

REIVINDICACIONES

1. Un método para crear un nuevo gen en una célula de una planta sin necesidad de proporcionar una plantilla de ADN foráneo caracterizado por comprender las siguientes etapas:

entregar un sistema CRISPR/Cas con propiedad de focalización a una célula de la planta para entrar en contacto con el ADN genómico;

generar simultáneamente rupturas de ADN en dos sitios diferentes en el mismo cromosoma o en cada uno de dos cromosomas diferentes en el genoma de la célula, en donde los dos sitios son sitios genómicos separando los promotores y las regiones codificantes de dos genes diferentes en el mismo cromosoma, o sitios genómicos que separan el promotor y la región codificante de cada uno de dos genes diferentes en dos cromosomas diferentes, y las rupturas de ADN se ligan entre sí mediante una unión de extremos no homólogos (NHEJ), generando una combinación del promotor de uno de los dos genes y la región codificante del otro gen, creando de ese modo el nuevo gen;

donde los dos genes tienen diferentes patrones de expresión;

y en el que el método da lugar a eventos de inversión o duplicación por duplicación de los fragmentos entre los blancos del mismo cromosoma, y/o el intercambio de fragmentos cromosómicos entre los blancos en diferentes cromosomas.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el sistema CRISPR/Cas está en forma de ADN.

3. El método según la reivindicación 1, caracterizado porque el sistema CRISPR/Cas está en forma de ARNm o proteína.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque el sistema CRISPR/Cas 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*.

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque la combinación es una combinación de la región del promotor para 5'UTR de uno de los dos genes con diferentes patrones de expresión y la CDS del otro gen.

6. El método de la reivindicación 5, caracterizado porque la combinación de:
el promotor del gen ubiquitina2 y la región codificante del gen HPPD;

el promotor del gen TKT y la región codificante del gen EPSPS;
el promotor del gen CP12 y la región codificante del gen PPO en arroz; o
el promotor del gen ubiquitina10 y la región codificante del gen PPO en *Arabidopsis*.

7. El método de la reivindicación 6, caracterizado porque el nuevo gen se selecciona del grupo que consiste en:

- (1) un gen HPPD de arroz con una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19;
- (2) un gen EPSPS de arroz con una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14; o
- (3) un gen PPO de arroz que tiene una secuencia de ácido nucleico como 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.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque 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.

9. Un método de edición para aumentar el nivel de expresión génica de un gen endógeno blanco en una planta, que es independiente de un fragmento de donante de ADN exógeno, que comprende las siguientes etapas:

entregar un sistema CRISPR/Cas con propiedad de focalización a una célula de la planta para entrar en contacto con el ADN genómico;

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

10. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9, donde la planta es arroz o *Arabidopsis*.

11. El método de edición de acuerdo con la reivindicación 10, donde el gen endógeno blanco es un gen de HPPD, EPSPS o PPO endógeno en una planta.

12. El método de edición de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- (1) generar simultáneamente rupturas de ADN en sitios seleccionados entre el promotor y la región codificadora de los genes de HPPD y el gen endógeno de alta expresión, 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 y el promotor endógeno fuerte para formar un nuevo gen de HPPD de alta expresión,
- (2) generar simultáneamente roturas de ADN en sitios entre el promotor y la región codificante del gen EPSPS y el gen endógeno de alta expresión, ligando las roturas de ADN entre sí mediante una vía de reparación intracelular, generando *in vivo* una fusión de la región codificante del gen EPSPS y el promotor endógeno fuerte para formar un nuevo gen EPSPS de alta expresión, o
- (3) generar simultáneamente roturas de ADN en sitios entre el promotor y la región codificante del gen PPO y el gen endógeno de alta expresión, ligando las roturas de ADN entre sí mediante una vía de reparación intracelular, generando *in vivo* una fusión de la región codificante del gen PPO y el promotor endógeno fuerte para formar un nuevo gen PPO de alta expresión.

13. El método de edición de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, caracterizado porque:

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, o

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 ubiquitina 10.

14. El método de la reivindicación 13, caracterizado porque el nuevo gen endógeno de alta expresión se selecciona del grupo que consiste en: (1) un gen HPPD de arroz con una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19; (2) un gen EPSPS de arroz con una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14; o (3) un gen PPO de arroz que tiene una secuencia de ácido nucleico como 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.