo gen endógeno de alta expresión. Este método se denomina como un método de edición para knocking-up un gen endógeno.

En una forma de realización específica, el gen endógeno blanco y el gen endógeno de alta expresión opcional se ubican en el mismo cromosoma.

En otra forma de realización específica, el gen endógeno blanco y el gen endógeno de alta expresión opcional se ubican en cromosomas diferentes.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de edición para knocking up la expresión del gen de HPPD endógeno en una planta, que comprende fusionar la región codificadora del gen de HPPD con un promotor endógeno de planta fuerte in vivo para formar un nuevo gen HPPD endógeno vegetal de alta expresión. Es decir, se generan simultáneamente rupturas de ADN en los sitios específicos entre el promotor y la CDS de cada uno del gen de HPPD y un gen endógeno de alta expresión opcional, se ligan las rupturas de ADN entre sí a través de una vía de reparación intracelular para formar la fusión in vivo de la región codificadora del gen de HPPD y el promotor fuerte endógeno opcional, de este modo se crea un nuevo gen de HPPD de alta expresión. En el arroz, el promotor fuerte con preferencia es un promotor del gen de ubiquitina2.

La presente invención también proporciona un gen HPPD endógeno vegetal de alta expresión que se puede obtener por el método de edición anterior.

La presente invención también proporciona un gen HPPD endógeno de arroz de alta expresión que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

(1) una secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 o una secuencia parcial de este, o una secuencia complementaria de esta;

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

(3) una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse con la secuencia mostrada en (1) o (2) en una condición rigurosa.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de edición para knocking up la expresión de un gen de EPSPS endógeno en una planta, que comprende la fusión de la región codificadora de un gen EPSPS con un promotor endógeno de planta fuerte in vivo para formar un nuevo gen de EPSPS endógeno de planta de alta expresión. Es decir, se generan simultáneamente rupturas de ADN en los sitios específicos entre el promotor y la CDS de cada uno del gen EPSPS y un gen endógeno de alta expresión opcional, se ligan las rupturas de ADN entre sí a través de una vía de reparación intracelular para formar la fusión in vivo de la región codificadora del gen EPSPS y el promotor endógeno fuerte opcional, de este modo se crea un nuevo gen EPSPS de alta expresión. En el arroz, el promotor fuerte con preferencia es un promotor del gen de TKT.

La presente invención también proporciona un gen de EPSPS endógeno de planta de alta expresión que se puede obtener por el método de edición anterior.

La presente invención también proporciona un gen de EPSPS

endógeno de arroz de alta expresión que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

(1) la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14 o una secuencia parcial de esta, o una secuencia complementaria de esta;

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

(3) una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse con la secuencia mostrada en (1) o (2) en una condición rigurosa.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de edición para knocking up la expresión de un gen de PPO (PPOX) endógeno en una planta, que comprende fusionar la región codificadora del gen de PPO con un promotor endógeno de planta fuerte in vivo para formar un nuevo gen de PPO endógeno de planta de alta expresión. Es decir, se generan simultáneamente rupturas de ADN en los sitios específicos entre el promotor y la CDS de cada uno del gen de PPO y un gen endógeno de alta expresión opcional, se ligan las rupturas de ADN entre sí a través de una vía de reparación intracelular para formar la fusión in vivo de la región codificadora del gen de PPO y el promotor endógeno fuerte opcional, de este

modo se crea un nuevo gen de PPO de alta expresión. En el arroz, el promotor fuerte con preferencia es un promotor del gen de CP12. En *Arabidopsis thaliana*, el promotor fuerte con preferencia es un promotor del gen de ubiquitina 10.

La presente invención también proporciona un gen de PPO endógeno de planta de alta expresión que se puede obtener por el método de edición anterior.

La presente invención también proporciona un gen de PPO endógeno de arroz de alta expresión que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

(1) la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, o SEQ ID NO: 26 o una secuencia parcial de esta, o una secuencia complementaria de esta;

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

(3) una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridarse con la secuencia mostrada en (1) o (2) en una condición rigurosa.

La presente invención también proporciona un ADN que contiene el gen de HPPD, EPSPS o PPO.

La presente invención también proporciona una proteína

codificada por el gen de HPPD, EPSPS o PPO o un fragmento biológicamente activo de este.

La presente invención también proporciona un vector de expresión recombinante, que comprende el gen de HPPD, EPSPS o PPO, y un promotor unido operativamente a este.

La presente invención además proporciona un casete de expresión que comprende el gen de HPPD, EPSPS o PPO.

La presente invención además proporciona a célula huésped de planta, que comprende el casete de expresión.

La presente invención además proporciona una planta regenerada a partir de la célula huésped de planta.

La presente invención también proporciona un método para producir una planta con un aumento de resistencia o tolerancia a un herbicida, que comprende regenerar la célula huésped de planta en una planta y/o progenie de esta.

En una forma de realización específica, la planta con aumento de resistencia o tolerancia a herbicidas es una línea no transgénica que se puede obtener mediante el cruzamiento de una planta regenerada de la célula huésped de planta de la invención con una planta de tipo salvaje para eliminar el componente transgénico exógeno a través de la segregación genética.

La presente invención también proporciona un arroz resistente a herbicidas, que comprende cualquiera de los anteriormente mencionados gen de HPPD endógeno de arroz de

alta expresión, gen de EPSPS endógeno de arroz de alta expresión, gen de PPO endógeno de arroz de alta expresión o cualquiera de sus combinaciones.

En una forma de realización específica, el arroz resistente a herbicidas es no transgénico.

La presente invención además proporciona el uso del gen de HPPD, EPSPS o PPO endógeno de planta de alta expresión para mejorar la resistencia o tolerancia a un herbicida inhibidora en una célula de planta, tejido de planta, parte de una planta o una planta.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para controlar una maleza en un sitio de cultivo de plantas, en donde la planta comprende la planta mencionada anteriormente o una planta preparada mediante el método mencionado anteriormente, que comprende aplicar al sitio de cultivo uno o más herbicidas inhibidores de HPPD, EPSPS o PPO en una cantidad para controlar eficazmente la maleza.

En el trabajo de investigación de los inventores, se descubrió que en las células que se someten simultáneamente a la edición de genes de doble blanco o múltiples blancos, una cierta proporción de los extremos de las rupturas de cadena doble del ADN en diferentes blancos se ligaron espontáneamente entre sí, lo que produce eventos de supresión, inversión o duplicación: duplicación de los fragmentos entre los blancos del mismo cromosoma y/o intercambio de fragmentos

cromosómicos entre los blancos en diferentes cromosomas. Se ha informado en la bibliografía que este fenómeno comúnmente existe en plantas y animales (Puchta et al. 2020. Changing local recombination patterns in Arabidopsis by CRISPR/Cas mediated chromosome engineering. Nat Commun. DOI: 10,1038/s41467-020- 18277-z; Li et al. 2015. Efficient inversions and duplications of mammalian regulatory DNA elements and gene clusters by CRISPR/Cas9. J Mol Cell Biol. DOI: 10,1093/jmcb/mjv016).

Los presentes inventores descubrieron sorprendentemente que, mediante la inducción de las rupturas de cadena doble de ADN en una combinación de blancos de edición de genes cerca de elementos específicos de un gen de interés, que causa el ligamiento de reparación espontánea, se puede lograr una combinación dirigida de diferentes elementos genéticos en el nivel del genoma sin la necesidad proporcionar un molde de ADN extraño, y es posible producir a partir del mismo un nuevo gen funcional. Esta estrategia acelera enormemente la creación de nuevos genes y tiene un gran potencial en el mejoramiento genético de animales y plantas y la investigación de la función genética.

Descripción detallada de la invención

En la presente invención, a menos que se especifique lo contrario, los términos científicos y técnicos utilizados en

la presente tienen los significados comúnmente entendidos por los expertos en la técnica. Además, la química de proteínas y ácidos nucleicos, biología molecular, cultivo de células y tejidos, microbiología, los términos relacionados con la inmunología y los procedimientos de laboratorio usados en la presente son todos términos y procedimientos de rutina ampliamente usados en los campos correspondientes. Por ejemplo, el ADN recombinante estándar y las técnicas de clonación molecular utilizadas en la presente invención son bien conocidas por los expertos en la técnica y se describen completamente en los siguientes documentos: Sambrook, J., Fritsch, EF and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989. Para una mejor comprensión de la presente invención, a continuación se proporcionan definiciones y explicaciones de términos relacionados.

El término “genoma”, como se usa en la presente, se refiere a todos los complementos de material genético (genes y secuencias no codificadoras) presentes en cada célula, virus u organela de un organismo, y/o genoma completo heredado de un padre como una unidad (haploide).

El término “edición de genes” se refiere a estrategias y técnicas para la modificación específica dirigida de cualquier información genética o genoma de organismos vivos. Por tanto, el término incluye la edición de regiones

codificadoras de genes, pero también incluye la edición de regiones distintas de las regiones codificadoras de genes del genoma. También incluye editar o modificar otra información genética de núcleos (si están presentes) y células.

El término "nucleasa CRISPR/Cas" puede ser una nucleasa basada en CRISPR o una secuencia de ácido nucleico que codifica la misma, que incluye pero sin limitación: 1) Cas9, que incluye SpCas9, ScCas9, SaCas9, xCas9, VRER-Cas9, EQR-Cas9, SpG-Cas9, SpRY-Cas9, SpCas9-NG, NG-Cas9, NGA-Cas9 (VQR), etc.; 2) Cas12, que incluye LbCpf1, FnCpf1, AsCpf1, MAD7, etc., o cualquier variante o derivado de la nucleasa basada en CRISPR mencionada anteriormente; con preferencia, en donde la al menos una nucleasa basada en CRISPR comprende una mutación en comparación con la secuencia de tipo salvaje correspondiente, de modo que la nucleasa basada en CRISPR obtenida reconoce una secuencia de PAM diferente. Como se usa en la presente, "nucleasa basada en CRISPR" es cualquier nucleasa que se ha identificado en un sistema CRISPR natural, que posteriormente se aísla de su contexto natural, y que con preferencia se ha modificado o combinado en un constructo recombinante de interés, adecuada como herramienta para la ingeniería del genoma dirigida. Siempre que la nucleasa basada en CRISPR de tipo salvaje original proporcione reconocimiento de ADN, es decir, propiedades de unión, se puede usar cualquier nucleasa basada en CRISPR y, opcionalmente,

reprogramar o mutar de otro modo para que sea adecuada para diversas realizaciones de la invención.

El término "CRISPR" se refiere a una técnica de manipulación genética específica de secuencia que se basa en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, que es diferente de la interferencia de ARN que regula la expresión génica a nivel transcripcional.

"Cas9 nucleasa" y "Cas9" se usan indistintamente en la presente y se refieren a nucleasa guiada por ARN que comprende la proteína Cas9 o un fragmento de esta (por ejemplo, una proteína que contiene el dominio de escisión de ADN activo de Cas9 y/o el dominio de unión de ARNg de Cas9). Cas9 es un componente del sistema de edición del genoma CRISPR/Cas (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas y sistemas asociadas). Puede dirigir y cortar secuencias blanco de ADN bajo la guía de ARN guía para formar rupturas de cadena doble de ADN (DSB).

"Proteína Cas" o "polipéptido Cas" se refiere a un polipéptido codificado por el gen Cas (asociado a CRISPR). La proteína Cas incluye la endonucleasa Cas. La proteína Cas puede ser una proteína bacteriana o arqueal. Por ejemplo, las proteínas CRISPR Cas de tipos I a III de la presente generalmente se originan a partir de procariotas; las proteínas Cas de tipo I y tipo III se pueden derivare de especies de bacterias o arqueas, y la proteína Cas de tipo II

(es decir, Cas9) se pueden derivar de especies bacterianas. Las "proteínas Cas" incluyen proteína Cas9, proteína Cpf1, proteína C2c1, proteína C2c2, proteína C2c3, Cas3, Cas3-HD, Cas5, Cas7, Cas8, Cas10, Cas12a, Cas12b, o una combinación o complejo de estos.

"Variante Cas9" o "variante de endonucleasa Cas9" se refiere a una variante de la endonucleasa Cas9 original, en donde cuando se asocia con ARNcr y ARNtrac o con ARNsg, la variante de endonucleasa Cas9 conserva la capacidad de reconocer, unirse a todo o parte de una secuencia de ADN blanco y, opcionalmente, desenrollar todo o parte de una secuencia blanco de ADN, mellar toda o parte de una secuencia blanco de ADN, o cortar toda o parte de una secuencia blanco de ADN. Las variantes de endonucleasa Cas9 incluyen las variantes de endonucleasa Cas9 descritas en la presente, en donde las variantes de endonucleasa Cas9 son diferentes de la endonucleasa Cas9 original de la siguiente manera: las variantes de endonucleasa Cas9 (cuando se complejan con ARNg para formar un complejo de endonucleasa dirigido por polinucleótidos capaz de modificar un sitio blanco) tienen al menos una propiedad mejorada, tal como, pero sin limitación, aumento de eficiencia de transformación, aumento de eficiencia de edición de ADN, disminución del corte fuera del blanco o cualquiera de sus combinaciones, en comparación con la endonucleasa Cas9 original (complejada con el mismo ARNg

para formar un complejo de endonucleasa guiado por polinucleótidos capaz de modificar el mismo sitio blanco).

Las variantes de endonucleasa Cas9 descritas en la presente incluyen variantes que se pueden unir y mellar sitios blanco de ADN de cadena doble cuando se asocian con ARNcr y ARNtracr o con ARNsg, mientras que la endonucleasa Cas original se puede unir al sitio blanco y producir una ruptura (escisión) de cadena doble cuando se asocia con ARNcr y ARNtracr o con ARNsg.

"ARN guía" y "ARNg" se usan indistintamente en la presente y se refieren a una secuencia de ARN guía que se usa para dirigir un gen específico para la corrección usando tecnología CRISPR, que generalmente consiste en moléculas de ARNcr y ARNtracr que son parcialmente complementarias para formar un complejo, en donde el ARNcr contiene una secuencia que tiene suficiente complementariedad con la secuencia blanco para hibridar con la secuencia blanco y dirigir el complejo CRISPR (Cas9 + ARNcr + ARNtracr) para unirse específicamente a la secuencia blanco. Sin embargo, se sabe en la técnica que se puede diseñar un ARN guía único (ARNg), que contiene tanto las propiedades del ARNcr como del ARNtracr.

Los términos "ARN guía único" y "ARNsg" se usan indistintamente en la presente y se refieren a la fusión sintética de dos moléculas de ARN, que comprende una fusión de un ARNcr (ARN CRISPR) de un dominio de direccionamiento

variable (unido a una secuencia de apareamiento de tracr hibridada con ARNtracr) y un ARNtracr (ARN CRISPR trans-activador). El ARNsg puede comprender ARNcr o fragmentos de ARNcr y ARNtracr o fragmentos de ARNtracr del sistema CRISPR/Cas de tipo II que pueden formar un complejo con la endonucleasa Cas de tipo II, donde el complejo de ARN guía/endonucleasa Cas puede guiar la endonucleasa Cas hacia un sitio blanco de ADN para que la endonucleasa Cas pueda reconocer, unirse opcionalmente al sitio blanco del ADN y, opcionalmente, mellar el sitio blanco del ADN o cortar (introducir una ruptura de cadena simple o doble) el sitio blanco del ADN.

En ciertas realizaciones, el ARN guía y Cas9 se pueden administrar a una célula como un complejo de ribonucleoproteína (RNP). La RNP está compuesta de proteína Cas9 purificada complejada con ARNg y es bien sabido en la técnica que la RNP se puede administrar eficazmente a muchos tipos de células, que incluyen, pero sin limitación, las células madre y las células inmunitarias (Addgene, Cambridge, MA, Mirus Bio LLC, Madison, WI).

El motivo adyacente del protoespaciador (PAM) en la presente se refiere a una secuencia de nucleótidos corta adyacente a una secuencia blanco (dirigida) (preespaciador) reconocida por el sistema de ARNg/endonucleasa Cas. Si la secuencia de ADN blanco no es adyacente a una secuencia PAM

apropiada, es posible que la endonucleasa Cas no pueda reconocer con éxito la secuencia de ADN blanco. La secuencia y longitud de PAM en la presente pueden ser diferentes de acuerdo con la proteína Cas o del complejo de proteína Cas en uso. La secuencia PAM puede tener cualquier longitud, pero normalmente tiene una longitud de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos.

Como se usa en la presente, el término "organismo" incluye animales, plantas, hongos, bacterias y similares.

Como se usa en la presente, el término "célula huésped" incluye células de planta, células animales, células fúngicas, células bacterianas y similares.

En la presente invención, se debe entender por "planta" cualquier organismo multicelular diferenciado capaz de realizar la fotosíntesis, en particular plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas, por ejemplo, (1) cultivos alimenticios: Oryza spp., like Oryza sativa, Oryza latifolia, Oryza sativa, Oryza glaberrima; Triticum spp., como Triticum aestivum, T. Turgidumssp. durum; Hordeum spp., como Hordeum vulgare, Hordeum arizonicum; Secale cereale; Avena spp., como Avena sativa, Avena fatua, Avena byzantine, Avena fatua var.sativa, Avena hybrida; Echinochloa spp., como Pennisetum glaucum, Sorghum, Sorghum bicolor, Sorghum vulgare, Triticale, Zea mays o Maize, Millet, Rice, Foxtail millet, Proso millet, Sorghum bicolor, Panicum, Fagopyrum spp., Panicum miliaceum,

Setaria italica, Zizania palustris, Eragrostis tef, Panicum miliaceum, Eleusine coracana; (2) cultivos de leguminosas: Glycine spp. like Glycine max, Soja hispida, Soja max, Vicia spp., Vigna spp., Pisum spp., poroto, Lupinus spp., Vicia, Tamarindus indica, Lens culinaris, Lathyrus spp., Lablab, haba, poroto mungo, poroto rojo, garbanzo; (3) cultivos oleaginosos: Arachis hypogaea, Arachis spp, Sesamum spp., Helianthus spp. como Helianthus annuus, Elaeis like Eiaeis guineensis, Elaeis oleifera, soja, Brassicanapus, Brassica oleracea, Sesamum orientale, Brassica juncea, colza oleaginosa, Camellia oleifera, palma oleaginosa, oliva, ricino, Brassica napus L., canola; (4) cultivos de fibra: Agave sisalana, Gossypium spp. like Gossypium, Gossypium barbadense, Gossypium hirsutum, Hibiscus cannabinus, Agave sisalana, Musa textilis Nee, Linum usitatissimum, Corchorus capsularis L, Boehmeria nivea (L.), Cannabis sativa, Cannabis sativa; (5) cultivos de frutass: Ziziphus spp., Cucumis spp., Passiflora edulis, Vitis spp., Vaccinium spp., Pyrus communis, Prunus spp., Psidium spp., Punica granatum, Malus spp., Citrullus lanatus, Citrus spp., Ficus carica, Fortunella spp., Fragaria spp., Crataegus spp., Dospyros spp., Eugenia unifora, Eriobotrya japonica, Dimocarpus longan, Carica papaya, Cocos spp., Averrhoa carambola, Actinidia spp., Prunus amygdalus, Musa spp. (musa acuminate), Persea spp. (Persea Americana), Psidium guajava, Mammea Americana, Mangifera indica, Canarium

album (Oleaeuropaea), Caricapapaya, Cocos nucifera, Malpighia emarginata, Manilkara zapota, Ananas comosus, Annona spp., Citrus reticulate (Citrus spp.), Artocarpus spp., Litchi chinensis, Ribes spp., Rubus spp., pera, durazno, damasco, ciruela, arándano rojo, limón, kumquat, durian, naranja, frutilla, arándano, melón hami, melón, palmera datilera, nogal, cerezo; (6) cultivos de rizoma: Manihot spp., Ipomoea batatas, Colocasia esculenta, mostaza de tubérculo, Allium cepa (cebolla), eleocharis tuberose (castaña de agua), Cyperus rotundus, Rhizoma doscoreae; (7) cultivos de hortalizas: Spinacia spp., Phaseolus spp., Lactuca sativa, Momordica spp, Petroselinum crispum, Capsicum spp., Solanum spp. (tales como Solanum tuberosum, Solanum integrifolium, Solanum lycopersicum), Lycopersicon spp. (tales como Lycopersicon esculentum, Lycopersicon lycopersicum, Lycopersicon pyriforme), Macrotyloma spp., Kale, Luffa acutangula, lentejas, quimbombó, cebolla, papa, alcaucil, espárragos, brócoli, repollitos de Bruselas, repollo, zanahoria, coliflor, apio, berza, calabaza Benincasa hispida, Asparagus officinalis, Apium graveolens, Amaranthus spp., Allium spp., Abelmoschus spp., Cichorium endivia, Cucurbita spp., Coriandrum sativum, B.carinata, Rapbanus sativus, Brassica spp. (tales como Brassica napus, Brassica rapa ssp., canola, colza, colza oleaginosa, colza, mostaza de hoja, repollo, mostaza negra, canola (colza), repollitos de

Bruselas, Solanaceae (berenjena), Capsicum annuum (pimiento dulce), pepino, luffa, repollo chino, canola, repollo, calabaza, cebollino chino, loto, raíz de loto, lechuga; (8) cultivos de flores: Tropaeolum minus, Tropaeolum majus, Canna indica, Opuntia spp., Tagetes spp., Cymbidium (orchid), Crinum asiaticum L., Clivia, Hippeastrum rutilum, Rosa rugosa, Rosa Chinensis, Jasminum sambac, Tulipa gesneriana L., Cerasus sp., Pharbitis nil (L.) Choisy, Calendula officinalis L., Nelumbo sp., Bellis perennis L., Dianthus caryophyllus, Petunia hybrida, Tulipa gesneriana L., Lilium brownie, Prunus mume, Narcissus tazetta L., Jasminum nudiflorum Lindl., Primula malacoides, Daphne odora, Camellia japonica, Michelia alba, Magnolia liliiflora, Viburnum macrocephalum, Clivia miniata, Malus spectabilis, Paeonia suffruticosa, Paeonia lactiflora, Syzygium aromaticum, Rhododendron simsii, Rhododendron hybridum, Michelia figo (Lour.) Spreng., Cercis chinensis, Kerria japonica, Weigela florida, Fructus forsythiae, Jasminum mesnyi, Parochetus communis, Cyclamen persicum Mill., Phalaenophsis hybrid, Dendrobium nobile, Hyacinthus orientalis, Iris tectorum Maxim, Zantedeschia aethiopica, Calendula officinalis, Hippeastrum rutilum, Begonia semperflorenshybr, Fuchsia hybrida, Begonia maculataRaddi, Geranium, Epipremnum aureum; (9) cultivos medicinales: Carthamus tinctorius, Mentha spp., Rheum rhabarbarum, Crocus sativus, Lycium chinense, Polygonatum

odoratum, Polygonatum Kingianum, Anemarrhena asphodeloides Bunge, Radix ophiopogonis, Fritillaria cirrhosa, Curcuma aromatica, Amomum villosum Lour., Polygonum multiflorum, Rheum officinale, Glycyrrhiza uralensis Fisch, Astragalus membranaceus, Panax ginseng, Panax notoginseng, Acanthopanax gracilistylus, Angelica sinensis, Ligusticum wallichii, Bupleurum sinenses DC., Datura stramonium Linn., Datura metel L., Mentha haplocalyx, Leonurus sibiricus L., Agastache rugosus, Scutellaria baicalensis, Prunella vulgaris L., Pyrethrum carneum, Ginkgo biloba L., Cinchona ledgeriana, Hevea brasiliensis (salvaje), Medicago sativa Linn, Piper Nigrum L., Radix Isatidis, Atractylodes macrocephala Koidz; (10) cultivos de materia prima: Hevea brasiliensis, Ricinus communis, Vernicia fordii, Morus alba L., Hops Humulus lupulus, Betula, Alnus cremastogyne Burk., Rhus verniciflua stokes; (11) cultivos de pastura: Agropyron spp., Trifolium spp., Miscanthus sinensis, Pennisetum sp., Phalaris arundinacea, Panicum virgatum, prairiegrasses, Indiangrass, Big bluestem grass, Phleum pratense, turf, cyperaceae (Kobresia pygmaea, Carex pediformis, Carex humilis), Medicago sativa Linn, Phleum pratense L., Medicago sativa, Melilotus suavcolen, Astragalus sinicus, Crotalaria juncea, Sesbania cannabina, Azolla imbircata, Eichhornia crassipes, Amorpha fruticosa, Lupinus micranthus, Trifolium, Astragalus adsurgens pall, Pistia stratiotes linn, Alternanthera philoxeroides, Lolium;

(12) cultivos de azúcar: Saccharum spp., Beta vulgaris; (13) cultivos de bebidas: Camellia sinensis, Camellia Sinensis, té, café (Coffea spp.), Theobroma cacao, Humulus lupulus Linn.; (14) cultivos de césped: Ammophila arenaria, Poa spp.(Poa pratensis (pasto azul)), Agrostis spp. (Agrostis matsumurae, Agrostis palustris), Lolium spp. (Lolium), Festuca spp. (Festuca ovina L.), Zoysia spp. (Zoysiajaponica), Cynodon spp. (Cynodon dactylon/bermudagras) , Stenotaphrum secunda tum (Stenotaphrum secundatum), Paspalum spp., Eremochloa ophiuroides (pasto ciempiés), Axonopus spp. (alfombra), Bouteloua dactyloides (pasto búfalo), Bouteloua var. spp. (Bouteloua gracilis), Digitaria sanguinalis, Cyperusrotundus, Kyllingabrevifolia, Cyperusamuricus, Erigeron canadensis, Hydrocotylesibthorpioides, Kummerowiastriata, Euphorbia humifusa, Viola arvensis, Carex rigescens, Carex heterostachya, césped; (15) cultivos de árboles: Pinus spp., Salix spp., Acer spp., Hibiscus spp., Eucalyptus spp., Ginkgo biloba, Bambusa sp., Populus spp., Prosopis spp., Quercus spp., Phoenix spp., Fagus spp., Ceiba pentandra, Cinnamomum spp., Corchorus spp., Phragmites australis, Physalis spp., Desmodium spp., Populus, Hedera helix, Populus tomentosa Carr, Viburnum odoratissinum, Ginkgo biloba L., Quercus, Ailanthus altissima, Schima superba, Ilex pur-purea, Platanus acerifolia, ligustrum lucidum, Buxus megistophylla Levl., Dahurian larch, Acacia mearnsii, Pinus massoniana, Pinus

khasys, Pinus yunnanensis, Pinus finlaysoniana, Pinus tabuliformis, Pinus koraiensis, Juglans nigra, Citrus limon, Platanus acerifolia, Syzygium jambos, Davidia involucrate, Bombax malabarica L., Ceiba pentandra (L.), Bauhinia blakeana, Albizia saman, Albizzia julibrissin, Erythrina corallodendron, Erythrina indica, Magnolia gradiflora, Cycas revolute, Lagerstroemia indica, coniferous, macrophanerophytes, Frutex; (16) cultivos de nueces: Bertholletia excelsea, Castanea spp., Corylus spp., Carya spp., Juglans spp., Pistacia vera, Anacardium occidentale, Macadamia (Macadamia integrifolia), Carya illinoensis Koch, Macadamia, Pistachio, Badam, otras plantas que producen nueces; (17) otros: arabidopsis thaliana, Bra chiaria eruciformis, Cenchrus echinatus, Setaria faberi, eleusine indica, Cadaba farinose, algas, Carex elata, plantas ornamentales, Carissa macrocarpa, Cynara spp., Daucus carota, Doscorea spp., Erianthus sp., Festuca arundinacea, Hemerocallis fulva, Lotus spp., Luzula sylvatica, Medicago sativa, Melilotus spp., Morus nigra, Nicotiana spp., Olea spp., Ornithopus spp., Pastinaca sativa, Sambucus spp., Sinapis sp., Syzygium spp., Tripsacum dactyloides, Triticosecale rimpaui, Viola odorata, y similares.

En una forma de realización específica, la planta se selecciona de arroz, maíz, trigo, soja, girasol, sorgo, colza, alfalfa, algodón, cebada, mijo, caña de azúcar, tomate, tabaco, mandioca, papa, banana, repollo chino, repollo, pepino, rosa

china, *Scindapsus aureus*, sandía, melón, frutilla, arándano, uva, manzana, cítricos, durazno, pera, banana, etc.

Como se usa en la presente, el término "planta" incluye una planta completa y cualquier progenie, célula, tejido o parte de la planta. El término "parte de la planta" incluye cualquier parte de una planta, que incluye, por ejemplo, pero sin limitación: semilla (que incluye semilla madura, embrión inmaduro sin cubierta de semilla y semilla inmadura); corte de plantas; célula de planta; cultivo de células de planta; órgano de planta (por ejemplo, polen, embrión, flor, fruto, yema, hoja, raíz, tallo y explante relacionado). El tejido de planta o el órgano de planta pueden ser semillas, tejido calloso o cualquier otra población de células de plantas organizadas en una unidad estructural o funcional. Algunas células de plantas o cultivos de tejidos pueden regenerar una planta que tiene las características fisiológicas y morfológicas de la planta de la que se deriva la célula o tejido, y pueden regenerar una planta que tiene sustancialmente el mismo genotipo que la planta. Por el contrario, algunas células de plantas no pueden regenerar plantas. Las células regenerables en las células de plantas o cultivos de tejidos pueden ser embriones, protoplastos, células meristemáticas, callos, polen, hojas, anteras, raíces, puntas de las raíces, estigmas, flores, granos, espigas, mazorcas, cáscaras o tallos.

Las partes de la planta comprenden partes cosechables y partes que se pueden usar para propagar plantas descendientes. Las partes de la planta que se pueden usar para la propagación incluyen, por ejemplo, pero sin limitación: semillas; frutas; esquejes; plántulas; tubérculos y portainjertos. Las partes cosechables de las plantas pueden ser cualquiera de las partes útiles de las plantas, que incluyen, por ejemplo, pero sin limitación: flores; polen; plántulas; tubérculos hojas; tallos; frutas; semillas y raíces.

Las células de planta son las unidades estructurales y fisiológicas de las plantas. Como se usa en la presente, las células de planta incluyen protoplastos y protoplastos con paredes celulares parciales. Las células de planta pueden estar en forma de células individuales aisladas o agregados celulares (por ejemplo, callos sueltos y células cultivadas), y pueden ser parte de unidades de tejido de orden superior (por ejemplo, tejidos de planta, órganos de planta y plantas intactas). Por lo tanto, las células de planta pueden ser protoplastos, células productoras de gametas, o células o colección de células capaces de regenerar una planta completa. Por lo tanto, en las realizaciones de la presente, una semilla que contiene una pluralidad de células de planta y que se puede regenerar en una planta completa se considera como una “parte de la planta”.

Como se usa en la presente, el término “protoplasto” se

refiere a una célula de planta cuya pared celular está completamente o parcialmente eliminada y cuya membrana de bicapa lipídica está expuesta. Normalmente, el protoplasto es una célula de planta aislada sin pared celular, que tiene el potencial de regenerar un cultivo celular o una planta completa.

La "descendencia" de la planta incluye cualquier generación posterior de la planta.

Los términos "tolerancia a herbicidas inhibidores" y "resistencia a herbicidas inhibidores" se pueden usar indistintamente, y ambos se refieren a tolerancia y resistencia a un herbicida inhibidor. "Mejora en la tolerancia al herbicida inhibidor" y "mejora en la resistencia al herbicida inhibidor" significan que la tolerancia o resistencia al herbicida inhibidor se mejora en comparación con una planta que contiene el gen de tipo salvaje.

El término "tipo salvaje" se refiere a una molécula de ácido nucleico o proteína que se puede encontrar en la naturaleza.

En la presente invención, el término "sitio de cultivo" comprende un sitio donde se cultiva la planta de la presente invención, tal como suelo, y también comprende, por ejemplo, semillas de plantas, plántulas de plantas y plantas cultivadas. El término "cantidad efectiva para el control de malezas" se refiere a una cantidad de herbicida que es suficiente para

afectar el crecimiento o desarrollo de la maleza blanco, por ejemplo, para prevenir o inhibir el crecimiento o desarrollo de la maleza blanco o matar la maleza. Ventajosamente, la cantidad efectiva para el control de malezas no afecta significativamente al crecimiento y/o desarrollo de las semillas de plantas, plántulas de plantas o plantas de la presente invención. Los expertos en la técnica pueden determinar dicha cantidad efectiva para el control de malezas mediante experimentos de rutina.

El término "gen" comprende un fragmento de ácido nucleico que expresa una molécula funcional (tal como, pero sin limitación, una proteína específica), incluidas las secuencias reguladoras antes (secuencias no codificadoras 5') y después (secuencias no codificadoras 3') a secuencia codificadoras.

La secuencia de ADN que "codifica" un ARN específico es una secuencia de ácido nucleico de ADN que se puede transcribir en ARN. Los polinucleótidos de ADN pueden codificar un ARN (ARNm) que se puede traducir a una proteína, o los polinucleótidos de ADN pueden codificar un ARN que no se puede traducir a una proteína (por ejemplo, ARNt, ARNr o ARN dirigido al ADN; conocido como ARN "no codificadora" o "ARNnc").

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente invención y se refieren a un

polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son análogos químicos artificiales de los aminoácidos correspondientes y naturales, así como a polímeros de aminoácidos naturales. Los términos "polipéptido", "péptido", "secuencia de aminoácidos" y "proteína" también pueden incluir sus formas de modificación, que incluyen pero sin limitación, glicosilación, enlace lipídico, sulfatación, γ-carboxilación de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP- ribosilación.

El término "fragmento biológicamente activo" se refiere a un fragmento que tiene uno o más residuos de aminoácidos suprimidos del extremo N y/o C-terminal de una proteína mientras que aún conserva su actividad funcional.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente y comprenden ADN, ARN o híbridos de estos, que pueden ser de cadena doble o cadena simple.

Los términos "secuencia de nucleótidos" y "secuencia de ácido nucleico" se refieren a la secuencia de bases en el ADN o ARN.

Los expertos en la técnica pueden usar fácilmente métodos conocidos, tales como métodos de evolución dirigida y mutación puntual, para mutar los fragmentos de ADN como se muestra en la SEQ ID No. 9 a SEQ ID No. 17 de la presente invención. Aquellas secuencias de nucleótidos modificadas

artificialmente que tienen al menos un 75% de identidad con cualquiera de las secuencias anteriores de la presente invención y exhiben la misma función se consideran derivados de la secuencia de nucleótidos de la presente invención y equivalentes a las secuencias de la presente invención.

El término "identidad" se refiere a la similitud de secuencia con una secuencia de ácido nucleico natural. La identidad de la secuencia se puede evaluar mediante observación o software de computadora. Usando un software de alineamiento de secuencias de computadora, la identidad entre dos o más secuencias se puede expresar como un porcentaje (%), que se puede usar para evaluar la identidad entre secuencias relacionadas. "Secuencia parcial" significa al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de una secuencia dada.

La condición rigurosa puede ser la siguiente: hibridación a 50 ℃ en una solución mixta de dodecilsulkfato de sodio 7% (SDS), $NaPO_4$ 0,5 M, y EDTA 1 mM, y lavado a 50 °C en 2× SSC y SDS 0,1%; o alternativamente: hibridación a 50 °C en una solución mixta de SDS 7%, $NaPO_4$ 0,5 M y EDTA 1 mM, y lavado a 50 °C en 1× SSC y SDS 0,1%; o alternativamente: hibridación a 50 °C en una solución mixta de SDS 7%, $NaPO_4$ 0,5 M y EDTA 1 mM, y lavado a 50 °C en 0,5× SSC y SDS 0,1%; o alternativamente: hibridación a 50 °C en una solución mixta de SDS 7%, $NaPO_4$ 0,5 M y EDTA 1 mM, y lavado a 50 °C en 0,1× SSC y SDS 0,1%;

o alternativamente: hibridación a 50 °C en una solución mixta de SDS 7%, $NaPO_4$ 0,5 M y EDTA 1 mM, y lavado a 65 ℃ en 0,1× SSC y SDS 0,1%; o alternativamente: hibridación a 65 ℃ en una solución de 6× SSC, 0,5% SDS, y luego el lavado de membrana con 2× SSC, SDS 0,1% y 1× SSC, SDS 0,1% cada vez; o alternativamente: hibridación y lavado de membrana dos veces en una solución de 2× SSC, SDS 0,1% a 68 ℃, 5 min cada vez, y luego hibridación y lavado de membrana dos veces en una solución de 0,5× SSC, SDS 0,1% a 68 °C, 15 min cada vez; o alternativamente: hibridación y lavado de membrana en una solución de 0,1× SSPE (o 0,1× SSC), SDS 0,1% a 65 ℃.

Como se usa en la presente invención, "casete de expresión", "vector de expresión" y "constructo de expresión" se refieren a un vector tal como un vector recombinante adecuado para la expresión de una secuencia de nucleótidos de interés en una planta. El término "expresión" se refiere a la producción de un producto funcional. Por ejemplo, la expresión de una secuencia de nucleótidos se puede referir a la transcripción de la secuencia de nucleótidos (tal como la transcripción para generar ARNm o ARN funcional) y/o la traducción de ARN en una proteína precursora o madura.

El "constructo de expresión" de la presente invención puede ser un fragmento de ácido nucleico lineal, un plásmido circular, un vector viral o, en algunas realizaciones, puede ser un ARN (tal como ARNm) que se puede traducir.

El “constructo de expresión” de la presente invención puede comprender secuencias reguladoras y secuencias de nucleótidos de interés de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias de nucleótidos de interés de la misma fuente pero dispuestas de una manera diferente de las que ocurren normalmente en la naturaleza.

El “gen de alta expresión” en la presente invención se refiere a un gen cuyo nivel de expresión es más alto que el de un gen común en un tejido específico.

Los términos “vector de expresión recombinante” o “constructo de ADN” se usan indistintamente en la presente y se refieren a una molécula de ADN que comprende un vector y al menos un inserto. Los vectores de expresión recombinantes se producen habitualmente con el propósito de expresión y/o propagación del inserto o para la construcción de otras secuencias de nucleótidos recombinantes. El inserto puede estar unido de forma operativa o no operativa a una secuencia promotora y puede estar unido de forma operativa o no operativa a una secuencia reguladora de ADN.

Los términos “secuencia reguladora” y “elemento regulador” se pueden usar indistintamente y se refieren a una secuencia de nucleótidos que se ubica en la corriente arriba (secuencia no codificadora 5’), media o corriente abajo (secuencia no codificadora 3’) de una secuencia codificadora y afecta la transcripción, procesamiento de ARN, estabilidad o traducción

de una secuencia codificadora relacionada. Los elementos reguladores de la expresión de plantas se refieren a secuencias de nucleótidos que pueden controlar la transcripción, el procesamiento del ARN o la estabilidad o traducción de una secuencia de nucleótidos de interés en plantas.

Las secuencias reguladoras pueden incluir, pero sin limitación, promotores, secuencias líder de traducción, intrones y secuencias de reconocimiento de poliA.

El término "promotor" se refiere a un fragmento de ácido nucleico capaz de controlar la transcripción de otro fragmento de ácido nucleico. En algunas realizaciones de la presente invención, el promotor es un promotor capaz de controlar la transcripción génica en células de planta, independientemente de si se deriva de células de planta. El promotor puede ser un promotor constitutivo o un promotor específico de tejido o un promotor regulado por el desarrollo o un promotor inducible.

El término "promotor fuerte" es un término bien conocido y ampliamente utilizado en la técnica. Se conocen en la técnica muchos promotores fuertes o se pueden identificar mediante experimentos de rutina. La actividad del promotor fuerte es mayor que la actividad del promotor unido operativamente a la molécula de ácido nucleico que se va a sobreexpresar en un organismo de tipo salvaje, por ejemplo,

un promotor con una actividad mayor que la del promotor de un gen endógeno. Con preferencia, la actividad del promotor fuerte es mayor en aproximadamente 2%, 5%, 8%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más del 1000% que la actividad del promotor unido operativamente a la molécula de ácido nucleico para sobreexpresarse en el organismo de tipo salvaje. Los expertos en la técnica saben cómo medir la actividad de un promotor y comparar las actividades de diferentes promotores.

El término "promotor constitutivo" se refiere a un promotor que generalmente producirá la expresión génica en la mayoría de los tipos de células en la mayoría de los casos. "Promotor específico de tejido" y "promotor preferido de tejido" se usan indistintamente y se refieren a un promotor que se expresa principalmente pero no en forma necesariamente exclusiva en un tejido u órgano, y también se expresa en una célula o tipo celular específico. "Promotor regulado por el desarrollo" se refiere a un promotor cuya actividad está determinada por un evento del desarrollo. El "promotor inducible" responde a un estímulo endógeno o exógeno (ambiente, hormona, señal química, etc.) para expresar selectivamente una secuencia de ADN operativamente unida.

Como se usa en la presente, el término "operativamente unido" se refiere a una conexión de un elemento regulador (por

ejemplo, pero sin limitación, secuencia promotora, secuencia de terminación de la transcripción, etc.) a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia codificadora o marco de lectura abierto) de manera que la transcripción de la secuencia de nucleótidos esté controlada y regulada por el elemento regulador de la transcripción. Las técnicas para unir operativamente la región del elemento regulador a la molécula de ácido nucleico son conocidas en la técnica.

La "introducción" de una molécula de ácido nucleico (tal como un plásmido, fragmento de ácido nucleico lineal, ARN, etc.) o proteína en una planta se refiere a transformar una célula de la planta con el ácido nucleico o la proteína para que el ácido nucleico o la proteína puede funcionar en la célula de planta. El término "transformación" usado en la presente invención comprende transformación estable y transformación transitoria.

El término "transformación estable" se refiere a que la introducción de una secuencia de nucleótidos exógena en el genoma de una planta produce una herencia estable del gen exógeno. Una vez transformada de manera estable, la secuencia de ácido nucleico exógeno se integra de manera estable en el genoma de la planta y cualquier generación sucesiva de la misma.

El término "transformación transitoria" se refiere a que la introducción de una molécula de ácido nucleico o proteína

en una célula de planta para realizar la función no produce una herencia estable del gen extraño. En la transformación transitoria, la secuencia de ácido nucleico exógeno no se integra en el genoma de la planta.

El cambio de la expresión de genes endógenos en organismos incluye dos aspectos: características de intensidad y espacio-temporales. El cambio de intensidad incluye el aumento (knock-up), la disminución (knock-down) y/o eliminación de la expresión del gen (knock-out); la especificidad espacio-temporal incluye la especificidad temporal (etapa de crecimiento y desarrollo) y la especificidad espacial (tejido), así como la capacidad de inducción. Además, incluye el cambio del direccionamiento de una proteína, por ejemplo, el cambio de la característica de localización citoplásmica de una proteína en una característica de localización de cloroplasto o localización nuclear.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente también se puede usar en la práctica o ensayo de la presente invención, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en esta descripción se incorporan en la presente como referencia como si cada publicación o patente individual estuviera indicada exacta e individualmente para ser incorporada como referencia, y se incorpora en la presente como referencia para divulgar y describir métodos y/o materiales relacionados con las publicaciones citadas. La mención de cualquier publicación que haya sido publicada antes de la fecha de presentación no se debe interpretar como una admisión de que la presente invención no sea elegible para preceder a la publicación de la invención existente. Además, la fecha de publicación proporcionada puede ser diferente de la fecha de publicación real, lo que puede requerir una verificación independiente.

A menos que se indique o implique específicamente, como se usa en la presente, los términos “un”, “una” y “el/la” significan “al menos uno”. Todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones mencionadas o citadas en la presente se incorporan aquí como referencia en su totalidad, con el mismo grado de citación que si se citaran individualmente.

La presente invención tiene los siguientes efectos técnicos ventajosos:

La presente invención usa de manera integral la información de los siguientes dos campos profesionales diferentes para desarrollar un método para crear directamente nuevos genes en organismos, cambiar por completo el uso

convencional de las herramientas de edición de genes originales (es decir, konck out de genes), realizar un nuevo uso de ellas para crear nuevos genes, en particular, realizar un método de edición para knocking up genes endógenos mediante el uso de tecnología de edición de genes para aumentar la expresión de genes blanco. La primera es la información en el campo de la edición de genes, es decir, cuando dos o más sitios blanco diferentes y Cas9 se dirigen simultáneamente al genoma u organismo, pueden ocurrir diferentes situaciones como tales como supresión, inversión, duplicación o inversión–duplicación. La segunda es la información en el campo de la genómica, es decir, la información sobre la ubicación y distancia de diferentes genes en el genoma, y ubicaciones, direcciones y funciones específicas de diferentes elementos (promotor, 5'UTR, región codificadora (CDS), diferentes regiones de dominio, terminador, etc.) en genes, y especificidad de expresión de diferentes genes, etc. Mediante la combinación de la información en estos dos campos diferentes, se inducen rupturas de ADN en sitios específicos de dos o más genes diferentes o en dos o más sitios específicos dentro de un gen único (los sitios específicos se pueden determinar en el campo de la genómica), se puede formar una nueva combinación de diferentes elementos genéticos o dominios funcionales mediante supresión, inversión, duplicación e inversión–duplicación o intercambio de brazos

cromosómicos, etc. (las situaciones específicas se pueden proporcionar en el campo de la edición de genes), de este modo se crea específicamente un nuevo gen en el organismo.

Los nuevos genes creados por la presente invención están formados por la fusión o recombinación de diferentes elementos de dos o más genes bajo la acción del mecanismo de reparación espontánea del ADN en el organismo para cambiar la intensidad de expresión, especificidad espacio-temporal, dominios funcionales especiales y similares del gen original sin un transgén exógeno o elementos génicos sintéticos. Debido a que el nuevo gen tiene la fusión de dos o más elementos genéticos diferentes, esto amplía enormemente el alcance de la mutación genética y producirá funciones más abundantes y diversas, por lo que tiene una amplia gama de perspectivas de aplicación. Al mismo tiempo, estos nuevos genes no están unidos a los vectores de edición de genes, por lo que los elementos del vector se pueden eliminar mediante la segregación genética y, por lo tanto, se produce materiales biológicos no transgénicos que contienen los nuevos genes para el mejoramiento genético de animales y plantas. Alternativamente, la edición transitoria no integrada se puede realizar mediante la administración de ARNm o complejo proteico de ácido ribonucleico (RNP) para crear materiales biológicos no modificados genéticamente que contienen los nuevos genes. Este proceso no es transgénico y los materiales editados

resultantes tampoco contendrían transgén. En teoría y en efecto, estos nuevos genes también se pueden obtener mediante técnicas de mejoramiento genético tradicionales (tales como radiación o mutagénesis química). La diferencia es que la detección con técnicas tradicionales requiere la creación de bibliotecas que contengan una gran cantidad de mutantes aleatorias y, por lo tanto, la detección de nuevos genes funcionales requiere mucho tiempo y es costosa. Si bien en la presente invención, se pueden crear nuevos genes funcionales mediante análisis bioinformático combinado con tecnología de edición de genes, la duración del mejoramiento genético se puede acortar en gran medida. El método de la presente invención no está obligado a las regulaciones actuales sobre organismos de edición de genes en muchos países.

Además, la tecnología de creación de nuevos genes de la presente invención se puede usar para cambiar muchos rasgos en organismos, incluido el crecimiento, desarrollo, resistencia, rendimiento, etc., y tiene un gran valor de aplicación. Los nuevos genes creados pueden tener nuevos elementos reguladores (tales como promotores), que cambiarán la intensidad de expresión y/o las características espacio-temporales de los genes originales, o tendrán nuevas secuencias de aminoácidos y por tanto tendrán nuevas funciones. Tomando los cultivos como ejemplo, el cambio de la expresión de genes específicos puede aumentar la resistencia de los

cultivos a organismos nocivos tales como plagas y malezas y estreses abióticos tales como sequía, anegamiento y salinidad, y también puede aumentar el rendimiento y mejorar la calidad. Tomando el pescado como ejemplo, el cambio de las características de expresión de la hormona del crecimiento en los peces puede cambiar significativamente su velocidad de crecimiento y desarrollo.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un diagrama esquemático de creación de un nuevo gen de HPPD en el arroz.

La Figura 2 muestra un diagrama esquemático de creación de un nuevo gen EPSPS en el arroz.

La Figura 3 muestra un diagrama esquemático de creación de un nuevo gen de PPOX en *Arabidopsis thaliana*.

La Figura 4 muestra un diagrama esquemático de creación de un nuevo gen de PPOX en el arroz.

La Figura 5 muestra los resultados de la secuenciación para el esquema de duplicación HPPD analizado con protoplasto de arroz

La Figura 6 muestra el mapa del vector de transformación de *Agrobacterium* pQY2091 para arroz.

La Figura 7 7 muestra los resultados de la electroforesis de los productos de PCR para la detección de nuevos fragmentos de genes en callos de arroz resistentes a higromicina

transformados con pQY2091. La flecha indica la banda de PCR del nuevo gen creado por la fusión del promotor del gen UBI2 con la región codificadora del HPPD. Los números son los números de las diferentes muestras de callos. M representa el marcador de ADN y los tamaños de banda son 100 pb, 250 pb, 500 pb, 750 pb, 1000 pb, 2000 pb, 2500 pb, 5000 pb, 7500 pb en orden.

La Figura 8 muestra los resultados de la electroforesis de los productos de PCR para la detección de nuevos fragmentos de genes en plántulas de arroz T0 transformadas con pQY2091. La flecha indica la banda de PCR del nuevo gen creado por la fusión del promotor del gen UBI2 con la región codificadora del HPPD. Los números son los números de serie de las diferentes plántulas T0. M representa el marcador de ADN, y los tamaños de banda son secuencialmente 100 pb, 250 pb, 500 pb, 750 pb, 1000 pb, 2000 pb, 2500 pb, 5000 pb, 7500 pb.

La Figura 9 muestra los resultados de la prueba para la resistencia a Shuangzuocaotong de la generación T0 QY2091 de la cepa duplicadora del gen HPPD. En la misma maceta, la Jinjing 818 de tipo salvaje está a la izquierda y la cepa duplicadora HPPD está a la derecha.

La Figura 10 muestra los niveles de expresión relativa de los genes HPPD y UBI2 en la generación T0 QY2091 de la cepa duplicadora del gen HPPD. 818CK1 y 818CK3 representan dos plantas de control del Jinjing 818 de tipo salvaje; 13M y 20M

representan las muestras de hojas de macollos primarios de las plantas T0 QY2091-13 y QY2091-20; 13L y 20L representan las muestras de hojas secundarias de macollos de las plantas QY2091-13 y QY2091-20 T0 utilizadas en la prueba de resistencia a herbicidas.

La Figura 11 muestra un diagrama esquemático de los posibles genotipos de la generación T1 QY2091 y los sitios de unión de los cebadores de detección molecular.

La Figura 12 muestra la comparación de los resultados de secuenciación que detectan la duplicación de HPPD y las secuencias duplicadas predichas para QY2091-13 y QY2091-20.

La Figura 13 muestra los resultados de la prueba de resistencia a herbicidas para la generación T1 de la cepa duplicadora QY2091 HPPD en la etapa de plántula.

La Figura 14 muestra un diagrama esquemático de los tipos de posibles eventos de edición de la inversión del fragmento cromosómico del gen PPO1 de arroz y los sitios de unión de los cebadores de detección molecular.

La Figura 15 muestra los resultados de secuenciación de la detección de inversión EPSPS.

La Figura 16 muestra el mapa del vector de transformación de arroz *Agrobacterium* pQY2234.

La Figura 17 muestra los resultados de la electroforesis de los productos de PCR para la detección de nuevos fragmentos de genes de callos de arroz resistentes a higromicina

transformados con pQY2234. La flecha indica la banda de PCR del nuevo gen creado por la fusión del promotor del gen CP12 con la región codificadora del PPO1. Los números son los números de serie de diferentes muestras de callos. M representa el marcador de ADN, y los tamaños de banda son secuencialmente 100 pb, 250 pb, 500 pb, 750 pb, 1000 pb, 2000 pb, 2500 pb, 5 pb, 7500 pb.

La Figura 18 muestra los resultados de la prueba de resistencia de la cepa 2081 de inversión del gen PPO1 de la generación T0 QY2234. Con la misma dosis de tratamiento, la maceta de la izquierda es el control Huaidao N.° 5 de tipo salvaje, y la derecha es la cepa de inversión PPO1.

La Figura 19 muestra los niveles de expresión relativa de los genes PPO1 y CP12 en la cepa de inversión de PPO1 de generación T0 QY2234. H5CK1 y H5CK2 representan dos plantas de control Huaidao No. 5 de tipo salvaje; 252M, 304M y 329M representan las muestras de hojas de macollos primarios de las plantas T0 QY2234-252, QY2234-304 y QY2234-329; 252L, 304L y 329L representan muestras de hojas secundarias de macollos.

La Figura 20 muestra la comparación del resultado de secuenciación de la inversión de PPO1 con la secuencia de inversión predicha en el fondo de Huaidao 5.

La Figura 21 muestra la comparación del resultado de secuenciación de la inversión de PPO1 con la secuencia de inversión predicha en el fondo de Jinjing 818.

La Figura 22 muestra los resultados de la prueba de resistencia a herbicidas para la generación T1 de la cepa de inversión QY2234 PPO1 en la etapa de plántula.

Modelos específicos para llevar a cabo la invención

La presente invención se describe adicionalmente junto con los ejemplos siguientes. La siguiente descripción es solo ilustrativa y el alcance de protección de la presente invención no debe limitarse a esto.

Ejemplo 1: Un método de edición para knocking up la expresión del gen de HPPD endógeno mediante la inducción de la duplicación del fragmento cromosómico en planta – prueba de protoplastos de arroz

El HPPD era una enzima clave en la vía de la síntesis de clorofila en las plantas, y la inhibición de la actividad del HPPD finalmente puede llevar a la clorosis albina y la muerte de las plantas. Muchos herbicidas, tales como mesotriona y topramezona, fueron inhibidores con la HPPD como proteína blanco y, por lo tanto, el aumento del nivel de expresión del gen HPPD endógeno en las plantas podría mejorar la tolerancia de las plantas a estos herbicidas. El gen HPPD de arroz (como se muestra en SEQ ID NO: 6, en el que 1–1067 pb es el promotor y el resto es la región de expresión) se localiza en el cromosoma 2 del arroz. Mediante análisis bioinformático, se encontró que la Ubiquitina2 del arroz (en adelante denominada como UBI2) (como se muestra en SEQ ID NO: 5, en el que 1–2107

pb fue el promotor, y el resto fue la región de expresión) se ubica aproximadamente 338 kb corriente abajo del gen HPPD, y el gen de UBI2 y el gen de HPPD fueron en la misma dirección en el cromosoma. De acuerdo con los datos del perfil de expresión génica del arroz proporcionados por el Proyecto Internacional de Secuenciación del Genoma del Arroz (http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml), la intensidad de expresión del gen de UBI2 en las hojas de arroz fue de 3 a 10 veces mayor que el del gen de HPPD, y el promotor del gen UBI2 era un promotor fuerte expresado constitutivamente.

Como se muestra en la Figura 1, el Esquema 1 muestra que las rupturas de cadena doble se generaron simultáneamente en los sitios entre los promotores y la región CDS de los genes de HPPD y UBI2 respectivamente, el evento de duplicar la región entre las dos rupturas se obtuvo después de la detección e identificación, y se podría formar un nuevo gen mediante la fusión del promotor de UBI2 y la región codificadora de HPPD. Además, de acuerdo con el Esquema 2, como se muestra en la Figura 1, un nuevo gen en el que el promotor de UBI2 y la región codificadora de HPPD se fusionaron también se podría formar mediante dos inversiones consecutivas. Primero, los esquemas que se muestran en la Figura 1 se probaron en el sistema de protoplasto de arroz de la siguiente manera:

1. En cebador lugar, las secuencias de ADN genómico de los genes de HPPD y UBI2 de arroz se introdujeron en la herramienta en línea CRISPOR (http://crispor.tefor.net/) para buscar sitios blanco de edición disponibles. Después de la puntuación en línea, se seleccionaron para las pruebas los siguientes sitios blanco entre los promotores y las regiones CDS de los genes de HPPD y UBI2:

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO
OsHPPD-ARN guía 1	GTGCTGGTTGCCTTGGCTGC	27
OsHPPD-ARN guía 2	CACAAATTCACCAGCAGCCA	28
OsHPPD-ARN guía 3	TAAGAACTAGCACAAGATTA	29
OsHPPD-ARN guía 4	GAAATAATCACCAAACAGAT	30

El ARN guía 1 y el ARN guía 2 ubicados entre el promotor y la región CDS del gen de HPPD, cerca del codón de inicio de la proteína HPPD, y el ARN guía 3 y el ARN guía 4 ubicados entre el promotor y la región CDS del gen UBI2, cerca del codón de inicio de la proteína UBI2.

El vector pHUE411 (https://www.addgene.org/62203/) se

utiliza como esqueleto, y los siguientes cebadores se diseñaron para que los sitios blanco mencionados anteriormente realicen la construcción del vector como se describe en "Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ. A CRISPR/Cas9 Toolkit for multiplex genome editing in plants. BMC Plant Biol. 2014 Nov 29; 14(1): 327",

Cebador N.°	Secuencia de ADN (5' ao 3')	SEQ ID NO
OsHPPD-sgRNA1-F	ATATGGTCTCGGGCGGTGCTGGTTGCCTTGG CTGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	31
OsHPPD-sgRNA2-F	ATATGGTCTCGGGCGCACAAATTCACCAGCA GCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	32
OsHPPD-sgRNA3-R	TATTGGTCTCTAAACTAATCTTGTGCTAGTT CTTAGCTTCTTGGTGCCGCGC	33
OsHPPD-sgRNA4-R	TATTGGTCTCTAAACATCTGTTTGGTGATTA TTTCGCTTCTTGGTGCCGCGC	34

Se construyeron vectores de edición de genes para la siguiente combinación de doble blanco siguiendo el método proporcionado en la bibliografía mencionada anteriormente. Específicamente, con el plásmido pCBC-MT1T2 (https://www.addgene.org/50593/) como molde, se amplificaron los fragmentos de doble blanco sgRNA1 + 3, sgRNA1 + 4, sgRNA2 + 3 y sgRNA2 + 4 respectivamente para construir los casetes de expresión de ARNsg. El esqueleto del vector de pHUE411 se

digirió con BsaI y se recuperó del gel, y el fragmento blanco se digirió y se usó directamente para la reacción de ligación. Se usó ADN ligasa T4 para ligar el esqueleto del vector y el fragmento blanco, y el producto de ligación se transformó en células competentes Trans5α. Se eligieron y secuenciaron diferentes monoclones. Se utilizó el mini kit de extracción de plásmidos de alta pureza Sparkjade para extraer plásmidos de los clones con secuencias correctas, de este modo se obtiene los plásmidos recombinantes, denominados respectivamente pQY002065, pQY002066, pQY002067 y pQY002068, de la siguiente manera:

Combinación pQY002065 pHUE411-HPPD-sgRNA1+3 de OsHPPD-ARN guía 1, ARN guía 3

Combinación pQY002066 pHUE411-HPPD-sgRNA1+4 de OsHPPD-ARN guía 1, ARN guía4

Combinación pQY002067 pHUE411-HPPD-sgRNA2+3 de OsHPPD-ARN guía 2, ARN guía 3

Combinación pQY002068 pHUE411-HPPD-sgRNA2+4 de OsHPPD-ARN guía 2, ARN guía4

2. Se prepararon plásmidos de alta pureza y alta concentración para los vectores pQY002065-002068 mencionados anteriormente de la siguiente manera:

Los plásmidos se extrajeron con el kit de extracción de plásmidos de medio Promega (Midipreps DNA Purification System, Promega, A7640) de acuerdo con las instrucciones. Las etapas

específicas fueron:

(1) Agregar 5 ml de *Escherichia coli* a 300 ml de medio líquido LB que contiene kanamicina y agitar a 200 rpm, 37 °C durante 12 a 16 horas;

(2) Colocar la solución de bacterias anterior en un tubo de centrífuga de 500 ml y centrifugar a 5,000 g durante 10 minutos, descartar el sobrenadante;

(3) Agregar 3 ml de solución de resuspensión celular (CRS) para resuspender el sedimento celular y agitar con vórtex para mezclar bien;

(4) Agregar 3 ml de solución de lisis celular (CLS) y mezclar lentamente durante no más de 5 minutos;

(5) Agregar 3 ml de solución de Neutralización y mezclar bien volcando hasta que el color se vuelva claro y transparente;

(6) Centrifugar a 14,000 g durante 15 minutos y centrifugar adicionalmente durante 15 minutos si el precipitado no se formó compacto;

(7) Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de centrífuga de 50 ml, evitando aspirar precipitado blanco en el tubo de centrífuga;

(8) Agregar 10 ml de resina de purificación de ADN (Resina de purificación, agitar vigorosamente antes de usar) y mezclar bien;

(9) Verter la mezcla de resina/ADN en una columna de filtro

y tratar mediante el método de presión negativa de bomba de vacío (0,05 MPa);

(10) Agregar 15 ml de solución de lavado de columna (CWS) a la columna de filtro y someter al vacío.

(11) Agregar 15 ml de CWS y repetir el vacío una vez; extender el vacío durante 30 s después de que toda la solución pasara a través de la columna de filtrado;

(12) Cortar la columna de filtro, transferir a un tubo de centrífuga de 1,5 ml, centrifugar a 12,000 g durante 2 minutos, eliminar el líquido residual y transferir la columna de filtro a un nuevo tubo de centrífuga de 1,5 ml;

(13) Agregar 200 µL de agua esterilizada precalentada a 70 °C y mantener el reposo durante 2 minutos;

(14) Centrifugar a 12,000 g durante 2 minutos para eluir el ADN plasmídico; y la concentración fue generalmente de aproximadamente 1 µg/µL.

3. Preparar protoplastos de arroz y realizar la transformación mediada por PEG:

Primero, se prepararon plántulas de arroz para protoplastos, que es de la variedad Nipponbare. Las semillas fueron proporcionadas por el Department of the School of Plant Protection, China Agricultural University y se expandieron en forma interna. Las semillas de arroz se descascaron primero y las semillas descascaradas se enjuagaron con etanol 75% durante 1 minuto, se trataron con hipoclorito de sodio 5%

(v/v) durante 20 minutos, luego se lavaron con agua estéril durante más de 5 veces. Después de secarlos con secador en una mesa ultra limpia, se colocaron en una botella de cultivo de tejidos que contiene 1/2 medio MS, 20 semillas por cada botella. Los protoplastos se prepararon mediante la incubación a 26 °C durante aproximadamente 10 días con 12 horas de luz.

Los métodos para la preparación de protoplastos de arroz y la transformación mediada por PEG se llevaron a cabo de acuerdo con "Lin et al., 2018 Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. Plant Biotechnology

(1) se seleccionó la vaina de la hoja de las plántulas, se cortó en trozos de aproximadamente 1 mm con una cuchilla de afeitar Geely afilada y se colocó en manitol 0,6 M y medio de cultivo MES (formulación: manitol 0,6 M, MES 0,4 M, pH 5,7) para uso posterior. Todos los materiales se cortaron y se transfirieron a 20 ml de solución de hidrólisis enzimática (formulación: Celulasa R10/RS 1,5% (YaKult Honsha), Mecerozima R10 0,5% (YaKult Honsha), manitol 0,5 M, KCl 20 mM, MES 20 mM, pH 5,7, $CaCl_2$ 10 mM, BSA 0,1%, β-mercaptoetanol 5 mM), envuelto en papel de aluminio y colocado en un agitador a 28 °C, hidrolizado enzimáticamente a 50 rpm en la oscuridad durante aproximadamente 4 horas, y la velocidad se incrementó

a 100 rpm en el último 2 minutos;

(2) después de la lisis enzimática, se agregó un volumen igual de solución W5 (formulación: NaCl 154 mM, $CaCl_2$ 125 mM, KCl 5 mM, MES 15 mM), se agitó horizontalmente durante 10 segundos para liberar los protoplastos. Las células después de la lisis enzimática se filtraron a través de un tamiz de malla 300 y se centrifugaron a 150 g durante 5 minutos para recoger los protoplastos;

(3) las células se enjuagaron dos veces con la solución W5 y los protoplastos se recogieron mediante centrifugación a 150 g durante 5 minutos;

(4) los protoplastos se resuspendieron con una cantidad apropiada de solución de MMG (formulación: $MgCl_2$ 3,05 g/l, MES 1 g/l, manitol 91,2 g/l) y la concentración de los protoplastos fue de aproximadamente 2 x 10^6 células/ml.

La transformación de protoplastos se llevó a cabo:

(1) a 200 µl de los protoplastos resuspendidos de MMG mencionados anteriormente, se agregó ADN plasmídico sin endotoxina de alta calidad (10–20 µg) y se golpeó suavemente para mezclar bien;

(2) se agregó un volumen igual de solución de PEG 40% (p/v) (formulación: PEG 40% (p/v), manitol 0,5 M, $CaCl_2$ 100 mM), se golpeó suavemente para mezclar bien y se mantuvo en reposo a 28 °C en la oscuridad durante 15 minutos;

(3) después de la inducción de la transformación, se

añadieron lentamente 1,5 ml de solución W5 y se golpearon para mezclar bien las células. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 150 g durante 3 minutos. Esta etapa se repitió una vez;

(4) Se añadieron 1,5 ml de solución W5 para resuspender las células, se colocaron en una incubadora a 28 °C y se cultivaron en la oscuridad durante 12–16 horas. Para extraer ADN genómico de protoplastos, el cultivo se debe realizar durante 48–60 horas.

4. Direccionamiento genómico y detección del nuevo gen:

(1) En cebador lugar, los ADN de protoplastos se extrajeron mediante el método CTAB con algunas modificaciones. El método específico fue el siguiente: se centrifugaron los protoplastos, luego se descartó el sobrenadante. Se agregaron 500 µL de solución de extracción de ADN (formulación: CTAB 20 g/L, NaCl 81,82 g/L, Tris–HCl 100 mM (pH 8,0), EDTA 20 mM, β–mercaptoetanol 0,2%), se agitó para mezclar bien y se incubó en un baño de agua a 65 °C durante 1 hora; cuando la muestra incubada se enfrió, se agregaron 500 µL de cloroformo y se mezclaron por inversión y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos; se transfirieron 400 µl del sobrenadante a un nuevo tubo de centrífuga de 1,5 ml, se agregó 1 ml de etanol 70% (v/v) y la mezcla se mantuvo a –20 °C para precipitar durante 20 minutos; la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos para precipitar el ADN; después

de que el precipitado se secó al aire, se agregaron 50 µL de agua ultrapura y se almacenaron a –20 °C para su uso posterior.

(2) Los cebadores de detección de la siguiente tabla se utilizaron para amplificar los fragmentos que contienen los sitios blanco en ambos lados o los fragmentos predichos resultantes de la fusión del promotor UBI2 y la región codificadora de HPPD. Las longitudes de los productos de la PCR estaban entre 300–1000 pb, en los que se usó la combinación cebador8–F + cebador6–R para detectar el fragmento de fusión en la unión media después de duplicar el fragmento cromosómico, y se esperaba que la longitud del producto sea de 630 pb.

Cebador	Secuencia (5’ a 3’)	SEQ ID NO
OsHPPD cebador duplicado1–F	CACTACCATCCATCCATTTGC	35
OsHPPD cebador duplicado6–R	GAGTTCCCCGTGGAGAGGT	36
OsHPPD cebador duplicado3–F	TCCATTACTACTCTCCCCGATT	37
OsHPPD cebador duplicado7–R	GTGTGGGGGAGTGGATGAC	38
OsHPPD cebador duplicado5–F	TGTAGCTTGTGCGTTTCGAT	39

OsHPPD cebador duplicado2-R	GGGATGCCCTCTTTGTCC	40
OsHPPD cebador duplicado8-F	TCTGTGTGAAGATTATTGCCACT	41
OsHPPD cebador duplicado4-R	GGGATGCCCTCCTTATCTTG	42

El sistema de reacción de PCR fue el siguiente:

Componentes	Volumen
2 × I5 solución buffer	5 µL
Cebador directo (10 µM)	2 µL
Cebador inverso (10 µM)	2 µL
ADN molde	2 µL
Agua ultrapura	Añadido a 50 µL

(3) Se realizó una reacción de PCR en las siguientes condiciones generales de reacción:

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	98 °C	30 s
Amplificación para 30-35 cicles	98 °C	15 s
	58 °C	15 s
	72 °C	30 s
Extensión final	72 °C	3 min
Terminado	16 °C	5 min

(4) Los productos de la reacción de PCR se detectaron

mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Los resultados mostraron que la banda positiva de 630 pb para el fragmento de fusión predicho del promotor UBI2 y la región codificadora de HPPD se puede detectar en las muestras transformadas pQY002066 y pQY002068.

5. Las muestras positivas del fragmento de fusión del promotor UBI2 y la región codificadora de HPPD se secuenciaron para verificación, y los cebadores OsHPPDcebadores duplicados8-F y OsHPPDcebadores duplicados6-R se usaron para secuenciar desde ambos extremos. Como se muestra en la Figura 5, el promotor del gen UBI2 y la región de expresión del gen HPPD se pueden ligar directamente, y se puede detectar el evento de edición de la fusión del promotor del gen UBI2 del arroz y la región de expresión del gen HPPD en el ADN genómico del protoplasto del arroz transformado con los plásmidos pQY002066 y pQY002068, lo que indica que el esquema de duplicación de los fragmentos cromosómicos para formar un nuevo gen HPPD era factible, se puede crear un nuevo gen HPPD cuya expresión fuera dirigida por un promotor fuerte, y esto se definió como un evento de duplicación de HPPD. El resultado de la secuenciación del protoplasto transformado con el vector pQY002066 para analizar el evento de duplicación de HPPD se mostró en la SEQ ID NO: 9; y el resultado de la secuenciación del protoplasto transformado con vector pQY002068 para probar el evento de duplicación de HPPD se mostró en la SEQ ID NO:

10.

Ejemplo 2: Creación de arroz resistente a herbicidas con expresión knock-up del gen de HPPD endógeno mediante la duplicación del fragmento cromosómico a través de la transformación mediada por *Agrobacterium*n

1. Construcción del vector de edición knock-up: Sobre la base de los resultados de la prueba de protoplastos en el Ejemplo 1, se seleccionó la combinación de doble blanco OsHPPD-ARN guía 1: 5'GTGCTGGTTGCCTTGGCTGC3 (SEQ ID NO: 27) 'y OsHPPD-ARN guía 4: 5'GAAATAATCACCAAACAGAT3' (SEQ ID NO: 30) con una alta eficiencia de edición. El vector de transformación de *Agrobacterium* pQY2091 se construyó de acuerdo con el Ejemplo 1. Se usó pHUE411 como el esqueleto del vector y se sometió a optimización de codones de arroz. El mapa del vector se mostró en la FIG. 6.

2. Transformación con *Agrobacterium* del callo de arroz:

1) Transformación con *Agrobacterium*: Se agregó 1 µg del plásmido pQY2091 de vector de edición de knock-up de arroz a 10 µl de células competentes de choque térmico *Agrobacterium* EHA105 (Angyu Biotech, número de catálogo G6040), se colocó en hielo durante 5 minutos, se sumergió en nitrógeno líquido para congelación rápida durante 5 minutos, luego se retiró y se calentó a 37 °C durante 5 minutos, y finalmente se colocó en hielo durante 5 minutos. Se añadieron 500 µl de medio líquido YEB (formulación: extracto de levadura 1 g/L, peptona

5 g/L, extracto de carne de vacuno 5 g/L, sacarosa 5 g/L, sulfato de magnesio 0,5 g/L). La mezcla se colocó en un agitador y se incubó a 28 °C, 200 rpm durante 2 ~ 3 horas; las bacterias se recolectaron por centrifugación a 3500 rpm durante 30 segundos, las bacterias recolectadas se extendieron en placa YEB (kanamicina 50 mg/L + rifampicina 25 mg/L) y se incubaron durante 2 días en una incubadora a 28 °C; las colonias únicas se recogieron y se colocaron en un medio de cultivo líquido, y las bacterias se almacenaron a −80 °C.

2) Cultivo de *Agrobacterium*: Se recogieron las colonias únicas de *Agrobacterium* transformado en la placa YEB, se agregaron a 20 ml de medio líquido YEB (kanamicina 50 mg/L + rifampicina 25 mg/L) y se cultivaron mientras se agita a 28 °C hasta que la OD600 fue 0,5, luego las células bacterianas se recolectaron por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos, se agregaron 20–40 ml de medio líquido AAM (Solarbio, número de lote LA8580) para resuspender las células bacterianas para alcanzar una OD600 de 0,2–0,3, y luego se agregó acetosiringona (Solarbio, número de artículo A8110) para alcanzar la concentración final de 200 μM para infectar el callo.

3) Inducción del callo de arroz: Las variedades del arroz receptor de la transformación fueron Huaidao 5 y Jinjing 818, compradas en el mercado de semillas de Huai’an, Jiangsu, y

expandidas internamente. Se descascarillaron 800–2000 semillas de arroz limpias, luego se lavaron con agua esterilizada hasta que el agua estuvo clara después del lavado. Luego se desinfectaron las semillas con alcohol 70% durante 30 segundos, luego se agregaron 30 ml de hipoclorito de sodio 5% y la mezcla se colocó en un agitador horizontal y se agitó a 50 rpm durante 20 minutos, luego se lavó con agua esterilizada por 5 veces. Las semillas se colocaron sobre papel absorbente estéril, se secaron al aire para eliminar el agua en la superficie de las semillas, se inocularon en un medio de inducción y se cultivaron a 28 °C para obtener callos.

La formulación del medio de inducción: 4,1 g/L de polvo de N6 + 0,3 g/L de caseína hidrolizada + 2,878 g/L de prolina + 2 mg/L de 2,4–D + sacarosa al 3% + 0,1 g/L de inositol + 0,5 g de glutamina + 0,45% de fitagel, pH 5,8.

4) Infección del callo de arroz con *Agrobacterium*: Se seleccionó el callo de Huaidao No. 5 o Jinjing 818 subcultivado durante 10 días con un diámetro de 3 mm y se recogió en un tubo de centrífuga de 50 ml; la solución de resuspensión de AAM *Agrobacterium* con la OD600 ajustada a 0,2–0,3 se vertió en el tubo de centrífuga que contiene el callo, se colocó en un agitador a 28 °C a una velocidad de 200 rpm para realizar la infección durante 20 minutos; cuando se completó la infección, se descartó la solución bacteriana, se colocó el callo en papel de filtro estéril y se secó al aire

durante aproximadamente 20 minutos, luego se colocó en una placa que contiene medio de co-cultivo para realizar el co-cultivo, sobre el cual la placa se cubrió con un papel de filtro estéril sumergido con medio líquido AAM que contiene acetosiringona 100 µM; después de 3 días de co-cultivo, se eliminó el *Agrobacterium* mediante lavado (primero lavado con agua estéril 5 veces, luego lavado con antibiótico cefalosporina 500 mg/L durante 20 minutos) y se cultivó selectivamente en medio de selección higromicina 50 mg/L.

La formulación del medio de cocultivo: 4,1 g/L de polvo N6 + 0,3 g/L de caseína hidrolizada + 0,5 g/L de prolina + 2 mg/L de 2,4-D + 200 µM de AS + 10 g/L de glucosa + sacarosa 3% + fitagel 0,45%, pH 5,5.

3. Identificación molecular y diferenciación en plántulas del callo resistente a higromicina:

A diferencia del proceso de selección de la transformación de arroz convencional, con cebadores específicos de los fragmentos de fusión generados después de la duplicación del fragmento cromosómico, se pudo identificar molecularmente el callo resistente a la higromicina durante la etapa de selección y cultivo del callo en la presente invención, se pudieron determinar eventos de duplicación positivos, y se seleccionaron callos que contienen nuevos genes resultantes de la fusión de diferentes elementos genéticos para el cultivo de diferenciación y se indujeron a que emergieran plántulas.

Las etapas específicas fueron las siguientes:

1) El callo cocultivado se transfirió al medio de selección para la primera ronda de selección (2 semanas). La formulación del medio de selección es: 4,1 g/L de polvo N6 + 0,3 g/L de caseína hidrolizada + 2,878 g/L de prolina + 2 mg/L de 2,4-D + sacarosa 3% + 0,5 g de glutamina + 30 mg/L de higromicina (HYG) + 500 mg/L de cefalosporina (cef) + 0,1 g/L de inositol + fitagel 0,45%, pH 5,8.

2) Después de completar la primera ronda de selección, el callo recién cultivado se transfirió a un nuevo medio de selección para la segunda ronda de selección (2 semanas). En esta etapa, el callo recién crecido con un diámetro mayor de 3 mm se sujetó con pinzas para tomar una pequeña cantidad de muestra, el ADN del mismo se extrajo con el método CTAB descrito en el Ejemplo 1 para la primera ronda de identificación molecular. En este ejemplo, se seleccionó el par de cebadores OsHPPDcebador duplicado8-F (8F) y OsHPPDcebador duplicado6-R (6R) para realizar la identificación por PCR del callo transformado con el vector pQY2091, en el que el sistema de reacción y las condiciones de reacción eran similares a los del Ejemplo 1. Entre el total de 350 callos analizados, no se detectó ninguna muestra positiva en los callos de Huaidao 5, mientras que se detectaron 28 muestras positivas en los callos de Jinjing 818. Los resultados de detección de PCR de algunos callos se

muestran en la Figura 7.

3) Los callos identificados como positivos por PCR se transfirieron a un nuevo medio de selección para la tercera ronda de cultivo de selección y expansión; después de que el diámetro de los callos fue mayor de 5 mm, el callo en el cultivo en expansión se sometió a la segunda ronda de identificación molecular usando el par de cebadores 8F + 6R, el callo amarillo-blanco en buen estado de crecimiento que se identificó como positivo en el la segunda ronda se transfirió a un medio de diferenciación para realizar la diferenciación, y las plántulas de aproximadamente 1 cm se pudieron obtener después de 3 a 4 semanas; las plántulas diferenciadas se transfirieron a un medio de enraizamiento para cultivo de enraizamiento; después de que las plántulas del cultivo de enraizamiento se sometieron a endurecimiento, se transfirieron a una maceta con tierra y se colocaron en un invernadero para su cultivo. La formulación del medio de diferenciación es: 4,42 g/L de polvo MS + 0,5 g/L de caseína hidrolizada + 0,2 mg/L de NAA + 2 mg/L de KT + sacarosa 3% + sorbitol 3% + 30 mg/L de higromicina + 0,1 g/L de inositol + fitagel 0,45%, pH 5,8. La formulación del medio de enraizamiento es: 2,3 g/L de polvo de MS + sacarosa 3% + fitagel 0,45%.

4. Detección molecular de plántulas de duplicación de HPPD (generación T0):

Después de la segunda ronda de identificación molecular, se co-diferenciaron 29 callos positivos de evento duplicado para obtener 403 plántulas de generación T0, y el par de cebadores 8F + 6R se utilizó para la tercera ronda de identificación molecular de las 403 plántulas, entre las cuales 56 tenía bandas positivas. Las plántulas positivas se trasladaron a un invernadero para su cultivo. Los resultados de la detección por PCR de algunas plántulas T0 se muestran en la Figura 8.

5. Prueba de resistencia a herbicidas inhibidores de HPPD para plántulas duplicadas de HPPD (generación T0):

Las plántulas de transformación de la generación T0 identificadas como positivas para el evento de duplicación se trasplantaron en grandes cubos de plástico en el invernadero para expandir la propagación y obtener semillas de la generación T1. Después de que las plántulas comenzaron a producir macollos, los macollos se tomaron de cepas de crecimiento vigoroso y se plantaron en las mismas macetas con los macollos de las variedades de control de tipo salvaje en el mismo período de crecimiento. Después de que la altura de la planta alcanzó aproximadamente 20 cm, se llevó a cabo la prueba de resistencia a herbicidas. El herbicida utilizado fue Shuangzuocaotong (CAS No. 1622908-18-2) producido por la empresa, y su dosis de campo fue usualmente de 4 gramos de ingredientes activos por mu (4 g a.i./mu). En este experimento,

se aplicó Shuangzuocaotong a un gradiente de dosis de 2 g a.i./mu, 4 g a.i./mu, 8 g a.i./mu y 32 g a.i./mu con una torre de rociado de entrada.

Los resultados de la prueba de resistencia se muestran en la Figura 9. Después de 5–7 días de la aplicación, las plántulas de arroz de control de tipo salvaje comenzaron a mostrarse albinas, mientras que las cepas de los eventos de duplicación de HPPD permanecieron todas normalmente verdes. Después de 4 semanas de la aplicación, las plántulas de arroz de tipo salvaje estaban cerca de la muerte, mientras que las cepas de los eventos de duplicación continuaron permaneciendo verdes y crecieron normalmente. Los resultados de la prueba mostraron que las cepas de genes duplicados de HPPD tenían una tolerancia significativamente mejorada a Shuangzuocaotong.

6. Detección cuantitativa de la expresión relativa del gen de HPPD en las plántulas duplicadas de HPPD (generación T0):

Se especuló que la mejora de la resistencia de la cepa duplicada del gen de HPPD a Shuangzuocaotong se debió a la fusión del promotor fuerte de UBI2 y la CDS del gen de HPPD que aumentó la expresión de HPPD, por lo que las cepas de generación T0 QY2091–13 y QY2091 –20 se utilizaron para tomar muestras de los macollos primarios y de los macollos secundarios utilizados para la prueba de resistencia a herbicidas para detectar el nivel de expresión de los genes HPPD y UBI2, respectivamente, con el Jinjing 818 de tipo

salvaje como control. Las etapas específicas fueron las siguientes:

1) Extracción del ARN total (método Trizol):

Se tomaron 0,1–0,3 g de hojas frescas y se molieron en polvo en nitrógeno líquido. Se agregó 1 ml de reactivo Trizol por cada 50–100 mg de tejido para lisis; el lisado de Trizol del tejido anterior se transfirió a un tubo de centrífuga de 1,5 ml, se dejó a temperatura ambiente (15–30 °C) durante 5 minutos; se agregó cloroformo en una cantidad de 0,2 ml por 1 ml de Trizol; el tubo de centrífuga se tapó, se agitó vigorosamente a mano durante 15 segundos, se mantuvo a temperatura ambiente (15–30 °C) durante 2–3 minutos, luego se centrifugó a 12000 g (4 l) durante 15 minutos; la fase acuosa superior se retiró y se colocó en un nuevo tubo de centrífuga, se agregó isopropanol en una cantidad de 0,5 ml por 1 ml de Trizol, la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente (15–30 °C) durante 10 minutos, luego se centrifugó a 12000 g (2–8 °C) durante 10 minutos; se descartó el sobrenadante y se agregó etanol al 75% al sedimento en una cantidad de 1 ml por 1 ml de Trizol para lavar. La mezcla se agitó con vórtex y se centrifugó a 7500 g (2–8 °C) durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante; el ARN precipitado se secó naturalmente a temperatura ambiente durante 30 minutos; el precipitado de ARN se disolvió en 50 µl de agua libre de ARNasa y se almacenó en el frigorífico a –80 °C después del análisis de

electroforesis y la determinación de la concentración.

2) Análisis de electroforesis de ARN:

Se preparó un gel de agarosa a una concentración del 1%, luego se tomó 1 µl del ARN y se mezcló con 1 µl de buffer de carga 2X. La mezcla se cargó sobre el gel. El voltaje se fijó en 180 V y el tiempo de electroforesis fue de 12 minutos. Una vez completada la electroforesis, se extrajo el gel de agarosa y se observaron las ubicaciones y el brillo de los fragmentos con un sistema de formación de imágenes de gel UV.

3) Detección de pureza del ARN:

La concentración de ARN se midió con un analizador de ácido nucleico de microproteínas. El ARN con una buena pureza tenía un valor de OD260/OD280 entre 1,8–2,1. El valor menor que 1,8 indica una contaminación proteica grave y valor mayor que 2,1 indica una degradación del ARN grave

4) PCR cuantitativa de fluorescencia en tiempo real

El ARN total extraído se transcribió de forma inversa a ADNc con un kit especial de transcripción inversa. El procedimiento principal consistió en: primero determinar la concentración del ARN total extraído, y se usó una porción de 1–4 µg de ARN para sintetizar el ADNc por síntesis de transcriptasa inversa. El ADNc resultante se almacenó a –20 °C.

① Se preparó una solución del molde de ARN en hielo como se expone en la siguiente tabla y se sometió a una reacción

de desnaturalización y apareamiento en un instrumento de PCR. Este proceso condujo a la desnaturalización del molde de ARN y el apareamiento específico de cebadores y moldes, de este modo mejora la eficiencia de la transcripción inversa.

Tabla 1: Transcripción inversa, desnaturalización y sistema de reacción de apareamiento

Componente	Cantidades (µl)
Cebador oligo dT (50 µM)	1 µl
mezcla dNTP (10 mM cada uno)	1 µl
Molde de ARN	1-4 µg
Agua libre de ARNasa	Agregado a 10 µL

Condiciones de reacción para desnaturalización y apareamiento:

65 ℃	5 min
4 ℃	5 min

②El sistema de reacción de transcripción inversa se preparó como se indica en la Tabla 2 para sintetizar ADNc.:

Tabla 2: Sistema de reacción de transcripción inversa

Componente	Cantidad (µl)
Solución de reacción después de la desnaturalización y el apareamiento anteriores	10 µl

Buffer de reacción 5X RTase Plus	4 µl
Inhibidor de ARnasa	0,5 µl
Evo M-MLV Plus RTasa (200 U/µl)	1 µl
Agua libre de ARNsa	Agregado a 20 µL

Condiciones de reacción para la síntesis de ADNc:	
42 ℃	60 min
95 ℃	5 min

③Se seleccionó el gen UBQ5 del arroz como gen de referencia interno y se utilizó el ADNc sintetizado como molde para realizar la PCR cuantitativa de fluorescencia. Los cebadores enumerados en la Tabla 3 se utilizaron para preparar la solución de reacción de acuerdo con la Tabla 4.

Tabla 3: Secuencia 5′-3′ del cebador para PCR cuantitativa por fluorescencia

CEBADOR	SECUENCIA	SEQ ID NO
UBQ5-F	ACCACTTCGACCGCCACTACT	43
UBQ5-R	ACGCCTAAGCCTGCTGGTT	44
RT-OsHPPD-F	CAGATCTTCACCAAGCCAGTAG	45
RT-OsHPPD-R	GAGAAGTTGCCCTTCCCAAA	46
RT-OsUbi2-F	CCTCCGTGGTGGTCAGTAAT	47
RT-OsUbi2-R	GAACAGAGGCTCGGGACG	48

Tabla 4: Solución de reacción para PCR cuantitativa en tiempo real (PCR de tiempo real)

Componentes de la mezcla	Cantidad (µl)
Premezcla SYBR ExTaq II	5 µl
Cebador directo (10 µM)	0,2 µl
Cebador inverso (10 µM)	0,2 µl
ADNc	1 µl
Rox II	0,2 µl
Agua ultrapura	3,4 µl
En total	10 µl

④La reacción se realizó siguiendo las etapas de reacción de PCR cuantitativa en tiempo real de la Tabla 5. La reacción se llevó a cabo durante 40 ciclos.

Tabla 5: Etapas de la reacción de PCR cuantitativa en tiempo real

Temperatura (℃)	Tiempo
50 °C	2 min
95℃	10 min
95℃	15 s
60℃	20 s
95℃	15 s
60℃	20 s
95℃	15 s

5) Procesamiento de datos y resultados experimentales

Como se muestra en la Tabla 6, se usó UBQ5 como referencia interna, ΔCt se calculó restando el valor Ct de UBQ5 del valor Ct del gen blanco, y luego se calculó $2^{-\Delta Ct}$, que representaba el nivel de expresión relativo del gen blanco. La 818CK1 y la 818CK3 eran dos plantas de control Jinjing 818 de tipo salvaje; 13M y 20M representaron las muestras de hojas de macollo primarias de las plantas QY2091-13 y QY2091-20 T0; 13L y 20L representaron las muestras de hojas de macollos secundarios de las plantas QY2091-13 y QY2091-20 T0 utilizadas para las pruebas de resistencia a herbicidas.

Tabla 6: Valores de Ct y niveles de expresión relativa de diferentes genes

	UBQ5	Media	UBI2	ΔCt	$2^{-\Delta Ct}$	Media	HPPD	ΔCt	$2^{-\Delta Ct}$	Media
	23,27		17,56	-5,88	58,95		20,81	-2,63	6,20	
	23,55		17,71	-5,73	53,09		21,01	-2,43	5,40	
818CK1	23,51	23,44	17,66	-5,78	55,06	55,70	20,98	-2,47	5,52	5,71
	23,45		17,88	-5,50	45,20		20,93	-2,44	5,43	
	23,19		17,94	-5,44	43,41		21,13	-2,24	4,74	
818CK3	23,49	23,37	17,72	-5,65	50,26	46,29	21,14	-2,24	4,72	4,96
	24,61		19,56	-4,92	30,32		20,23	-4,25	19,07	
	24,27		19,52	-4,96	31,05		20,29	-4,19	18,28	
13M	24,56	24,48	19,16	-5,32	39,97	33,78	20,48	-4,00	15,99	17,78

	23,98		18,76	-5,20	36,70		19,02	-4,94	30,64	
	23,89		18,52	-5,43	43,19		19,07	-4,89	29,56	
13L	24,00	23,96	18,81	-5,14	35,34	38,41	19,07	-4,88	29,45	29,88
	24,34		19,01	-5,40	42,30		19,37	-5,04	32,98	
	24,41		19,07	-5,34	40,64		19,33	-5,09	34,05	
20M	24,49	24,41	19,29	-5,13	35,00	39,32	19,26	-5,16	35,65	34,22
	24,63		19,46	-5,11	34,52		19,88	-4,69	25,83	
	24,67		19,38	-5,19	36,48		19,91	-4,66	25,31	
20L	24,41	24,57	19,42	-5,15	35,61	35,54	19,86	-4,71	26,16	25,77

Los resultados se muestran en la Figura 10. El arroz UBQ5 se usó como un gen de referencia interno para calcular los niveles de expresión relativa de los genes OsHPPD y UBI2. Los resultados mostraron que el nivel de expresión de HPPD de la cepa duplicada de HPPD era significativamente más alto que el del tipo salvaje, lo que indica que el promotor fuerte UBI2 fusionado aumentó el nivel de expresión de HPPD, de este modo se crea un gen de HPPD de alta expresión, con el gen de HPPD knocked up. La ligera disminución en el nivel de expresión de UBI2 se puede deber a las mutaciones a pequeña escala resultantes de la edición de la región promotora, y en efecto los autores habían detectado inserciones de bases, supresiones o supresiones de pequeños fragmentos en el sitio blanco de UBI2. En comparación con el tipo salvaje, los niveles de expresión de UBI2 y HPPD tendieron

significativamente a ser constantes y cumplieron las expectativas teóricas; entre ellas, el nivel de expresión de HPPD de la muestra 20M fue aproximadamente 6 veces mayor que el del grupo CK3 de tipo salvaje.

Los resultados anteriores demostraron que, siguiendo el programa eficaz de duplicación de fragmentos cromosómicos probado en protoplastos, los callos y plántulas transformados con eventos de duplicación se pueden seleccionar mediante múltiples rondas de identificación molecular durante la transformación de *Agrobacterium* y el cultivo de tejidos, y el promotor fuerte de UBI2 en la fusión del nuevo gen de HPPD generado en las plántulas transformadas sí aumentó el nivel de expresión del gen HPPD, lo que hace que las plantas adquieran resistencia al herbicida inhibidor de HPPD Shuangzuocaotong, hasta 8 veces la dosis de campo, y por lo tanto se creó un arroz resistente a herbicidas con gen de HPPD endógeno knock-up. Tomando esto como ejemplo, usando la solución técnica de duplicación de fragmentos de cromosoma del Ejemplo 1 y del Ejemplo 2, también se puede introducir un promotor deseado en un gen endógeno, cuyo patrón de expresión génica se debería cambiar para crear un nuevo gen y se puede crear una nueva variedad de plantas con el patrón de expresión génica deseado mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

Ejemplo 3: Detección molecular y prueba de resistencia a

herbicidas de generación T1 de cepa de arroz resistente a herbicidas con expresión knock-up del gen de HPPD endógeno causada por la duplicación del fragmento cromosómico

La distancia física entre el gen HPPD y el gen de UBI2 en el genoma del arroz de tipo salvaje fue de 338 kb, como se muestra en el Esquema 1 de la Figura 1. La longitud del cromosoma aumentó en 338 kb después de que el fragmento cromosómico entre ellos se duplicó por duplicación, y se generó un nuevo gen HPPD de alta expresión con un promotor UBI2 en la unión del fragmento duplicado para dirigir la expresión de la región CDS de HPPD. Para determinar si el nuevo gen se puede heredar de forma estable y el efecto del fragmento de cromosoma duplicado sobre la estabilidad genética, se llevó a cabo una prueba de detección molecular y resistencia a herbicidas para la generación T1 de las cepas duplicadas de HPPD.

En cebador lugar, se observó que el evento de duplicación no tuvo un efecto significativo sobre la fertilidad de las plantas de generación T0, ya que todas las cepas T0 positivas pudieron producir semillas normales. Se realizaron además pruebas de siembra de plántulas de la generación T1 para las cepas QY2091-13 y QY2091-20.

1. Preparación de muestras:

Para QY2091-13 se plantaron un total de 36 plántulas T1, de las cuales 27 crecieron normalmente y 9 eran albinas. Se

seleccionaron 32 para la extracción y detección de ADN, donde los números 1–24 eran plántulas normales y los números 25–32 eran plántulas albinas.

Para QY2091–20 se plantaron un total de 44 plántulas T1, de las cuales 33 crecieron normalmente y 11 eran albinas. Se seleccionaron 40 para la extracción y detección de ADN, donde los números 1–32 eran plántulas normales y los números 33–40 eran plántulas albinas.

Se observaron plántulas de albino en las plantas de generación T1. Se especuló que, debido a que HPPD era una enzima clave en la vía de síntesis de clorofila de las plantas, y las plantas de generación T0 resultantes de la edición de blanco doble posiblemente podrían ser quimeras de muchos genotipos tales como duplicación, supresión, inversión de fragmentos de cromosomas o mutación de fragmento pequeño en el sitio blanco editado. El fenotipo albino se puede generar en las plantas donde se destruyó el gen HPPD, por ejemplo, se suprimió la región CDS HPPD. Se diseñaron diferentes pares de cebadores para PCR para determinar posibles genotipos.

2. Identificación molecular de PCR:

1) Secuencias de los cebadores de detección: secuencia 5’–3’

Cebador 8F: TCTGTGTGAAGATTATTGCCACTAGTTC (SEQ ID NO:49)

Cebador 6R: GAGTTCCCCGTGGAGAGGT (SEQ ID NO:36)

Prueba 141–F: CCCCTTCCCTCTAAAAATCAGAACAG (SEQ ID NO:50)

Cebador 4R: GGGATGCCCTCCTTATCTTGGATC (SEQ ID NO:51)

Cebador 3F: CCTCCATTACTACTCTCCCCGATTC (SEQ ID NO:52)

Cebador 7R: GTGTGGGGGAGTGGATGACAG (SEQ ID NO:53)

pg-Hyg-R1: TCGTCCATCACAGTTTGCCA (SEQ ID NO:54)

pg-35S-F: TGACGTAAGGGATGACGCAC (SEQ ID NO:55)

2) Los sitios de unión de los cebadores anteriores se muestran en la Figura 11. Entre ellos, el Cebador 8F + Cebador 6R se usaron para detectar el fragmento de fusión del promotor UBI2 y la CDS de HPPD después de la duplicación del fragmento cromosómico, y la longitud del producto fue 630 pb; se usaron las pruebas 141-F + Cebador 4R para detectar el evento de supresión de fragmentos cromosómicos, y la longitud del producto fue 222 pb; y pg-Hyg-R1 + pg-35S-F se usaron para detectar el fragmento de ADN-T del vector de edición, y la longitud del producto fue de 660 pb.

3) El sistema de reacción de PCR, el procedimiento de reacción y la detección de electroforesis en gel se realizaron de acuerdo con el Ejemplo 1.

3. Resultados de la detección molecular:

Los resultados de detección de los eventos de duplicación y supresión se muestran en la Tabla 7. Se pudo observar que los eventos de duplicación y supresión de fragmentos cromosómicos se observaron en las plantas de generación T1, con diferentes relaciones entre diferentes líneas. Los eventos de duplicación en el QY2091-13 (29/32) fueron mayores

que en el QY2091-20 (21/40), posiblemente debido a las diferentes relaciones quiméricas en las plantas de generación T0. Los resultados de la prueba indicaron que el gen de fusión generado por la duplicación era heredable.

Tabla 7: Resultados de detección de eventos duplicación y supresión

QY2091-20	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Duplicación	+	–	–	–	+	+	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	+	+	+	–
Supresión	–	–	–	–	–	+	–	–	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Duplicación	–	+	–	–	+	–	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–
Supresión	–	–	+	+	–	+	–	–	–	+	+	–	+	–	+	–	–	–	–	+

QY2091-13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Duplicación	+	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Supresión	–	+	–	+	+	+	–	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32								
Duplicación	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+								
Supresión	–	–	+	–	–	+	–	–	+	+	–	+								

Los cebadores pg-Hyg-R1 + pg-35S-F se usaron para detectar el fragmento de T-ADN del vector de edición para las plántulas T1 anteriores. Los resultados de la electroforesis de los productos de PCR de QY2091-20-17 y QY2091-13-7 fueron negativos para el fragmento de ADN-T, lo que indica que era una duplicación homocigótica. Se pudo observar que las cepas

no transgénicas homocigóticas con duplicación se pueden segregar de la generación T1 de los eventos de duplicación.

4. Detección de eventos de edición por secuenciación:

Los fragmentos de fusión duplicados se secuenciaron para las muestras de generación T1 positivas duplicadoras homocigotas 1, 5, 7, 11, 18 y 19 para QY2091-20 y para las muestras T1 positivas duplicadoras homocigotas 1, 3, 7, 9, 10 y 12 para QY2091-13. El sitio blanco izquierdo del gen de HPPD y el sitio blanco derecho del UBI2 se amplificaron al mismo tiempo para la secuenciación para detectar los eventos de edición en los sitios blanco. Entre ellos, se usaron el Cebador 3F + Cebador 7R para detectar el evento de edición del sitio blanco HPPD izquierdo, donde el producto de control de tipo salvaje tenía 481 pb de longitud; se usaron el Cebador 8F + Primer 4R para detectar el evento de edición del sitio blanco UBI2 derecho, donde el producto de control de tipo salvaje tenía 329 pb de longitud.

1) Genotipo de los eventos de duplicación:

El resultado de secuenciación de la duplicación de HPPD en QY2091-13 se mostró en la SEQ ID NO: 18, y el resultado de secuenciación de la duplicación de HPPD en QY2091-20 se mostró en SEQ ID NO: 19, ver Figura 12. En comparación con las secuencias ligadoras predichas de la duplicación, se insertó una base T en el ligador en QY2091-13, se suprimieron 19 bases del ligador en QY2091-20, y tanto la inserción como la

supresión se produjeron en la región promotora de UBI2 y no tuvieron ningún efecto sobre la región codificadora de la proteína HPPD. A partir de los resultados de detección de los niveles de expresión del gen de HPPD en el Ejemplo 2, se puede ver que los niveles de expresión de estos nuevos genes de HPPD donde los promotores UBI2 se fusionaron con la región CDS de HPPD aumentaron significativamente.

2) Eventos de edición en los sitios blando de HPPD y UBI2 originales en ambos lados:

Hubo más tipos de eventos de edición en los sitios blanco en ambos lados. En dos líneas, se produjeron tres tipos de edición en la región promotora de HPPD, a saber, inserción de base única, supresión de 17 bases, y supresión de 16 bases; y se produjeron dos tipos de edición en la región promotora de UBI2, a saber, inserción de 7 bases y supresión de 3 bases. Las plantas T1 utilizadas para las pruebas y el muestreo eran todas plántulas verdes y crecieron normalmente, lo que indica que las mutaciones a pequeña escala en estas regiones promotoras no tuvieron un efecto significativo sobre la función genética, y se pudieron seleccionar variedades de arroz resistentes a herbicidas a partir de su descendencia.

5. Ensayo de resistencia a herbicidas en plántulas de generación T1:

La resistencia a herbicidas de la generación T1 de la cepa doble QY2091 HPPD se probó en la etapa de plántula. Después

de que las semillas de la generación T1 se sometieron a desinfección de la superficie, germinaron en medio 1/2 MS que contiene Shuangzuocaotong 1,2 µM y se cultivaron a 28 16, 16 horas de luz/8 horas de oscuridad, en el que se usó Jinjing 818 de tipo salvaje como control.

Los resultados de la prueba de resistencia se muestran en la Figura 13. Después de 10 días de cultivo a la luz, las plántulas de arroz de control de tipo salvaje mostraron fenotipos de albinismo y eran casi todas albinas, mientras que las líneas de los eventos de duplicación de HPPD QY2091-7, 13, 20, 22 mostraron segregación fenotípica de clorosis y plántulas verdes. De acuerdo con los resultados de detección molecular mencionados anteriormente, hubo segregación de genotipo en la generación T1. Las plántulas albinas aparecieron en ausencia de tratamiento con herbicidas, mientras que las plántulas verdes continuaron siendo verdes y crecieron normalmente después de la adición de 1,2 µM de Shuangzuocaotong. Los resultados de la prueba indicaron que la alta resistencia a Shuangzuocaotong de las líneas de genes de HPPD duplicados se puede heredar de forma estable a la generación T1.

Ejemplo 4: Un método de edición para knocking up la expresión del gen de PPO endógeno mediante la inducción de la inversión del fragmento cromosómico – prueba de protoplastos de arroz

El gen PPO1 del arroz (también conocido como PPOX1) (como se muestra en SEQ ID NO: 7, en el que 1–1065 pb era el promotor, el resto era la región codificadora) se localizó en el cromosoma 1, y el gen de CP12 de la proteína del ciclo de calvin (como se muestra en SEQ ID NO: ID NO: 8, en el que 1–2088 pb era el promotor y el resto era la región codificadora) se localizó 911 kb corriente abajo del gen de PPO1 con direcciones opuestas. Según los datos del perfil de expresión génica del arroz proporcionados por el Proyecto Internacional de Secuenciación del Genoma del Arroz (http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml), la intensidad de expresión del gen de CP12 en las hojas de arroz era 50 veces mayor que la del gen de PPO1 y el promotor del gen CP12 era un promotor fuerte de alta expresión en las hojas.

Como se muestra en el Esquema 1 de la Figura 4, mediante la inducción simultánea y la detección de rupturas de cadena doble entre los respectivos promotores y la región CDS de los dos genes, la región entre las dos rupturas se puede revertir, con el promotor del gen PPO1 reemplazado con el promotor del gen CP12, aumenta el nivel de expresión del gen PPO1 y se obtiene la resistencia a herbicidas inhibidores de PPO, por lo que se podrían seleccionar líneas resistentes a herbicidas. Además, como se muestra en el Esquema 2 de la Figura 4, también se puede crear un nuevo gen de PPO1 dirigido por el promotor del gen CP12 primero por inversión y luego duplicación.

1. Primero, las secuencias de ADN genómico de arroz PPO1 y CP12 se introdujeron en la herramienta en línea CRISPOR (http://crispor.tefor.net/) para buscar sitios de edición blanco disponibles. Después de la puntuación en línea, se seleccionaron los siguientes sitios blanco entre los promotores y las regiones CDS de los genes PPO1 y CP12 para la prueba:

Nombre del ARNsg blanco	Secuencia (5’ a 3)	SEQ ID NO
OsPPO-ARN guía 1	CCATGTCCGTCGCTGACGAG	56
OsPPO-ARN guía 2	CCGCTCGTCAGCGACGGACA	57
OsPPO-ARN guía 3	GCCATGGCTGGCTGTTGATG	58
OsPPO-ARN guía 4	CGGATTTCTGCGTGTGATGT	598

El ARN guía 1 y el ARN guía 2 se ubican entre el promotor y la región CDS del gen PPO1, cerca del codón de inicio PPO1, y el ARN guía 3 y el ARN guía 4 se ubican entre el promotor y la región CDS del gen CP12, cerca del CP12 codón de inicio.

Como se describe en el Ejemplo 1, los cebadores se diseñaron para los sitios blanco anteriores para construir vectores de doble blanco, con pHUE411 como esqueleto:

Cebador N.°	Secuencia de ADN (5’ a 3’)	SEQ ID NO
OsPPO1–sgRNA1–F	ATATGGTCTCGGGCGCCATGTCCGTCGCTGACG AGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	60
OsPPO1–sgRNA2–F	ATATGGTCTCGGGCGCCGCTCGTCAGCGACGGA CAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	61
OsPPO1–sgRNA3–R	TATTGGTCTCTAAACCATCAACAGCCAGCCATG GCGCTTCTTGGTGCCGCGCCTC	62
OsPPO1–sgRNA4–R	TATTGGTCTCTAAACACATCACACGCAGAAATC CGGCTTCTTGGTGCCGCGCCTC	63

Específicamente, el plásmido pCBC–MT1T2 (https://www.addgene.org/50593/) se usó como molde para amplificar los fragmentos de doble blanco sgRNA1 + 3, sgRNA1 + 4, sgRNA2 + 3, sgRNA2 + 4 y los casetes de expresión de ARnsg del constructo, respectivamente. El esqueleto del vector pHUE411 se digirió con BsaI y se recuperó del gel, y el fragmento blanco se usó directamente para la reacción de ligación después de la digestión. Se usó ADN ligasa T4 para ligar el esqueleto del vector y el fragmento blanco, el producto de ligación se transformó en células competentes Trans5α, se seleccionaron y secuenciaron diferentes monoclones. Se usó el kit de extracción mini de plásmidos de alta pureza Sparkjade se utilizó para extraer plásmidos con

resultados de secuenciación correctos, de este modo se obtienen plásmidos recombinantes, denominados respectivamente pQY002095, pQY002096, pQY002097, pQY002098, como se muestra a continuación:

pQY002095 pHUE411–PPO–sgRNA1+3 que contiene la combinación de OsPPO–ARN guía 1, ARN guía 3

pQY002096 pHUE411–PPO–sgRNA2+3 que contiene la combinación de OsPPO–ARN guía 2, ARN guía 3

pQY002097 pHUE411–PPO–sgRNA1+4 que contiene la combinación de OsPPO–ARN guía 1, ARN guía 4

pQY002098 pHUE411–PPO–sgRNA2+4 que contiene la combinación de OsPPO–ARN guía 2, ARN guía 4

2. Se prepararon plásmidos de alta pureza y alta concentración para los vectores pQY002095–002098 mencionados anteriormente como se describe en la etapa 2 del Ejemplo 1.

3. Se prepararon protoplastos de arroz y se sometieron a transformación mediada por PEG con los vectores mencionados anteriormente como se describe en la etapa 3 del Ejemplo.

4. Direccionamiento genómico y detección de nuevo gen con los cebadores de detección que se muestran en la siguiente tabla para la detección por PCR como se describe en la etapa 4 del Ejemplo 1.

Cebador	Secuencia (5’ a 3’)	SEQ ID NO
OsPPOinversion-checkF1 (PPO-F1)	GCTATGCCGTCGCTCTTTCTC	64
OsPPOinversion-checkF2 (PPO-F2)	CGGACTTATTCCCACCAGAA	65
OsPPOinversion-checkR1 (PPO-R1)	GAGAAGGGGAGCAAGAAGACGT	66
OsPPOinversion-checkR2 (PPO-R2)	AAGGCTGGAAGCTGTTGGG	67
OsCPinversion-checkF1 (CP-F1)	CATTCCACCAAACTCCCCTCTG	68
OsCPinversion-checkF2 (CP-F2)	AGGTCTCCTTGAGCTTGTCG	69
OsCPinversion-checkR1 (CP-R1)	GTCATCTGCTCATGTTTTCACGGTC	70
OsCPinversion-checkR2 (CP-R2)	CTGAGGAGGCGATAAGAAACGA	71

Entre ellos, la combinación de PPO-R2 y CP-R2 se utilizó para amplificar el nuevo fragmento de gen de CDS PPO1 dirigido por el promotor CP12 que se generó en el lado derecho después de la inversión del fragmento cromosómico, y la combinación de PPO-F2 y CP-F2 se utilizó para amplificar el nuevo fragmento de gen CDS CP12 dirigido por el promotor PPO1 que

se generó en el lado izquierdo después de la inversión. Los posibles genotipos resultantes de la edición de doble blanco y los sitios de unión de los cebadores de detección molecular se muestran en la Figura 14.

5. Los resultados de la PCR y la secuenciación mostraron que el nuevo gen esperado en el que el promotor CP12 dirigía la expresión de PPO1 se creó a partir de la transformación de protoplastos de arroz. El evento de edición en el que el promotor del gen CP12 de arroz se fusionó con la región de expresión del gen PPO1 se pudo detectar en el ADN genómico de los protoplastos de arroz transformados. Esto indicó que el esquema para formar un nuevo gen PPO a través de la inversión de fragmentos cromosómicos era factible, y se puede crear un nuevo gen PPO dirigido por un promotor fuerte, que se definió como un evento de inversión de PPO1. Los resultados de la secuenciación para la inversión de los fragmentos cromosómicos en protoplastos transformados con el vector pQY002095 se mostraron en la SEQ ID NO: 15; los resultados de la secuenciación para la supresión del fragmento cromosómico en protoplastos transformados con el vector pQY002095 se mostraron en la SEQ ID NO: 16; y los resultados de la secuenciación para la inversión de los fragmentos cromosómicos en protoplastos transformados con el vector pQY002098 se muestran en la SEQ ID NO: 17.

Ejemplo 5: Creación de arroz resistente a herbicidas con

la expresión de knock-up del gen de PPO endógeno causado por la inversión del fragmento cromosómico a través de la transformación mediada por *Agrobacterium*

1. Construcción del vector de edición de knock-up: sobre la base de los resultados de las pruebas de protoplastos, se seleccionó la combinación de doble blanco de OsPPO-ARN guía 1: 5'CCATGTCCGTCGCTGACGAG3' (SEQ ID NO: 56) y OsPPO-ARN guía 4: 5'CGGATTTCTGCGT-GTGATGT3' (SEQ ID NO: 59) con alta eficiencia de edición para construir el vector de transformación de *Agrobacterium* pQY2234. Se usó pHUE411 como el esqueleto del vector y se realizó la optimización del codón de arroz. El mapa del vector se muestra en la Figura 16.

2. Callo de arroz transformado por *Agrobacterium* y dos ronda de identificación molecular:

El plásmido pQY2234 se utilizó para transformar callos de arroz de acuerdo con el método descripto en la etapa 2 del Ejemplo 2. Las variedades receptoras fueron Huaidao N.° 5 y Jinjing 818. En la etapa de selección de callos, se realizaron dos rondas de identificación molecular en callos resistentes a higromicina y se diferenciaron callos positivos en evento de inversión. Durante la detección molecular del callo, la amplificación del nuevo fragmento de gen de CDS PPO1 dirigido por el promotor CP12 generado en el lado derecho después de la inversión del fragmento cromosómico por la combinación de PPO-R2 y CP-R2 se consideró como el estándar positivo para el

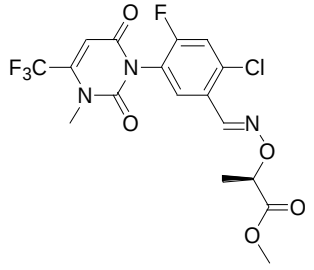
evento de inversión, mientras que el nuevo gen CP12 generado en el lado izquierdo después de la inversión se consideró después de la diferenciación y la emergencia de plántulas del callo. Se analizaron un total de 734 callos de Huaidao N.° 5, de los que 24 callos resultaron positivos para el evento de inversión, y se analizaron 259 callos de Jinjing 818, de los que 29 callos fueron positivos para el evento de inversión. La Figura 17 mostró los resultados de la detección por PCR de los callos Jinjing 818 N.° 192-259.

3. Un total de 53 callos con eventos de inversión positivos se sometieron a dos rondas de identificación molecular y luego se co-diferenciaron, y se identificaron 9 callos con eventos de duplicación positivos, que se sometieron a dos rondas de identificación molecular y luego se co-diferenciaron para producir 1,875 plántulas T0, de las que 768 cepas eran del fondo Huaidao N.°5 y 1107 cepas eran del fondo Jinjing 818. Estas 1875 plántulas se sometieron además a la tercera ronda de identificación molecular con el par de cebadores PPO-R2 y CP-R2, en la que 184 líneas del fondo Huaidao N.° 5 mostraron bandas de inversión positiva, 350 cepas del fondo Jinjing 818 mostraron bandas de inversión positiva. Las plántulas positivas se trasladaron al invernadero para su cultivo.

4. Prueba de resistencia a herbicidas inhibidores de PPO de plántulas de inversión de PPO1 (generación T0):

Las plántulas de transformación de la generación T0 QY2234

identificadas como positivas para el evento de inversión se trasplantaron en grandes cubos de plástico en el invernadero para cultivar semillas de la generación T1. Hubo una gran cantidad de plántulas positivas, por lo que se seleccionaron algunas plántulas T0 y líneas de control de tipo salvaje con un período y estado de crecimiento similar. Cuando la altura de la planta alcanzó unos 20 cm, se llevó a cabo directamente la prueba de resistencia a herbicidas. El herbicida utilizado fue un herbicida inhibidor de PPO de alta eficacia.



producido por la empresa (código 2081, ver la Solicitud de patente de China para la invención n.° 202010281666,4). En este experimento, el herbicida se aplicó en los gradientes de tres niveles, a saber, 0,18, 0,4 y 0,6 g a.i./mu, mediante una torre de rociado de tipo de entrada.

Los resultados de la prueba de resistencia se muestran en la Figura 18. 3-5 días después de la aplicación, las plántulas de arroz de control de tipo salvaje comenzaron a marchitarse desde la punta de la hoja, aparecieron manchas necróticas en las hojas y las plantas se marchitaron gradualmente, mientras que la mayoría de las líneas del evento de inversión de PPO1 mantuvieron un crecimiento normal, las hojas no tenían

fitotoxicidad evidente. Además, algunas líneas mostraron fitotoxicidad, probablemente debido al mosaicismo poligenotípico de los eventos de edición y al bajo nivel de expresión de PPO1 en las líneas de generación T0. Dos semanas después de la aplicación, las plántulas de arroz de tipo salvaje murieron y la mayoría de las cepas del evento de inversión continuaron permaneciendo verdes y crecieron normalmente. Los resultados de la prueba mostraron que las líneas con inversión de PPO1 podrían mejorar significativamente la tolerancia de las plantas a 2081.

5. Detección cuantitativa del nivel de expresión relativa del gen de PPO1 en plántulas de inversión de PPO1 (generación T0):

Se especuló que el aumento de la resistencia de las líneas de inversión del gen PPO1 a 2081 se debió a la fusión del promotor de CP12 fuerte y la CDS del gen de PPO1 que puede aumentar el nivel de expresión de PPO1. Por lo tanto, se seleccionaron las líneas de generación T0 QY2234-252, QY2234-304 y QY2234-329 del fondo Huaidao N.° 5, se muestrearon sus macollos primarios y secundarios y se sometieron a la detección de niveles de expresión de genes PPO1 y CP12. Como control se utilizó el Huaidao N.° 5 de tipo salvaje. Los protocolos específicos siguieron la etapa 6 del Ejemplo 2, con el gen UBQ5 del arroz como gen de referencia interno, los cebadores cuantitativos de fluorescencia fueron los

siguientes: 5’-3’

CEBADOR	SEQUENCE	SEQ ID NO
UBQ5-F	ACCACTTCGACCGCCACTACT	43
UBQ5-R	ACGCCTAAGCCTGCTGGTT	44
RT-OsPPO1-F	GCAGCAGATGCTCTGTCAATA	72
RT-OsPPO1-R	CTGGAGCTCTCCGTCAATTAAG	73
RT-OsCP12-F1	CCGGACATCTCGGACAA	74
RT-OsCP12-R1	CTCAGCTCCTCCACCTC	75

Se utilizó el UBQ5 como referencia interna. ΔCt se calcula restando el valor Ct de UBQ5 del valor Ct del gen blanco. Luego se calculó $2^{-\Delta Ct}$, que representaba el nivel de expresión relativo del gen blanco. La H5CK1 y H5CK2 eran dos plantas de control de tipo salvaje de Huaidao N.° 5, las 252M, 304M y 329M representaban las muestras de hojas de macollos primarios de las plantas QY2234-252, QY2234-304 y QY2234-329 T0, y las 252L, 304L, y 329L representaron sus muestras de hojas de macollos secundarios. Los resultados se muestran en la Tabla 8 a continuación:

Tabla 8: Valores de Ct y niveles de expresión relativa de diferentes genes

	UBQ5	Media	PPO1	ΔCt	$2^{-\Delta Ct}$	Media	CP12	ΔCt	$2^{-\Delta Ct}$	Media
	28,18		25,83	-2,43	5,39		22,28	-3,98	15,77	
	28,37		25,98	-2,28	4,85		22,06	-4,20	18,44	
H5CK1	28,23	28,26	25,93	-2,33	5,03	5,09	22,11	-4,15	17,76	17,32

	28,23		25,73	-2,36	5,15		21,63	-6,47	88,58	
	27,98		26,02	-2,07	4,20		21,53	-6,57	94,87	
H5CK2	28,07	28,09	25,92	-2,18	4,52	4,62	21,54	-6,55	93,83	92,43
	25,51		25,17	-0,54	1,45		22,26	-3,45	10,95	
	25,82		25,22	-0,49	1,41		22,36	-3,36	10,23	
252M	25,80	25,71	25,22	-0,49	1,41	1,42	22,43	-3,29	9,76	10,31
	26,41		23,36	-3,14	8,84		22,30	-4,21	18,49	
	26,64		23,41	-3,10	8,56		21,95	-4,56	23,55	
252L	26,47	26,51	23,46	-3,05	8,28	8,56	21,78	-4,73	26,47	22,84
	25,74		24,55	-1,29	2,44		22,51	-3,32	10,02	
	25,99		24,53	-1,31	2,48		22,45	-3,39	10,47	
304M	25,78	25,84	24,48	-1,36	2,57	2,50	22,56	-3,28	9,71	10,07
	25,97		23,63	-2,36	5,14		21,60	-4,39	20,97	
	26,00		23,75	-2,25	4,74		21,43	-4,56	23,55	
304L	26,00	25,99	23,56	-2,43	5,39	5,09	22,32	-3,68	12,78	19,10
	26,94		23,11	-3,89	14,84		22,23	-4,76	27,16	
	26,99		23,25	-3,75	13,42		21,85	-5,15	35,39	
329M	27,07	27,00	23,22	-3,78	13,71	13,99	21,82	-5,18	36,29	32,95
	26,50		23,64	-2,63	6,19		22,00	-4,27	19,30	
	26,52		23,74	-2,53	5,79		21,97	-4,30	19,71	
329L	25,79	26,27	23,77	-2,50	5,65	5,87	22,15	-4,12	17,42	18,81

Los niveles de expresión relativa de PPO1 y CP12 en diferentes cepas se muestran en la Figura 19. Como mostraron los resultados, a diferencia del evento de duplicación en el

Ejemplo 2, los niveles de expresión génica de estas cepas de eventos de inversión fueron significativamente diferentes. Los niveles de expresión de CP12 son muy diferentes entre los dos grupos CK de Huaidao N.° 5, posiblemente debido a las diferentes tasas de crecimiento de las plántulas. En comparación con el grupo de control H5CK2, los niveles de expresión de CP12 en los grupos experimentales mostraron todos una tendencia a la disminución, mientras que los niveles de expresión de PPO1 para 252L y 329M aumentaron significativamente y los niveles de expresión de PPO1 para 304L y 329L aumentaron modestamente, y los niveles de expresión de PPO1 para 252M y 304M disminuyeron. A diferencia de la duplicación de los fragmentos de cromosomas que aumentaron principalmente el nivel de expresión génica, la inversión de los fragmentos de cromosomas generó nuevos genes en ambos lados, por lo que podrían ocurrir varios eventos de edición en los blancos de ambos lados, y los cambios en la dirección de la transcripción también podrían afectar nivel de expresión génica al mismo tiempo. Es decir, las plantas de generación T0 eran quimeras complejas. También puede haber diferencias significativas en los niveles de expresión génica entre macollos primarios y secundarios de la misma planta. Se puede observar a partir de los resultados de la PCR cuantitativa que los eventos de inversión de PPO1 mostraron una mayor probabilidad de aumentar el nivel de expresión del

gen de PPO1 y, por lo tanto, se pueden seleccionar las cepas resistentes a herbicidas con un alto nivel de expresión de PPO1 mediante la selección de resistencia a herbicidas por los eventos de inversión.

Los resultados anteriores demostraron que, siguiendo el esquema de detección de inversión efectiva de fragmentos cromosómicos en protoplastos, los callos y las plántulas transformadas con eventos de inversión se pueden seleccionar a través de múltiples rondas de identificación molecular durante la transformación de *Agrobacterium* y el cultivo de tejidos, y el promotor de CP12 fuerte fusionado con el nuevo gen PPO1 generado en las plántulas transformantes podría aumentar en efecto el nivel de expresión del gen PPO1, lo que puede conferir a las plantas resistencia al herbicida inhibidor de PPO 2081, de este modo se creó arroz resistente a herbicidas con gen de PPO endógeno knock-up. Tomando esto como ejemplo, el protocolo de inversión de fragmentos cromosómicos del Ejemplo 4 y el Ejemplo 5 también se aplicó a otros genes endógenos cuyo patrón de expresión génica se necesitaba cambiar mediante la introducción y fusión con un promotor requerido, de ese modo se puede crear un nuevo gen, y se pueden crear nuevas variedades con un patrón de expresión génica deseado mediante la transformación en plantas mediada por *Agrobacterium*.

Ejemplo 6: Detección molecular y prueba de resistencia a

herbicidas de las plantas de generación T1 de líneas de arroz resistentes a herbicidas con expresión knock-up del gen de PPO1 endógeno a través de la inversión de fragmento cromosómico

La distancia física entre el gen PPO1 del genoma del arroz de tipo salvaje y el gen CP12 fue de 911 kb. Como se muestra en la Figura 14, se generó un gen PPO1 de alta expresión con una región CDS de PPO1 dirigida por el promotor CP12 en el lado derecho después de la inversión del fragmento cromosómico entre los dos genes. También se puede producir una supresión de un fragmento cromosómico. Para probar si el nuevo gen se puede heredar de manera estable y la influencia de la inversión de los fragmentos cromosómicos en la estabilidad genética, se llevó a cabo una prueba de detección molecular y resistencia a herbicidas en la generación T1 de la cepa de inversión PPO1.

En primer lugar, se observó que el evento de inversión no tuvo un efecto significativo sobre la fertilidad de las plantas de generación T0, ya que todas las cepas T0 positivas pudieron producir semillas normalmente. Se seleccionaron para la detección las generaciones T1 de las cepas QY2234/H5-851 con el fondo Huaidao N.°,5

1. Preparación de muestras:

Para QY2234/H5-851, se plantó un total de 48 plántulas T1. Todas las plantas crecieron normalmente.

2. Identificación molecular por PCR:

1) Detección de la secuencia del cebador: 5’-3’

PPO-R2: AAGGCTGGAAGCTGTTGGG (SEQ ID NO: 67)

CP-R2: CTGAGGAGGCGATAAGAAACGA (SEQ ID NO: 71)

PPO-F2: CGGACTTATTTCCCACCAGAA (SEQ ID NO: 76)

CP-F2: AGGTCTCCTTGAGCTTGTCG (SEQ ID NO: 69)

pg-Hyg-R1: TCGTCCATCACAGTTTGCCA (SEQ ID NO: 54)

pg-35S-F: TGACGTAAGGGATGACGCAC (SEQ ID NO: 55)

2) Los sitios de unión de los cebadores anteriores se muestran en la Figura 14, en donde PPO-R2 + CP-R2 se utilizó para detectar el fragmento de fusión del promotor CP12 derecho y la región codificadora de PPO1 después de la inversión del fragmento cromosómico, y la longitud del producto fue 507 pb; se usó PPO-F2 + CP-F2 para detectar el fragmento de fusión del promotor PPO1 izquierdo y la región codificadora de CP12 después de la inversión del fragmento cromosómico, y la longitud del producto fue de 560 pb; se usó PPO-F2 + PPO-R2 para detectar el sitio blanco de PPO izquierdo antes de la inversión, y la longitud del producto en el control de tipo salvaje fue de 586 pb; se usó CP-F2 + CP-R2 para detectar el sitio blanco CP12 correcto antes de la inversión, y la longitud del producto en el control de tipo salvaje fue de 481 pb. Se usó pg-Hyg-R1 + pg-35S-F para detectar el fragmento de ADN-T del vector de edición, y la longitud del producto fue de 660 pb.

3) Sistema de reacción de PCR y condiciones de reacción:

Sistema de reacción (sistema de 10 µL):

Buffer 2*KOD	5 µL
dNTP 2 mM	2 µL
Enzima KOD	0,2 µL
Cebador F	0,2 µL
Cebador R	0,2 µL
Agua	2,1 µL
Muestra	0,3 µL

Condiciones de reacción:

94 °C	2 minutos	
98 °C	20 segundos	} 40 ciclos
60 °C	20 segundos	
68 °C	20 segundos	
68 °C	2 minutos	
12 °C	5 minutos	

Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa 1% con un voltaje de 180 V durante 10 minutos.

3. Resultados de la detección molecular:

Los resultados de detección se muestran en la Tabla 9. Se detectaron un total de 48 plantas, de las cuales 12 plantas (2/7/11/16/26/36/37/40/41/44/46/47) fueron homocigotas en inversión, 21 plantas (1/3/4/5/6/8/9/15/17/20/22/23/24/27/30/31/33/34/39/42/43) fueron heterocigotas en inversión y 15 plantas (10/12/13/14/18/19/21/25/28/29/32/35/38/45/48) fueron homocigotas en no inversión. La relación de inversión homocigótica: inversión heterocigótica: no inversión homocigótica fue 1: 1,75: 1,25, aproximadamente 1: 2: 1. Por lo tanto, los resultados de la detección cumplieron con la ley de herencia de Mendel, lo que indica que el nuevo gen PPO1 generado por inversión era heredable.

Tabla 9: Resultados de la detección molecular

QY2234-851	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Lado derecho de la inversión	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	+	+	+	−	−	+
Lado izquierdo de la inversión	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	+	+	+	−	−	+

PPO WT	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+
CP12 WT	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+
QY2234-851	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Lado derecho de la inversión	−	+	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	+	+	−	+	+	−	+	+
Lado izquierdo de la inversión	−	+	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	+	+	−	+	+	−	+	+
PPO WT	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	−
CP12 WT	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	−
QY2234-851	41	42	43	44	45	46	47	48												
Lado derecho de la inversión	+	+	+	+	−	+	+	−												
Lado izquierdo de la inversión	+	+	+	+	−	+	+	−												
PPO WT	−	+	+	−	+	−	−	+												

CP12 WT	–	+	+	–	+	–	–	+

Para las plántulas T1 anteriores, se usaron los cebadores Pg-Hyg-R1 + pg-35S-F para detectar el fragmento de ADN-T del vector de edición. Los resultados de la electroforesis de 16 y 41 fueron negativos para el fragmento de ADN-T, lo que indica una inversión homocigótica. Se puede observar que las cepas no transgénicas de inversión homocigótica se pueden segregar de la generación T1 del evento de inversión.

4. Detección de secuenciación de los eventos de edición:

La detección del genotipo de los eventos de inversión se centró en los eventos de edición del nuevo gen PPO en el lado derecho. Se conservaron los eventos de mutación con el marco de codificación de proteínas completo del gen PPO1. Se conservaron los eventos de edición del sitio CP12 en el lado izquierdo que no afectaron el crecimiento normal de las plantas a través de la observación del fenotipo en el invernadero y en el campo. Los genotipos de los eventos de edición detectados en las líneas positivas del evento de inversión se enumeran a continuación, en los que sin fisuras indica idéntico a la secuencia de fragmentos de fusión predicha después de la inversión. Los genotipos de los eventos de inversión QY2234 exitosos en el fondo Huaidao N.°5 fueron los siguientes:

N.°	Genotipo	No.	Genotipo
2234/H5-295	Lado derecho -1bp; lado izquierdo -32bp	2234/H5-650	Sin fisuras lado derecho; lado izquierdo +1bp (G)
2234/H5-381	Lado derecho +18bp	2234/H5-263	Sin fisuras lado derecho; sin fisuras lado izquierdo
2234/H5-410	Lado derecho -1bp; lado izquierdo +1bp	2234/H5-555	Lado derecho -23bp
2234/H5-159	Lado derecho -16bp	2234/H5-645	Lado derecho -5bp, +20bp,
2234/H5-232	Lado derecho -4bp		

Algunos de los mapas de picos de secuenciación y los resultados de la comparación de secuencias se muestran en la Figura 20.

Los genotipos de la exitosa inversión QY2234 en el fondo Jinjing818 fueron los siguientes:

N.°	Genotipo de PPO del lado derecho	N.°	Genotipo de PPO del lado derecho
2234/818-5	Sin fisuras lado derecho	2234/818-144	Lado derecho +1bp

2234/818-42	Lado derecho -16bp	2234/818-151	Lado derecho +2bp, -26bp, pico puro
2234/818-108	Lado derecho -15bp	2234/818-257	Lado derecho +1bp
2234/818-134	Lado derecho +5bp, -15bp		

Algunos de los mapas de picos de secuenciación y los resultados de la comparación de secuencias se muestran en la Figura 21.

Los resultados de secuenciación de los diferentes nuevos genes de PPO1 anteriores con el promotor CP12 fusionado a la región codificadora de PPO1 se muestran en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26.

5. Prueba de resistencia a herbicidas de plántulas de la generación T1:

La prueba de resistencia a herbicidas se realizó en la generación T1 de las líneas de inversión de PPO1 QY2234/H5-851 en la etapa de plántula. El Huaidao N. °5 de tipo salvaje se utilizó como control y se plantó simultáneamente con las semillas de la generación T1 de las líneas de inversión. Cuando las plántulas alcanzaron una altura de planta de 15 cm, se aplicó 2081 mediante pulverización a cuatro niveles de 0,3, 0,6, 0,9 y 1,2 g a.i./mu. Las condiciones de cultivo fueron 28 °C, con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Los resultados de la prueba de resistencia se muestran en la Figura 22. Después de 5 días de la aplicación, las plántulas de arroz de control de tipo salvaje mostraron una fitotoxicidad evidente a una dosis de 0,3 g a.i./mu. Comenzaron a marchitarse desde la punta de la hoja y aparecieron manchas necróticas en las hojas; a una dosis de 0,6 g a.i./mu, las plantas murieron rápidamente. Sin embargo, las plántulas de T1 QY2234/H5-851 pudieron mantener un crecimiento normal a una dosis de 0,3 g a.i./mu, y no se pudo observar fitotoxicidad evidente en las hojas; a dosis de 0,6 y 0,9 g a.i./mu, algunas plántulas T1 mostraron puntas de hojas secas, pero la mayoría de las plántulas T1 pudieron mantenerse verdes y continuar creciendo, mientras que el control murió sustancialmente. A una dosis de 1,2 g a.i./mu, las plantas de control estaban todas muertas, mientras que algunas de las plántulas T1 podían mantenerse verdes y continuar creciendo. Los resultados de la prueba indicaron que la resistencia de las líneas de inversión del gen PPO1 a 2081 se puede heredar de forma estable a su generación T1.

Ejemplo 7: Un método de edición para knocking up la expresión del gen de EPSPS endógeno en plantas

EPSPS fue una enzima clave en la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos en plantas y el sitio blanco del herbicida glifosato biocida. El alto nivel de expresión del gen de EPSPS podría dotar a las plantas de resistencia al

glifosato. El gen de EPSPS (como se muestra en la SEQ ID NO: 4, en el que 1–1897 pb era el promotor y el resto era la región de expresión) se localizó en el cromosoma 6 en arroz. El gen corriente arriba era transcetolasa (TKT, como se muestra en SEQ ID NO: 3, en el que 1–2091 pb era el promotor y el resto era la región de expresión) con una dirección opuesta. La intensidad de expresión del gen de TKT en las hojas fue de 20 a 50 veces mayor que la del gen de EPSPS. Como se muestra en la Figura 2, al inducir simultáneamente rupturas de cadena doble entre el promotor y la región CDS de los dos genes respectivamente, la inversión (Esquema 1) o la duplicación de inversión (Esquema 2) de la región entre las dos rupturas se puede obtener después de las pruebas. En ambos casos, el promotor del gen de EPSPS se puede reemplazar con el promotor del gen de TKT, de este modo aumenta el nivel de expresión del gen EPSPS y se obtiene la resistencia al glifosato. Además, los Esquemas 3, 4 y 5, como se muestra en la Figura 2, también podrían crear nuevos genes de EPSPS dirigidos por el promotor del gen de TKT. La estructura génica de EPSPS adyacente y opuesta en dirección con relación a TKT se conservó en plantas monocotiledóneas (Tabla 10). Mientras que en plantas dicotiledóneas, ambos genes también eran adyacentes pero en la misma dirección; por tanto, este método fue universal en las plantas.

Tabla 10: Distancia entre el gen EPSPS y el gen de TKT

adyacente en diferentes plantas

Especies	Ubicación (cromosoma)	Distancia del sitio de inicio de la región CD (kb)	Dirección
Arroz	6	4	Inversa <TKT-EPSPS>
Trigo	7A	35	Inversa <TKT-EPSPS>
	7D	15	Inversa <TKT-EPSPS>
	4A?	50	Inversa <TKT-EPSPS>
Maíz	9	22	Inversa <TKT-EPSPS>
Brachypodium distachyon	1	5	Inversa <TKT-EPSPS>
Sorgo	10	15	Inversa <TKT-EPSPS>
Mijo	4	5	Inversa <TKT-EPSPS>
Poroto de soja	3	6	Directo TKT>EPSPS>

Tomate	5	6	Directo TKT>EPSPS>
Maní	2	6	Directo TKT>EPSPS>
	12	5	Directo TKT>EPSPS>
Algodón	9	22	Directo TKT>EPSPS>
Alfalfa	4	8	Directo TKT>EPSPS>
Arabidopsis	2	5	Directo TKT>EPSPS>
Uva	15	17	Directo TKT>EPSPS>

Para este fin, se usó pHUE411 como el esqueleto, y los siguientes como blancos:

Nombre del ARN sg	Secuencia (5' a 3)	SEQ ID NO
OsEPSPS-ARN guía 1	CCACACCACTCCTCTCGCCA	77
OsEPSPS-ARN guía 2	CCATGGCGAGAGGAGTGGTG	78
OsEPSPS-ARN guía 3	ATGGTCGCCGCCATTGCCGG	79

OsEPSPS-ARN guía 4	GACCTCCACGCCGCCGGCAA	80
OsEPSPS-ARN guía 5	TAGTCATGTGACCATCCCTG	81
OsEPSPS-ARN guía 6	TTGACTCTTTGGTTCATGCT	82

Se han construido varios vectores de doble blanco diferentes:

pQY002061 pHUE411-EPSPS-sgRNA1+3

pQY002062 pHUE411-EPSPS-sgRNA2+3

pQY002063 pHUE411-EPSPS-sgRNA1+4

pQY002064 pHUE411-EPSPS-sgRNA2+4

pQY002093 pHUE411-EPSPS-sgRNA2+5

pQY002094 pHUE411-EPSPS-sgRNA2+6

(2) Con los cebadores de detección relevantes que se muestran en la siguiente tabla, se amplificaron los fragmentos que contienen los sitios blanco en ambos lados o los fragmentos predichos generados por la fusión del promotor UBI2 y la región codificadora de HPPD, y la longitud de los productos está entre 300 1000 pb.

Cebador	Secuencia (5′ a 3′)	SEQ ID NO
EPSPSinversion checkF1	ATCCAAGTTACCCCCTCTGC	83
EPSPSinversion checkR1	CACAAACACAGCCACCTCAC	84
EPSPSinversion check-nestF2	ATGTCCACGTCCACACCATA	85
EPSPSinversion check-nestR2	AATGGAATTCACGCAAGAGG	86
EPSPSinversion checkF3	GTAGGGGTTCTTGGGGTTGT	87
EPSPSinversion checkR3	CGCATGCTAACTTGAGACGA	88
EPSPSinversion check-nestF4	GGATCGTGTTCACCGACTTC	89
EPSPSinversion check-nestR4	CCGGTACAACGCACGAGTAT	90

EPSPSinversion checkF5	GGCGTCATTCCATGGTTGATTGT	91
EPSPSinversion checknestF6	GATAGACCCAGATGGGCATAGAATC	92
EPSPSinversion checkR5	TGCATGCATTGATGGTTGGTGC	93
EPSPSinversion checknestR6	CCGGCCCTTAGAATAAAGGTAGTAG	94

Después de la transformación de protoplastos, los resultados de la detección mostraron que se obtuvieron los eventos de inversión esperados. Como se muestra en la Figura 15, el resultado de la secuenciación de la detección de inversión del protoplasto transformado con el vector pQY002062 se mostró en la SEQ ID NO: 11; el resultado de la secuenciación de la detección por supresión del protoplasto transformado con vector pQY002062 se mostró en SEQ ID NO: 12; el resultado de la secuenciación de la detección de inversión del protoplasto transformado con el vector pQY002093 se mostró en SEQ ID NO: 13; y el resultado de la secuenciación de la detección por supresión del protoplasto transformado con el vector pQY002093 se mostró en SEQ ID NO: 14.

Estos vectores se transfirieron a *Agrobacterium* para

transformar callos de arroz. Se obtuvieron plantas que contienen el nuevo gen de EPSPS. Los resultados del bioensayo de herbicidas mostraron que las plantas tenían una resistencia evidente al herbicida glifosato.

Ejemplo 8: Un método de edición para knocking up la expresión de el gen de PPO endógeno en *Arabidopsis*

La protoporfirinógeno oxidasa (PPO) fue uno de los principales blancos de los herbicidas. Mediante la PPO endógena de plantas de alta expresión, la resistencia a los herbicidas inhibidores de la PPO se puede incrementar significativamente. El gen de PPO de *Arabidopsis* (como se muestra en SEQ ID NO: 1, en el que 1–2058bp fue el promotor y el resto fue la región de expresión) ubicado en el cromosoma 4, y el gen ubiquitina10 (como se muestra en SEQ ID NO: 2, en el que 1–2078 pb era el promotor y el resto era la región de expresión) ubicado 1,9 M corriente abajo con la misma dirección que el gen PPO.

Como se muestra en el Esquema ilustrado en la Figura 3, se generan simultáneamente rupturas de cadena doble en los sitios entre el promotor y la región CDS de los genes de PPO y ubiquitina10 respectivamente. Los eventos de duplicación de la región entre las dos rupturas se pueden obtener mediante pruebas, es decir, un nuevo gen generado mediante la fusión del promotor de ubiquitina10 y la región codificadora de PPO. Además, siguiendo el Esquema 2 como se muestra en la Figura

1, también se puede crear un nuevo gen en el que el promotor de ubiquitina10 y la región codificadora de PPO se fusionaron.

Con este fin, se utilizó pHEE401E como esqueleto (https://www.addgene.org/71287/), y se utilizaron las siguientes ubicaciones como sitios blanco:

Nombre del ARNsg blanco	Secuencia (5' a 3)	SEQ ID NO
AtPPO-ARN guía 1	CAAACCAAAGAAAAAGTATA	95
AtPPO-ARN guía 2	GGTAATCTTCTTCAGAAGAA	96
AtPPO-ARN guía 3	ATCATCTTAATTCTCGATTA	97
AtPPO-ARN guía4	TTGTGATTTCTATCTAGATC	98

Los vectores de blanco doble se construyeron siguiendo el método descripto por "Wang ZP, Xing HL, Dong L, Zhang HY, Han CY, Wang XC, Chen QJ. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in Arabidopsis in a single generation. Genome Biol. 2015 Jul 21;16:144.":

pQY002076	pHEE401E-AtPPO-sgRNA1+3
pQY002077	pHEE401E-AtPPO-sgRNA1+4
pQY002078	pHEE401E-AtPPO-sgRNA2+3
pQY002079	pHEE401E-AtPPO-sgRNA2+4

Arabidopsis se transformó de acuerdo con el método de la siguiente manera:

(1) Transformación con *Agrobacterium*

Las células competentes de *Agrobacterium* GV3101 se transformaron con los plásmidos recombinantes para obtener *Agrobacterium* recombinante

(2) Preparación de la solución de infección con *Agrobacterium*

1) Se transformaron células competentes *Agrobacterium* GV3101 con los plásmidos recombinantes para obtener *Agrobacterium* recombinante.

(2) Preparación de la solución de infección por *Agrobacterium*

1) Se inoculó *Agrobacterium* activado en 30 ml de medio líquido YEP (que contiene 25 mg/L de Rif y 50 mg/L de Kan), se cultivó a 28 °C con agitación a 200 rpm durante la noche hasta que el valor de OD600 fue de aproximadamente 1,0–1,5.

2) Las bacterias se recolectaron por centrifugación a 6000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante.

3) Las bacterias se resuspendieron en la solución de infección (sin necesidad de ajustar el pH) para alcanzar una OD600 = 0,8 para su uso posterior.

(3) Transformación de *Arabidopsis*

1) Antes de la transformación de la planta, las plantas deben crecer bien con una inflorescencia exuberante y sin

respuesta al estrés. La primera transformación se puede realizar siempre que la altura de la planta alcance los 20 cm. Cuando el suelo estuvo seco, se realizó el riego según corresponda. El día antes de la transformación, las silicuas crecidas se cortaron con tijeras.

2) La inflorescencia de la planta para transformar se sumergió en la solución anterior durante 30 segundos a 1 minuto con agitación suave. La planta infiltrada debe tener una capa de película líquida sobre ella.

3) Después de la transformación, la planta se cultivó en la oscuridad durante 24 horas y luego se llevó a un ambiente de luz normal para el cultivo.

4) Después de una semana, se realizó la segunda transformación de la misma forma.

(4) Recolección de semillas

Las semillas se recolectaron cuando estaban maduras. Las semillas recolectadas se secaron en un horno a 37 °C durante aproximadamente una semana.

(5) Selección de plantas transgénicas

Las semillas se trataron con desinfectante durante 5 minutos, se lavaron con ddH_2O 5 veces y luego se esparcieron uniformemente en medio de selección MS (que contiene 30 μg/ml de Hyg, 100 μg/ml de Cef). Luego se colocó el medio en una incubadora de luz (a una temperatura de 22 ℃, 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, intensidad de luz 100–150 μmol/m^2/s y

una humedad del 75%) para el cultivo. Se seleccionaron las plántulas positivas y se trasplantaron al suelo después de una semana.

(6) Detección de plantas mutantes T1

(6,1) Extracción de ADN genómico

1) Se cortaron aproximadamente 200 mg de hojas de Arabidopsis y se colocaron en un tubo de centrífuga de 2 ml. Se agregaron bolas de acero y las hojas se trituraron con un disruptor tisular de alto rendimiento.

2) Después de triturar a fondo, se agregaron 400 µL de buffer de extracción SDS y se mezclaron por inversión. La mezcla se incubó en un baño de agua a 65 ℃ durante 15 minutos y se mezcló por inversión cada 5 minutos durante el período.

3) La mezcla se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos.

4) Se retiraron 300 µl de sobrenadante y se transfirieron a un nuevo tubo de centrífuga de 1,5 ml, se agregó un volumen igual de isopropanol preenfriado a −20 °C en el tubo de centrífuga y luego el tubo de centrífuga se mantuvo a −20 °C durante 1 hora o toda la noche.

5) La mezcla se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante.

6) Se añadieron 500 µl de etanol 70% al tubo de centrífuga para lavar el precipitado, la solución de lavado se descartó después de la centrifugación (sin descartar cuidadosamente el precipitado). Después de que el precipitado se secó a

temperatura ambiente, se agregaron 30 µl de ddH_2O para disolver el ADN y luego se almacenó a −20 °C.

(6,2) Amplificación por PCR

Con el genoma extraído de la planta T1 como molde, se amplificó el fragmento blanco con los cebadores de detección. Se tomaron 5 µl del producto de amplificación y se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, y luego se obtuvieron imágenes mediante un generador de imágenes en gel. El producto restante fue secuenciado directamente por una empresa de secuenciación.

Los resultados de la secuenciación mostraron que la duplicación del gen AtPPO1 se logró con éxito en Arabidopsis, y la prueba de resistencia a herbicidas mostró que la planta con duplicación tenía resistencia al herbicida PPO.

Ejemplo 9: Creación del gen GH1 con nuevas características de expresión en pez cebra

Los genes de la hormona del crecimiento (GH) en los peces controlaron su velocidad de crecimiento y desarrollo. En la actualidad, la alta expresión del gen GH en los salmones del Atlántico a través de la tecnología transgénica podría aumentar significativamente sus tasas de crecimiento. La técnica fue de gran valor económico, pero solo fue aprobada para su comercialización después de décadas. El gen GH1 era el gen de la hormona del crecimiento en el pez cebra. En la presente invención, los promotores adecuados en el pez cebra

(adecuados en términos de expresión continua, intensidad y especificidad tisular) se fusionaron in vivo mediante supresión, inversión, duplicación, duplicación de inversión, transferencia de cromosomas, etc., para crear una variedad de pescado de crecimiento rápido.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la descripción se incorporan en la presente como referencia, como si cada publicación o solicitud de patente se incorporara individual y específicamente en la presente como referencia.

Aunque la invención anterior se ha descrito con más detalle por medio de ejemplos y realizaciones para una comprensión clara, es obvio que ciertos cambios y modificaciones se pueden implementar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, tales cambios y modificaciones están dentro del alcance de la presente invención.

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.

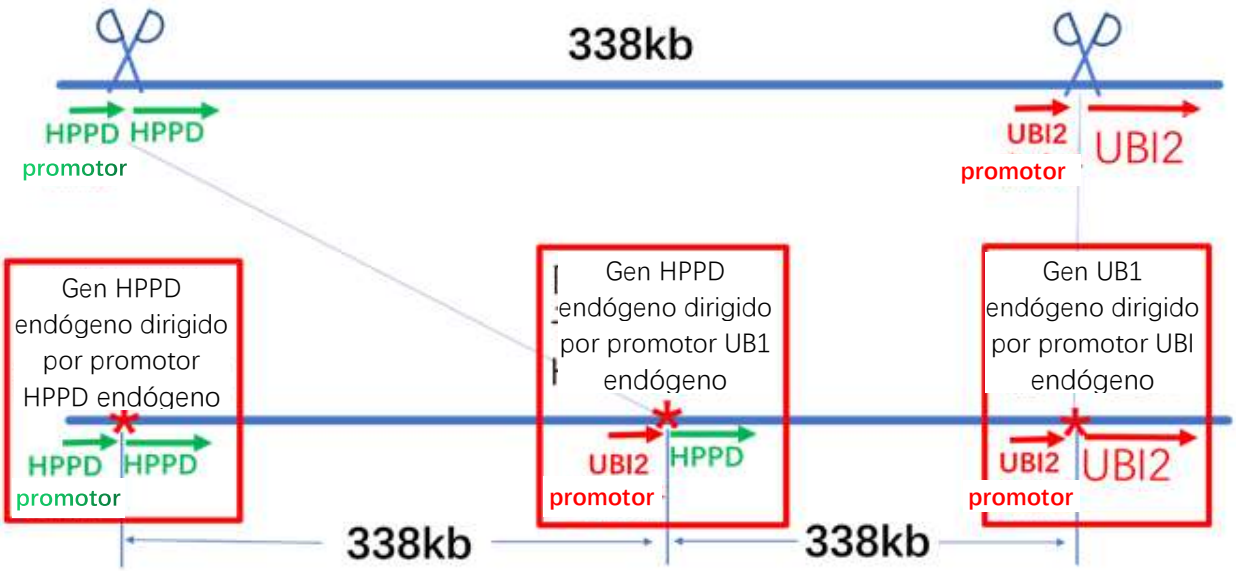
23. Un ADN que comprende el gen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20-22.

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.

Esquema 1 Duplicación



Esquema 2 Dos inversión consecutivas

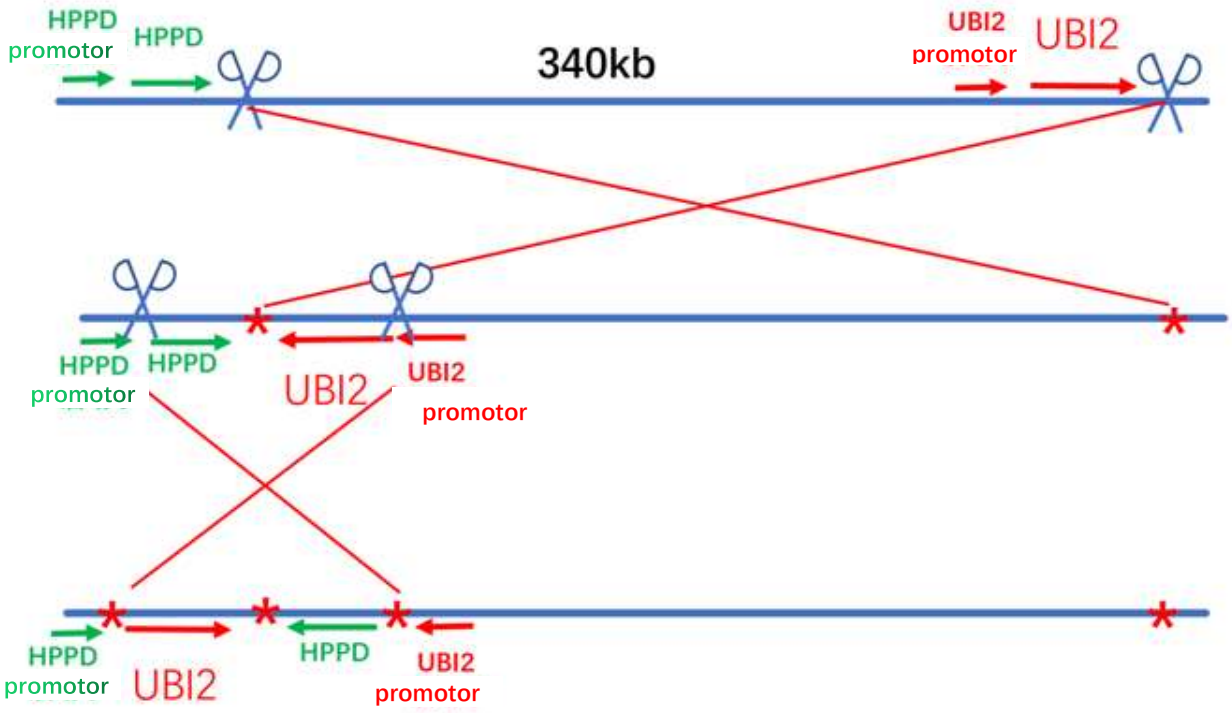


Figura 1

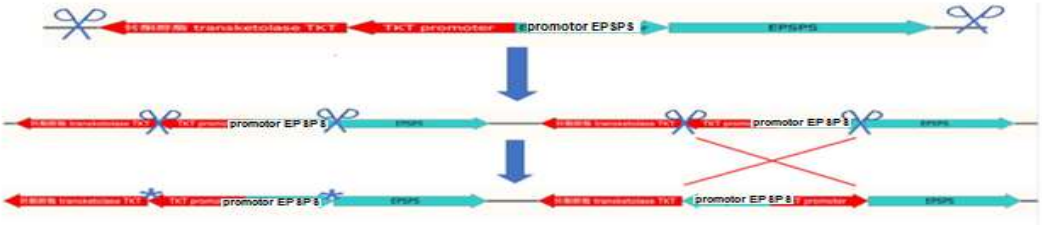
Esquema 1 Inversión



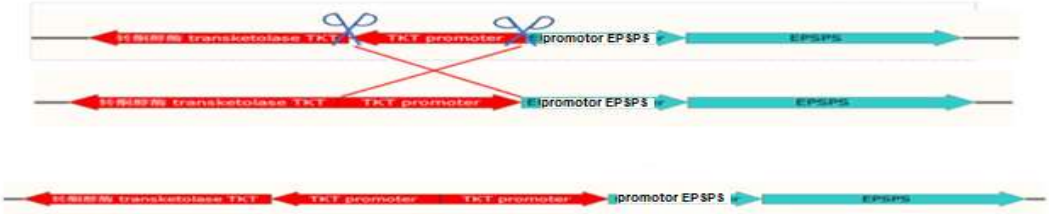
Esquema 2 Duplicación de inversión



Esqeuma 3: Primero duplicación luego inversión



Esquema 4 Inversión del promotor TKT y duplicación de inversión



Esquema 5 Primero inversión luego duplicación

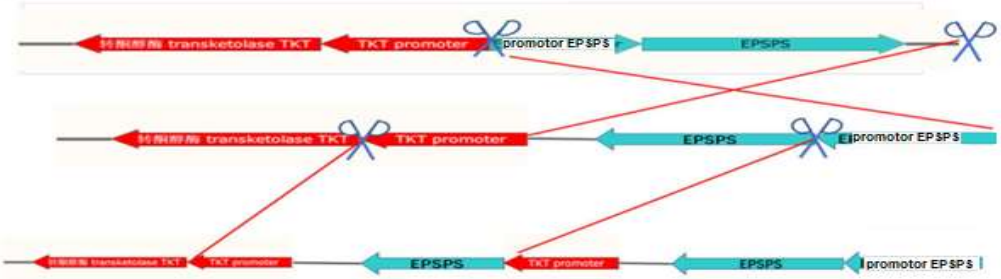


Figura 2

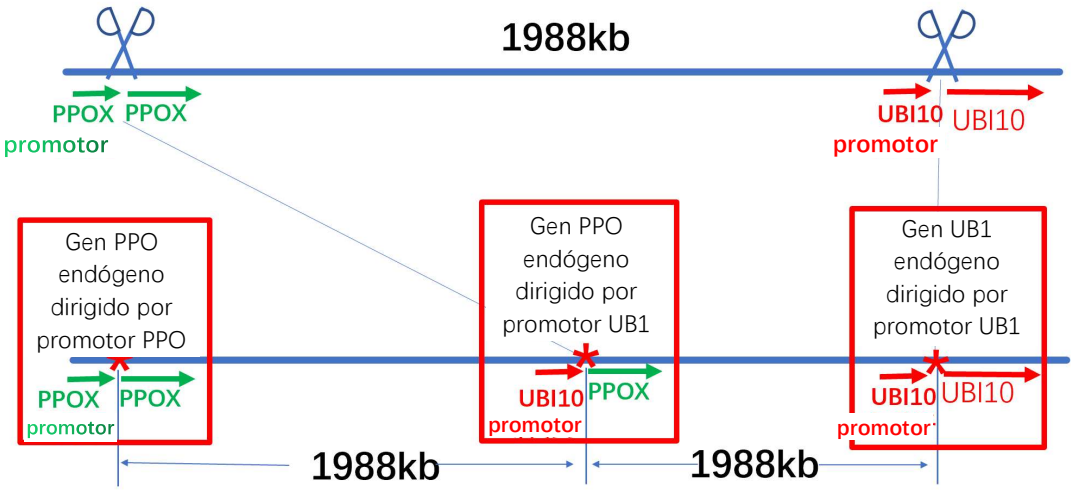
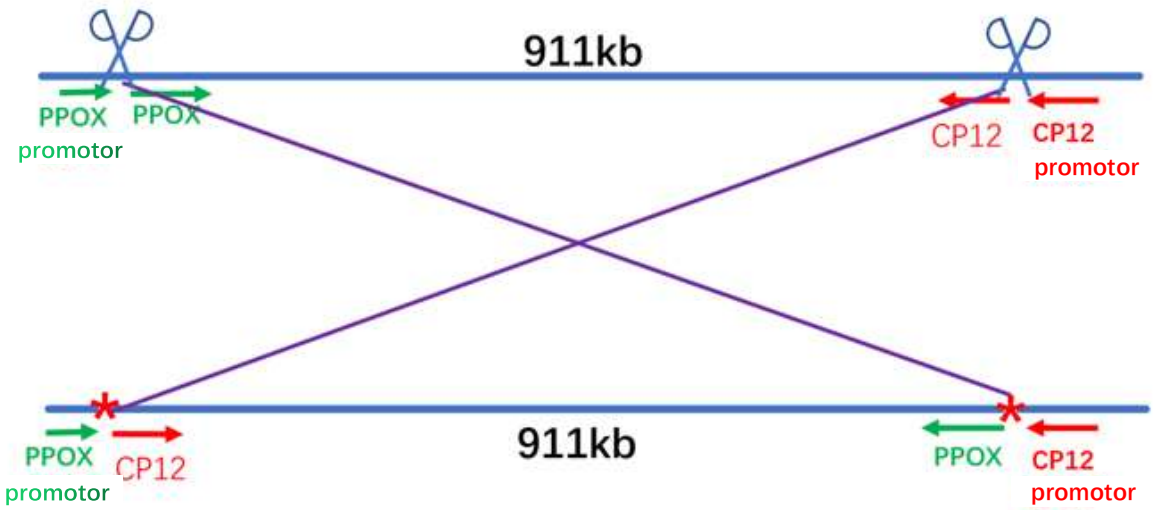


Figura 3

Esquema 1 Inversión



Esquema 2 Primero inversión luego duplicación

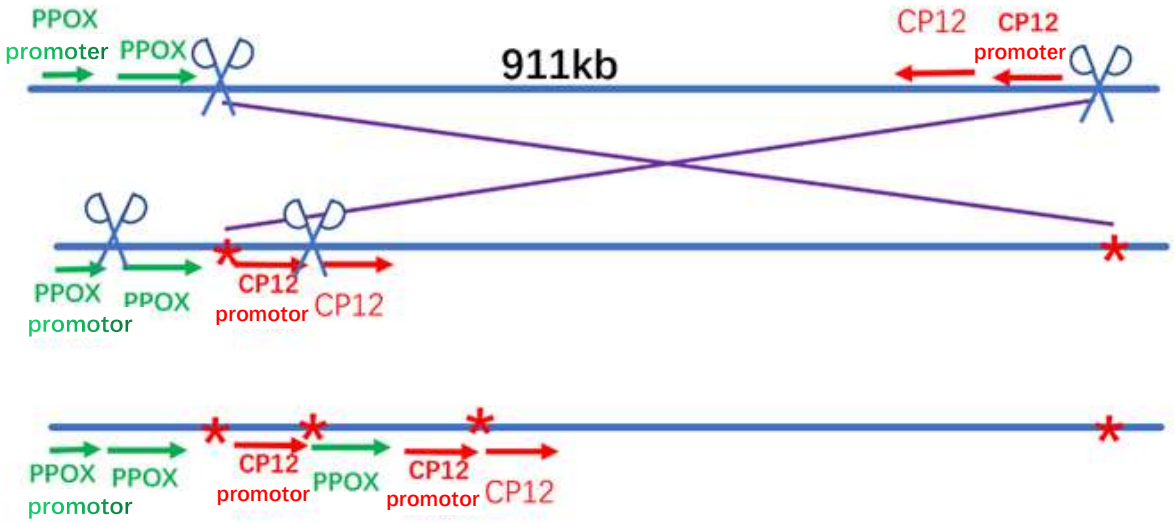


Figura 4

(2) Resultado de la secuenciación de la duplicación resultante de la transformación del vector pQY002066 del protoplasto (la parte subrayada es el promotor del gen Ubiquitina2, la parte en cursiva es la región de expresión del gen HPPD

TTCAAGTCCATAGGCGAGGCGACCGGCCCGCGGCGGACGCGGCGTCGGCGCACCAGAGCTCGACGTGGTGGAACGCGA
GCGCCTGGAACCGGTCGCTCCGCGGGTTGGCGCGGACGAAGCGGCGGTGCCCGACGAGGCGGAACCCCGCGTTCTCCCC
CGCCGCCGCAGCGGCCGAGACGGCGCCGGTGGTGGCGGTGGGGGTGGGAGTGGGAGGCATGGCGCGGCGCGGCGCG
GCGTGGCGTGGCGCGTCGTGGGGTGTGGGGGAGTGGATGACAGTGGCGGCGTGGGGGGAGGAGTTGGTGGTGGGGGG
TTAAATAAAGGGAGGAGATGGCGCCACGTGGACGCTAAGTCTAGTGGTTGCGGACGGGATTTGTCCTCTGGTGCTGGTTG
CCTTGGC*AGATAGGGTAAGAACTAGCACAAGATTAAGGACACAACAACGGATCAAACAGCAAACATATTCCAACAGAACATA*
CATGTATTCAAAAGATAGTAACAGGCACATCACACATGTATTCAGATAGGTAGTAACAGCACACGTATCCTGAACTTCATAAA
TAAGTAGAATGAACTAGTGGCAATAACTTTTCACACAGAACATCTCCCTTGTTTTCAAATATGTAGTAACAGCACACGTATCCT
GTACTTCAAAACTTAGTAGAATGAACTAGTGGCAGTAATCTTTCACACAGAAAGAATGAACTAGTGGCAATAATCTTTCACAC
AGAATGTTGGTTGATGGATAG

(1) Resultado de la secuenciación de la duplicación resultante de la transformación del vector pQY002068 del protoplasto (la parte subrayada es el promotor del gen Ubiquitina2, la parte en cursiva es la región de expresión del gen HPPD)

CAACGTGCCTTAGGCGAGGCGACCGGCCCGCGGCGGACGCGGCGTCGGCGCACCAGAGCTCGACGTGGTGGAACGCGA
GCGCCTGGAACCGGTCGCTCCGCGGGTTGGCGCGGACGAAGCGGCGGTGCCCGACGAGGCGGAACCCCGCGTTCTCCCC
CGCCGCCGCAGCGGCCGAGACGGCGCCGGTGGTGGCGGTGGGGGTGGGAGTGGGAGGCATGGCGCGGCGCGGCGCG
GCGTGGCGTGGCGCGTCGTGGGGTGTGGGGGAGTGGATGACAGTGGCGGCGTGGGGGGAGGAGTTGGTGGTGGGGGG
TTAAATAAAGGGAGGAGATGGCGCCACGTGGACGCTAAGTCTAGTGGTTGCGGACGGGATTTGTCCTCTGGTGCTGGTTG
CCTTGG*AGATAGGGTAAGAACTAGCACAAGATTAAGGACACAACAACGGATCAAACAGCAAACATATTCCAACAGAACATAC*
ATGTATTCAAAAAGATAGTAACAGGCACATCACACATGTATTCAGATAGGTAGTAACAGCACACGTATCCTGAACTTCAGAAAT
AAGTAGAATGAACTAGTGGCAATAACTTTTCCCCCCAAAAACCTGTC

Figura 5

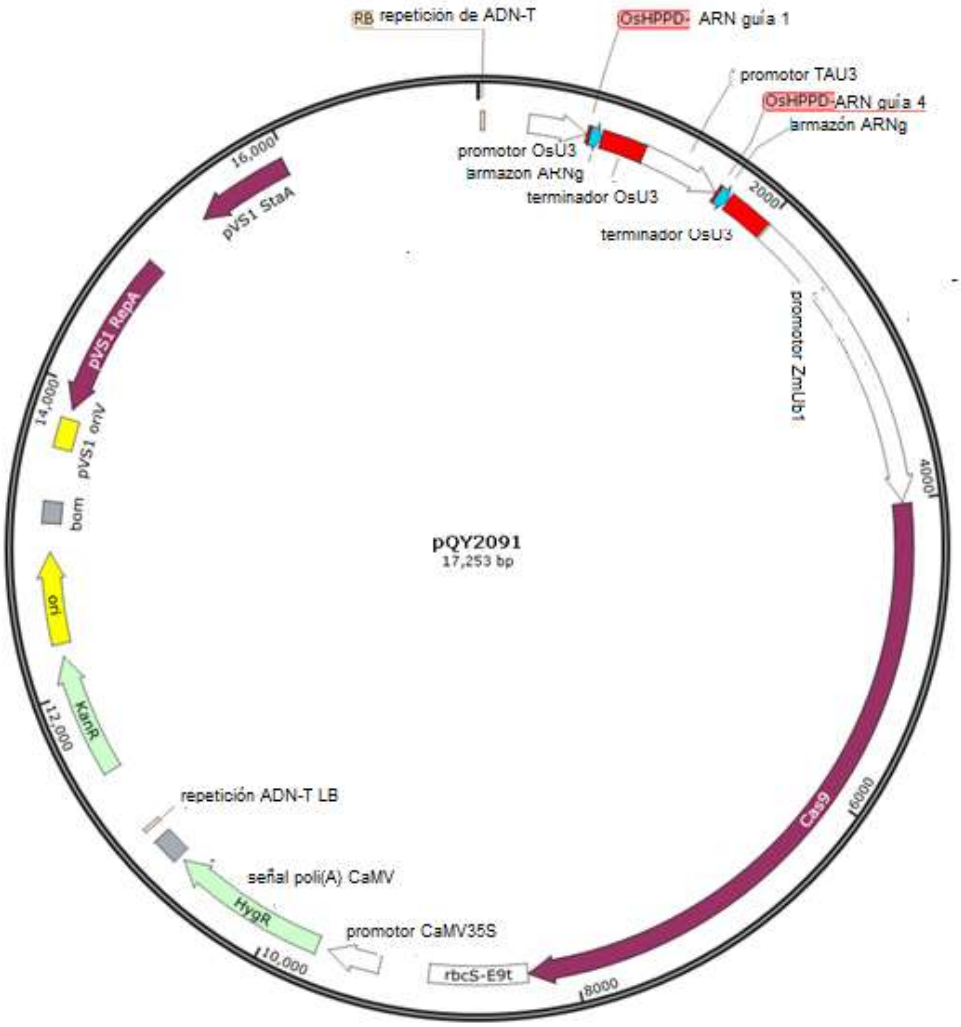


Figura 6

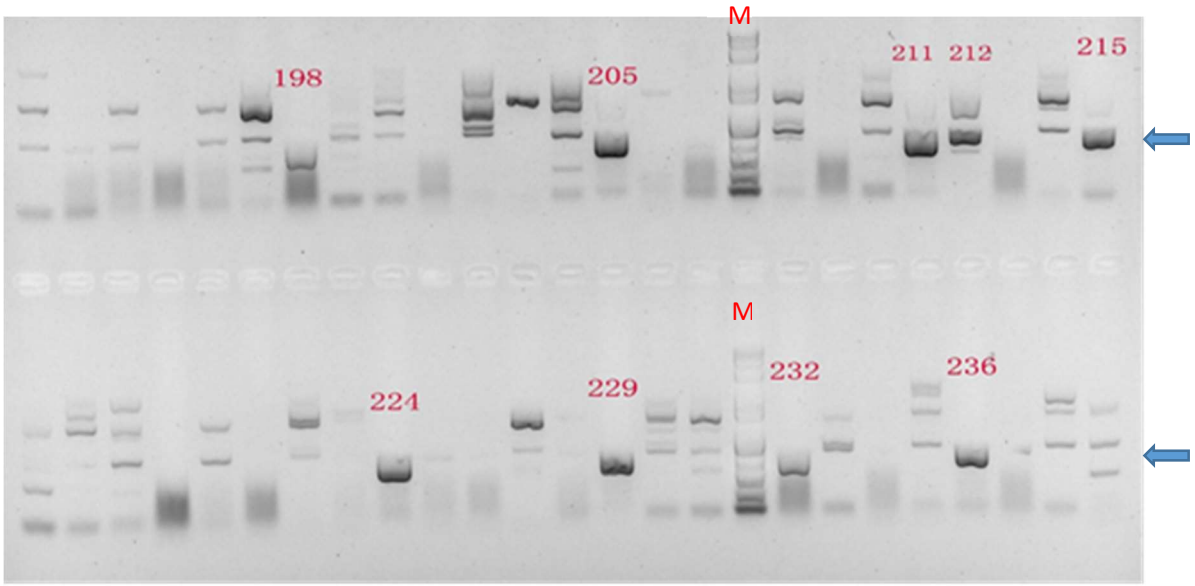


Figura 7

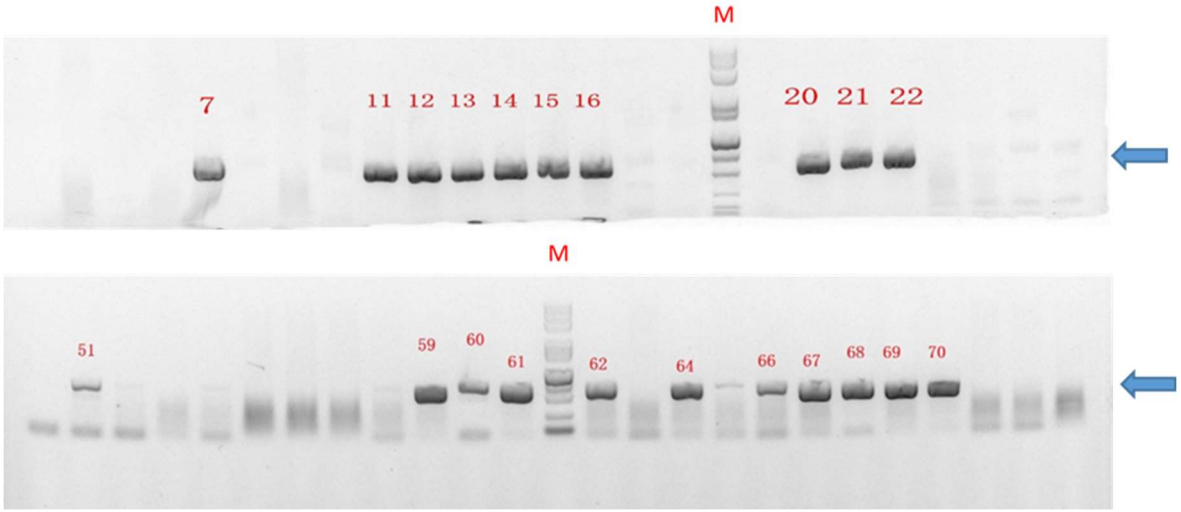
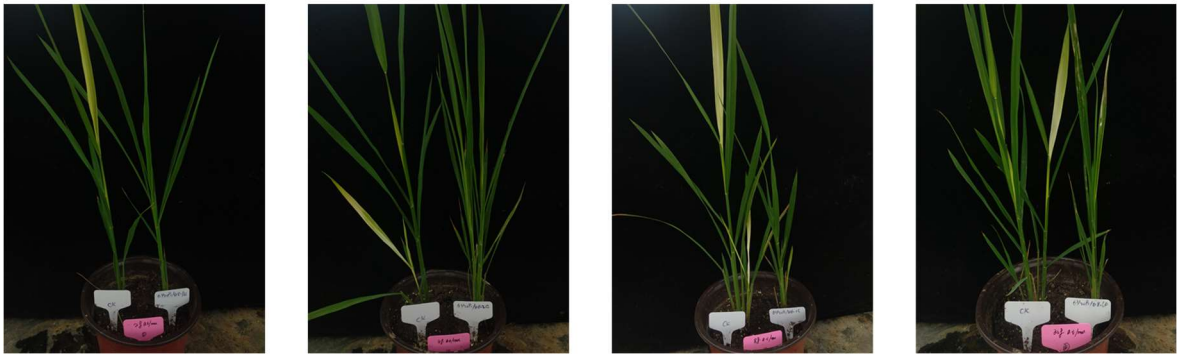


Figura 8

Prueba de resistencia a Shuangzuocaotong para líneas knock-up HPPD de QY2091



2 g a.i./mu | 4 g a.i./mu | 8 g a.i./mu | 32 g a.i./mu

Figura 9

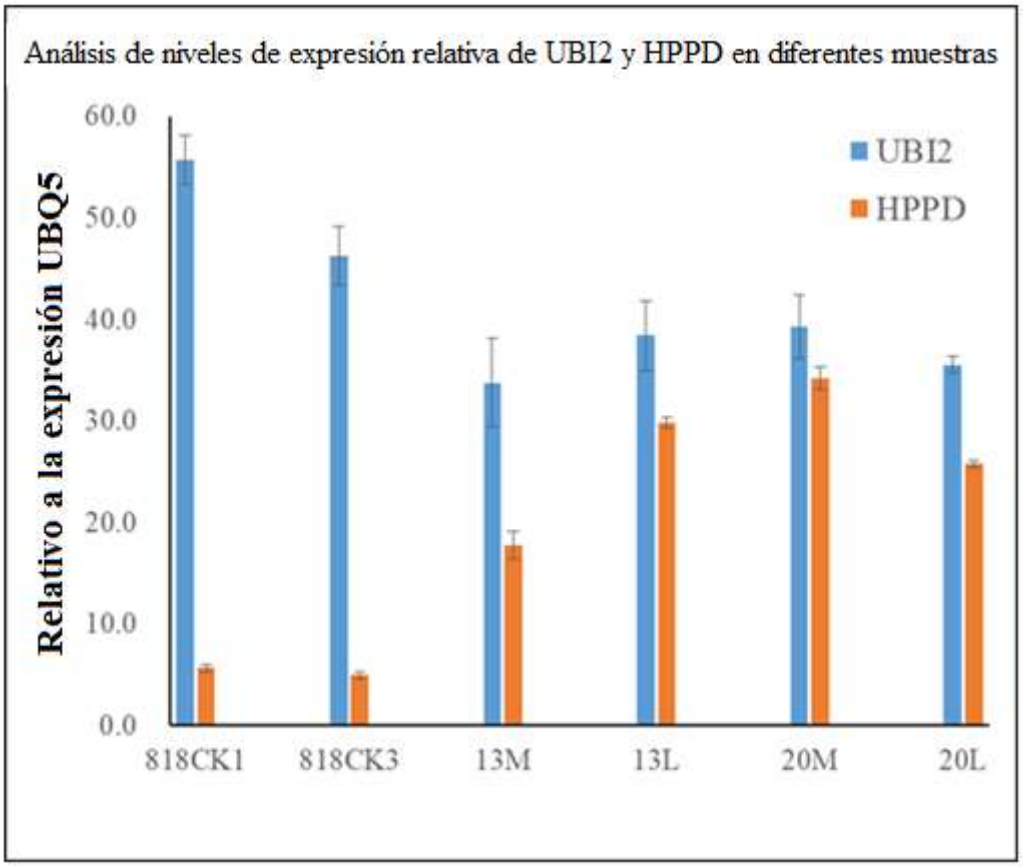


Figura 10

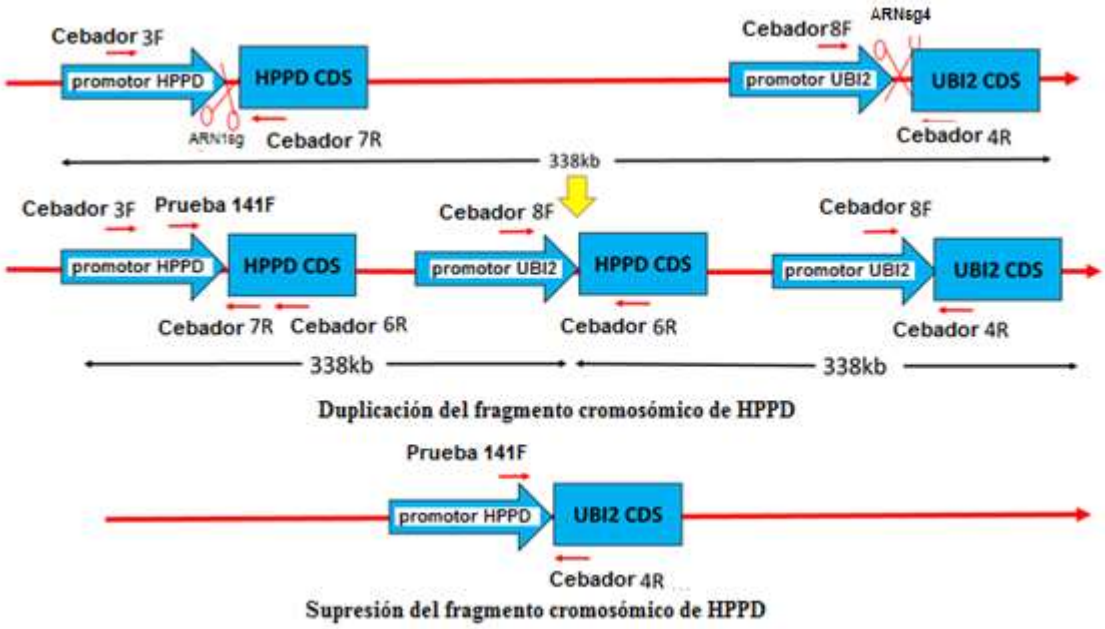


Figura 11



Figura 12



Figura 13

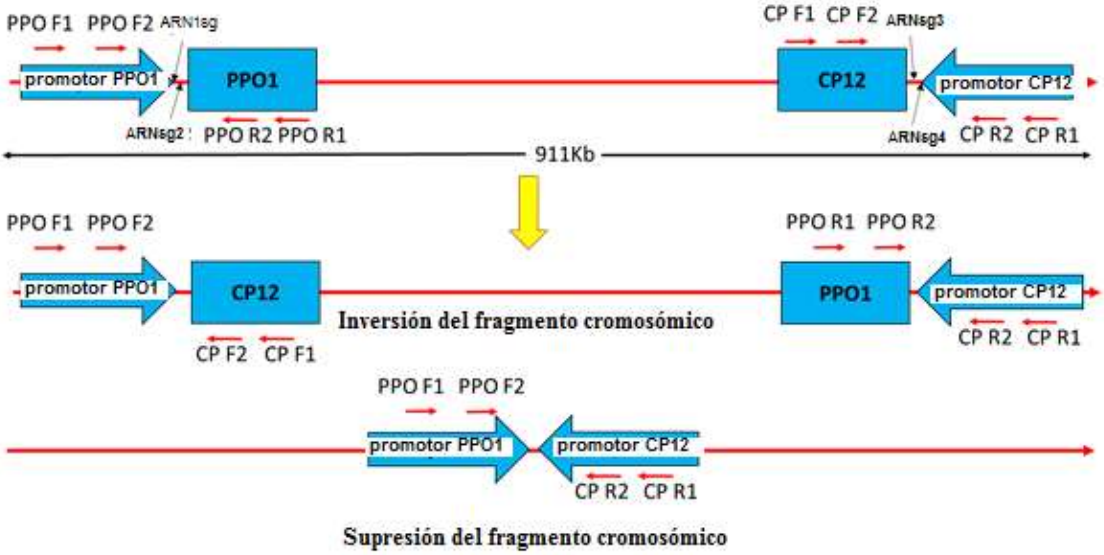


Figura 14

(1) Resultado de la secuenciación de la inversión resultante de la transformación del vector pQY002062 del protoplasto (la parte subrayada es la región de expresión OsEPSPS, la parte cursiva es el promotor OsTKT)

GGGCGGATTTCGACGGAGGGGCGGAGAGGAGGAGGATCCTGTTGGAGAGCGACTTGGACCCTGGCAGCTGAACCGCCC
CGGAGATCTCCCTGATGGGCTGGAGCACGATCTCCTCCGCCTTCGCCGCCGGCGCTGCCACCGACGACGACGACGCGGAC
GCCACCACCACCGCCTCCCGCCGCCCCCGCGCCCGCACCCGCACCCGCATCCCCCCGCGCGCCGCGGCGGGCAGCCGCAG
CTGCTTCCGCGACGAGAACGCCGCCGACGCCGCCACGGCCTGGTCCAGGGACACCGCCGCCGCAGCCGCGGCGTTGGAC
GCCATGGTCGCCGCCATTGCGGTGTGGTGGCGAGGAGAGGCGGAGATGGCGAGGTTGTGGGGTGGGAGATGGGATGGG
TTATGTATAGACTTGGGGGTGCGTTTTGGGGGGACTCGTAGCCAATAAAAAGGAGGGGGCTATGGTGTGGCCGTTTGGACA
T

(2) Resultado de la secuenciación de la supresión resultante de la transformación del vector pQY002062 del protoplasto (la parte subrayada es la región de expresión de OsEPSPS, la parte en cursiva es la región de expresión de OsTKT)

TTTTCGTTGGAGGGGCGGAGAGGAGGAGGATCCTGTTGGAGAGCGACTTGGACCCTGGCAGCTGAACCGCCCCGGAGAT
CTCCCTGATGGGCTGGAGCACGATCTCCTCCGCCTTCGCCGCCGGCGCTGCCACCGACGACGACGACGCGGACGCCACCA
CCACCGCCTCCCGCCGCCCCCGCGCCCGCACCCGCACCCGCATCCCCCCGCGCGCCGCGGCGGGCAGCCGCAGCTGCTTC
CGCGACGAGAACGCCGCCGACGCCGCCACGGCCTGGTCCAGGGACACCGCCGCCGCAGCCGCGGCGTTGGACGCCATGG
TCGCCGCCATTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACTGCCTCGGTCCATGGCCGCG
CACTCCGTCGCCGCCGCGCACGCCACCATCGCCGCGCGCGCGGGTGCCGCCGCGCCAGCGCCCGCGCCGCCGGAGCGCCT
CGGGTTCCGCCTCAGCGCGCTCGCCGGCCGCGGCCTCCGCTCCCCGCTCCCGCCTCGCCGCGGCGCGCCATCGGCGTCCGC
GTCGCGCCGCCGCCACAACAACCGCGTGCGCGCGGCGGCGGTCGAGACGCTCGAGGGGCAGGCGGCGACGGGGGCGCT
GCTCGAGAAGTCGGAAACCCCCGAATCCAAA

(3) Resultado de secuenciación de la inversión resultante de la transformación del vector pQY002093 del protoplasto (la parte subrayada es la región de expresión de OsTKT, la parte en cursiva es el promotor de inversión de OsTKT)

GAACGATGCGAGCCCCACGCTCGACCGCCGCCGCGCGCACGCGGTTGTTGTGGCGGCGGCGCGACGCGGACGCCGATGG
CGCGCCGCGGCGAGGCGGGAGCGGGGAGCGGAGGCCGCGGCCGGCGAGCGCGCTGAGGCGGAACCCGAGGCGCTCC
GGCGGCGCGGGCGCTGGCGCGGCGGCACCCGCGCGCGCGGCGATGGTGGCGTGCGCGGCGGCGACGGAGTGCGCGGC
CATGGCGAGAGGAGTGGATGGTCACCTGACTACCGGTCCCCTCAAACTGGTTTAATTTCCCCTGGCAAAATCCACCTCCGGA
CCTACAATTTAAGCTCCCCTTTTTTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAGAGGGTAAACCAACTAACCTAGCTTGGACCTTTTTTAA
TGGAGTAAGGGATTTAAAACAAAAACAAAAAAAAAATCCAAACTGGTAAAAAAACAAACAAACCATTTAAATAAAAATTTTC
CCCAAAGGGAAATTCCTGGCGAAAAAAATCTATGCCCCTCTGGGTCTATCTTGGTATTTTTTCCCCGGGGCTCCGTTTCATCC
TTCATTTTGGCGAATACAAAAAAAACCGTTTGAATTTTTTTGGTTGAAAGAATGGCAATTTACTGGCCAGGATCATGTACTC
TGCATCTAAGAATTGATTTTTTGACCCCAAATTTCAACTTAGCCTCCATCGCAGTAGTGCGCACACACAGGCTGAAGGTGACT
CTTAGACCCAATGTCACTATCTCAGCAATATGCAGAGAGAATGACCCAA

(4) Resultado de la secuenciación de la supresión resultante de la transformación del vector pQY002093 del protoplasto (la parte subrayada es la región de expresión de OsTKT, la parte en cursiva es el promotor de OsEPSPS)

AGAACGATGCGCAGCCTCGGCGTCTCGACCGCCGCCGCGCGCACGCGGTTGTTGTGGCGGCGGCGCGACGCGGACGCCG
ATGGCGCGCCGCGGCGAGGCGGGAGCGGGGAGCGGAGGCCGCGGCCGGCGAGCGCGCTGAGGCGGAACCCGAGGCG
CTCCGGCGGCGCGGGCGCTGGCGCGGCGGCACCCGCGCGCGCGGCGATGGTGGCGTGCGCGGCGGCGACGGAGTGCG
CGGCCATGGCGAGAGGAGTGTGGTGGGTACCCTTTCAAACCCCCAAAAGAGTGGGTCGGGTCTCTCTTTCGGCTCTCGGC
GGGGGCTGCTTCCCACAAAGACCGCCATCAGACGTGAGTGAACTGCAAGTCTGCAACTACCACTCCAGGTGCTCTCCCCTTA
AATTACTTTACTACTACCTTTATTCTAGGGGCCGGTTCAGATAATTGCCAAAATCACTCGCACCATTTTTTAATAATATTAGGATG
AAATATATATGTCGCGCCAAATTTTTCTACTGTTACTGAAATTTGGACACAAACTACACACCACCGTATATTTATCTTTTTTACCA
AATAGGGGTATGGTTTAAAATGACTTTAATCTAAATAGGCCCTGAAATATAAAAGCGCCCCACCCCTCA

Figura 15

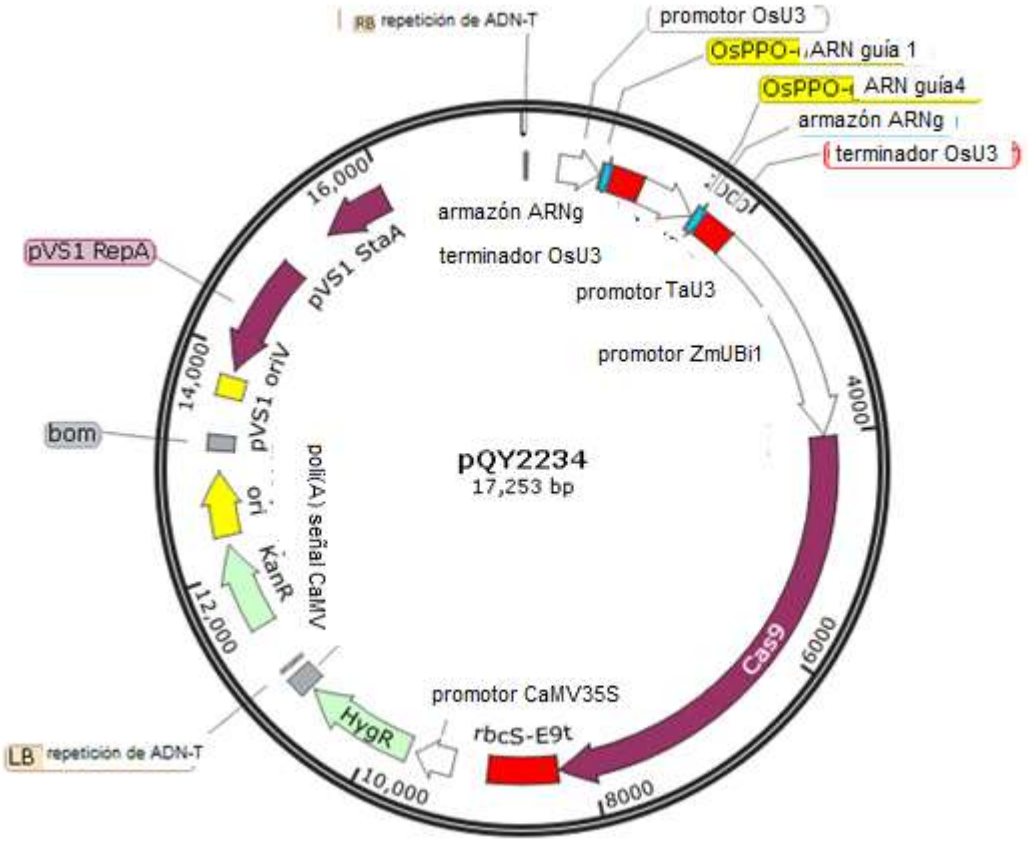


Figura 16

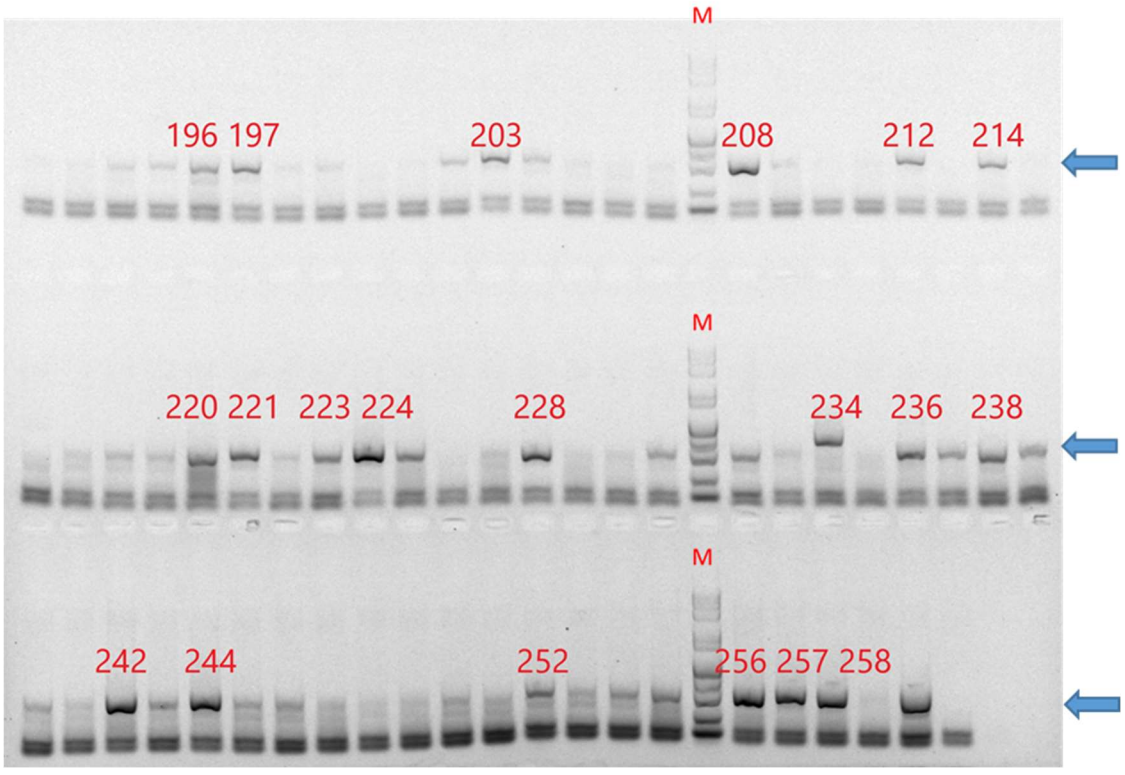


Figura 17

Prueba de resistencia 2081 para líneas de inversión QY2234 PPO1



0.18 g a.i./mu 0.4 g a.i./mu 0.6 g a.i./mu

Figura 18

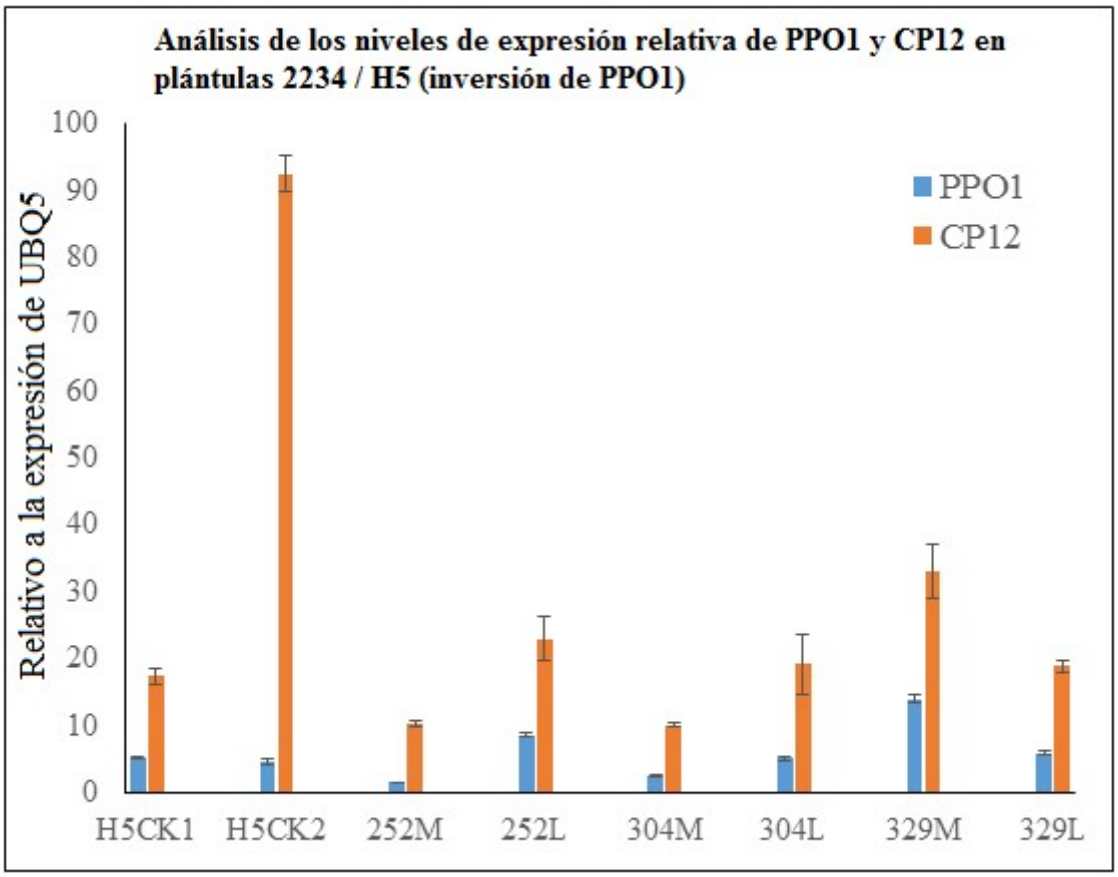


Figura 19

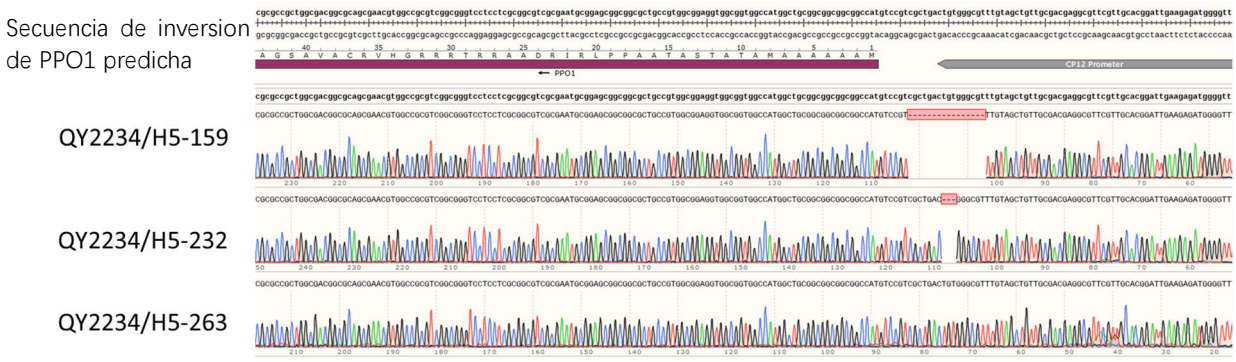


Figura 20

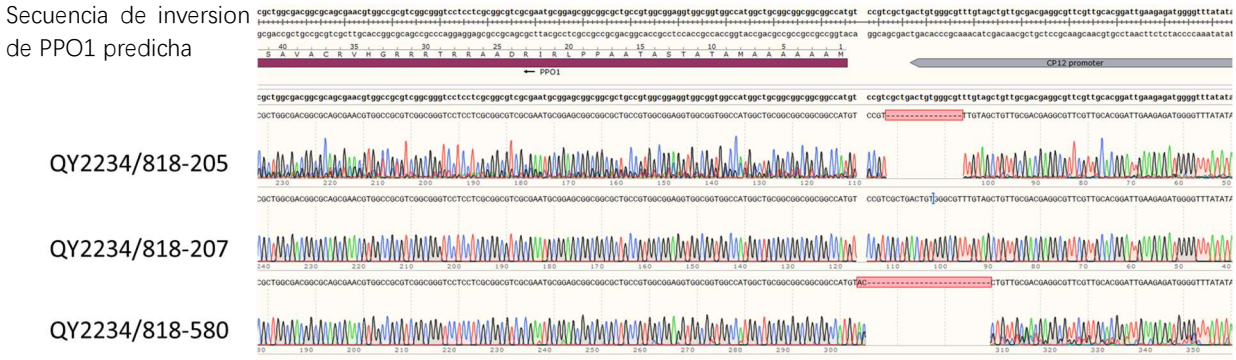


Figura 21

Prueba de resistencia 2081 para generación T1 QY2234 / H5-851 en etapa de plántula

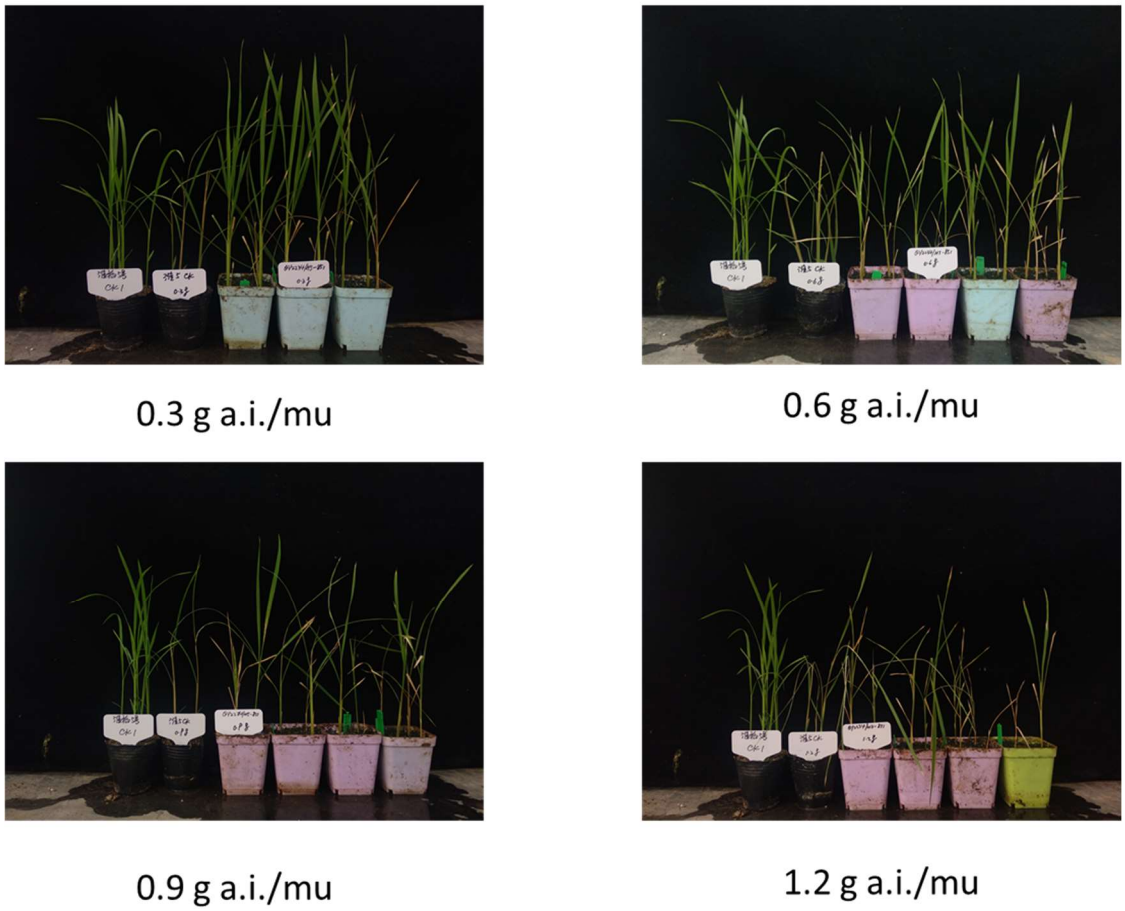


Figura 22

Listado de secuencias

<110> QINGDAO KINGAGROOT CHEMICAL COMPOUNDS CO., LTD.

<120> Método para editar un gen en una célula de un organismo.
<130> IEC200394PCT

<150> CN201911073406.1
<151> 2019-11-06

<150> CN202011190279.6
<151> 2020-10-30

<160> 98

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 4439
<212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana gen PPO (número Genbank secuencia AT4G01690)

<400> 1
gatattttga tgtcgtatgt atatcaatgt tgttagctgt aaactgtcca atgaaaatcc 60
atttaatatt tggacaaatt attattaggg aaattaatgt aatgtggagt attttatatg 120
aaatgtgtat taatgacgac gaccttactt gatcccggaa gtgtgtatta atttaatcgc 180
ggtgcatcgc tgtccacacg gttgggttca tgcgtacgtg gtatttgctg gcaagtggca 240
gtgaagtttc ttgtttgata ctgtatgttc cattcatgtc tttccctaga tgcatgtttc 300
ttctattttt atatattaat atttttttgt ttttcttatt atgttttctt tccctttgtg 360
aggagaataa ttgcgatacg attatttgtt ttaacagaaa aaagtgaagc gaaaaagatg 420
attcgaagtt tgaagtacga ttaaaatttt tctttttccg gatccgagtt tgatcttctt 480
tagaaacaaa aattatattt gtttagaaag tctgtcagtt gggttttggc ccaattgatt 540
tacctggtag tcagaaatgt aagtgacctg actacccttg acattagtca gaaaacattc 600
taaactcgag ataaacactg tggtagttct ttagaaagaa gtcgactcta aagtactttg 660
gcgtaaaaca aaaaaatttc ccttgaaatt atactttatt tgtttgacat aaatgtttca 720
aatataatct tcttttaatc aatgtagtta aatttttttg atagaagcac gtcagaattt 780
cacactagta atgtataagt ggtaatcatc attgcctaaa acaatgatta attaaaattt 840
tagaattcgt cgtcgacaaa gaatttttct tatgatgaag gttttgtgca taattatgaa 900
cggatccatt tatttcactc taactaggaa tagatgtttg atgggataca agtgaacacg 960
acacaaagta acaaaaattc atttaacgtc acaaattatt ctcaatcgaa tttcgaagta 1020
tcaagaaaaa gggcaattaa aaacgtaatc tcattatgtc tttgaaatct aaattaaaag 1080
ttgagtttat tttaattatt aatttccttt ttgatgatgt aggggatgac aattgacaac 1140
caatttgatt tgaaagatta acataaatca ttttgagcat acatatattg cttaaatcac 1200
acccgtttat ctctaaaaac ctccataatt tatatcagga aaataaatct agttattgat 1260
atcgccatca aatatttttt tcttaaattg ttttttttttg ttgttgttga aaatttaatt 1320
agaaagataa gtggacaacg acgcgagaca aagacacaat ctttagggcc ttgagtaaat 1380
tagggacagc ataaacacat gcactagtcc tgtctttatt taattatgtg gtgtttactc 1440
taatgacgtc gctttgatta accaagtggt cataattaat atatcgatcg aattatataa 1500
ttatcataaa tttgaataag catgttgcct tttattaaag aggtttaata aagtttggta 1560
ataatggact ttgacttcaa actcgattct catgtaatta attaatattt acatcaaaat 1620
ttggtcacta atattaccaa attaatatac taaaatgtta attcgcaaat aaaacactaa 1680
ttccaaataa agggtcatta tgataaacac gtattgaact tgataaagca aagcaaaaat 1740
aatgggtttc aaggtttggt tatatatgac aaaaaaaaaa aaaggtttgg ttatatatct 1800
attgggccta taaccatgtt ataacaaatt tgggcctaac taaaataata aaataaacgt 1860

aatggtcctt tttatatttg ggtcaaaccc aactctaaac ccaaaccaaa gaaaaagtat 1920
acggtacggt acacagactt atggtgtgtg tgattgcagg tgaatatttc tcgtcgtctt 1980
ctcctttctt ctgaagaaga ttacccaatc tgaaaaaaac caagaagctg acaaaattcc 2040
gaattctctg cgatttccat ggagttatct cttctccgtc cgacgactca atcgcttctt 2100
ccgtcgtttt cgaagcccaa tctccgatta aatgtttata agcctcttag actccgttgt 2160
tcagtggccg gtggaccaac cgtcggatct tcaaaaatcg aaggcggagg aggcaccacc 2220
atcacgacgg attgtgtgat tgtcggcgga ggtattagtg gtctttgcat cgctcaggcg 2280
cttgctacta agcatcctga tgctgctccg aatttaattg tgaccgaggc taaggatcgt 2340
gttggaggca acattatcac tcgtgaagag aatggttttc tctgggaaga aggtcccaat 2400
agttttcaac cgtctgatcc tatgctcact atggtggtaa gttcttgaaa caatctgatt 2460
cgttaatact gagaacaatg tatttgtgaa ttgtttgatt tgtggattta gccttctctg 2520
tttatggtta gagtaggtag atagtggttt gaaggatgat ttggtgttgg gagatcctac 2580
tgcgccaagg tttgtgttgt ggaatgggaa attgaggccg gttccatcga agctaacaga 2640
cttaccgttc tttgatttga tgagtattgg tgggaagatt agagctggtt ttggtgcact 2700
tggcattcga ccgtcacctc cagtgtgtat tcttacgacc ttttagatca atatgatttt 2760
tagggcttta tgttggtaga atctgctcat gttcttagag tttggcaaag gtgacagggt 2820
cgtgaagaat ctgtggagga gtttgtacgg cgtaacctcg gtgatgaggt ttttgagcgc 2880
ctgattgaac cgttttgttc aggtagagtt atagataaaa cttcatgtga accatttatt 2940
catttagatg tcagcgaatc tgattatcta gcagttttca tttttgttct agtgcaccct 3000
taatgcttta gattttatgc ttttaggtgt ttatgctggt gatccttcaa aactgagcat 3060
gaaagcagcg tttgggaagg tttggaaact agagcaaaat ggtggaagca taataggtgg 3120
tacttttaag gcaattcagg agaggaaaaa cgctcccaag gcagaacgag acccgtgagt 3180
aacatcaaac ttttctgttg cttgggtctt ttgtcccttc atatatatat ttgtaaaaca 3240
actcaacctg cttcttcagg cgcctgccaa aaccacaggg ccaaacagtt ggttctttca 3300
ggaagggact tcgaatgttg ccagaagcaa tatctgcaag gtatccagta cttgtctctc 3360
tctattgttg gaagggaaaa gggaaaaact ttcaaatgtt ttctgaaatc ttttgcactt 3420
tgacagatta ggtagcaaag ttaagttgtc ttggaagctc tcaggtatca ctaagctgga 3480
gagcggagga tacaacttaa catatgagac tccagatggt ttagtttccg tgcagagcaa 3540
aagtgttgta atgacggtgc catctcatgt tgcaagtggt ctcttgcgcc ctctttctgt 3600
aagtttctca ttttgcgaac taggaatttg ctcaaaattc atagattcga caaatatggg 3660
ttcttaaatc gtgtgctgca actgttatct tctcaggaat ctgctgcaaa tgcactctca 3720
aaactatatt acccaccagt tgcagcagta tctatctcgt acccgaaaga agcaatccga 3780
acagaatgtt tgatagatgg tgaactaaag ggttttgggc aattgcatcc acgcacgcaa 3840
ggagttgaaa cattaggtat atatcttgta gttataatcg tcaattatgt caaaatgttc 3900
atagaatctt catgctgttg ctcgtatttc ttcaggaact atctacagct cctcactctt 3960
tccaaatcgc gcaccgcccg gaagaatttt gctgttgaac tacattggcg ggtctacaaa 4020
caccggaatt ctgtccaagg taaaaaacag caaacacttg taacacatct ttattcaacc 4080
aagtaaacct aagaactgat agttttcttc tctctctctc ttttgttttg attccgcagt 4140
ctgaaggtga gttagtggaa gcagttgaca gagatttgag gaaaatgcta attaagccta 4200
attcgaccga tccacttaaa ttaggagtta gggtatggcc tcaagccatt cctcagtttc 4260
tagttggtca ctttgatatc cttgacacgg ctaaatcatc tctaacgtct tcgggctacg 4320
aagggctatt tttgggtggc aattacgtcg ctggtgtagc cttaggccgg tgtgtagaag 4380
gcgcatatga aaccgcgatt gaggtcaaca acttcatgtc acggtacgct tacaagtaa 4439

<210> 2
<211> 3452
<212> ADN
<213> genómico

<400> 2
aaacaagact accaatatga tgaactgatg attttttttt ttttttttgt ggctcaacaa 60
caaactttcc attcacccat ttatggatac acagtctagc tcaacagagc ttttaaccca 120
aattggtaca atagaataca actttagatc ataattctca aaagaaagag attccttagc 180
tattctatct gccactccat ttccttctcg gcttgtatgc acaagcataa aatcctcaaa 240

cttgctaagt agatacttta tgtcttggat aattggattg agacttgaca agcataactt 300
tcatgtaacc aaagacacaa gttgctgaga atccacctca aaaatgatct tcctataatt 360
gaatcgggat aatgacagca cagcccatct aagagcctcc acttctactt ccagcacgct 420
tcttactttt accacagctc ttgcacctaa ccataacacc ttccctgtat gatcgcgaag 480
cacccaccct aagccacatt ttaatccttc tgttggccat gccccatcaa agttgcactt 540
aacccaagat tgtggtggag cttcccatgt ttctcgtctg tcccgacggt gttgtggttg 600
gtgctttcct tacattctga gcctctttcc ttctaatcca ctcatctgca tcttcttgtg 660
tccttactaa tacctcattg gttccaaatt ccctcccttt aagcaccagc tcgtttctgt 720
tcttccacag cctcccaagt atccaaggga ctaaagcctc cacattcttc agatcaggat 780
attcttgttt aagatgttga actctatgga ggtttgtatg aactgatgat ctaggaccgg 840
ataagttccc ttcttcatag cgaacttatt caaagaatgt tttgtgtatc attcttgtta 900
cattgttatt aatgaaaaaa tattattggt cattggactg aacacgagtg ttaaatatgg 960
accaggcccc aaataagatc cattgatata tgaattaaat aacaagaata aatcgagtca 1020
ccaaaccact tgccttttt aacgagactt gttcaccaac ttgatacaaa agtcattatc 1080
ctatgcaaat caataatcat acaaaaatat ccaataacac taaaaaatta aaagaaatgg 1140
ataatttcac aatatgttat acgataaaga agttactttt ccaagaaatt cactgatttt 1200
ataagcccac ttgcattaga taaatggcaa aaaaaaacaa aaaggaaaag aaataaagca 1260
cgaagaattc tagaaaatac gaaatacgct tcaatgcagt gggacccacg gttcaattat 1320
tgccaatttt cagctccacc gtatatttaa aaaataaaac gataatgcta aaaaaatata 1380
aatcgtaacg atcgttaaat ctcaacggct ggatcttatg acgaccgtta gaaattgtgg 1440
ttgtcgacga gtcagtaata aacggcgtca aagtggttgc agccggcaca cacgagtcgt 1500
gtttatcaac tcaaagcaca aatacttttc ctcaacctaa aaataaggca attagccaaa 1560
aacaactttg cgtgtaaaca acgctcaata cacgtgtcat tttattatta gctattgctt 1620
caccgcctta gctttctcgt gacctagtcg tcctcgtctt ttcttcttct tcttctataa 1680
aacaataccc aaagagctct tcttcttcac aattcagatt tcaatttctc aaaatcttaa 1740
aaactttctc tcaattctct ctaccgtgat caaggtaaat ttctgtgttc cttattctct 1800
caaaatcttc gattttgttt tcgttcgatc ccaatttcgt atatgttctt tggtttagat 1860
tctgttaatc ttagatcgaa gacgattttc tgggtttgat cgttagatat catcttaatt 1920
ctcgattagg gtttcataga tatcatccga tttgttcaaa taatttgagt tttgtcgaat 1980
aattactctt cgatttgtga tttctatcta gatctggtgt tagtttctag tttgtgcgat 2040
cgaatttgtc gattaatctg agtttttctg attaacagat gcagatcttt gttaagactc 2100
tcaccggaaa gacaatcacc ctcgaggtgg aaagctccga caccatcgac aacgttaagg 2160
ccaagatcca ggataaggag ggcattcctc cggatcagca gaggcttatt ttcgccggca 2220
agcagctaga ggatggccgt acgttggctg attacaatat ccagaaggaa tccaccctcc 2280
acttggtcct caggctccgt ggtggtatgc agattttcgt taaaacccta acgggaaaga 2340
cgattactct tgaggtggag agttctgaca ccatcgacaa cgtcaaggcc aagatccaag 2400
acaaagaggg tattcctccg gaccagcaga ggctgatctt cgccggaaag cagttggagg 2460
atggcagaac tcttgctgac tacaatatcc agaaggagtc cacccttcat cttgttctca 2520
ggctccgtgg tggtatgcag attttcgtta agacgttgac tgggaaaact atcactttgg 2580
aggtggagag ttctgacacc attgataacg tgaaagccaa gatccaagac aaagagggta 2640
ttcctccgga ccagcagaga ttgatcttcg ccggaaaaca acttgaagat ggcagaactt 2700
tggccgacta caacattcag aaggagtcca cactccactt ggtcttgcgt ctgcgtggag 2760
gtatgcagat cttcgtgaag actctcaccg gaaagaccat cactttggag gtggagagtt 2820
ctgacaccat tgataacgtg aaagccaaga tccaggacaa agagggtatc ccaccggacc 2880
agcagagatt gatcttcgcc ggaaagcaac ttgaagatgg aagaactttg gctgactaca 2940
acattcagaa ggagtccaca cttcacttgg tcttgcgtct gcgtggaggt atgcagatct 3000
tcgtgaagac tctcaccgga aagactatca ctttggaggt agagagctct gacaccattg 3060
acaacgtgaa ggccaagatc caggataagg aaggaatccc tccggaccag cagaggttga 3120
tctttgccgg aaaacaattg gaggatggtc gtactttggc ggattacaac atccagaagg 3180
agtcgaccct tcacttggtg ttgcgtctgc gtggaggtat gcagatcttc gtcaagactt 3240
tgaccggaaa gaccatcacc cttgaagtgg aaagctccga caccattgac aacgtcaagg 3300
ccaagatcca ggacaaggaa ggtattcctc cggaccagca gcgtctcatc ttcgctggaa 3360
agcagcttga ggatggacgt actttggccg actacaacat ccagaaggag tctactcttc 3420
acttggtcct gcgtcttcgt ggtggtttct aa 3452

<210> 3
<211> 5159
<212> ADN
<213> genómico

<400> 3
catgaaccaa agagtcaaat tcaagatggc gtgctgctct tggtcttttg aatgtggcag 60
cagccaggat caatgcatcc taatatatct atgttggctt agtgaatgac taattaaaca 120
caattaaccc cagggatggt cacatgacta ctgatctctt caaactgttt taatttccca 180
tgtcagaatc tacatctgta cgtacaattt aagctctcct ttttttttt ttaaaaaaaa 240
aagacgaggt taaactaact aactaagctt gagcatcttc taatgtagta aggtatataa 300
atcagaagca aaaacaacat caaaactgtt acaaaaacaa gcaaaccata taaataagaa 360
tattccacaa aggtagattc ctgctgaata gattctatgc ccatctgggt ctatcttgtt 420
atttattctc gtgtggctcg gtttcatcat ccatcttggc gaatcacaga aaagagcggt 480
ttgcaattta tatttggttg aaaagaatgg caattttaca tgccaggatc atatacctct 540
gcatctaaaa agttgatttt tttgacccca aattttcaac ataaacatca caatcaacca 600
tggaatgacg ccagaaaaca actgtgacgg cgacgacccc aacatacaca aggagccagg 660
acaatcttta cattattttt atctcttaga aaaaaatatg tcccataaca attttttttt 720
caaaaggctc accagaccac taacaaatag gcgaaaatat ctttaataat atccaatcgt 780
ttcctaccct cttccaacgg ccaggatcat cttgtttgcc atatcaacgg tcatggctga 840
tatcctcatc caccaaccca cctcaccaca cccatcccca cataaaccca gtccatacac 900
gcaaatctaa tcaaaaccac atgtatagct gcagaatata tataacaatt ctatcatata 960
tacatactac aaacttgcac tttattattc caagaattga taccatttcc agcatctttt 1020
ttaaacctaa ctgtagaatt ttgtgaaagc tacaaaatca gtcaggtcaa tgttcatgta 1080
aaacgaacta attctcatca gattagtgtg ctataaacat aagcaaaata tataaagaaa 1140
ttagtaagat cactcctcta tgtgaatatt ttcacacctt tgccaaatat gcataaattt 1200
tttatccaag atgttgcata tacttcctcc gtttcacaat gtaagtcact ctagcatttt 1260
ccacatttat attgatgtta acgaatctag acagtctaga ttcgtgtcta gcttcattaa 1320
catcaatatg aatgtgggaa atgctagaat gacttacatt gtgaaacgga gggagtactt 1380
acctaggtta acatttgtta agtttttttt attgtgtcat attttcatca tttgttgata 1440
atgctatact ttcttttcag tatagactat gtaagtaagt agctatagct tctgttaaaa 1500
caaatgtcag gttttatcta ttatctaaaa acatccaagt tacccctct gcttcatatt 1560
ataagtcgtt tatttttttc ctaatcaaat attgttaatt tcgacaaaat ttatagaaaa 1620
aattaacaac atctaagata ttaaattagt tttattaaat ctaagttgta tatattttga 1680
taatatgatt gttgtgttga aaatactaat atatttttct acatatttag ttaaacttaa 1740
aaaaagtttg ataaaatttt tttaaaggat ttataatata aaaggaggga gtaacatttg 1800
ttaactacaa tataaaaact aatttaaaga tcaaataagt acaataacta ctttataaag 1860
attataggtt caataattgc ggcgaagaaa gtgctcctaa tctcaccagc catggcggct 1920
taggatgctg gtccatgcac catgtccacg tccacaccat agccccctcc tttttattgg 1980
ctacgagtcc ccccaaaacg caccccccaag tctatacata acccatccca tctcccaccc 2040
cacaacctcg ccatctccgc ctctcctcgc caccacacca ctcctctcgc catggccgcg 2100
cactccgtcg ccgccgcgca cgccaccatc gccgcgcgcg cgggtgccgc cgcgccagcg 2160
cccgcgccgc cggagcgcct cgggttccgc ctcagcgcgc tcgccggccg cggcctccgc 2220
tccccgctcc cgcctcgccg cggcgcgcca tcggcgtccg cgtcgcgccg ccgccacaac 2280
aaccgcgtgc gcgcggcggc ggtcgagacg ctcgaggggc aggcggcgac gggggcgctg 2340
ctcgagaagt cggtgaacac gatccggttc ctcgccatcg acgccgtcga gaaggccaac 2400
tcggggcacc ccggcctgcc catggggtgc gcgcccatgg ggcacatcct ctacgacgag 2460
gtcatgcggt acaaccccaa gaacccctac tggttcaacc gcgaccgctt catcctctcc 2520
gccggccacg gctgcatgct ccagtacgcc ctgctccacc tcgccggcta cgacgccgtc 2580
ttggtaagcg cttcccatat ccctttgctc cttgcatctc tctttcgctt ctcgagttgg 2640
ttggtttggg gcggataaat cgggagtagg ttcgtgcaag tttcggatct tgttaggtga 2700
agcagtggaa agtgtggatc ttgactgcta tttttgtgtg gcggcttcgt ttttttccta 2760
gtaaaagtgt gcacctttc cagtcgtcag agatctgttt agtggaattt aatcttatgt 2820

aatacttcct aggaagatta gttggaagat gctattaagt cgagcaattg ttcactgtaa 2880
attctggagt gatcggtgaa gtgtttaata tggttgactt cagtttcaac tgatttgttc 2940
atcgagcttg ctgtaactat ggccgcatat tgctgcagga ggaggacttg aagcaattca 3000
ggcaatgggg aagcaagact ccaggccatc ccgagaactt cgagacgccc ggagttgaag 3060
ttaccactgg tctgtcatct caactgaagc tcatagcacc tttaagtttc tatgcttgaa 3120
tacatacaga actgaatgtt tcggtttctt gtttggtttc gttctgtagg acctcttggt 3180
cagggtattg caaatgcagt tgggctggcc cttgctgaga agcacctggc tgctcgtttc 3240
aacaagcccg acagcgagat tgttgatcac tacacgtaat ttttttttta tcatgaatac 3300
ctttagtttt cactttagtt atggtggtgc aaccttggta acatgattca tggattttgt 3360
gcagctactg tattttggga gatgggtgcc agatggaggg tatctccaat gaagcttgct 3420
cgttggctgg ccattggggt cttggcaagc tgattgcatt ctatgatgac aaccacattt 3480
ccattgacgg agacacagag attgcattca ctgaggatgt gagtgctcgc tttgaggctc 3540
ttgggtggca tacaatctgg gttaagaatg gaaacgatgg ctatgatgag attcgtgccg 3600
ccattaagga agcaaaggcg gtaactgaca agccaacact aatcaaggtt agattcctgt 3660
acattctgtt atgctgtgtt ttgttataga gcttatcata tttagccaaa atgtactctt 3720
tttaggtgac caccacaatc ggttttggat cacccaacaa ggccaactca tacagcgtcc 3780
acggaagtgc tttgggtacc aaagaggttg aagcaaccag agagaacctt ggatggccct 3840
atgagccatt ctttgtgcct gaggatgtga agaggtttgt ctattgttgt tttggttatc 3900
tgaatgagat gttgaaattt catagcactc accttatggt ttatttgcat gggctgttac 3960
agccactgga gccgccatgt gcctcaaggt gctgcttttg aggctgactg gaatgctaag 4020
ttcgccgagt atgagaagaa gtacccagaa gatgcagcga ccttgaagag cattgtctca 4080
ggggagttgc ctgctggctg ggctgacgct cttcctgtaa gtcttttacc atttctactc 4140
ataacatttg agctggtatg tgaatgatga cattctaatg gtagattact tgatttgtac 4200
agaaatacac tccagagagc cctgcagatg ccaccaggaa tctgtcacag cagtgcttaa 4260
acgcacttgc taaagttgtt cctggtcttc ttggaggaag tgctgatctt gcatcctcca 4320
acatgacatt gcttaagatg ttcggtgact tccagaagga tacgcctgag gagcgcaatg 4380
tccgatttgg agtcagggag catggaatgg gcgccatttg caacggcatt gctctgcaca 4440
gcccaggact cattccatac tgtgctactt tctttgtttt cactgattac atgagagctg 4500
ccatgaggat ctcagccttg tgtgaagccg gagttatcta tgttatgacc catgactcta 4560
ttggtcttgg agaagatggt ccaacccatc agcccattga gcacttggtg agcttccgtg 4620
cgatgcccaa cattctgatg cttcgtcctg ctgatggtaa cgagactgct ggggcataca 4680
aaatcgcggt cctcaacagg aagaggccat ccgtccttgc tctctccagg caaaagcttg 4740
ctcagctgcc tggtacctcg attgagggtg ttgagaaggg tgggtacatc gtctctgaca 4800
actcaactgg caacaagcct gacttcattg tgatgagcac tggctctgaa ctagagattg 4860
tcgccaaggc tgctgatgag ttgaggaagg aggggaagac tgtccgtgtc gtgtcatttg 4920
tttgctggga gcttttcgat gaacagtcgg ctgagtacaa ggagagtgtt ctccctgagg 4980
ctgttactgc aagagtcagc cttgaagcag ggtctactct tggatggcag aagtacgtcg 5040
gaagcaaagg caaggctatt ggcatcgaca aattcggtgc aagtgctcct gctggaaaga 5100
tctaccagga gtatggcatc accgcggaga acgtcatcgc aacagcaaag agcctgtaa 5159

<210> 4
<211> 5164
<212> ADN
<213> genómico

<400> 4
gctgggtagc ctttcaaagc cccaaaagat tgggtcgggt ctctctttcg gctctcgtcg 60
gtggctgctt cccacaaaga ccgccatcag acgtgaatga actgcaagtc tgcaactacg 120
actccagttg ctatcccctt aaattacttt actactacct ttattctaag ggccggttcg 180
gataattgcc aaaatcaatc gtaccaaatt ttaataatat taggatgaaa taaatatgtt 240
gcgccaaaat tttctactgt tactgaaatt tggtaacaaa ctaaacacaa ccgtatattt 300
atcaatttta ccaaatagtg gtatggttta aaatgacatt aatctaaata ggtcctgaaa 360
tataaaaatg caccaaccat caatgcatgc agttacattc caaagttctc ctaggacaca 420
tatgccatat attttcgatg gatagcctta atgtctgact actctcttca tcgcaacaaa 480

tctaatataa tacaaatctg aataggagct tatataaata tatagtagta gaatatgtca 540
taatattaca gtggtattcc atattggatt tgttgattat agaacgacga aagtatgcgt 600
taacttacaa ggttgtttac attatgacga aatgaagaga aggaacgcac ctactgcgaa 660
gagctcaaca actacttcct ccaaatttcc actcaccaac tgatcaccac caattcactt 720
gtgcagtgcc acctacccaa tttcattcca gtggcgtggt acgtaggttc cgcatgtcag 780
tgtgacaatc gtacggactg ccatgtgtat tgtgttcagg taggtgcact ggtcgtggtc 840
tcaccatctc tcctccagtc gtacggcgcc acgtaggcag tacacgtaga cggccttctt 900
cctcctccct cgagttgagt tggttggtga gagtgagaca ccgacggaac ggaaggagaa 960
ccacgccgct tggatttttc ttttttacct tttcaaattt taatttaaaa aataaaacca 1020
ttttaaaaac ttatcttcaa atacaaatct tttaaaaaca ctaacacgtg acacacagcg 1080
ggcacgtcac ccaaacgggc gtgacaatat tgttttgcca caccaatcca gctggtgtgg 1140
acaaaatgtt catatattga aaataaaatt taaaacaatt tatatttttt atctatatca 1200
ttataaaaat tgaagatgtt tttaccggta ttttgttact catttgtgca tgagtcggtt 1260
tttaagtttg ttcgcttttg gaaatacata tccgtatttg agtatgtttt taagttcgtt 1320
cgtttttga aatacaaaag gaatcgtaaa ataaatctat tttaaaaaac tcgcatgcta 1380
acttgagacg atcgaactgc taattgcagc tcataatttt ccaaaaaaaa atatatccaa 1440
acgagttctt atagtagatt tcaccttaat taaaacatat aaatgttcac ccggtacaac 1500
gcacgagtat ttttataagt aaaattaaaa gtttaaaata aataaaaatc ccgccaccac 1560
ggcgcgatgg taaaaggggg acgcttctaa acgggccggg cacgggacga tcggccccga 1620
acccggccca tctaaccgct gtaggcccac cgcccaccaa tccaactccg tactacgtga 1680
agcgctggat ccgcaacccg ttaagcagtc cacacgactc gactcgactc gcgcactcgc 1740
cgtggtaggt ggcaaccctt cttcctcctc tatttcttct tcttcctccc ttctccgcct 1800
caccacacca accgcaccaa ccccaacccc gcgcgcgctc tcccctctcc cctcccacca 1860
accccacccc atcctcccga cctccacgcc gccggcaatg gcggcgacca tggcgtccaa 1920
cgccgcggct gcggcggcgg tgtccctgga ccaggccgtg gcggcgtcgg cggcgttctc 1980
gtcgcggaag cagctgcggc tgcccgccgc ggcgcgcggg gggatgcggg tgcgggtgcg 2040
ggcgcggggg cggcgggagg cggtggtggt ggcgtccgcg tcgtcgtcgt cggtggcagc 2100
gccggcggcg aaggcggagg agatcgtgct ccagcccatc agggagatct ccggggcggt 2160
tcagctgcca gggtccaagt cgctctccaa caggatcctc ctcctctccg ccctctccga 2220
ggtgagacgc ggatcccttc ctcttgcgtg aattccattt ctggagatga gattttaggg 2280
ggtttattag gtgaggtggc tgtgtttgtg aaatcctagg aattatctct caagtcaatc 2340
taacgatgag atataactga ggttctggtt ttaatcacac actcatataa ccaatttatt 2400
gaaacatttt ggtttggcat aagaaactgc ttacgaaggt atgatatcct cctacatgtc 2460
aggctactaa attttcacga cggtatgatc cactcaaaac aagtttctta acgagtctgg 2520
tgaggtctgt tatgaaattt gtgtaaacta aggcaacttt ggaggtttcg cactgtacca 2580
atgttatgtt tgaacatttt gcaagcagtg ctttctccca aaattatgca attttgaggc 2640
tcctctacat cattataatt ccccaataca ttgctcttta ttcttaatag ctttgatcgc 2700
gaaatttaac attttaattc ttgagctgtt attttgtagc atcagtttat catgagccat 2760
gtttggtact aaatatacaa tcccttgggt ttatttgttt ccaagcatgt cattaactta 2820
tcttaatgtg gacaagaaac tgatgcctgc ttacattgct attatttcaa gcgggtattg 2880
atcctttgac atgtgattga tcatttttt ttctctggtt attagggcac aacagtggtg 2940
gacaacttgc tgaacagtga ggatgttcac tacatgcttg aggccctgaa agccctcggg 3000
ctctctgtgg aagcagataa agttgcaaaa agagctgtag tcgttggctg tggtggcaag 3060
tttcctgttg agaaggatgc gaaagaggaa gtgcaactct tcttggggaa cgctggaact 3120
gcaatgcgac cattgacagc agccgtgact gctgctggtg gaaatgcaac gtatgttttt 3180
ttttttaatg tttatgaaaa tatgtatgga attcatgggg tatgttttat gacctttttc 3240
tttaccatca gttatgtgct tgatggagtg ccacgaatga gggagagacc gattggtgac 3300
ttggttgtcg ggttgaaaca acttggtgcg gatgtcgact gtttccttgg cactgaatgc 3360
ccacctgttc gtgtcaaggg aattggagga cttcctggtg gcaaggttag ttactcctaa 3420
actgcatcct ttgtacttct gtatgcacct caattctttg tcaaccttct gcatttataa 3480
ggaacattct atgatgcaat tcgaccttac actgcacagt aacttgaaat gtttcatgct 3540
taatcaatat gccatattcc tgccaagctc aagcgagcaa tatttgtttg aatttggtac 3600
catatttttg tatatttggg cattcctttt tggtcttgat gtcttctttt gaattagcat 3660
ttaactgaat tacactcaac aggttaagct ctctggttcc atcagcagtc agtacttgag 3720

tgccttgctg atggctgctc ctttggccct tggggatgtg gagatcgaaa tcattgacaa 3780
actaatctcc attccttacg ttgaaatgac attgagattg atggagcgtt ttggtgtgaa 3840
ggcagagcat tctgatagtt gggacagatt ctatattaag ggagggcaga agtacaagta 3900
agcttctacc tgccttactg agctgaatta ttcgggtgtt tatgattaac tccctaaact 3960
aacccttttt cttttctttg gcattgacag atctcctgga aatgcctatg ttgaaggtga 4020
tgcctcaagc gcgagctatt tcttggctgg tgctgcaatc actggaggca ctgtgacagt 4080
tcaaggttgt ggtacgacca gtttgcaggt ataactgtag tgcctgtttt gacattctac 4140
cgtttagtca agtttagtca gtagtcacat attcagaata tagcacaatc tgtattatgc 4200
cactgttaat caaatacgct tgacctagag agtgctatat accctagctt aatcttcaaa 4260
ctaaacagtt ctcttgtggc ttgctgtgct gttatgttcc ctgacctaca tgttaatatt 4320
acagggtgat gtcaaatttg ctgaggtact tgagatgatg ggagcaaagg ttacatggac 4380
tgacaccagt gtaaccgtaa ctggtccacc acgtgagcct tatgggaaga aacacctgaa 4440
agctgttgat gtcaacatga acaaaatgcc tgatgttgcc atgacccttg ccgttgttgc 4500
actcttcgct gatggtccaa ctgctatcag agatggtaaa cattaaggcc tattatacct 4560
gttctatcat actagcaatt actgcttagc attgtgacaa aacaaataac caaactttct 4620
tcaaaataac ttagaaatat aagaaaggtt cgttttgtgt ggtaaacagt actactgtag 4680
tttcagctat gaagtttgct gctggcaatt ttctgaacgg tttcagctaa attgcatgtt 4740
tgttcatcat acttatccat tgtcttccac agtggcttcc tggagagtaa aggaaaccga 4800
aaggatggtt gcaattcgga ccgagctaac aaaggtaaat tcattaggtc ccgtgtcctt 4860
tcattcttca agtagtttgt tcataagttg aattctcctt caatgatgtt taaattcatc 4920
atcttctttt ttggtgttgt gccagctggg agcatcggtt gaagaaggtc ctgactactg 4980
catcatcacc ccaccggaga agctgaacat cacggcaatc gacacctacg atgatcacag 5040
gatggccatg gccttctccc tcgctgcctg cgccgacgtg cccgtgacga tcagggaccc 5100
tggttgcacc cgcaagacct tccccaacta cttcgacgtt ctaagcactt tcgtcaggaa 5160
ctga 5164

<210> 5
<211> 3481
<212> ADN
<213> genómico

<400> 5
gaaatcaaaa gggaaatgca ccatcttata tctccagttt atatgaacag attggataag 60
atcataagat caagtggttt atattatttt gaggaatata acatggattc atcctaatca 120
ctcgtctagg cagtatgtgt attcatgatg gatatggtac tatactacgg agttttttct 180
tcacaaaata acctgttatt ttgacctcca accaaacacg aattatacca aaaattgggt 240
tatttcatct atagtacaac tctattataa acatgcagta aattatccta cacatatacc 300
aaaattcaag tgtaataatc ctaatacaca gacttaaaaa acaaactatt tccttttaa 360
gaaaaggaaa accatttttt taacggaagg aaaacaaatt cgggtcaagg cggaagccag 420
cgcgccaccc cacgtcagca aatacggagg cgcggggttg acggcgtcac ccggtcctaa 480
cggcgaccaa caaaccagcc agaagaaatt acagtaaaaa aaaagtaaat tgcactttga 540
tccacctttt attacctaag tctcaatttg gatcaccctt aaacctatct tttcaatttg 600
ggccgggttg tggtttggac taccatgaac aacttttcgt catgtctaac ttccctttca 660
gcaaacatat gaaccatata tagaggagat cggccgtata ctagagctga tgtgtttaag 720
gtcgttgatt gcacgagaaa aaaaaatcca aatcgcaaca atagcaaatt tatctggttc 780
aaagtgaaaa gatatgttta aaggtagtcc aaagtaaaac ttatagataa taaaatgtgg 840
tccaaagcgt aattcactca aaaaaaatca acgagacgtg taccaaacgg agacaaacgg 900
catcttctcg aaatttccca accgctcgct cgcccgcctc gtcttcccgg aaaccgcggt 960
ggtttcagcg tggcggattc tccaagcaga cggagacgtc acggcacggg actcctccca 1020
ccacccaacc gccataaata ccagcccccc catctcctct cctcgcatca gctccacccc 1080
cgaaaaattt ctccccaatc tcgcgaggct ctcgtcgtcg aatcgaatcc tctcgcgtcc 1140
tcaaggtacg ctgcttctcc tctcctcgct tcgtttcgat tcgatttcgg acgggtgagg 1200
ttgttttgtt gctagatccg attggtggtt agggttgtcg atgtgattat cgtgagatgt 1260
ttaggggttg tagatctgat ggttgtgatt tgggcacggt tggttcgata ggtggaatcg 1320

tggttaggtt ttgggattgg atgttggttc tgatgattgg ggggaatttt tacggttaga 1380
tgaattgttg gatgattcga ttggggaaat cggtgtagat ctgttgggga attgtggaac 1440
tagtcatgcc tgagtgattg gtgcgatttg tagcgtgttc catcttgtag gccttgttgc 1500
gagcatgttc agatctactg ttccgctctt gattgagtta ttggtgccat gggttggtgc 1560
aaacacaggc tttaatatgt tatatctgtt ttgtgtttga tgtagatctg tagggtagtt 1620
cttcttagac atggttcaat tatgtagctt gtgcgtttcg atttgatttc atatgttcac 1680
agattagata atgatgaact cttttaatta attgtcaatg gtaaatagga agtcttgtcg 1740
ctatatctgt cataatgatc tcatgttact atctgccagt aatttatgct aagaactata 1800
ttagaatatc atgttacaat ctgtagtaat atcatgttac aatctgtagt tcatctatat 1860
aatctattgt ggtaatttct ttttactatc tgtgtgaaga ttattgccac tagttcattc 1920
tacttatttc tgaagttcag gatacgtgtg ctgttactac ctatctgaat acatgtgtga 1980
tgtgcctgtt actatctttt tgaatacatg tatgttctgt tggaatatgt ttgctgtttg 2040
atccgttgtt gtgtccttaa tcttgtgcta gttcttaccc tatctgtttg gtgattattt 2100
cttgcagatg cagatctttg tgaagacatt gaccggcaag actatcaccc tcgaggtgga 2160
gtcctctgac accatcgata atgtcaaggc taagatccaa gataaggagg gcatcccccc 2220
ggaccagcag cgtctcatct tcgctggcaa gcagctggag gatggcagga cccttgctga 2280
ctacaacatc cagaaggagt cgacccttca ccttgtcctc cgcctccgtg gtggcatgca 2340
gatctttgtc aagactctga ccggcaagac tatcaccctt gaggtggagt cttctgacac 2400
catcgacaac gtcaaggcca agatccagga caaagagggc atccccccag accagcagcg 2460
tctcatcttc gccggcaagc agctggagga tggcaggacc cttgctgact acaacatcca 2520
gaaggagtcc accctccacc ttgtcctccg cctccgtggt ggcatgcaga tctttgtcaa 2580
gacactgacc ggcaagacca tcaccctcga ggtggaatct tctgacacca tcgacaacgt 2640
caaggccaag atccaggaca aggagggcat tcccccggac cagcagcgtc tcatctttgc 2700
cggcaagcag cttgaggacg gcaggaccct tgctgactac aacatccaga aggagtcaac 2760
gcttcacctt gtcctccgtc tcaggggagg catgcaaatc ttcgtgaaga ctctgaccgg 2820
caagaccatc accctcgagg tggagtcttc tgataccatc gacaatgtca aggccaagat 2880
ccaggacaag gagggcattc ccccggacca gcagcgcctc atctttgctg gcaagcagct 2940
ggaggatggc aggacccttg ctgactacaa catccagaag gagtccaccc tccaccttgt 3000
gctccgcctt cgtggtggta tgcagatctt tgtcaagacc ctcacaggca agaccatcac 3060
cctggaggtt gagagctcgg acaccatcga caacgtcaag gccaagatcc aggacaagga 3120
gggcatcccc ccagaccagc agcgtctcat cttcgccggc aagcagctcg aggatggccg 3180
caccctcgcc gactacaaca tccagaagga gtctaccctc cacctggtgc ttcgtctccg 3240
tggtggtatg cagatcttcg tgaagacctt gactgggaag accatcactt tggaggttga 3300
gagctccgac accattgata atgtgaaggc caagatccag gacaaggagg ggattccccc 3360
agaccagcag cgtctgatct tcgctggcaa gcagctggag gatggacgca ccctcgccga 3420
ctacaacatc cagaaggagt ccaccctcca cctggtgctc cgcctccgtg gtggtcagta 3480
a 3481

<210> 6
<211> 3166
<212> ADN
<213> genómico

<400> 6
aaatggtatt gtttagaagt ttagaaaacg ttctgccgga cggaatggtt ccatccctta 60
aaaaaggacg ctgtttcaaa ttcgaaaaaa agaagagcca tcacgataac cagacggtta 120
ctgacgattt tgccgaaggt gattatcgat ggtcagtcaa caaagtataa accctgctta 180
gcggtaataa acacttgatg ttttacgtaa aatcttttga aacttagacg gccaacgact 240
atcaaaatat ttacatcgaa atcatgaaaa aatgttgtgt tcatttgtct ttgcaaataa 300
tttcaaggcc tcataaactt attttaatac aaaataatgg ctaacgtcac actaaatcaa 360
aatccaatat caaatgcttt taaggaagca gtagagatat cttcaattga gattttgact 420
gtttgagaca gctcattcta ccgcttttca tatgtctatc gagaccgagg taatatatgt 480
ggcacaaaac gttttagaga agtgatgtga aaaacactac catccatcca tttgcaataa 540
gaaaatcctc cattactact ctccccgatt cttaatagat aacactatca atttttaaaa 600

atatatattt atcattcatc taattaagga atataattat cttttatttt tttaacttgg 660
tttatcatta aaaacacttt taaatatgac ttatattttc ttatgtttac acatgttttt 720
aaaataaaac aaatgattga acatataatc acctagtaaa aacaagagct ttactccaag 780
ttaccacaaa atttgtttcc ccttccctct aaaaatcaga acagtcacca acttttctca 840
aaaaaaaaaa aagtaacaaa ctcatcagct tcacaaattc accagcagcc aaggcaacca 900
gcaccagagg acaaatcccg tccgcaacca ctagacttag cgtccacgtg gcgccatctc 960
ctccctttat ttaacccccc accaccaact cctcccccca cgccgccact gtcatccact 1020
cccccacacc ccacgacgcg ccacgccacg ccgcgccgcg ccgcgccatg cctcccactc 1080
ccacccccac cgccaccacc ggcgccgtct cggccgctgc ggcggcgggg gagaacgcgg 1140
ggttccgcct cgtcgggcac cgccgcttcg tccgcgccaa cccgcggagc gaccggttcc 1200
aggcgctcgc gttccaccac gtcgagctct ggtgcgccga cgccgcgtcc gccgcgggcc 1260
ggttcgcctt cgccctgggc gcgccgctcg ccgccaggtc cgacctctcc acggggaact 1320
ccgcgcacgc ctccctcctc ctccgctccg cctccgtcgc gttcctcttc accgcccccc 1380
acggcggcga ccacggcgtc ggcgcggacg cggccaccac cgcctccatc ccttccttct 1440
ccccaggcgc cgcgcggagg ttcgccgcgg accacggcct cgcggtgcac gccgtggcgc 1500
tgcgcgtcgc cgacgcggcc gacgccttcc gcgccagcgt cgcggccggt gcgcgcccgg 1560
cgttccagcc cgccgacctc ggcggtggct tcggcctcgc ggaggtggag ctctacggcg 1620
acgtcgtgct ccgcttcgtc agccacccgg acggcgccga cgcgcccttc ctcccgggtt 1680
tcgagggcgt cagcaacccg ggcgccgtgg actacggcct ccgccggttc gaccacgtcg 1740
tcggcaacgt gccggagctc gctccggtag ccgcgtacat ctccgggttc accgggttcc 1800
acgagttcgc cgagttcacc gccgaggacg tgggcaccgc cgagagcggc ctcaactcgg 1860
tggtgctcgc caacaacgcg gagaccgtgc tgctgccgct caacgagccg gtgcacggca 1920
ccaagcggcg gagccagata cagacgtacc tggaccacca cggcggcccg ggggtgcagc 1980
acatcgcgct ggccagcgac gacgtgctcg ggacgctgag ggagatgcgg gcgcgctccg 2040
ccatgggcgg cttcgagttc ttggcgccgc cgccgcccaa ctactacgac ggcgtgcggc 2100
ggcgcgccgg ggacgtgctc tcggaggagc agatcaacga gtgccaggag ctcggggtgc 2160
tcgtggacag ggatgaccag ggggtgttgc tccagatctt caccaagcca gtaggagaca 2220
ggtaaaatcc tcacctcttt catgatgaaa atggcttatg aattcagatt tgcagttatt 2280
tgttggcaca tagcatcgat taggcgcaga aaggtgtcaa gcattatgaa attaatccag 2340
aatgcttgaa taatacagta taatatatga tagtgagctc tgtgatactc catggatact 2400
ctttatgtgt ctccatgaat ccatgatgcg cctttctgaa gattgtgaca ctagaaaggg 2460
aataaagctg aatgtgcata ggaaaaaaat gaaaagccaa tgtgtgtctg tttatgcctt 2520
cttgcaagca tatcccagtt ccttttgcc ggcatgttgt aatgcagata gccagccaca 2580
tatagctact taattagtga gtactccctc tcacaatgta agtcattcta gtattttcca 2640
cattcatatt gatgctaatc tatctagatt cattagcatc aatatgaata tgggaaatac 2700
tagaatgact tacattgtga aacggaggaa gtattactta ctacatctaa ggtccatgga 2760
ttccttttt tacaaaagaa agaaagaatc ttatggcaac tccatcagca taaaccagca 2820
atgctgctgg gaacaactta aactttaggt tcaggaggtt gtaattgtct ttaagcttaa 2880
tagtctgatt cagtcagtat tctaatttct gctgcatctt tgctattgtt atttcctctc 2940
tgtgactcca aatctaactg gatcagctat ttcactcagg ccaacctttt tcttggagat 3000
gatacaaagg attgggtgca tggagaagga tgagagtggg caggagtacc agaagggcgg 3060
ctgcggcggg tttgggaagg gcaacttctc ggagctgttc aagtccattg aggagtatga 3120
gaaatccctt gaagccaagc aagcccctac agttcaagga tcctag 3166

<210> 7
<211> 4311
<212> ADN
<213> genómico

<400> 7
caaaaaaaat tattcaaaag gaagcaggca gggcagcaca ttgtgaggga atcaggcggc 60
ggcgcacagt tctctccctt ggcaccctcc tttccctcat atgcaatgga ctcaaaaggg 120
cggctgcagc gtatgccggt ggattaggtt tcgagggtgg atccagtgag agcaaaggtg 180
gtggggtgac ccaaggacgc tgcttcgctc aagtccacat gtgcttcgcc tcaaggccag 240

gatgccgccg ccctactcga gactaggtag ctgacttgag actaggccgt tgtcgcgcgt 300
cggggccgcc cagccgctgc tccaccttgg gtcacgctgt cactctatct caaggctggg 360
ccatcgccac tatgcttgaa gccgcactac cgtcccacct caaggccggc accctgtcac 420
tccacctcga ggctacctag acgttatttt gttccgctgc tacgccttag agacacccca 480
ctgccgctct accttgggct atgccgtcgc tctttctcca aggcgcgctg ctacaactcc 540
gccctgagtc tccatgtgcc tgtgtggaga aaggagaggg aagaaagaaa gaaaggagaa 600
agaagtggga ggaatcacta acatgtgagc tctgtatatt gatttggtca gttggattag 660
gtcaacgagc catccaagag aaaacaaccc ttaaaatcat tgagaaaatc atttttaact 720
gttttaatag ttaagagatg aagatatatt tttttttata gaaagagatg aagatatccg 780
atatccaata tgataggaat cagaaaacgt atatttttga gggagtcaat gcggacttat 840
tcccaccaga aactgcagca tattggacgc agtggttcct tccgcggtag ctgcgcccgc 900
gcccacggga atgcgattcc cagcccattc cacccccttc ccattccggt gggccattcc 960
gaatccaacc aaccaaccaa ccatcgaacc cgcacccgca tcgtatccac tcctctccag 1020
tctccccgcc gctccgcatc ccgcagccgc tcgtcagcga cggacatggc cgccgccgcc 1080
gcagccatgg ccaccgccac ctccgccacg gcagcgccgc cgctccgcat tcgcgacgcc 1140
gcgaggagga cccgccgacg cggccacgtt cgctgcgccg tcgccagcgg cgcggccgag 1200
gcgcccgcgg cgcccggggc gcgggtgtcg gcggactgcg tcgtggtggg cggcggcatc 1260
agcgggctct gcaccgcgca ggcgctggcc acaaagcacg gcgtcggcga cgtgctcgtc 1320
acggaggccc gcgcccgccc cggcggcaac atcaccaccg ccgagcgcgc cggcgagggc 1380
tacctctggg aggaggggcc caacagcttc cagccttccg accccgtcct caccatggcc 1440
gtacgtcttc ttgctcccct tctcttctga ttctctcgcg gcggagacga catgaatggg 1500
aatggtggtg catggattgg ggcgcgcagg tggacagcgg gctcaaggac gatctcgtgt 1560
tcggggaccc caacgcgccg cggttcgtgc tgtgggaggg gaagctaagg ccggtgccgt 1620
ccaagcccgg cgacctgccg ttcttcgacc tcatgagcat ccccggcaag ctcagggccg 1680
gccttggcgc gctcggcgtt cgagcgccac ctccagtttg tgtgctctcc ccgctgtgca 1740
ttcttgattc acttgtgaaa ttcgattgtg ctgagcgttt ccggcgaagg tttcaggggc 1800
gtgaggagtc ggtggaggac ttcgtgcggc gcaacctcgg cgcggaggtc tttgagcgcc 1860
tcattgagcc tttctgctca ggtgtttatt gtagtgtgca attgctgttt tgtttttgat 1920
gattcagata agaatacggt gatttcggtg cttaggtgtg tatgctggtg atccttcaaa 1980
gctcagtatg aaggctgcat ttgggaaggt gtggaggctg gaggatactg gaggtagcat 2040
tattggtgga accatcaaaa caatccagga gaggggggaaa aaccccaaac cgccgaggga 2100
tccgtgagtg agaaattgcc ttctttgttg gattaattgt ccattgtgtt acactgatat 2160
gccttcacca tttttagccg ccttccaacg ccaaaggggc agacagttgc atctttcagg 2220
aagggtctga ctatgctccc ggatgctatt acatctaggt ttgttatcat tgtctttgta 2280
atttacctag ttcttcaact atggatatta ggtgctgtag attgttcaga tagatgcaca 2340
ttgtacaaca atctaggtag attgattgct atggcttgtt gaattaactg tttcacttgc 2400
atcattgcct cagcacatat gaagcatatg gatagattct tcaatcattt atccctcaat 2460
aacacaattt tgacaccagt gcttctcctt tttttcatcc tgcttcatct ggctatccac 2520
aatataatta agcatacaaa agaggcactc tttgatggac aattcatagt gttgtgggtt 2580
aatattcatt tgcattcttt gagggacaat tcgttacacc ctaacatgaa ctagtaatga 2640
ttggggtgct taaccatttg ttctgcattt cctccatttt caggttgggt agcaaagtca 2700
aactttcatg gaagttgaca agcattacaa agtcagacaa caaaggatat gcattagtgt 2760
atgaaacacc agaaggggtg gtctcggtgc aagctaaaac tgttgtcatg accatcccat 2820
catatgttgc tagtgatatc ttgcggccac tttcagtaag ttatatatat ttaattaact 2880
ttctgttccc aaaatacact gcagcacttc attgcttcct gaggtcctcg attcattttt 2940
cggtagacag gaagtagtat tcatttgcac tttttaaggg attaattcaa catatccact 3000
ggaaatatac atatcctaca catcctgtca acatacttgc taaacagcat tttgtttgag 3060
ttgactggca tctcagcagc caattactat ctttagggga caagccacat tcttaataaa 3120
tcctgtcgga aatcactttt tgatttttat agattagtgt tgtcatagaa tttggcttgg 3180
tgatctactt ggtaaggtta actgattcac aagtcggaca atttcttcac caatctagca 3240
gtatgtttaa gtgtgttggt acttaattct aaatgtcctg cgcatggtaa catatcatat 3300
gcaaaaattc ctcagtaacc gaaatttata ctgtaagttt taactgtctt tacactgtta 3360
attttagaca tacttcttcc ttgcttgttc attgaacttg tttccccctt ccacagagtg 3420
atgcagcaga tgctctgtca atattctatt atccaccagt tgctgctgta actgtttcat 3480

atccaaaaga agcaattaga aaagaatgct taattgacgg agagctccag ggtttcggcc 3540
agctgcatcc gcgtagtcag ggagttgaga ctttaggtac ttataggaat tcaaccttat 3600
tattcttcta acatataaat gaactaatct ttcttgtcta gtttgcattt attgtggatt 3660
aagtttggtt atattgttct tacaagtttg tggtattatt ttgtatagga acaatatata 3720
gctcatcact ctttccaaat cgtgctccag ctggaagggt gttacttctg aactacatag 3780
gaggttctac aaatacaggg attgtttcca aggtatcgct gtcaagttgt ttattttgcg 3840
actatatgat tacagtatcc tgtttttcaa ctccagctgc tgttagactg tcataataaa 3900
tctgctacta catgtttgca cactatttga ctgcatttaa aaactcagat agcctatatt 3960
tttagttgcc tgctactggg tgtatttcta atgatcccat catgtttgca gactgaaagt 4020
gagctggtag aagcagttga ccgtgacctc aggaagatgc tgataaatcc taaagcagtg 4080
gacccttttgg tccttggcgt ccgggtatgg ccacaagcca taccacagtt cctcattggc 4140
catcttgatc atcttgaggc tgcaaaatct gccctgggca aaggtggtta tgatggattg 4200
ttcctcggag ggaactatgt tgcaggagtt gccctgggcc gatgcgttga aggtgcatat 4260
gagagtgcct cacaaatatc tgactacttg accaagtacg cctacaagtg a 4311

<210> 8
<211> 2463
<212> ADN
<213> genómico

<400> 8
tttaaatcgt atttctactt ggactctcct ttccttttct aattttggat ttttttttg 60
aattttgatt aatctcgtat tgggttctta tatggaaact tctttcaata ttgcttattt 120
tcaattccga atttcagcta tttttaaatc gtatttctac ttggactctc cttttctttt 180
tttctttttc ttcgattaat gtgggaattt ctagccccca cagcgaacgt ggtgactatt 240
ttcaaagctg ttttaataat ataatagatt ttattttagg gcctgttcag attgtagcca 300
aaataaacct tatcaaaatt tgacaatacc aaaattttgt caagttgaca atattgccaa 360
aattttggca ggatttctta cgtatttatc aaatttggca acaaactaaa catagatatt 420
tttttggcaa ctttaccaaa aaagttgtat gattgaaaat gacatcaatc tgaacagccc 480
cttagaactt agaactacaa tctgaacagc cccttagaac ttagaactac agtggaatcc 540
atcttggcat atgtacttgg cagggaattt tttttacatt tttattatta aaaaattaca 600
aaatttttttt tcgaaaattt acaaatctag acgcctaaca tcctttagga gggcgttttt 660
ttaaatcgcc cttctaaagg gcgttaaggg acctaaatgc aaaatttta tttgtattcg 720
aacccctttcc accagtttta attgcttaaa agctaataat gcttatttga cactccaaat 780
aattttaaat gaaaaggtaa taaactacaa agttgtagat ctcatcgaga tctatatctt 840
ttttataaag tttatctcca tccaatgtcg tttgaaatgt agttctgaga atttttttaa 900
ataggtttta gattttgtaa cgaatatttg gacatctaaa cgatcttaaa tgaaagttgt 960
taattacaaa cttgtagatc ttctccagct ctacaatttt gatataaact ttaatttcat 1020
atggctttat atgatatagt tttaaattgt aaaatcatag aggtagcaag ctatgatgga 1080
aaatttgtat ttaggtccct aacgccctct ggaagggtga tttgaaaaaa gccctctagg 1140
aggacgtgag gcacgactag atttgtaaat tttcggaatg aaaaattatt tttaaatatt 1200
ttaatcaaaa aatgtaaaaa taaaaaaaat tctcggcagg gtggcagcat gggcctaagg 1260
cccagtcaac tgtgggccta taagcgacta atccggctgt aactgggcct tgcaagaggc 1320
ttgtcttgtt ggtccgaact caggaagtcc aggttgcggg gacaacttca aggccatctg 1380
gtttccactt ctcttaccac ctcaattccg ctcttgatcc gagctagctt agtcccaatc 1440
taaaaacttt acaaagaaag aaccatacgc acctattggg caaaatgaaa aataatttgc 1500
tactcaccaa ataatttgag cacctctgca cctgtacact aaataactct gttccaccaa 1560
aatagttgag atatctagga cgtttcattt tgtccgttct tcaccaaact tttccatagt 1620
atctcagata ttttcgagac cgaaagtgat ctttctggcc ttagaccgag ttcacttccc 1680
tacaagccat tctttgctgg cacaacacga acctctacat caatttcgta tccaacctga 1740
acttctgcat acatgtacac acccacagtc atctgctcat gttttcacgg tcaaattaaa 1800
actgcttctc tcaccttaga ttcacccaag ggaaaagaaa aagatctcct ttgccaagtc 1860
cccatttcgc atgaaatatc tcaaaataca gcccacgtgg cacacgacga ttggctgagg 1920
aggcgataag aaacgagtgc acgtcgtcga atcctctctc cccttctccc ccaccccacg 1980

gagctatata tatataaacc ccatctcttc aatccgtgca acgaacgcct cgtcgcaaca 2040
gctacaaacg cccacatcac acgcagaaat ccgcatcaac agccagccat ggcgtccacg 2100
ctgaccaacg tcggcctgtc taccccggcg gcggcggcgt cgtccctcgt taggccggtc 2160
gccggagctg gacgcgtggt gtttccccgt gttggccgcg gcgggttcgc ggcggtgagg 2220
gcgagcgggc cggcgacgcc gccggacatc tcggacaaga tgtcggagag catcgacaag 2280
gcgaaggagg cgtgcgcgga ggacacggcg agcggcgagt gcgcggcggc gtgggacgag 2340
gtggaggagc tgagcgcggc ggcgagccac gcgcgcgaca agctcaagga gacctccgac 2400
ccgctcgagg cctactgcaa ggacaacccg gagaccgacg agtgccgcac ctacgacaac 2460
tga 2463

<210> 9
<211> 744
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 9
ttcaagtcca taggcgaggc gaccggcccg cggcggacgc ggcgtcggcg caccagagct 60
cgacgtggtg gaacgcgagc gcctggaacc ggtcgctccg cgggttggcg cggacgaagc 120
ggcggtgccc gacgaggcgg aaccccgcgt tctcccccgc cgccgcagcg gccgagacgg 180
cgccggtggt ggcggtgggg gtgggagtgg gaggcatggc gcggcgcggc gcggcgtggc 240
gtggcgcgtc gtggggtgtg ggggagtgga tgacagtggc ggcgtggggg gaggagttgg 300
tggtgggggg ttaaataaag ggaggagatg gcgccacgtg gacgctaagt ctagtggttg 360
cggacgggat ttgtcctctg gtgctggttg ccttggcaga tagggtaaga actagcacaa 420
gattaaggac acaacaacgg atcaaacagc aaacatattc caacagaaca tacatgtatt 480
caaaaagata gtaacaggca catcacacat gtattcagat aggtagtaac agcacacgta 540
tcctgaactt cataaataag tagaatgaac tagtggcaat aacttttcac acagaacatc 600
tcccttgttt tcaaatatgt agtaacagca cacgtatcct gtacttcaaa acttagtaga 660
atgaactagt ggcagtaatc tttcacacag aaagaatgaa ctagtggcaa taatctttca 720
cacagaatgt tggttgatgg atag 744

<210> 10
<211> 603
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 10
caacgtgcct taggcgaggc gaccggcccg cggcggacgc ggcgtcggcg caccagagct 60
cgacgtggtg gaacgcgagc gcctggaacc ggtcgctccg cgggttggcg cggacgaagc 120
ggcggtgccc gacgaggcgg aaccccgcgt tctcccccgc cgccgcagcg gccgagacgg 180
cgccggtggt ggcggtgggg gtgggagtgg gaggcatggc gcggcgcggc gcggcgtggc 240
gtggcgcgtc gtggggtgtg ggggagtgga tgacagtggc ggcgtggggg gaggagttgg 300
tggtgggggg ttaaataaag ggaggagatg gcgccacgtg gacgctaagt ctagtggttg 360
cggacgggat ttgtcctctg gtgctggttg ccttggagat agggtaagaa ctagcacaag 420
attaaggaca caacaacgga tcaaacagca aacatattcc aacagaacat acatgtattc 480
aaaaagatag taacaggcac atcacacatg tattcagata ggtagtaaca gcacacgtat 540
cctgaacttc agaaataagt agaatgaact agtggcaata acttttcccc ccaaaaacct 600
gtc 603

<210> 11
<211> 477
<212> ADN
<213> secuencia de invesión resultante de la transformación de protoplasto pQY002062(Secuencia artificial)

<400> 11
gggcggattt cgacggaggg gcggagagga ggaggatcct gttggagagc gacttggacc 60
ctggcagctg aaccgccccg gagatctccc tgatgggctg gagcacgatc tcctccgcct 120
tcgccgccgg cgctgccacc gacgacgacg acgcggacgc caccaccacc gcctcccgcc 180
gcccccgcgc ccgcacccgc acccgcatcc ccccgcgcgc cgcggcgggc agccgcagct 240
gcttccgcga cgagaacgcc gccgacgccg ccacggcctg gtccagggac accgccgccg 300
cagccgcggc gttggacgcc atggtcgccg ccattgcggt gtggtggcga ggagaggcgg 360
agatggcgag gttgtggggt gggagatggg atgggttatg tatagacttg ggggtgcgtt 420
ttgggggggac tcgtagccaa taaaaaggag ggggctatgg tgtggccgtt tggacat 477

<210> 12
<211> 670
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 12
ttttcgttgg aggggcggag aggaggagga tcctgttgga gagcgacttg gaccctggca 60
gctgaaccgc cccggagatc tccctgatgg gctggagcac gatctcctcc gccttcgccg 120
ccggcgctgc caccgacgac gacgacgcgg acgccaccac caccgcctcc cgccgccccc 180
gcgcccgcac ccgcacccgc atccccccgc gcgccgcggc gggcagccgc agctgcttcc 240
gcgacgagaa cgccgccgac gccgccacgg cctggtccag ggacaccgcc gccgcagccg 300
cggcgttgga cgccatggtc gccgccattg gacgagtcgg aatcgcagac cgataccagg 360
atcttgccat cctatggaac tgcctcggtc catggccgcg cactccgtcg ccgccgcgca 420
cgccaccatc gccgcgcgcg cgggtgccgc cgcgccagcg cccgcgccgc cggagcgcct 480
cgggttccgc ctcagcgcgc tcgccggccg cggcctccgc tccccgctcc cgcctcgccg 540
cggcgcgcca tcggcgtccg cgtcgcgccg ccgccacaac aaccgcgtgc gcgcggcggc 600
ggtcgagacg ctcgaggggc aggcggcgac gggggcgctg ctcgagaagt cggaaacccc 660
cgaatccaaa 670

<210> 13
<211> 777
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 13
gaacgatgcg agccccacgc tcgaccgccg ccgcgcgcac gcggttgttg tggcggcggc 60
gcgacgcgga cgccgatggc gcgccgcggc gaggcgggag cggggagcgg aggccgcggc 120
cggcgagcgc gctgaggcgg aacccgaggc gctccggcgg cgcgggcgct ggcgcggcgg 180
cacccgcgcg cgcggcgatg gtggcgtgcg cggcggcgac ggagtgcgcg gccatggcga 240
gaggagtgga tggtcacctg actaccggtc ccctcaaact ggtttaattt cccctggcaa 300
aatccacctc cggacctaca atttaagctc ccctttttt ttttaaaaaa aaaaaaaaag 360
agggtaaacc aactaaccta gcttggacct tttttaatgg agtaagggat ttaaaacaaa 420
aacaaaaaaa aaatccaaac tggtaaaaaa acaaacaaac catttaaata aaaattttcc 480
ccaaagggaa attcctggcg aaaaaaatct atgcccctct gggtctatct tggtattttt 540
tccccggggc tccgtttcat ccttcatttt ggcgaataca aaaaaaaccg tttgaatttt 600
ttttggttga aagaatggca atttactggc caggatcatg tactctgcat ctaagaattg 660
atttttgac cccaaatttc aacttagcct ccatcgcagt agtgcgcaca cacaggctga 720
aggtgactct tagacccaat gtcactatct cagcaatatg cagagagaat gacccaa 777

<210> 14
<211> 635
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 14
agaacgatgc gcagcctcgg cgtctcgacc gccgccgcgc gcacgcggtt gttgtggcgg 60
cggcgcgacg cggacgccga tggcgcgccg cggcgaggcg ggagcgggga gcggaggccg 120
cggccggcga gcgcgctgag gcggaacccg aggcgctccg gcggcgcggg cgctggcgcg 180
gcggcacccg cgcgcgcggc gatggtggcg tgcgcggcgg cgacggagtg cgcggccatg 240
gcgagaggag tgtggtgggt acccctttcaa acccccaaaa gagtgggtcg ggtctctctt 300
tcggctctcg gcgggggctg cttcccacaa agaccgccat cagacgtgag tgaactgcaa 360
gtctgcaact accactccag gtgctctccc cttaaattac tttactacta cctttattct 420
aggggccggt tcagataatt gccaaaatca ctcgcaccat tttttaataa tattaggatg 480
aaatatatat gtcgcgccaa atttttctac tgttactgaa atttggacac aaactacaca 540
ccaccgtata tttatctttt ttaccaaata ggggtatggt ttaaaatgac tttaatctaa 600
ataggccctg aaatataaaa gcgccccacc cctca 635

<210> 15
<211> 652
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 15
tttgagtaga ctcgccggcg cgctcggcgg tggtgatgtt gccgccgggg cgggcgcggg 60
cctccgtgac gagcacgtcg ccgacgccgt gctttgtggc cagcgcctgc gcggtgcaga 120
gcccgctgat gccgccgccc accacgacgc agtccgccga cacccgcgcc ccgggcgccg 180
cgggcgcctc ggccgcgccg ctggcgacgg cgcagcgaac gtggccgcgt cggcgggtcc 240
tcctcgcggc gtcgcgaatg cggagcggcg gcgctgccgt ggcggaggtg gcggtggcca 300
tggctgcggc ggcggcggcc atgtccgtcg ctgacatgcg gatttctgcg tgtgatgtgg 360
gcgtttgtag ctgttgcgac gaggcgttcg ttgcacggat tgaagagatg gggtttatat 420
atatatagct ccgtggggtg ggggagaagg ggagagagga ttcgacgacg tgcactcgtt 480
tcttatcgcc tcctcagcca atcgtcgtgt gccacgtggg ctgtattttg agatatttca 540
tgcgaaatgg ggacttggca aaggagatct ttttcttttc ccttgggtga atctaaggtg 600
agagaagcag ttttaatttg accgtgaaaa catgagccaa aaggaaaaaa gg 652

<210> 16
<211> 506
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 16
acgcgtggtt cttccggtag ctgcgcccgc gcccacggga atgcgattcc cagcccattc 60
cacccccttc ccattccggt gggccattcc gaatccaacc aaccaaccaa ccatcgaacc 120
cgcacccgca tcgtatccac tcctctccag tctccccgcc gctccgcatc ccgcagccgc 180
tcgatgcgga tttctgcgtg tgatgtgggc gtttgtagct gttgcgacga ggcgttcgtt 240
gcacggattg aagagatggg gtttatatat atatagctcc gtggggtggg ggagaagggg 300
agagaggatt cgacgacgtg cactcgtttc ttatcgcctc ctcagccaat cgtcgtgtgc 360
cacgtgggct gtattttgag atatttcatg cgaaatgggg acttggcaaa ggagatcttt 420
ttcttttccc ttgggtgaat ctaaggtgag agaagcagtt ttaatttgac cgtgaaaaca 480
tagcccagaa tgacaaaata accttt 506

<210> 17
<211> 614
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 17
gcatcgtccg gccgtcggcg gtggtgatgt tgccgccggg gcgggcgcgg gcctccgtga 60

cgagcacgtc gccgacgccg tgctttgtgg ccagcgcctg cgcggtgcag agcccgctga 120
tgccgccgcc caccacgacg cagtccgccg acacccgcgc cccgggcgcc gcgggcgcct 180
cggccgcgcc gctggcgacg gcgcagcgaa cgtggccgcg tcggcgggtc ctcctcgcgg 240
cgtcgcgaat gcggagcggc ggcgctgccg tggcggaggt ggcggtggcc atggctgcgg 300
cggcggcggc catgttgtgg gcgtttgtag ctgttgcgac gaggcgttcg ttgcacggat 360
tgaagagatg gggtttatat atatatagct ccgtggggtg ggggagaagg ggaaagagga 420
ttcgacgacg tgcactcgtt tcttatcgcc tcctcagcca atcgtcgtgt gccacgtggg 480
ctgtattttg agatatttca tgcgaaatgg ggacttggca aaggagatct ttttcttttc 540
ccttgggtga atctaaggtg agagaagcag ttttaatttg accgtgaaaa catgagccca 600
aattgacaaa tccc 614

<210> 18
<211> 574
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 18
ggatacgtgt gctgttacta cctatctgaa tacatgtgtg atgtgcctgt tactatcttt 60
ttgaatacat gtatgttctg ttggaatatg tttgctgttt gatccgttgt tgtgtcctta 120
atcttgtgct agttcttacc ctatctgcca aggcaaccag caccagagga caaatcccgt 180
ccgcaaccac tagacttagc gtccacgtgg cgccatctcc tccctttatt taacccccca 240
ccaccaactc ctcccccccac gccgccactg tcatccactc ccccacaccc cacgacgcgc 300
cacgccacgc cgcgccgcgc cgcgccatgc ctcccactcc cacccccacc gccaccaccg 360
gcgccgtctc ggccgctgcg gcggcggggg agaacgcggg gttccgcctc gtcgggcacc 420
gccgcttcgt ccgcgccaac ccgcggagcg accggttcca ggcgctcgcg ttccaccacg 480
tcgagctctg gtgcgccgac gccgcgtccg ccgcgggccg gttcgccttc gccctgggcg 540
cgccgctcgc cgccaggtcc gacctctcca cggg 574

<210> 19
<211> 551
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 19
aggatacgtg tgctgttact acctatctga atacatgtgt gatgtgcctg ttactatctt 60
tttgaataca tgtatgttct gttggaatat gtttgctgtt tgatccgttg ttgtgtcctt 120
aatcttgtcc aaggcaacca gcaccagagg acaaatcccg tccgcaacca ctagacttag 180
cgtccacgtg gcgccatctc ctccctttat ttaacccccc accaccaact cctcccccca 240
cgccgccact gtcatccact cccccacacc ccacgacgcg ccacgccacg ccgcgccgcg 300
ccgcgccatg cctcccactc ccacccccac cgccaccacc ggcgccgtct cggccgctgc 360
ggcggcgggg gagaacgcgg ggttccgcct cgtcgggcac cgccgcttcg tccgcgccaa 420
cccgcggagc gaccggttcc aggcgctcgc gttccaccac gtcgagctct ggtgcgccga 480
cgccgcgtcc gccgcgggcc ggttcgcctt cgccctgggc gcgccgctcg ccgccaggtc 540
cgacctctcc a 551

<210> 20
<211> 155
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 20
tctctctccc ttctccccca ccccacggag ctatatatat ataaacccca tctcttcaat 60
ccgtgcaacg aacgcctcgt cgcaacagct acaaacgccc acaagcaacg aaggaaatgg 120
gcggccgccg ccgaaccctg ggccccggcc cctcc 155

<210> 21
<211> 447
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 21
cccttctccc ccaccccacg gagctatata tatataaacc ccatctcttc aatccgtgca 60
acgaacgcct cgtcgcaaca gctacaaacg gacatggccg ccgccgccgc agccatggcc 120
accgccacct ccgccacggc agcgccgccg ctccgcattc gcgacgccgc gaggaggacc 180
cgccgacgcg gccacgttcg ctgcgccgtc gccagcggcg cggccgaggc gcccgcggcg 240
cccggggcgc gggtgtcggc ggactgcgtc gtggtgggcg gcggcatcgg cgggctctgc 300
accgcgcagg cgctggccac aaagcacggc gtcggcgacg tgctcgtcac ggaggcccgc 360
ccccgccccg gcggcaacat caccaccgcc gagcgcgccg gcgagggcta cctctgggag 420
gaggggccca acagcttcca gccttcc 447

<210> 22
<211> 463
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 22
cccttctccc ccaccccacg gagctatata tatataaacc ccatctcttc aatccgtgca 60
acgaacgcct cgtcgcaaca gctacaaacg cccacagtca gcgacggaca tggccgccgc 120
cgccgcagcc atggccaccg ccacctccgc cacggcagcg ccgccgctcc gcattcgcga 180
cgccgcgagg aggacccgcc gacgcggcca cgttcgctgc gccgtcgcca gcggcgcggc 240
cgaggcgccc gcggcgcccg gggcgcgggt gtcggcggac tgcgtcgtgg tgggcggcgg 300
catcagcggg ctctgcaccg cgcaggcgct ggccacaaag cacggcgtcg gcgacgtgct 360
cgtcacggag gcccgcgccc gccccggcgg caacatcacc accgccgagc gcgccggcga 420
gggctacctc tgggaggagg ggcccaacag cttccagcct tcc 463

<210> 23
<211> 388
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 23
cccttctccc ccaccccacg gagctatata tatataaacc ccatctcttc aatccgtgca 60
acgaacgcct cgtcgcaaca ggtacatggc cgccgccgcc gcagccatgg ccaccgccac 120
ctccgccacg gcagcgccgc cgctccgcat tcgcgacgcc gcgaggagga cccgccgacg 180
cggccacgtt cgctgcgccg tcgccagcgg cgcggccgag gcgcccgcgg cgcccggggc 240
gcgggtgtcg gcggactgcg tcgtggtggg cggcggcatc agcgggctct gcaccgcgca 300
ggcgctggcc acaaagcacg gcgtcggcga cgtgctcgtc acggaggccc gcgcccgccc 360
cggcggcaac atcaccaccg ccgagcgc 388

<210> 24
<211> 417
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 24
cccttctccc ccaccccacg gagctatata tatataaacc ccatctcttc aatccgtgca 60
acgaacgcct cgtcgcaaca gctacaaacg gacatggccg ccgccgccgc agccatggcc 120
accgccacct ccgccacggc agcgccgccg ctccgcattc gcgacgccgc gaggaggacc 180

cgccgacgcg gccacgttcg ctgcgccgtc gccagcggcg cggccgaggc gcccgcggcg 240
cccggggcgc gggtgtcggc ggactgcgtc gtggtgggcg gcggcatcag cgggctctgc 300
accgcgcagg cgctggccac aaagcacggc gtcggcgacg tgctcgtcac ggaggcccgc 360
gcccgccccg gcggcaacat caccaccgcc gagcgcgccg gcgagggcta cctctgg 417

<210> 25
<211> 430
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 25
ccttctcccc caccccacgg agctatatat atataaaccc catctcttca atccgtgcaa 60
cgaacgcctc gtcgcaacag ctacaaacgc ccgtcagcga cggacatggc cgccgccgcc 120
gcagccatgg ccaccgccac ctccgccacg gcagcgccgc cgctccgcat tcgcgacgcc 180
gcgaggagga cccgccgacg cggccacgtt cgctgcgccg tcgccagcgg cgcggccgag 240
gcgcccgcgg cgcccggggc gcgggtgtcg gcggactgcg tcgtggtggg cggcggcatc 300
agcgggctct gcaccgcgca ggcgctggcc acaaagcacg gcgtcggcga cgtgctcgtc 360
acggaggccc gcgcccgccc cggcggcaac atcaccaccg ccgagcgcgc cggcgagggc 420
tacctctggg 430

<210> 26
<211> 424
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 26
ataaacccca tctcttcaat ccgtgcaacg aacgcctcgt cgcaacagct acaaacgccc 60
acagtcagcg acggacatgg ccgccgccgc cgcagccatg gccaccgcca cctccgccac 120
ggcagcgccg ccgctccgca ttcgcgacgc cgcgaggagg acccgccgac gcggccacgt 180
tcgctgcgcc gtcgccagcg gcgcggccga ggcgcccgcg gcgcccgggg cgcgggtgtc 240
ggcggactgc gtcgtggtgg gcggcggcat cagcgggctc tgcaccgcgc aggcgctggc 300
cacaaagcac ggcgtcggcg acgtgctcgt cacggaggcc cgcgcccgcc ccggcggcaa 360
catcaccacc gccgagcgcg ccggcgaggg ctacctctgg gaggaggggc ccaacagctt 420
ccag 424

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 27
gtgctggttg ccttggctgc 20

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 28
cacaaattca ccagcagcca 20

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 29
taagaactag cacaagatta 20

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 30
gaaataatca ccaaacagat 20

<210> 31
<211> 58
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 31
atatggtctc gggcggtgct ggttgccttg gctgcgtttt agagctagaa atagcaag 58

<210> 32
<211> 58
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 32
atatggtctc gggcgcacaa attcaccagc agccagtttt agagctagaa atagcaag 58

<210> 33
<211> 52
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 33
tattggtctc taaactaatc ttgtgctagt tcttagcttc ttggtgccgc gc 52

<210> 34
<211> 52
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 34
tattggtctc taaacatctg tttggtgatt atttcgcttc ttggtgccgc gc 52

<210> 35
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 35
cactaccatc catccatttg c 21

<210> 36
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 36
gagttccccg tggagaggt 19

<210> 37
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 37
tccattacta ctctccccga tt 22

<210> 38
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 38
gtgtggggga gtggatgac 19

<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 39
tgtagcttgt gcgtttcgat 20

<210> 40
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 40
gggatgccct ctttgtcc 18

<210> 41
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 41
tctgtgtgaa gattattgcc act 23

<210> 42
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 42
gggatgccct ccttatcttg 20

<210> 43
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 43
accacttcga ccgccactac t 21

<210> 44
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 44
acgcctaagc ctgctggtt 19

<210> 45
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 45
cagatcttca ccaagccagt ag 22

<210> 46
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 46
gagaagttgc ccttcccaaa 20

<210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 47
cctccgtggt ggtcagtaat 20

<210> 48
<211> 18
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 48
gaacagaggc tcgggacg 18

<210> 49
<211> 28
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 49
tctgtgtgaa gattattgcc actagttc 28

<210> 50
<211> 26
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 50
ccccttccct ctaaaaatca gaacag 26

<210> 51
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 51
gggatgccct ccttatcttg gatc 24

<210> 52
<211> 25
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 52
cctccattac tactctcccc gattc 25

<210> 53
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 53
gtgtggggga gtggatgaca g 21

<210> 54
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 54
tcgtccatca cagtttgcca 20

<210> 55
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 55
tgacgtaagg gatgacgcac 20

<210> 56
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 56
ccatgtccgt cgctgacgag 20

<210> 57
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 57
ccgctcgtca gcgacggaca 20

<210> 58
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 58
gccatggctg gctgttgatg 20

<210> 59
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 59
cggatttctg cgtgtgatgt 20

<210> 60
<211> 58
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 60
atatggtctc gggcgccatg tccgtcgctg acgaggtttt agagctagaa atagcaag 58

<210> 61
<211> 58
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 61
atatggtctc gggcgccgct cgtcagcgac ggacagtttt agagctagaa atagcaag 58

<210> 62
<211> 55
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 62
tattggtctc taaaccatca acagccagcc atggcgcttc ttggtgccgc gcctc 55

<210> 63
<211> 55
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 63
tattggtctc taaacacatc acacgcagaa atccggcttc ttggtgccgc gcctc 55

<210> 64
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 64
gctatgccgt cgctctttct c 21

<210> 65
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 65
cggacttatt cccaccagaa 20

<210> 66
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 66
gagaagggga gcaagaagac gt 22

<210> 67
<211> 19
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 67
aaggctggaa gctgttggg 19

<210> 68
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 68
cattccacca aactcccctc tg 22

<210> 69
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 69
aggtctcctt gagcttgtcg 20

<210> 70
<211> 25
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 70
gtcatctgct catgttttca cggtc 25

<210> 71
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 71
ctgaggaggc gataagaaac ga 22

<210> 72
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 72
gcagcagatg ctctgtcaat a 21

<210> 73
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 73
ctggagctct ccgtcaatta ag 22

<210> 74
<211> 17
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 74
ccggacatct cggacaa 17

<210> 75
<211> 17
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 75
ctcagctcct ccacctc 17

<210> 76
<211> 21
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 76
cggacttatt tcccaccaga a 21

<210> 77
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 77
ccacaccact cctctcgcca 20

<210> 78
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 78
ccatggcgag aggagtggtg 20

<210> 79
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 79
atggtcgccg ccattgccgg 20

<210> 80
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 80
gacctccacg ccgccggcaa 20

<210> 81
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 81
tagtcatgtg accatccctg 20

<210> 82
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 82
ttgactcttt ggttcatgct 20

<210> 83
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 83
atccaagtta ccccctctgc 20

<210> 84
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 84
cacaaacaca gccacctcac 20

<210> 85
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 85
atgtccacgt ccacaccata 20

<210> 86
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 86
aatggaattc acgcaagagg 20

<210> 87
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 87
gtaggggttc ttggggttgt 20

<210> 88
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 88
cgcatgctaa cttgagacga 20

<210> 89
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 89
ggatcgtgtt caccgacttc 20

<210> 90
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 90
ccggtacaac gcacgagtat 20

<210> 91
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 91
ggcgtcattc catggttgat tgt 23

<210> 92
<211> 25
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 92
gatagaccca gatgggcata gaatc 25

<210> 93
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 93
tgcatgcatt gatggttggt gc 22

<210> 94
<211> 25
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 94
ccggccctta gaataaaggt agtag 25

<210> 95
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 95
caaaccaaag aaaaagtata 20

<210> 96
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 96
ggtaatcttc ttcagaagaa 20

<210> 97
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 97
atcatcttaa ttctcgatta 20

<210> 98
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia artificial

<400> 98
ttgtgatttc tatctagatc 20

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2025/0000698
Recibo: 25-111158
Fecha: 23/01/2025

JUAN CARLOS CUESTA QUINTERO
CC: 79.339.809
Consignación No: 1065690

NC Modificación a las reivindicaciones
Request on Patente PCT NC2022/0007902

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	$ 226,000	$ 226,000
		TOTAL			$ 226,000

Sede Centro: Carrera 13 No.27-00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá D.C. - Colombia
Web: www.sic.gov.co e-mail:contactenos@sic.gov.co Conmutador:(571)5870000 Contact Center: (571)5920400