

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 895**

21 Número de solicitud: 201730792

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**12.06.2017**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**14.12.2018**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (90.0%)  
C/ Serrano, nº 117  
28006 Madrid ES y  
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA  
(10.0%)**

72 Inventor/es:

**PASIN, Fabio;  
GARCÍA ALAVAREZ, Juan Antonio;  
BEDOYA ROJAS, Leonor Cecilia;  
SIMÓN MATEO, Carmen;  
ORZAEZ CALATAYUD, Diego y  
BERNABE ORTS, Joan Miquel**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **VECTORES BINARIOS Y USOS DE LOS MISMOS**

57 Resumen:

Vectores binarios y usos de los mismos.

La invención se refiere a una serie de vectores binarios que están basados en orígenes de replicación compatibles, autónomos y para una amplia gama de hospedadores para su mantenimiento en *Agrobacterium* sp. y *Escherichia coli* como nueva herramienta de biología sintética vegetal, así como un marco flexible para ensamblaje de múltiples elementos de ADN, transferencia y caracterización de partes de ADN. Los vectores binarios divulgados son de pequeño tamaño, preferentemente inferior a 3,8 kb, estables, con un origen compatible con los vectores binarios de ADN-T de uso más habitual, concuerdan con los estándares actuales de biología sintética vegetal y permiten la administración de múltiples casetes de ADN-T mediante multiplexación de los vectores. La presente invención también se refiere a métodos para transferir y expresar secuencias de ADN usando los vectores binarios y usos de los mismos.

ES 2 693 895 A1

**VECTORES BINARIOS Y USOS DE LOS MISMOS**

**DESCRIPCIÓN**

5           La invención se refiere de una forma general al campo de la biología molecular y los agentes útiles en la manipulación de organismos eucariotas. Más particularmente, la presente invención proporciona métodos para ensamblar, transferir y expresar secuencias de ADN utilizando vectores binarios, los propios vectores binarios, y usos de los mismos.

10

**TÉCNICA ANTERIOR**

Las plantas son organismos plásticos que detectan y responden a los estímulos ambientales. Estas respuestas o rasgos específicos de las plantas pueden no ajustarse a las necesidades de los seres humanos, y su manipulación se puede lograr mediante el uso dirigido de microorganismos que interactúan con plantas, o mediante la transformación genética de las plantas. La biotecnología de plantas utiliza herramientas avanzadas para generar plantas con nuevas funciones, mejores rasgos agronómicos, o para producir productos nuevos. La biología sintética aplica principio de ingeniería para facilitar la producción de organismos con funciones personalizadas y para el control preciso de funciones biológicas específicas. Los componentes genéticos de complejos sistemas biológicos se reducen a partes de ADN con asignaciones modulares y definidas. Una vez caracterizadas mediante la ayuda de herramientas informáticas, las bibliotecas de piezas se ensamblan para proporcionar rutas y redes con salidas predecibles. Se han utilizado métodos para analizar dispositivos moleculares dinámicos para diseñar plantas mediante ingeniería genética con funciones adaptables.

15

20

25

30

Las construcciones de ADN ensambladas se transfieren directamente a las plantas, o se introducen en cepas de *Agrobacterium tumefaciens* con pTI desactivado que sirven como chasis lanzadera para suministrar construcciones mantenidas en vectores de ADN T binarios a plantas. Se generaron de 1986 a 2000 vectores de ADN-T binarios usando diversos orígenes de replicación y partes (Murai N., Am. J. Plant Sci. 2013, 4, 932-939). Una desventaja de los vectores binarios existentes es su tamaño, que es difícil de manipular, y su bajo número de copias, por ejemplo, el 12-kb pBIN19 (Bevan M., Nucleic Acids Res. 1984, 12, 8711-8721). El bajo número de

copies conduce a bajos rendimientos de ADN de los plásmidos, y dificulta los procedimientos de clonación. Para mejorar los bajos rendimientos de ADN y facilitar los procedimientos de clonación, las cadenas principales de los plásmidos se pueden amplificar mediante PCR y a continuación utilizarse en reacciones de ensamblaje de ADN de una sola etapa. Debido a los grandes tamaños de muchos vectores binarios, la amplificación de cadenas principales mediante PCR no es práctico. Las series pPZP (Hajdukiewicz P., *et al.* Plant Mol. Biol. 1994, 25, 989–994) y pGreen (Helles R., *et al.*, Plant Molecular Biology. 2000, 42, 819–832) de vectores binarios incluyen orígenes con números de copias elevados que proporcionan elevados rendimientos de plásmidos. Orígenes de replicación inestables pueden conducir a pérdidas de plásmidos variables durante la replicación. Aunque el vector pGreen, que es muy pequeño (4,6 kb de tamaño), no es autónomo y carece de los elementos necesarios para una multiplicación estable en agrobacterias, de forma que solamente se puede usar con cepas de *Agrobacterium* específicas (Helles R., *et al.*, Plant Molecular Biology. 2000, 42, 819-832). Para ciertas aplicaciones, el uso de orígenes con números de copias elevados no es deseable, ya que puede favorecer delecciones/alteraciones en inserciones de ADN grandes, de secuencias que muestran toxicidad bacteriana, o de elementos de secuencia repetidos. La inestabilidad se manifiesta especialmente con componentes de ADN que se utilizan varias veces dentro de las construcciones. Por ejemplo, no es extraño que un promotor de expresión en plantas concreto se pueda usar para impulsar la expresión de diferentes regiones que codifican proteínas en una planta transgénica. Otros componentes génicos tales como las regiones 3' no traducidas (es decir, secuencias que determinan el terminador de la transcripción y la adición de poliadenilación) e incluso regiones que codifican proteínas muy similares se pueden duplicar o estar presentes en múltiples copias dentro de una sola región de ADN-T. Como se ha mencionado anteriormente, estos elementos de secuencia repetidos, que pueden existir en orientaciones repetidas tanto de forma invertida como de manera directa, son dianas de recombinaciones intramoleculares que pueden conducir a delecciones y otros reordenamientos del ADN.

Los vectores binarios descritos carecen de características que reducen la expresión indeseada de secuencias de ADN-T en hospedadores bacterianos. La expresión indeseada de secuencias exógenas puede conducir a la producción de productos tóxicos durante la propagación del vector en las bacterias, y mejorar la inserción y la inestabilidad del vector. En este sentido, se sabe que los terminadores

transcripcionales naturales o sintéticos puede aislar contra los promotores activos en bacterias (Chen Y.J., *et al.*, Nat Methods. 2013, 10, 7, 659-664).

En las series de vectores binarios iniciales, existe también frecuentemente una carencia de un número suficiente de sitios de enzimas de restricción para la clonación de secuencias deseadas en casetes de ADN-T, o bien los vectores solamente  
5 permiten el uso de pocos marcadores seleccionables.

Se han notificado versiones más recientes de los vectores anteriormente descritos (Murai N., Am. J. Plant Sci. 2013, 4, 932-939). Estas versiones generalmente adoptan las cadenas principales descritas, que se han modificado para incluir  
10 secuencias para mejorar la administración del casete de ADN-T a células eucariotas, y para facilitar la inserción de las secuencias exógenas en casetes de ADN-T. Durante décadas, los enfoques más habituales para ensamblar construcciones de ADN en vectores binarios han aprovechado la especificidad de las endonucleasas de restricción para crear extremos compatibles que se pueden unir usando ADN ligasas.  
15 La presencia o carencia de sitios de restricción en el vector y las secuencias de inserción puede limitar posibles ensamblajes, especialmente, las que implican múltiples inserciones. Se han desarrollado métodos de clonación que superan estas limitaciones, permitiendo de esta forma un ensamblaje de construcciones de ADN con alto rendimiento. Las tecnologías de tipo recombinante, tales como la clonación  
20 Gateway, Creator, Echo, y Univector, son muy eficaces y se basan en enzimas que recombinan de forma específica inserciones y secuencias de vectores. Las tecnologías de tipo recombinante están limitadas a vectores con las secuencias de combinación adecuadas, permiten la clonación de un pequeño número de inserciones a la vez, y no siempre sin cicatrices, ya que dejan > 20 pb de cicatrices entre bloques de  
25 construcción. Las nuevas estrategias de clonación desarrolladas en la última década utilizan métodos de ensamblaje basados en la endonucleasa de restricción de Tipo IIS y en el solapamiento (por ejemplo, Golden Gate, y ensamblaje Gibson) para superar los requisitos de secuencia, y permitir ensamblar múltiples inserciones en una reacción determinada. Solamente un pequeño número de vectores binarios descritos permiten  
30 el ensamblaje de construcciones de ADN-T de alto rendimiento por métodos de ensamblaje basados en la endonucleasa de restricción de Tipo IIS y en el solapamiento. Golden Gate es un sistema sólido usado por muchos botánicos (Patron N.J., *et al.*, New Phytol. 2015, 208, 13–19) y el ensamblaje Gibson es muy versátil, porque no requiere etapas de domesticación de las piezas, tiene la capacidad de unir

2-10 fragmentos en un orden predeterminado, sin restricciones de secuencia ni cicatrices (Gibson D.G., *et al.*, Nat. Methods 2009, 6, 343–345), pero no se ha adoptado ampliamente para la construcción de construcciones vegetales. Para reducir significativamente el fondo de colonias indeseadas compuestas solo por vectores en las reacciones con ensamblaje Gibson, el vector debería ser un producto PCR en lugar de un fragmento de restricción, y tratarse con DpnI para eliminar el arrastre del molde. Debido a los grandes tamaños de muchos vectores binarios, la linealización de la cadena principal mediante la PCR no es práctica y, por tanto, los vectores binarios de menor tamaño son deseables para una clonación de construcciones eficaz mediante ensamblaje Gibson y otros métodos de ensamblaje basados en el solapamiento.

La transferencia multigénica es algo obligatorio en la edición génica multiplexada y para diseñar mediante ingeniería genética rasgos complejos, diseño de circuitos, y rutas metabólicas. En las plantas, los métodos de apilamiento convencionales requieren notables esfuerzos de reproducción que se pueden resolver introduciendo múltiples genes dentro de un único ADN-T, o infecciones de plantas simultáneas con múltiples cepas de *A. tumefaciens*, teniendo cada una un vector binario de ADN-T diferente. Se sabe que una sola cepa de *A. tumefaciens* puede suministrar dos casetes de ADN-T no vinculados y transformarlos en la misma célula eucariota; sin embargo, el uso simultáneo de vectores binarios de ADN-T compatibles es una estrategia poco aplicada en biotecnología vegetal. Además, la mayoría de los sistemas de vectores binarios existentes carecen de la posibilidad de eliminar los marcadores seleccionables de las líneas transgénicas en un momento temporal posterior. La administración de casetes de ADN-T no vinculados permite el uso de un marcador seleccionable durante la regeneración de la planta y posterior recuperación de una progenie exenta de marcadores.

En este sentido, se conocen sistemas de vectores binarios donde dos casetes de ADN-T se administraron a una planta mediante una sola cepa de *A. tumefaciens*. Específicamente, un único vector binario que contiene dos casetes de ADN-T (Komari T., *et al.*, Plant J. 1996, 10, 165–174) o dos casetes de ADN-T incluidos en dos vectores binarios compatibles (Daley M., *et al.*, Plant Cell Rep. 1998, 17, 489–496) se administraron a una planta mediante una sola cepa de *A. tumefaciens*. Las limitaciones técnicas de los sistemas conocidos incluyen una flexibilidad de clonación limitada debido al elevado tamaño de los plásmidos (> 15 kb), incompatibilidad con métodos de ensamblaje de construcciones de alto rendimiento, o carencia de

independencia de replicación de los vectores binarios utilizados.

Otra desventaja operativa de los vectores binarios es el uso de componentes comunes en sus secuencias de la cadena principal, que dificulta su mantenimiento simultáneo en una sola célula bacteriana. Como bien saben los expertos en el campo de la biología molecular, el uso de orígenes que pertenecen a grupos de incompatibilidad idéntica impiden la replicación y el mantenimiento del vector en la misma célula. Además, secuencias largas repetidas conducen a posibles deleciones y otras reordenaciones del ADN, especialmente cuando las repeticiones son una parte de la estructura del plásmido. Dichas reordenaciones pueden conducir a una pérdida parcial o completa de la región de ADN-T, que finalmente da como resultado poca o ninguna transferencia de las secuencias extrañas deseadas a las células eucariotas.

Otra desventaja de los vectores binarios es la presencia de secuencias de movilización de plásmidos necesarias para movilizar los vectores a las *Agrobacterium* mediante emparejamiento triparental. La presencia de secuencias de movilización en vectores binarios contribuye a aumentar su tamaño y a reducir su seguridad biológica. Además, se sabe que el origen de transferencia de ciertos plásmidos puede interferir con el procesamiento de ADN-T deseado y su administración a células eucariotas (Buchanan-Wollaston V., *et al.*, Nature 1987, 328, 172–175). En este sentido, se sabe que *Agrobacterium* se transforma por plásmidos mediante enfoques físicos, por ejemplo, métodos de electroporación o de congelación-descongelación (Höfgen R. & Willmitzer L., Nucleic Acids Res. 1988, 16, 9877).

Teniendo en cuenta las desventajas anteriores, sería deseable diseñar vectores binarios mejorados y sistemas de vectores binarios que ya no tengan las limitaciones anteriormente mencionadas. Por lo tanto, existe una necesidad de proporcionar un vector binario que tenga un tamaño reducido y características que lo vuelvan estable y limiten su transferencia horizontal. Existe una necesidad adicional de un vector binario compatible con métodos de clonación de ADN avanzados de alto rendimiento y que facilite el ensamblaje de múltiples componentes. Es también deseable proporcionar un sistema de vectores binarios que incorpore orígenes de replicación mínimos, individuales y compatibles para una amplia gama de hospedadores que permitan el mantenimiento simultáneo de múltiples vectores binarios en una sola célula bacteriana. Por consiguiente, los vectores binarios necesarios, sistemas de vectores binarios, composiciones, usos y método que comprende los mismos, se pueden aplicar para mejorar el proceso de transformación

para integrar construcciones de ADN-T de longitud completa en la célula eucariota u organismo que estén exentas de cualquier secuencia de cadena principal del vector binario residual. En este sentido, existe una necesidad adicional de un sistema de vectores binarios que facilite la administración de un casete de multi ADN-T a células eucariotas. El desarrollo de un sistema de transformación de la planta novedoso y mejorado proporciona beneficios significativos a los biólogos celulares, usos agronómicos, compuestos farmacéuticos y protección de proteínas recombinantes.

### SUMARIO DE LA INVENCION

La invención resuelve los problemas mencionados anteriormente mediante la generación de la serie pLX, un conjunto de vectores binarios de ADN-T que facilitan el ensamblaje y la administración de construcciones multicomponentes. Los vectores binarios de ADN-T de la presente invención. son una nueva herramienta para la biología sintética vegetal, así como un marco flexible para la transferencia multigénica y la caracterización de partes del ADN. Las ventajas de los vectores binarios de ADN-T de la presente invención son: (i) tamaño reducido, preferentemente inferior a 3,8 kb; (ii) presencia de un origen de replicación único, autónomo y para una amplia gama de hospedadores para su mantenimiento en bacterias, preferentemente en *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*; (iii) el uso de un origen de replicación compatible con los vectores binarios de ADN-T de uso más habitual; (iv) presencia de terminadores de la transcripción para reducir la expresión indeseada de secuencias de ADN-T en los hospedadores bacterianos y promover la estabilidad del plásmido; (v) incorporación de casetes de ADN-T con sitios de reconocimiento únicos de corte infrecuente; (vi) coherencia con los estándares actuales de biología sintética vegetal para permitir el ensamblaje de construcciones de ADN-T de alto rendimiento de elementos de ADN prefabricados por métodos de clonación basados en la endonucleasa de restricción de Tipo IIS; (vii) la posibilidad de adoptar métodos dependientes del solapamiento para el ensamblaje de construcciones de ADN-T de alto rendimiento; (viii) la posibilidad de amplificarse mediante PCR para mejorar la eficacia de la clonación basada en solapamiento; (ix) incorporación de un par de vectores binarios con orígenes compatibles y diseñados específicamente mediante ingeniería genética para que no tengan regiones de cadena principal con una identidad > 28 nucleótidos; y (x) la posibilidad de administrar casetes multi ADN-T mediante un sistema de vectores binarios que permita el multiplexado de vectores en una célula

bacteriana individual.

Los vectores binarios de ADN-T de la presente invención comprenden un origen de replicación mínimo derivado de un plásmido pBBR1 (pLX basado en pBBR1) o RK2 (pLX basado en RK2), preferentemente, del plásmido pBBR1 (Antoine R. & Loch C., Mol. Microbiol. 1992, 6, 1785-1799). La cadena principal basada en pBBR1 y la cadena principal basada en RK2 de los vectores pLX de la invención es sustancialmente más pequeña que los vectores basados en pBIN19 y pCAMBIA ampliamente utilizados, e iguala a los vectores basados en pGreen, los plásmidos binarios más pequeños disponibles (**Fig. 2A** y **Fig. 9**). La replicación de los vectores pGreen en *A. tumefaciens* requiere un plásmido corresidente que suministre el gen pSa-RepA (por ejemplo, pSoup). Por el contrario, los vectores binarios pLX de la presente invención facilitan diseños experimentales flexibles porque su replicación es autónoma tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens*, y en consecuencia, no requiere factores adicionales para su mantenimiento en hospedadores bacterianos. En este sentido, los vectores binarios pLX de la presente invención son útiles por su replicación autónoma en diferentes bacterias, y la presencia de casetes de ADN-T.

Los vectores binarios pLX de la invención también incluyen diversos marcadores seleccionables (genes *nptII*, *aadA*, o *aacC1*) para su selección en células hospedadoras bacterianas, un casete de ADN-T con límites de tipo octopina o succinamopina de pTi procedente de *A. tumefaciens* y una segunda secuencia de límite izquierdo que se demostró que reduce la transferencia de la cadena principal (**Fig. 2A**). Terminadores bacterianos sintéticos basados en diferentes cadenas principales (T1, T2,  $\lambda$ T1 y/o  $\lambda$ T2) se incluyeron para reducir la expresión indeseada de las secuencias de ADN-T en hospedadores bacterianos y aumentar la estabilidad del plásmido. Se incluyó un sitio de reconocimiento *Ascl* de corte infrecuente fuera del casete de ADN-T para modificar la cadena principal del vector pLX de la presente invención con un fin determinado, por ejemplo, sin limitación, mediante la inserción de toxina-antitoxina, sistemas de contrasegregación, o genes de virulencia génica para mejorar la estabilidad del plásmido y/o potenciar la eficacia de transformación, tal como y sin limitación, los genes *hok/sok*, *parD/parE*, y *virG*. Adicionalmente, los vectores binarios pLX de la presente invención facilitan los procedimientos de clonación molecular ya que los casetes de ADN-T comprenden sitios de restricción *PmlI* y *SbfI* de corte infrecuente útiles para la clonación convencional con endonucleasa de restricción/ADN ligasa y sitios de restricción *BsaI* y *BsmBI*



compatibles con el método de alto rendimiento basado en endonucleasa de restricción de Tipo IIS, tal como la clonación Golden Gate y la clonación GolderBraid. Los salientes producidos con Bsal y BsmBI cumplen los estándares de la biología sintética vegetal propuestos, y facilitan el ensamblaje de elementos de ADN prefabricados que  
5 están disponibles en bibliotecas públicas. Los casetes de ADN-T también incluyen regiones de hibridación del cebador divergentes sin estructuras secundarias y ni similitudes de secuencia entre ellas. Por lo tanto, los minivectores binarios de ADN-T de la presente invención se pueden linealizar fácilmente mediante PCR, tratarse con Dpnl y usarse en métodos dependientes del solapamiento con alta eficiencia y sin  
10 fondo de colonas no deseadas compuestas solamente por vectores. Por lo tanto, los vectores binarios pLX de la presente invención son un conjunto de miniplásmidos de ADN-T binarios adecuados para la clonación convencional con endonucleasa de restricción/ADN ligasa y métodos avanzados de ensamblaje basados en endonucleasa de restricción de Tipo IIS y de solapamiento, tal como y sin limitación, ensamblaje  
15 Golden Gate/GolderBraid y Gibson.

Debido a su pequeño tamaño, los vectores pLX se podrían administrar directamente a células eucariotas, por ejemplo, mediante transfección de células/protoplastos. Como alternativa, los vectores pLX pueden usar cepas bacterianas adecuadas, preferentemente, cepas de *Agrobacterium* sp., como chasis  
20 lanzadera para transferir su casete de ADN-T a células eucariotas. Los vectores pLX se pueden introducir en las bacterias por métodos físicos (por ejemplo, electroporación, choque térmico) y es menos probable que se produzca la transferencia horizontal indeseada del vector pLX ya que no incluye un origen de transferencia conjugativa u otras regiones de movilización de plásmidos. Se predice  
25 que la transferencia de las secuencias de la cadena principal del vector pLX que flanquean los casetes de ADN-T se reduce mediante la incorporación de un doble límite izquierdo. En este sentido, *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* y plantas se han usado en los ejemplos de la presente invención, sin embargo, los vectores binarios de la invención son adecuados para su uso en sistemas alternativos,  
30 tales como en chasis procariotas diferentes a *E. coli* y *A. tumefaciens*, y para transformar organismos eucariotas diferentes a plantas superiores, tales como células de algas, hongos, y animales.

Los vectores binarios pLX de la presente invención incluyen el origen pBBR1, que no muestra incompatibilidad con plásmidos conocidos. Un sistema vector que

utiliza, sin limitación, vectores binarios pLX basados en pBBR1 y RK2 de la invención facilita la administración de múltiple de ADN-T a células eucariotas ya que incluye vectores con orígenes de replicación compatibles, diferentes marcadores seleccionables, y baja similitud de secuencia para reducir los eventos de recombina-  
5 recombina-  
ción homóloga. El uso simultáneo de vectores pLX basados en pBBR1 y RK2 como sistema de transformación, en un sistema de dos vectores/una cepa de *Agrobacterium* permite la administración de multiADN-T y múltiples genes a organismos eucariotas, tales como plantas, hongos y animales.

El uso de orígenes de replicación alternativos compatibles debería expandir adicionalmente el diseño de administración multigénico a un sistema “N-vectores/una  
10 cepa”. Este sistema se puede combinar con la coinfección con múltiples cepas de *A. tumefaciens*, para aumentar adicionalmente el número de casetes de ADN-T administrados.

Los vectores binarios divulgados en la presente invención se han probado (véanse los ejemplos siguientes) para la transformación de plantas, tanto transitoria como estable, edición del genoma, agroinoculación de nuevos clones víricos infecciosos y la administración de secuencias exógenas a plantas mediante vectores víricos. Los inventores han utilizado un sistema de dos vectores/una cepa para administrar múltiples casetes de ADN-T a las células de la línea germinal vegetal y  
15 para expresar en plantas componentes de una puerta tampón sencilla activada por un inductor químico.  
20

Las aplicaciones de los vectores binarios pLX de la presente invención incluyen, sin limitación, su uso para ensamblar grandes construcciones de ADN T y unidades de transcripción; para la expresión transgenes tanto transitoria como estable; para la generación de plantas transgénicas exentas de marcadores de resistencia a fármacos; para lanzar infecciones víricas mediante agroinoculación; para la administración de secuencias exógenas y producción de proteínas recombinantes usando vectores víricos; para la edición del genoma; para la administración de los componentes de un sistema de repeticiones palindrómicas cortas separadas regularmente entre sí y agrupadas (CRISPR)/proteína asociada a CRISPR (Cas); para  
25 para la administración de sistemas de expresión regulados químicamente; y para la administración de componentes del circuito genético.  
30

En este sentido, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un vector binario, a partir de ahora en el presente documento, el primer vector binario de

la invención (vector pLX basado en pBBR1), que comprende al menos tres módulos:

- i. un módulo casete de ADN-T que comprende al menos un límite derecho e izquierdo de ADN-T,
- 5 ii. un módulo origen de replicación que comprende un origen pBBR1 mínimo, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, y
- iii. al menos un módulo marcador seleccionable.

En una realización preferida, el vector pLX basado en pBBR1 de la invención comprende un casete de ADN-T que comprende un límite derecho y dos límites izquierdos de ADN-T.

10 En una realización preferida adicional del vector pLX basado en pBBR1 de la invención, el origen pBBR1 comprende regiones pBBR1-*oriV* y pBBR1-*rep*, o una variante funcionalmente equivalente del mismo. En una realización más preferida, el origen pBBR1 comprende la SEQ ID NO: 105.

15 En otra realización preferida, el vector pLX basado en pBBR1 de la invención comprende un casete de ADN-T que está flanqueado por al menos dos terminadores transcripcionales, preferentemente seleccionados entre T1 (SEQ ID NO: 108), T2 (SEQ ID NO: 109),  $\lambda$ T1 (SEQ ID NO: 110),  $\lambda$ T2 (SEQ ID NO: 111), o cualesquiera combinaciones de los mismos.

20 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere además a otro vector binario, denominado vector pLX basado en RK2, que comprende al menos tres módulos:

- i. un módulo casete de ADN-T que comprende al menos un límite derecho e izquierdo de ADN-T,
- 25 ii. un módulo origen de replicación que comprende un origen RK2 mínimo, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, y
- iii. al menos un módulo marcador seleccionable.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a otro vector binario que preferentemente se usa junto con el vector pLX basado en pBBR1 de la invención, que comprende al menos tres módulos:

- 30 i. un módulo casete de ADN-T que comprende al menos un límite derecho e izquierdo de ADN-T,
- ii. un módulo origen de replicación que comprende un origen compatible con el origen pBBR1, seleccionado preferentemente entre la lista que consiste en orígenes del grupo de incompatibilidad con el plásmido

IncQ, IncW, IncU, pRi, pVS1, IncP- $\alpha$ , y

iii. al menos un módulo marcador seleccionable.

En una realización preferida, el vector pLX basado en RK2 de la invención comprende un casete de ADN-T que comprende un límite derecho y dos límites  
5 izquierdos de ADN-T.

En una realización más preferida, el módulo origen de replicación es un origen del grupo de incompatibilidad con el plásmido IncP- $\alpha$  y, más preferentemente, es el origen RK2. En una realización preferida adicional, el origen RK2 comprende las regiones RK2-*oriV* y RK2-*trfA*, o una variante funcionalmente equivalente de las  
10 mismas. En una realización más preferida, el origen RK2 comprende la SEQ ID NO: 106 o la SEQ ID NO: 107.

En otra realización preferida, el vector pLX basado en RK2 de la invención comprende un casete de ADN-T flanqueado por al menos dos terminadores transcripcionales, preferentemente, terminadores transcripcionales bacterianos.

En otra realización preferida, el gen marcador seleccionable del vector pLX basado en RK2 difiere del gen marcador seleccionable del vector pLX basado en pBBR1.  
15

En otra realización preferida, la cadena principal del vector pLX basado en RK2 no tiene regiones de la cadena principal con identidad > 28 nucleótidos respecto al  
20 vector pLX basado en pBBR1 de la presente invención.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un sistema de vectores binarios que comprende:

- (a) un primer vector binario que es el vector binario pLX basado en pBBR1 divulgado en la presente invención y
- 25 (b) un segundo vector binario seleccionado entre el vector pLX basado en RK2 o el vector que se puede usar plásmido junto con el primer vector binario de la invención donde el módulo de origen pBBR1 está sustituido por cualquiera de los orígenes de replicación seleccionados entre los orígenes del grupo de incompatibilidad del plásmido: IncQ, IncW, IncU,  
30 pRi, pVS1, IncP- $\alpha$ .

donde cada uno de los vectores binarios de (a) y (b) tiene una replicación y un mecanismo de selección bacteriano que permite una coexistencia mutua y autónoma entre sí en la misma célula hospedadora.

En una realización preferida del sistema de vectores binarios de la invención, el

módulo de origen del segundo vector binario es un origen del grupo de incompatibilidad con el plásmido IncP- $\alpha$ , y más preferentemente, es el origen RK2 de acuerdo con la presente invención. En una realización más preferida, el segundo vector binario es el vector pLX basado en RK2 de la presente invención.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula hospedadora que comprende el vector pLX basado en pBBR1, el vector pLX basado en RK2, o el sistema de vectores binarios divulgado en la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un cultivo celular que comprende la célula hospedadora de la presente invención.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para administrar al menos una secuencia de nucleótidos de interés a al menos una célula vegetal que comprende:

- (a) insertar al menos una secuencia de nucleótidos de interés en el primer o segundo vectores binarios, o en el sistema de vectores binarios de la invención,
- 15 (b) introducir los vectores binarios o el sistema de vectores binarios de la etapa (a) en al menos una célula hospedadora bacteriana, y
- (c) poner en contacto la célula hospedadora de la etapa (b) con al menos una célula eucariota.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para administración *in vitro* de al menos una secuencia de nucleótidos de interés a al menos un organismo eucariota, que comprende:

- (a) insertar al menos una secuencia de nucleótidos de interés en el vector binario o en el sistema de vectores binarios de la invención, y
- 25 (b) introducir el vector binario o el sistema de vectores binarios de la etapa (a) en al menos un organismo eucariota.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para obtener una planta o célula vegetal diseñada mediante ingeniería genética que comprende la etapa de introducir el vector binario, el sistema vector, o la célula hospedadora bacteriana de la invención en una célula vegetal. Otro aspecto de la presente invención se refiere a una planta o célula vegetal diseñada mediante ingeniería genética que se puede obtener por el método de obtener una planta o célula vegetal diseñada mediante ingeniería genética de la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para obtener *in*

*in vitro* una célula u organismo eucariota diseñado mediante ingeniería genética que comprende la etapa de introducir el vector binario o el sistema de vectores binarios de la presente invención, en una célula eucariota. Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula u organismo eucariota diseñado mediante ingeniería genética que se puede obtener según el método para obtener *in vitro* una célula u organismo eucariota diseñado mediante ingeniería genética de acuerdo con la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “diseñado mediante ingeniería genética” como se usa en el presente documento, se refiere a una célula vegetal, planta, célula eucariota o individuo que se ha generado por los métodos anteriormente mencionados.

La presente invención se refiere además a un sistema vegetal genéticamente modificado, preferentemente transformado, mutante o modificado, a células regeneradas o a una planta regenerarse a partir de la misma, a su progenie o semillas de las mismas generados de acuerdo con los métodos de la invención descritos anteriormente en el presente documento. En una realización concreta de la presente invención, este sistema vegetal transformado se caracteriza por modificaciones individuales o múltiples del genoma de la célula vegetal, epigenoma, transcriptoma o metaboloma, y por que puede comprender o no comprender cualesquiera segmentos de secuencia del vector anteriormente mencionado, sistema de vector, y sus casetes de ADN-T.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para transformar células eucariotas u organismos eucariotas que comprende la etapa de introducir en la célula u organismo eucariota los vectores binarios, el sistema de vectores binarios, la célula hospedadora, la planta o célula vegetal diseñada mediante ingeniería genética o la una célula u organismo eucariota diseñado mediante ingeniería genética, divulgado en la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos para ensamblar secuencias sintéticas, genómicas, epigenómicas, y/o de ADNc de interés en vectores binarios o el sistema de vectores binarios divulgado en la presente invención. De acuerdo con la presente invención, se puede usar una variedad de métodos para el ensamblaje de ácidos nucleicos. En una realización preferida, las secuencias de interés se ensamblan mediante el uso de una endonucleasa de restricción de alto rendimiento, preferentemente y de forma no limitativa, endonucleasas de restricción de

Tipo IIS, o métodos de ensamblaje dependientes del solapamiento, tal como y sin limitación, ensamblaje Golden Gate/GoldenBraid o Gibson.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso *in vitro* o *ex vivo* del vector binario, el sistema de vectores binarios, la célula hospedadora, o el cultivo celular de la invención:

- a) para inactivación génica específica del sitio;
  - b) para edición del genoma específica del sitio;
  - c) para interferencia específica de la secuencia de ADN;
  - d) para edición del epigenoma específica del sitio;
  - e) para modulación transcripcional específica del sitio; o
  - f) para diseño mediante ingeniería del genoma multiplexado;
- con la condición de que el uso *in vitro* o *ex vivo* no comprende un proceso para modificar la identidad genética de la línea germinar de seres humanos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al kit que comprende los vectores binarios, el sistema de vectores binarios, la célula hospedadora, o el cultivo celular de la invención.

## DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**Fig. 1. Construcción de vectores binarios de ADN-T mediante ensamblaje de piezas modulares.**

El Módulo 1, 2, y 3 se refieren al casete de ADN-T, origen pBBR1 y marcador seleccionable, respectivamente. Cada módulo incluye una o varias partes de ADN, que están flanqueadas por dos enlazadores de ensamblaje diversos (rombos): Enlazador\_1 (SEQ ID NO: 112), Enlazador\_2 (SEQ ID NO: 113), Enlazador\_3 (SEQ ID NO: 114). Las partes de los tres módulos se obtuvieron mediante PCR o se sintetizaron químicamente, y se reunieron mediante en ensamblaje de ADN isoterma en una etapa para generar los vectores binarios pLX-B2 (SEQ ID NO: 3), pLX-B3 (SEQ ID NO: 4), pLX-B4 (SEQ ID NO: 5).

**Fig. 2. Novedosos vectores binarios de ADN-T de la serie pLX y sus características.**

(A) Organización de los plásmidos pLX basados en pBBR1. Los vectores binarios están compuestos por tres módulos, (i) un casete de ADN-T que incluye un límite derecho, un gen indicador de *Escherichia coli*, dos límites izquierdos, y está flanqueado por terminadores transcripcionales bacterianos (T1 y T2); (ii) el origen

pBBR1 para una amplia gama de hospedadores para una replicación adecuada del plásmido en *E. coli* y *Agrobacterium tumefaciens* (*oriV+rep*); y (iii) un marcador seleccionable tal como genes de resistencia a antibióticos (*R*). Los vectores plásmidos se indican mediante una letra que refleja el módulo de origen (B, origen derivado de pBBR1) y un dígito de acuerdo con el gen *R*: 2, *nptII*, gen que transmite resistencia a kanamicina; 3, *aadA*, gen que transmite resistencia a espectinomicina/estreptomicina; 4, *aacC1*, gen que transmite resistencia a gentamicina. **(B)** Características de clonación del casete de AND-T de un vector pLX. El indicador *lacZα* está flanqueado por dos sitios de reconocimiento Bsal divergentes (triángulos rellenos), los salientes no palindrómicos generados por la digestión con Bsal permiten el ensamblaje de las unidades transcripcionales usando clonación Golden Gate de digestión-ligadura en una sola etapa. Se incluyeron sitios BsmBI convergentes (triángulos blancos) para construir múltiples construcciones de unidades de transcripción mediante ensamblaje Golden Braid. Como alternativa, los vectores pLX se pueden linealizar mediante PCR inversa usando cebadores divergentes (flechas), tratarse con DpnI y usarse para unir una o más inserciones solapantes mediante ensamblaje de ADN isoterma en una etapa (ensamblaje Gibson). **(C)** Diagramas de características de clonación del vector pLX. Partes de las unidades transcripcionales se pueden ensamblar en vectores pLX usando estándares Golden Gate y GoldenBraid basados en Bsal. Los fragmentos de ADN solapantes se pueden unir en vectores pLX solapantes mediante ensamblaje de Gibson. Los vectores pLX se pueden multiplexar en células de *Agrobacterium* para administración de multiADN-T.

**Fig. 3. Expresión de transgén transitoria en plantas usando la serie de vectores pLX.**

**(A)** Esquema de la construcción del transgén para la transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana*. El gen TagRFP-T (RFP) impulsado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) se insertó en diferentes cadenas principales derivadas de pLX, que se administraron a plantas mediante agroinfiltración. Los datos se recopilaron a los 6 días de la agroinfiltración (dpa); CTRL, control vacío; B2-RFP, pLX-B2-TagRFP-T (SEQ ID NO: 13); B3-RFP, pLX-B3-TagRFP-T (SEQ ID NO: 14); B4-RFP, pLX-B4-TagRFP-T (SEQ ID NO: 15). **(B)** Se tomaron imágenes de fluorescencia RFP de las hojas infiltradas con un estereomicroscopio de fluorescencia. **(C)** Se tomaron imágenes de fluorescencia RFP de las células mediante microscopio confocal; barras de escala, 100  $\mu$ m. **(D)** La acumulación de RFP se evaluó mediante



análisis de inmunotransferencia. Transferencias teñidas con rojo de Ponceau como control de carga.

**Fig. 4. Expresión de transgén estable en plantas usando la serie de vectores pLX.**

5 (A) La construcción del transgén se ensambló en pLX-B2-P<sub>CRC</sub>:mTFP1 (SEQ ID NO: 23) para la transformación estable de *Arabidopsis thaliana*. Un gen de la proteína fluorescente cian (mTFP1) está impulsada mediante el promotor cruciferina C de *A. thaliana*, que está activo en las semillas (P<sub>CRC</sub>). (B) La PCR del ADN genómico se llevó a cabo para confirmar la integración estable del transgén, usando cebadores  
10 específicos del transgén (mTFP1; 765 pb) o control (P<sub>CRC</sub>; 1081 pb). Cada línea representa una muestra vegetal individual; C, muestra vegetal sin transformar; T<sub>1</sub>, líneas independientes seleccionadas mediante fluorescencia cian de semillas recogidas de plantas tratadas con *Agrobacterium*. Se muestran las imágenes de fluorescencia de las semillas no transformadas (Col-0), y semillas recogidas de una  
15 sola planta T<sub>1</sub> (T<sub>2</sub>).

**Fig. 5. Estabilidad de la serie de vectores pLX en *Escherichia coli*.**

(A) El casete de expresión de un clon de ADNc marcado con GFP del *virus de la sharka* (PPV) se subclonó a partir de un vector derivado de pBIN19 (pSN-PPV) en un plásmido pLX, para generar el vector pLX-PPV (SEQ ID NO: 21). Los esquemas no  
20 están a escala. (B) Clones #A y #B del nuevo vector pLX-PPV se transformaron en *E. coli* para evaluar la estabilidad del plásmido, entradas (In). Para cada transformación, se repicaron ocho colonias individuales y se sometieron a seis ciclos de crecimiento (24 h, 37°C). Los plásmidos purificados, salidas (Out), se digirieron con EcoRI y se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos derivados del  
25 casete de copia del ADNc del genoma de PPV se han indicado (izquierda); las bandas superiores son fragmentos específicos de la cadena principal. (C) El casete de expresión de un clon de ADNc del *virus del mosaico del repollo* (TuMV) se subclonó a partir de un vector basado en pUC (p35Tunos-vec01-NAT1) en un plásmido derivado de pLX-B2, y generando el vector pLX-TuMV (SEQ ID NO: 28). (D) El pLX-TuMV (SEQ  
30 ID NO: 28) se transformó en *E. coli* para evaluar la estabilidad del plásmido, entrada (In). Se recogieron diez colonias individuales y se sometieron a seis ciclos de crecimiento de 24 h, a 37°C. Los plásmidos purificados, salidas (Out), se digirieron con EcoRI y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa.

**Fig. 6. Administración de vectores víricos y producción de proteínas**

**recombinantes en plantas usando la serie de vectores pLX.**

Los vectores víricos pLX-PPV (pLX) (SEQ ID NO: 21) y pSN-PPV (pSN) se administraron a plantas de *N. benthamiana* mediante agroinfiltración (**A-D**); El vector vírico pLX-TuMV se administró a plantas de *A. thaliana* mediante agroinoculación (**E-G**). (**A**) GFP recombinante se expresó en plantas usando un clon PPV quimérico. (**B**) La acumulación vírica se evaluó por análisis mediante inmunotransferencia usando un anticuerpo dirigido contra la proteína de revestimiento (CP) del PPV de muestras de hojas agroinfiltradas y no inoculadas superiores, a 6 y 14 dpa, respectivamente. Transferencias teñidas con rojo de Ponceau como control de carga. (**C**) La intensidad de fluorescencia (FI) GFP de los parches de hojas agroinfiltradas se cuantificó en un lector de placas de 96 pocillos a 6 dpa. El gráfico de barras muestra media  $\pm$  SD ( $n = 4$ ); \*  $p < 0,001$ , prueba de la  $t$  de Student. (**D**) Se tomaron imágenes de hojas no inoculadas superiores a 14 dpa en un transiluminador de luz azul; fluorescencia GFP en gris claro; barra de escala, 2 cm. (**E**) GFP recombinante se expresó en plantas usando un clon TuMV quimérico. (**F**) El vector pLX-TuMV (SEQ ID NO: 28) se administró a plantas de *A. thaliana* mediante agroinoculación, y los datos se recogieron 11 días después de la agroinoculación. La acumulación vírica se evaluó por análisis mediante inmunotransferencia usando un anticuerpo dirigido contra la proteína de revestimiento (CP) del TuMV de hojas no inoculadas superiores; Transferencias teñidas con rojo de Ponceau como control de carga. (**G**) Se obtuvieron imágenes de las hojas no inoculadas superiores; fluorescencia GFP en gris claro; barra de escala, 1 cm.

**Fig. 7. Ensamblaje de partes de ADN en vectores pLX usando estándares de biología sintética.**

(**A**) Se usaron unidades normalizadas para administrar a plantas genes de resistencia a la kanamicina (NptII) y proteína fluorescente roja (DsRED) en el vector pLX-B2 (SEQ ID NO: 3), para generar el vector pLX-B2-NptII-DsRED (SEQ ID NO: 20). (**B**) El vector pLX-B2-XT1-XT2-hCas9 (SEQ ID NO: 19) se ensambló para administrar unidades normalizadas: un gen de resistencia a la kanamicina (NptII), gen Cas9 de *Streptococcus pyogenes* con optimización de codones humanos (hCas9), y ARNsg dirigido a los genes endógenos Niben101Scf04205Ctg025 (XT1) y Niben101Scf04551Ctg021 (XT2) de *N. benthamiana*. (**C**) Esquema de vectores pLX que incorporan casetes de clonación compatibles con el ensamblaje binario GoldenBraid. Los plásmidos resistentes a kanamicina de nivel alfa tienen sitios

divergentes Bsal y sitios convergentes BsmBI; los plásmidos resistentes a espectinomicina de nivel omega tienen sitios divergentes BsmBI y sitios convergentes Bsal. Todos los plásmidos incluyen el origen pBBR1 y el indicador *lacZα*.

**Fig. 8. Ensamblaje de unidades transcripcionales grandes por métodos de clonación basados en el solapamiento, y agroinoculación vírica usando la serie de vectores pLX.**

(A) Uso de un vector pLX para generar un clon de ADNc de un virus de ARN infeccioso. Tres fragmentos RT-PCR (cuadros grises) que abarcaban la totalidad del genoma del *virus del mosaico marrón de la yuca ugandesa* (UCBSV) se clonaron en un vector linealizado basado en pLX-B2 mediante ensamblaje de Gibson. El vector pLX-UCBSV (SEQ ID NO: 22) obtenido se administró a plantas de *N. benthamiana* mediante agroinfiltración y los datos se recogieron a 12 dpa. (B) Fotografías de plantas infiltradas de forma simulada e infiltradas con pLX-UCBSV (izquierda y derecha, respectivamente). La altura relativa de la planta se representó gráficamente, media  $\pm$  SD ( $n = 4$ ); \*  $p = 0,0059$ , prueba de la  $t$  de Student. (C) La micrografía de transmisión electrónica muestra partículas observadas en muestras de plantas infectadas; barra de escala, 100 nm. (D) La acumulación vírica se evaluó por análisis mediante inmunotransferencia con un anticuerpo dirigido contra la proteína de revestimiento (CP) del UCBSV de hojas no inoculadas superiores. Transferencias teñidas con rojo de Ponceau como control de carga.

**Fig. 9. Comparación de tamaño relativo entre la cadena principal de pLX-B2 y vectores binarios de ADN-T seleccionados.**

Comparación de tamaño relativo entre la cadena principal de pLX-B2 y vectores binarios de ADN-T seleccionados (no se tuvieron en cuenta las secuencias del casete de ADN-T). Se rellenaron gráficos de barra de acuerdo con los orígenes de replicación mostrados a la derecha; los vectores binarios basados en pVS1 y pSa incluyen un origen de gama de hospedadores estrecha para mantenimiento en *E. coli*; \*, el origen pSa en vectores basados en pGreen no es autónomo, de este modo, el tamaño del plásmido pSoup basado en RK2 necesario para el mantenimiento de pGreenII en *A. tumefaciens* también se ha incluido en el gráfico de barras. Glifos de acuerdo con el formato visual del idioma abierto de biología sintética.

**Fig. 10. Comparación de vectores binarios de ADN-T pLX basado en pBBR1, RK2 y pVS1 en ensayos de expresión en plantas.**

(A) El módulo de replicación pBBR1 de los vectores pLX se sustituyó por un

origen RK2 mínimo para construir los vectores pLX-R2 (SEQ ID NO: 6), pLX-R3 (SEQ ID NO: 7) y pLX-R4 (SEQ ID NO: 8). Estos se diseñaron mediante ingeniería genética para expresar el gen TagRFP-T (RFP) obteniendo los vectores pLX-R2-TagRFP-T (SEQ ID NO: 16), pLX-R3-TagRFP-T (SEQ ID NO: 17) y pLX-R4-TagRFP-T (SEQ ID NO: 18). (B) En ensayos de expresión transitoria, los vectores RFP de la Figura 3 (B2-RFP: pLX-B2-TagRFP-T (SEQ ID NO: 13); B3-RFP: pLX-B3-TagRFP-T (SEQ ID NO: 14); B4-RFP: pLX-B4-TagRFP-T (SEQ ID NO: 15)) se compararon con los vectores pLX basados en RK2 (R2-RFP: pLX-R2-TagRFP-T (SEQ ID NO: 16); R3-RFP: pLX-R3-TagRFP-T (SEQ ID NO: 17); R4-RFP: pLX-R4-TagRFP-T (SEQ ID NO: 18)); CTRL, control vacío. La intensidad de la fluorescencia (FI) RFP de suspensiones bacterianas y muestras de plantas infiltradas (a 4 o 6 dpa) se midió en un lector de placas. Los gráficos de barras muestran los valores de FI de las plantas, media  $\pm$  SD ( $n \geq 3$ ); las letras indican  $p < 0,05$ , ANOVA monolateral y la prueba HSD de Tukey; \*  $p = 0,00047$ , prueba de la  $t$  de Student. Los gráficos de dispersión muestran el análisis de regresión lineal de los valores FI de plantas y bacterias; B3-RFP, R3-RFP, y las muestras de control vacío son de color negro, gris y blanco, respectivamente. (C) La expresión del casete DsRED convencional se comparó en ensayos de expresión transitoria y estable. Vectores derivados de pCAMBIA (GB1686, SEQ ID NO: 27) y los vectores pLX-B2-NptII-DsRED (pLX, SEQ ID NO: 20) se transforman en plantas de *N. benthamiana*; CTRL, control. En muestras de hojas agroinfiltradas, se obtuvieron imágenes de fluorescencia DsRED en células mediante microscopio confocal (barras de escala, 100  $\mu$ m) y se cuantificó en un lector de placas. Los valores de FI se representaron gráficamente, media  $\pm$  SD ( $n = 4$ ); las letras indican  $p < 0,05$ , ANOVA monolateral y la prueba HSD de Tukey. En ensayos de transformación estable, las muestras de hojas se cultivaron simultáneamente con las cepas de *A. tumefaciens* indicadas, y se transfirieron a un medio que contenía kanamicina. Las imágenes muestran las plántulas, donde las imágenes se obtuvieron con un microscopio de epifluorescencia a los 40 días de la inoculación. La gráfica muestra la eficacia de transformación definida como el número de plántulas resistentes a kanamicina que mostraron fluorescencia DsRED, media  $\pm$  SD ( $n = 7$ ); n.s.,  $p = 0,91$ . Se indican los orígenes de los vectores: pBBR1, círculos/barras rellenos; pVS1, círculos/barras sin rellenar.

**Fig. 11. Administración de los componentes del sistema CRISPR/Cas y comparación con los vectores binarios de ADN-T pLX y pVS1 basados en pBBR1**

**en ensayos de mutagénesis dirigida al genoma.**

Mutagénesis dirigida usando un sistema CRISPR/Cas9 basado en GoldenBraid en ensayos de expresión transitoria. **(A)** Plantas de *Nicotiana benthamiana* se infiltraron con un vector derivado de pCAMBIA (GB1108) y un vector pLX-B2-NptII-DsRED (pLX: SEQ ID NO: 20) que contienen unidades de transcripción de Cas9 con optimización de codones humanos (hCas9), y ARNsg dirigido a los genes endógenos Niben101Scf04205Ctg025 (XT1) y Niben101Scf04551Ctg021 (XT2). **(B)** Los geles muestran los ensayos de PCR/digestión; los asteriscos marcan bandas de ADN resistente a la escisión; CTRL, hCas9 se administró sin secuencias de ARNsg. La eficacia de la mutagénesis se estimó cuantificando la relación entre las bandas no escindidas y escindidas, y trazando la representación gráfica, media  $\pm$  SD ( $n = 4$ ); \*  $p < 0,001$ . Se indican los orígenes de los vectores: pBBR1, círculos/barras rellenos; pVS1, círculos/barras sin rellenar.

**Fig. 12. Similitud de secuencia entre los vectores binarios de ADN-T pLX y de referencia.** **(A)** Representación del nuevo vector binario pLX compatible con el origen pBBR1. pLX-Z4 (SEQ ID NO: 9) comparte la organización modular de pLX y el casete de clonación mostrado en la Figura 2; incluye secuencias de ADN-T límite procedentes del plásmido pTiBo542 tipo succinamopina, una segunda secuencia de límite izquierdo, terminadores de fagos lambda, un gen de resistencia a gentamicina (*aacC1*), y un replicón mínimo de 2,2 kb procedente del plásmido RK2 para una amplia gama de hospedadores. **(B)** Las gráficas del porcentaje de identidad muestran alineamientos locales de ADN significativos entre los vectores pLX-B2 basado en pBBR1 y pLX-Z4 basado en RK2 (SEQ ID NO: 9), o pLX-R4 (SEQ ID NO: 8). Las secuencias del casete de clonación se omitieron en la comparación; las gráficas se generaron mediante PipMaker (Schwartz S., *et al.*, Genome Res. 2000, 10, 577-586). **(C)** Similitud de secuencia entre los nuevos vectores binarios de ADN-T pLX y de referencia. La matriz muestra las salidas obtenidas mediante análisis de emparejamiento de secuencia de las cadenas principales de los vectores. La similitud de secuencia se clasificó de acuerdo con los valores de puntuación total BLASTN: alto,  $> 4100$ ; parcial,  $800 - 4100$ ; bajo,  $< 800$ . Las entradas de la matriz de los vectores pLX basados en pBBR1 están recuadrados, y las entradas rayadas marcan pares de vectores que muestran baja similitud de secuencia pero comparten antibióticos de selección.

**Fig. 13. Caracterización de la cepa de *A. tumefaciens* de tipo octopina**

**desactivada que muestra sensibilidad a varios antibióticos y su uso en la multiplexación de vectores.**

(A) Sensibilidad a antibióticos de la cepa C58C1-313 de *A. tumefaciens* desactivada. Las bacterias se inocularon en LB suplementado con rifampicina junto con los antibióticos indicados: AMP (ampicilina), CL (cloranfenicol), GENT (gentamicina), TC (tetraciclina), KAN (kanamicina), SP (espectinomicina) y ST (estreptomomicina). Para realizar el seguimiento de las curvas de crecimiento, la absorbancia (DO600) se midió en un lector de placas. Las gráficas muestran media  $\pm$  SD ( $n = 6$ ); h, horas. (B) C58C1-313 contiene un pTi de tipo octopina. Un fragmento del gen pTi *repB* se amplificó mediante PCR a partir de C58C1-313 y se secuenció. Se construyó un árbol filogenético a partir de la alineación de la secuencia *repB* de 607 nt procedente de la cepa C58C1-313 y las secuencias del plásmido Ti depositadas (NCBI: DQ058764.1; AB016260.1; AE007871.2; M24529.1; CP011249.1; AF242881.1). C58C1-313 se agrupa con los números de registro pTi de tipo octopina. (C) Estabilidad del mantenimiento de pTi en la cepa C58C1-313 de *A. tumefaciens*. C58C1-313 se sembró en placas, y se confirmó la presencia de pTi en colonias individuales mediante PCR utilizando cebadores específicos de pTi (*repB*; 724 pb); N, control negativo. (D) Diagrama de una cepa de *A. tumefaciens* (hexágono rayado) que contiene simultáneamente vectores derivados de pLX-B2 y pLX-Z4 que transmiten resistencia a kanamicina y gentamicina, respectivamente. Curvas de crecimiento de *A. tumefaciens* C58C1-313 que no contiene vectores (CTRL, gris), o vectores derivados de pLX-B2 y pLX-Z4 (negro). LB suplementado con kanamicina y gentamicina se inoculó con las cepas indicadas, y la absorbancia se midió en un lector de placas. La gráfica muestra media  $\pm$  SD ( $n = 6$ ); h, horas.

**Fig. 14. Uso de la serie de vectores pLX para la administración de múltiples ADN-T a plantas.**

(A) Diagrama de una cepa de *A. tumefaciens* (hexágono rayado) que contiene simultáneamente vectores derivados de pLX-B2 y pCAMBIA que transmiten resistencia a kanamicina y espectinomicina, respectivamente; se indican los orígenes de los vectores: pBBR1, círculo relleno; pVS1, círculo sin rellenar. Los componentes de pLX-B2-P<sub>CRC</sub>:mTFP1 se describen en la Figura 4; en pSN.5-P<sub>PAP85</sub>:RFP, el gen TagRFP-T (RFP) está activado por el promotor PAP85 de *A. thaliana* (P<sub>PAP85</sub>). Los promotores P<sub>CRC</sub> y P<sub>PAP85</sub> utilizados están activos en las semillas. (B) Plantas de *Arabidopsis* se trataron con la cepa pLX-B2-P<sub>CRC</sub>:mTFP1 más pSN.5-P<sub>PAP85</sub>:RFP de *A.*

*tumefaciens* mediante inmersión floral. Las semillas  $T_1$  recogidas se visualizaron bajo un estereomicroscopio de fluorescencia. Las imágenes muestran semillas que expresan mTFP1 solamente (ADN-T individual) o mTFP1 más RFP (ADN-T doble); para cada condición, se indica el número y porcentaje de semillas obtenidas.

5 **Fig. 15. Diseño experimental para la administración de los componentes del circuito sintético a plantas mediante multiplexado del vector pLX.**

(A) Secuencia del promotor sintético  $P_{EtOH}$  (SEQ ID NO: 35). El terminador de 35S del *virus del mosaico de la coliflor* (CaMV) se incluyó para el aislamiento de promotores que podrían flanquear los sitios de integración del ADN-T; los sitios de unión al ADN de AlcR (triángulos) derivados de los promotores *alcM*, *alcR*, *aldA*, *alcA* de *Aspergillus nidulans* se colocan en dirección 5' con respecto a un promotor mínimo de 34S del *virus del mosaico de la escrofularia* (flecha); recuadro no relleno, codón de partida de la secuencia de codificación. (B) Tabla de verdad de la puerta lógica SI. Símbolo de una puerta lógica SI que utiliza etanol (EtOH) como entrada y la fluorescencia mNeonGreen (NEON) como salida. (C) Circuito genético que implementa la puerta lógica anterior. El hexágono rayado representa una sola cepa de *A. tumefaciens* (R-AlcR +  $P_{EtOH}$ :NEON) que contiene dos vectores binarios de ADN-T-compatibles, pLX-Z4- $P_{mas}$ :RFP-AlcR (SEQ ID NO: 24) y pLX-B2- $P_{EtOH}$ :NEON (SEQ ID NO: 25), que transmiten resistencia a gentamicina y kanamicina, respectivamente. Una vez suministrado a plantas, el promotor constitutivo de la manopina sintasa ( $P_{mas}$ ) activa la expresión de las proteínas RFP y AlcR. En presencia de EtOH (estrella), AlcR se une, y activa, un promotor sintético de otra forma silente ( $P_{EtOH}$ ). La acumulación de NEON es el resultado de la activación de la puerta lógica.

25 **Fig. 16. Control de la expresión génica y administración de los componentes del circuito sintético a plantas mediante el vector pLX.**

Evaluación de una compuerta lógica SI en plantas. (A) Plantas de *Nicotiana benthamiana* se infiltraron con una cepa de *Agrobacterium* que contiene los dos vectores binarios pLX-Z4- $P_{mas}$ :RFP-AlcR (SEQ ID NO: 24) y pLX-B2- $P_{EtOH}$ :NEON (SEQ ID NO: 25) (R-AlcR +  $P_{EtOH}$ :NEON), tratados dos veces con agua o EtOH. A 4 dpa, se obtuvieron imágenes de fluorescencia RFP y NEON mediante barrido láser de las hojas. Barra de escala, 3 cm. (B) Hojas de *Nicotiana benthamiana* se dejaron sin tratar (N), o se infiltraron con la cepa de *A. tumefaciens* R-AlcR +  $P_{EtOH}$ :NEON. Se recogieron discos de las hojas, se introdujeron en placas de 96 pocillos, y se suministraron con o sin EtOH. Se obtuvieron imágenes de fluorescencia RFP y NEON mediante

microscopio confocal a las 24 h de tratamiento (hpt). (C) Los discos de hojas de parches agroinfiltrados se introdujeron en una placa de 96 pocillos y se añadieron diferentes cantidades de inductor. Las intensidades de fluorescencia (FI) se midieron en un lector de placas a 22 hpt, y el valor de IF de NEON/RFP relativo de las condiciones sin inductor (Ninguno) se ajustó a 1. El gráfico de barras muestra la media  $\pm$  SD ( $n = 18$ ). Las letras indican  $p < 0,01$ , ANOVA monolateral y la prueba HSD de Tukey. (D) Cinética de la puerta lógica SI sensible a EtOH. Discos de hojas de parches agroinfiltrados se trataron con agua (gris, menos) o EtOH al 0,1% (negro, más), y la intensidad de fluorescencia se midió en un lector de placas. El valor de la FI NEON/RFP relativo de la condición con agua se ajustó a 1. La gráfica muestra media  $\pm$  SD ( $n = 5$ ).

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un vector binario (vector pLX basado en pBBR1) que comprende al menos tres módulos:

- i. un módulo casete de ADN-T que comprende al menos secuencias de límite derecho e izquierdo de ADN-T,
- ii. un módulo origen de replicación que comprende un origen pBBR1 o una variante funcionalmente equivalente del mismo, y
- iii. al menos un módulo marcador seleccionable.

Los términos “plásmido” y “vector”, tal como se usan en el presente documento, son indistintos, y se refieren a un elemento extracromosómico que puede incluir uno o más genes. Los plásmidos y los vectores suelen ser moléculas de ADN bicatenario circulares. Sin embargo, los plásmidos y los vectores pueden ser ácidos nucleicos lineales o circulares, de un ADN o ARN monocatenario o bicatenario, y se pueden derivar de cualquier fuente, donde varias secuencias de nucleótidos se han unido o recombinado en una única construcción que es capaz de introducir un fragmento de promotor y una secuencia de un polinucleótido codificante junto con una secuencia 3' no traducida adecuada en una célula. En los ejemplos, los plásmidos y los vectores pueden comprender secuencias de replicación autónomas, secuencias que se integran en el genoma, y/o secuencias de fagos o nucleótidos.

La expresión “vector vírico” se refiere a un vector que incluye secuencias del genoma vírico que pueden iniciar infecciones víricas, y son útiles para una administración rápida de alto nivel de secuencias exógenas a células eucariotas.



Las expresiones “plásmido Ti”, “plásmido Ri”, “pTi” y “pRi” tal como se utilizan en el presente documento son indistintas, y se refieren a un plásmido grande contenido en la *Agrobacterium* sp. de tipo natural, que comprende ADN-T (ADN de transferencia) que se introducen en plantas, región de virulencia (región vir), etc. El

5 ADN-T es un fragmento de ADN introducido en el genoma de una célula vegetal, y en *Agrobacterium* sp. de tipo natural comprende los genes para la síntesis de opinas y reguladores del crecimiento vegetal. La región *vir* es una región que codifica proteínas de virulencia, un grupo de proteínas necesario para la integración del ADN-T en plantas, y comprende genes tales como los genes *virA*, *virB*, *virC*, *virD1*, *virD2*, *virD3*,

10 *virG* y *virJ*.

La expresión “plásmido Ti desactivado” se refiere a un plásmido producido eliminando la región de ADN-T de un plásmido Ti de tipo natural y que codifica proteínas de virulencia, o un plásmido funcionalmente equivalente, artificial o natural, tal como y sin limitación, el plásmido p42a de *Rhizobium etli* (Lacroix B. & Citovsky V.,

15 PLoS Pathog. 2016, 12, 3, e1005502). Por lo tanto, un plásmido Ti desactivado carece de la región ADN-T, y es capaz de mediar en la transferencia de ADN a células eucariotas y su posterior modificación genética.

La expresión “secuencia límite”, por ejemplo, límite izquierdo (RB) o límite derecho (LB), se refiere a una secuencia de ácido nucleico repetida directamente que

20 define un extremo de la región ADN-T. Las secuencias límite puede derivar de un plásmido Ti, o pueden ser otras secuencias bacterianas, derivadas de plantas, o sintéticas que funcionan análogamente. En una realización preferida del vector pLX basado en pBBR1 de la invención, las LB y RB se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en un límite de ADN-T de un plásmido Ti de tipo nopalina,

25 octopina, succinamopina, o cualquier combinación de los mismos. En una realización preferida, los límites de ADN-T se seleccionan entre plásmidos Ti de tipo octopina o succinamopina procedentes de *A. tumefaciens*, e incluyen un segundo borde izquierdo de tipo nopalina.

Las expresiones “vector binario” y “vector binario de ADN-T”, tal como se usan

30 en el presente documento, son indistintas. Se refieren a un plásmido que tiene un origen de replicación (*ori*) que permite el mantenimiento del vector en una amplia gama de bacterias incluyendo *E. coli* y *Agrobacterium* sp., y que comprende un casete de ADN-T; marcadores de selección y mantenimiento en bacterias; y, en algunas realizaciones, el vector binario puede incluir un marcador seleccionable para la

selección en organismos eucariotas, preferentemente para su selección en plantas.

Las expresiones “casete de ADN-T” y “casete de clonación de ADN-T”, tal como se usan en el presente documento, son indistintas, se refieren a una región ADN-T que comprende al menos las secuencias RB y LB, y características que permiten la inserción de la secuencia de interés entre las secuencias RB y LB de una forma que la secuencia de interés se puede transferir a células eucariotas.

En una realización más preferida, el vector binario pLX basado en pBBR1 de la presente invención se caracteriza por que el casete de ADN-T comprende una secuencia de límite derecho y dos secuencias de límite izquierdo de ADN-T. En una realización más preferida, el límite derecho comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 102 o la SEQ ID NO: 115. En una realización más preferida, el límite izquierdo comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, idéntica a la SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 o la SEQ ID NO: 116. En una realización más preferida, el límite derecho comprende la SEQ ID NO: 102 y los bordes izquierdos comprende la SEQ ID NO: 103 y la SEQ ID NO: 104. En una realización más preferida, el límite derecho consiste en SEQ ID NO: 102 y los bordes izquierdos consisten en la SEQ ID NO: 103 y la SEQ ID NO: 104.

En una realización preferida adicional, el vector binario pLX basado en pBBR1 se caracteriza por que la región ADN-T también comprende al menos dos terminadores de la transcripción. Los terminadores de la transcripción útiles en la presente invención son conocidos en la técnica (es decir, en Chen Y.J., *et al.*, Nat Methods. 2013, 10, 7, 659-664). En una realización más preferida, los terminadores de la transcripción comprenden una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a cualquiera de las secuencias seleccionadas de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, o cualesquiera combinaciones de las mismas, más preferentemente, SEQ ID NO: 108 y 109. En una realización más preferida, los terminadores de la transcripción se seleccionan entre las secuencias que comprenden la SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111 o cualesquiera combinaciones de las mismas, más preferentemente, SEQ ID NO: 108 y 109. En una realización más preferida, los terminadores de la transcripción consisten en cualesquiera de las secuencias seleccionadas entre la SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, o cualesquiera combinaciones de las mismas, más preferentemente, SEQ ID NO: 108 y 109.

“Homología” o “identidad” o “similitud” se refiere a una similitud de secuencia entre dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos. La homología puede determinarse mediante la comparación de una posición de cada secuencia, que puede alinearse con fines de comparación. Cuando una posición equivalente de la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces, las moléculas son idénticas en dicha posición. Un grado de homología o similitud o identidad entre secuencias de ácidos nucleicos es una función del número de nucleótidos idénticos o coincidentes en las posiciones compartidas por las secuencias de ácidos nucleicos. Un grado de identidad de secuencias de aminoácidos es una función del número de aminoácidos idénticos en posiciones compartidas por las secuencias de aminoácidos. Un grado de homología o similitud de secuencias de aminoácidos es una función del número de aminoácidos, es decir, estructuralmente relacionados, en posiciones compartidas por las secuencias de aminoácidos. El grado de homología, identidad, y/o similitud se puede determinar mediante el uso de algoritmos, programas y métodos, tales como, y sin limitaciones, Clustal, Wilbur-Lipman, GAG, GAP, BLAST, BLASTN, BLASTP, EMBOSS Needle, FASTA, Smith Waterman o BLOSUM.

En una realización más preferida, el vector pLX basado en pBBR1 de la invención se caracteriza por que los límites de ADN-T flanquean una secuencia de interés. La una o más secuencias de ácidos nucleicos de interés están operativamente unidas con secuencias necesarias para la transferencia del ADN a la célula eucariota diana.

La expresión "operativamente unida" u "operativamente asociada" se refiere a una unión funcional entre la secuencia reguladora y una secuencia de codificación o una unión funcional entre dos secuencias reguladoras. El término “construcción” se refiere a unidades o componentes así descritos que se ensamblan y se unen operativamente en una relación tal que les permita funcionar de la forma prevista. Colocar una secuencia codificante bajo control regulador de un promotor u otra secuencia reguladora significa poner la secuencia codificante de forma que la expresión de la secuencia codificante esté controlada por la secuencia reguladora. La expresión “unidad transcripcional” se refiere a una construcción que incluye secuencias de promotor, de codificación, y del terminador que están operativamente unidas para permitir la expresión o la administración de la secuencia de interés de la forma prevista.

La secuencia de interés, aunque frecuentemente una secuencia génica, puede

ser realmente cualquier secuencia de ácido nucleico tanto si produce una proteína como si no lo hace, un ARN, una molécula de sentido contrario o secuencia reguladora o similar.

5 Un "transgén" se refiere a una secuencia de interés que, independientemente de que esta secuencia se haya introducido de forma exógena o se haya manipulado; en ambos casos, no se ha demostrado que la secuencia definida como "transgén" sea natural. La expresión "gen endógeno", "secuencia endógena", "gen natural" o "secuencia natural" se refiere a un gen nativo en su localización natural en el genoma de un organismo.

10 Las secuencias de interés o transgenes pueden incluir elementos funcionales que afectan a los procesos de desarrollo, fertilidad, resistencia a estrés abióticos y bióticos, o permiten nuevos fenotipos, y similares. Otros transgenes que son útiles incluyen secuencias para fabricar vacunas comestibles (por ejemplo, patentes de Estados Unidos números: patente de Estados Unidos n.º 6.136.320; patente de  
15 Estados Unidos n.º 6.395.964) para seres humanos o animales, alteran el contenido de ácidos grasos, cambian la composición de aminoácidos de los cultivos agrícolas (por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 6.664.445), introducen enzimas en rutas para sintetizar metabolitos tales como vitamina A y vitamina E, aumentan la concentración de hierro, controlan la maduración del fruto, reducen las propiedades  
20 alergénicas de, por ejemplo, el trigo y los frutos secos, absorben y almacenan sustancias tóxicas y peligrosas para ayudar en la limpieza de suelos contaminados, alteran el contenido en fibra de las maderas, mejorar la resistencia a enfermedades, bacterias, hongos, nematodos, herbicidas, virus e insectos, aumentan la tolerancia a las sales y la resistencia a la sequía, entre otros.

25 En un vector típico, la secuencia de interés está operativamente unida a un promotor. Un "promotor" es una secuencia de nucleótidos a partir de la cual se puede iniciar la transcripción de un ADN operablemente unido posteriormente. El producto de la secuencia de interés se puede expresar constitutivamente, tras la inducción, en tejidos selectivos o en determinadas etapas del desarrollo. Los elementos reguladores  
30 para efectuar dicha expresión son bien conocidos en la técnica. Muchos ejemplos de elementos reguladores se pueden encontrar en el documento Patent Lens "Promoters used to regulate gene expression" versión 1.0, octubre de 2003 (incorporado en su totalidad). Se pueden identificar otros promotores mediante una variedad de ensayos. Los elementos potenciadores u otros elementos reguladores se pueden incluir junto

con el promotor. Las secuencias de “promotor mínimo”, tales como las denominadas promotor 35S mínimo del *virus del mosaico de la coliflor* (CaMV), o el promotor 34S mínimo del *virus del mosaico de la escrofularia*, suelen necesitar un elemento potenciador para la actividad.

5 En una realización más preferida, el vector basado en pBBR1 de la invención se caracteriza por que el casete de ADN-T también comprende un casete de clonación, más preferentemente, el casete de clonación de ADN-T comprende endonucleasa de restricción y sitios de hibridación del cebador, en una realización más preferida, estos sitios son compatibles con los métodos de ensamblaje de alto  
10 rendimiento del ADN basado en la endonucleasa de restricción de Tipo IIS y/o en el solapamiento, tales como y sin limitaciones, Golden Gate, GoldenBraid, Clonación modular (MoClo), ensamblaje de Gibson de una o dos etapas (Gibson D.G., *et al.*, Nat. Methods 2009, 6, 343–345), clonación independiente de la secuencia y ligadura (SLIC), clonación y ensamblaje inconsútil GeneArt (Thermo Fisher Scientific),  
15 ensamblaje de ADN NEBuilder HiFi (New England BioLabs), clonación con fusión fría (System Biosciences), clonación en fusión (Clontech).

En otra realización preferida, un casete de clonación de ADN-T también comprende un marcador de cribado seleccionable o elementos indicadores para identificar la inserción de la secuencia de interés. El marcador o elemento indicador es  
20 un gen o un operón que transmite un fenotipo visual o selección negativa, tales como, y sin limitaciones, *lacZ $\alpha$* , *ccdB*, *sacB*, una luciferasa, genes de proteínas fluorescentes, o un operón de biosíntesis de cantaxantina. Adicionalmente, el marcador seleccionable o elemento indicador incluido en el casete de ADN-T se puede seleccionar entre la lista que se indica más adelante para el módulo del marcador seleccionable del vector  
25 binario de la presente invención.

En una realización preferida adicional, el módulo origen de replicación del vector pLX basado en pBBR1 de la invención comprende un origen pBBR1 que comprende regiones pBBR1-*oriV* y pBBR1-*rep*, o una variante funcionalmente equivalente de las mismas. En una realización preferida adicional, el origen pBBR1  
30 comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 105, más preferentemente, el origen pBBR1 comprende la SEQ ID NO: 105, y más preferentemente, el origen pBBR1 consiste en la SEQ ID NO: 105.

Como se usa en el presente documento, la expresión “variante funcionalmente

equivalente" se refiere a cualquier variante donde la secuencia de nucleótidos codifica una secuencia de aminoácidos que comprende alteraciones conservativas o no conservativas que dan como resultado cambios silenciosos que conservan la funcionalidad de la molécula, entre los que se incluyen, por ejemplo, deleciones, 5 adiciones y sustituciones. Dichas moléculas alteradas pueden ser, deseablemente, las que proporcionan determinadas ventajas durante su uso. Como se usa en el presente documento, las sustituciones conservativas implican la sustitución de uno o más aminoácidos dentro de la secuencia del péptido correspondiente por otro aminoácido que tenga una polaridad y características de hidrofobicidad/hidrofilicidad similares, 10 dando como resultado una molécula funcionalmente equivalente. Dichas sustituciones conservativas incluyen, pero no se limitan a las sustituciones comprendidas entre los siguientes grupos de aminoácidos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; fenilalanina, tirosina; y metionina, norleucina. El experto en la materia entenderá que 15 las mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un péptido, que da lugar a sustituciones de aminoácidos conservativas en posiciones que no son esenciales para la funcionalidad del péptido, son mutaciones evolutivamente neutras que no afectan a su estructura global o a su funcionalidad.

La expresión "origen de replicación" (ori) se refiere a una secuencia de 20 actuación en cis esencial para la replicación. Se han descrito secuencias de orígenes que permiten la replicación del plásmido, o su mantenimiento en una amplia gama hospedadores (patentes de Estados Unidos números 4.940.838; 5.149.645; 6.165.780; 6.265.638, incorporadas en su totalidad). En una realización preferida, el origen de replicación es un origen para una amplia gama de hospedadores o un origen para una 25 gama de hospedadores grande, utilizado de forma indistinta en la presente invención. Como se usa en el presente documento, "amplia gama de hospedadores" o "gama de hospedadores grande" significa que el vector se replica en al menos dos especies bacterianas, preferentemente en *Agrobacterium* sp. y *E. coli*. La gama de hospedadores se transmite mediante un origen de replicación. Cuando la molécula de 30 ácido nucleico se integra en el cromosoma bacteriano u otra molécula de ADN bacteriano autorreplicante, no es necesario un origen. Por lo tanto, cuando se modifican y diseñan mediante ingeniería genética de forma adecuada, estas bacterias pueden utilizarse para transferir secuencias de ácidos nucleicos, a células eucariotas, y especialmente a células vegetales.

En otra realización preferida, el vector pLX basado en pBBR1 también comprende un módulo marcador seleccionable o de cribado para identificar los transformantes de la célula hospedadora, preferentemente transformantes bacterianos. Los marcadores seleccionables bien conocidos son genes que transmiten

5 resistencia a fármacos, tales como los antibióticos seleccionados de la lista que consiste en: neomicina, ampicilina, carbenicilina, cloranfenicol, kanamicina, tetraciclina, gentamicina, espectinomicina, bleomicina, fleomicina, estreptomycin, eritromicina, blasticidina e higromicina; genes de resistencia a herbicidas, y similares. Otros sistemas de selección, incluidos los genes que codifican la resistencia a otros

10 compuestos tóxicos, tales como los genes de resistencia a telurita de potasio, genes que codifican productos necesarios para el crecimiento de las células, tales como en selección positiva, se pueden utilizar como alternativa. Los ejemplos de estos sistemas de "selección positiva" son abundantes (véase por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 5.994.629). Por lo demás, también se pueden usar sistemas de "selección

15 negativa". Como alternativa, se puede emplear un marcador seleccionable o gen indicador para permitir la selección de las células transformadas basándose en un fenotipo visual, por ejemplo, una  $\beta$ -glucuronidasa, una luciferasa, o una gen de proteínas fluorescentes. El marcador seleccionable también tiene, de forma típica, elementos reguladores operablemente unidos para la transcripción de los genes, por

20 ejemplo, un promotor constitutivo o inducible y una secuencia de terminación. Se incluyen opcionalmente elementos que potencian la eficacia de la transcripción. En una realización preferida, el módulo marcador seleccionable comprende un gen que transmite resistencia a un fármaco seleccionado del grupo que consiste en genes de la resistencia a neomicina, ampicilina, carbenicilina, cloranfenicol, kanamicina,

25 tetraciclina, gentamicina, espectinomicina, bleomicina, fleomicina, estreptomycin, eritromicina, blasticidina e higromicina.

En una realización más preferida, el vector pLX basado en pBBR1 se selecciona entre la lista que consiste en: SEQ ID NO: 3 (pLX-B2), SEQ ID NO: 4 (pLX-B3), SEQ ID NO: 5 (pLX-B4), SEQ ID NO: 10 (pLX-B2 $\alpha$ 2), SEQ ID NO: 11 (pLX-B3 $\Omega$ 1), SEQ ID NO: 12 (pLX-B3 $\Omega$ 2), SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 y la SEQ ID NO: 28.

30

Además, un vector pLX basado en pBBR1 de la presente invención se puede usar bien como un único vector binario, que tiene replicación autónoma, o en un

sistemas de vectores binarios, que incluye una combinación de vectores binarios que tienen mecanismos de replicación y selección bacteriana que permiten una coexistencia mutua y autónoma entre sí.

Como se usa en el presente documento, la expresión “sistemas de vectores binarios” se refiere a vectores binarios que pueden replicarse en ambas *E. coli* y *A. tumefaciens*, y contienen casetes de ADN-T no vinculados. En un sistemas de vectores binarios, los vectores se multiplexan y se utilizan para administrar múltiples casetes de ADN-T a las células u organismos eucariotas, preferentemente a plantas.

En una realización más preferida, los vectores binarios y los vectores del sistema de vectores binarios de la presente invención tienen un tamaño mínimo de 2 a 20 kb, preferentemente de 2,5 a 3,8 kb, más preferentemente tienen un tamaño inferior a 3,8 kb.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un sistemas de vectores binarios que comprende el plásmido pLX basado en pBBR1 de acuerdo con la presente divulgación y otro vector binario (segundo vector binario) descrito en el estado de la técnica, y compatible con un primer vector binario de la presente invención. En una realización más preferida del sistema de vectores binarios de la invención, el segundo vector binario es un plásmido pLX basado en RK2 que se describe en el presente documento.

Otro aspecto de la presente invención, el plásmido pLX basado en RK2 de acuerdo con la presente divulgación se refiere a un vector binario que comprende al menos tres módulos:

- i. un módulo casete de ADN-T que comprende al menos un límite derecho e izquierdo de ADN-T,
- ii. un módulo origen de replicación que comprende un origen compatible con el origen pBBR1, seleccionado preferentemente entre la lista que consiste en orígenes del grupo de incompatibilidad con el plásmido IncQ, IncW, IncU, pRi, pVS1 e IncP- $\alpha$ , donde, más preferentemente, es un origen del grupo de incompatibilidad con el plásmido IncP- $\alpha$ , y donde, más preferentemente, el origen de replicación es el origen RK2, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, y
- iii. al menos un módulo marcador seleccionable.

En una realización preferida, el vector pLX basado en RK2 de la invención comprende un casete de ADN-T que comprende un límite derecho y dos límites



izquierdos de ADN-T, comprendiendo preferentemente las secuencias de límites de ADN-T anteriormente mencionados. En una realización más preferida, el límite derecho comprende la SEQ ID NO: 115 y los bordes izquierdos comprende la SEQ ID NO: 116 y la SEQ ID NO: 104. En una realización más preferida, el límite derecho  
 5 consiste en SEQ ID NO: 115, y los bordes izquierdos consisten en la SEQ ID NO: 104 y la SEQ ID NO: 116.

En una realización preferida adicional, el vector pLX basado en RK2 se caracteriza por que el casete de ADN-T está flanqueado por al menos dos terminadores de la transcripción, preferentemente, los terminadores de la transcripción  
 10 que se han divulgado anteriormente. En una realización más preferida, los terminadores de la transcripción comprenden la SEQ ID NO: 110 y 111, más preferentemente, los terminadores de la transcripción consisten en la SEQ ID NO: 110 y 111.

En una realización más preferida, el vector pLX basado en RK2 de la invención  
 15 se caracteriza por que los límites de ADN-T flanquean una secuencia de interés. La una o más secuencias de ácidos nucleicos de interés están operativamente unidas con secuencias necesarias para la transferencia del ADN a la célula eucariota diana. En una realización más preferida, las secuencias de interés se han mencionado anteriormente.

En una realización más preferida, el vector basado en RK2 de la invención se caracteriza por que el casete de ADN-T también comprende un casete de clonación, más preferentemente, el casete de clonación de ADN-T comprende el marcador seleccionable de cribado o los elementos indicadores anteriormente mencionados. En una realización preferida adicional, el casete de ADN-T comprende la endonucleasa  
 20 de restricción y sitios de hibridación del cebador, en una realización más preferida, estos sitios son compatibles con los métodos de ensamblaje de alto rendimiento basados en la endonucleasa de restricción de Tipo IIS y en el solapamiento, como se ha mencionado anteriormente.

En una realización preferida adicional, el origen de replicación del vector pLX  
 30 basado en RK2 de la invención comprende el origen de replicación RK2 que comprende las regiones *RK2-oriV* y *RK2-trfA*, o una variante funcionalmente equivalente de las mismas. En una realización más preferida, el origen RK2 comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 106 o la SEQ ID NO: 107, más

preferentemente, el origen RK2 comprende la SEQ ID NO: 106 o la SEQ ID NO: 107, y más preferentemente, el origen RK2 consiste en la SEQ ID NO: 106 o la SEQ ID NO: 107.

5 En otra realización preferida, el módulo marcador seleccionable del vector binario pLX basado en RK2 comprende un gen marcador seleccionable o de cribado anteriormente mencionado.

10 En una realización más preferida, el gen marcador seleccionable del vector binario pLX basado en RK2 difiere del gen marcador seleccionable del vector pLX basado en pBBR1, de forma que se facilita la selección simultánea de ambos plásmidos.

En una realización más preferida, el vector pLX basado en RK2 se selecciona entre la lista que consiste en: SEQ ID NO: 6 (pLX-R2), SEQ ID NO: 7 (pLX-R3), SEQ ID NO: 8 (pLX-R4), SEQ ID NO: 9 (pLX-Z4), SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 24.

15 En otra realización preferida, la cadena principal del vector pLX basado en RK2 no tiene regiones con identidad > 28 nucleótidos respecto al vector pLX basado en pBBR1 de la presente invención.

20 Por consiguiente, el sistema de vectores binarios de la presente invención comprende el plásmido pLX basado en pBBR1 y preferentemente, el plásmido pLX basado en RK2 de acuerdo con la presente divulgación.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos para ensamblar secuencias sintéticas, genómicas, epigenómicas, y/o de ADNc de interés en vectores binarios o el sistema de vectores divulgado en la presente invención.

25 En otro aspecto de la presente invención, se relaciona con una célula hospedadora que comprende el pLX basado en pBBR1, pLX basado en RK2, o el sistema de vectores binarios de la presente invención.

30 De acuerdo con la presente invención, el término "célula hospedadora" se refiere a una célula que se ha transformado, o que se puede transformar, mediante una secuencia de ADN exógeno, preferentemente mediante los vectores binarios o el sistema de vectores binarios de la presente invención. Se puede utilizar una célula hospedadora, por ejemplo, para la expresión de un ácido nucleico de interés, la propagación de vectores plásmidos y/o la administración de una secuencia de interés a células eucariotas.

En una realización preferida, la célula hospedadora de la presente invención es

una célula bacteriana, preferentemente seleccionada de *Agrobacterium* sp. y *E. coli*. En una realización más preferida, la célula hospedadora es preferentemente una especie de la familia *Rhizobiaceae*, más preferentemente una bacteria de *Agrobacterium* sp., especialmente preferentemente una cepa de *Agrobacterium* que  
5 comprende un plásmido Ti desactivado.

Como alternativa, las secuencias genómicas de *Agrobacterium* sp. y otras especies bacteriano se pueden comparar; los genes perdidos en la última bacteria que son importantes para administración de ADN-T y la transformación en células eucariotas se pueden repicar individualmente del genoma de *Agrobacterium* e  
10 introducirse en el genoma bacteriano deseado por cualquier medio o expresarse en un plásmido. De manera similar, la bacteria también se puede utilizar para transformar un organismo o célula eucariota en una variedad de condiciones de ensayo, tales como temperatura, pH, aditivos nutrientes, y similares. Las mejores condiciones se pueden determinar rápidamente y después analizarse durante la transformación de las células  
15 vegetales u otras células eucariotas, como se ha mencionado anteriormente. Además, las especies de bacterias hospedadoras pueden interactuar naturalmente de formas específicas con numerosos organismos eucariotas tales como plantas. Estas interacciones bacteria-planta son muy diferentes de la forma en que *Agrobacterium* interactúa naturalmente con las plantas. Por lo tanto, los tejidos y células que se  
20 pueden transformar mediante *Agrobacterium* sp. pueden ser diferentes en el caso de utilizar otras bacterias.

En general, los plásmidos se transfieren a través de un método de transferencia directa a la bacteria (célula hospedadora) de la presente invención. Mediante la transferencia de vectores tanto individuales como múltiples, como se  
25 describe en el presente documento, se generan bacterias competentes para transformación. Estas bacterias se pueden usar para transformar un organismo eucariota o una célula eucariota, tal como una levadura, un hongo, una planta, un insecto y un animal.

El término “célula eucariota” se refiere tanto a células individuales como a  
30 agregados de células, tales como tejidos u órganos, partes de tejidos u órganos, y organismos completos, que comprende una levadura, un hongo, un alga, una planta, un insecto y un animal.

En una realización más preferida, el término “célula vegetal” se refiere a células individuales o agregados de células, tejidos vegetales organizados, órganos, o plantas

completas, tal como y sin limitación, protoplastos, callos, cultivos celulares, meristemos y tejidos meristemáticos, hojas, brotes, raíces, flores, óvulos, polen y tubos polínicos, semillas, embriones, hipocótilos, cotiledones, plántulas y plantas maduras.

Las células eucariotas se pueden transformar dentro del contexto de la presente invención. En general, las células eucariotas a transformar se cultivan antes de la transformación, o las células se pueden transformar *in situ*. En algunas realizaciones, las células se cultivan en presencia de aditivos para volverlas más susceptibles a la transformación. Los transformantes se pueden detectar fácilmente por su fenotipo alterado, por ejemplo, crecimiento en un medio que incluye fármacos/herbicidas/compuestos tóxicos, o que carecen de un componente esencial para el crecimiento, donde no pueden crecer las células no transformadas. En otras realizaciones, las células se transforman antes del cultivo.

En resumen, en un protocolo de transformación ilustrativo, para generar plantas transformadas, las células vegetales se transforman mediante su cultivo simultáneo con un cultivo de bacterias que contiene los vectores binarios o el sistema de vectores binarios descritos en el presente documento. Tras el cultivo simultáneo durante varios días, las bacterias se eliminan, por ejemplo, mediante lavado y tratamiento con antibióticos, y las células vegetales se transfieren a placas de medio de postcultivo que contienen, de manera general, un antibiótico para inhibir o destruir el crecimiento bacteriano y, opcionalmente, un agente de selección, tal como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.994.629. Las células vegetales se incuban adicionalmente durante varios días. En ese momento se puede analizar la expresión del transgén. Después de una incubación adicional de varias semanas en un medio de selección, las células vegetales se transfieren a un medio de regeneración y se ponen a la luz. Los brotes obtenidos se transfieren a un medio de enraizamiento, y las plantas resultantes se propagan adicionalmente.

Los métodos alternativos para transformar células vegetales incluyen la inmersión de flores completas en una suspensión de bacterias, hacer crecer las plantas adicionalmente para formar semillas, cosechar las semillas y hacerlas germinar en presencia de un agente de selección que permite el crecimiento solamente de las plántulas transformadas. Como alternativa, las semillas germinadas se pueden tratar con un agente de selección que solamente toleran las plantas transformadas. Como alternativa, las semillas se pueden seleccionar visualmente mediante la detección de proteínas fluorescentes que solamente acumulan las

semillas transformadas.

La transformación de células mediante *Agrobacterium* se produce independientemente de la integración estable del transgén en los genomas hospedadores, y el uso de sistemas de expresión transitoria o unidades de replicación autónoma de ARN/ADN (vectores víricos), puede evitar la necesidad de integración del gen, si se desea. En este sentido, los términos "infiltración" y "agroinfiltración" se refieren a un método de transformación transitoria que se basa en la introducción mecánica de cultivos de células hospedadoras que comprenden al menos un vector binario, en organismos eucariotas o sus órganos, preferentemente plantas enteras, plántulas u hojas. El escalado se consigue mediante, por ejemplo, el uso de infiltración a vacío. El término "agroinoculación" se refiere a la administración de vectores víricos mediante transformación transitoria mediada por *Agrobacterium*.

Las plantas que son especialmente deseables para transformar incluyen maíz, arroz, trigo, soja, alfalfa y otras leguminosas, patata, tomate, tabaco, *Nicotiana benthamiana*, y así sucesivamente.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un cultivo celular que comprende las células hospedadoras de la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para administrar al menos una secuencia de nucleótidos de interés a al menos una célula vegetal, que comprende:

- (a) insertar la secuencia de nucleótidos de interés en el casete de ADN-T del vector pLX basado en pBBR1, el vector pLX basado en RK2, o el sistema de vectores binarios de la presente invención,
- (b) introducir el vector pLX basado en pBBR1, el vector pLX basado en RK2, o el sistema de vectores binarios de la etapa (a) en al menos una célula hospedadora bacteriana de acuerdo con la presente invención, y
- (c) poner en contacto la célula hospedadora de la etapa (b) con una célula vegetal.

En una realización preferida, el método para administrar al menos una secuencia de nucleótidos de interés a al menos una célula vegetal se caracteriza por que la célula hospedadora bacteriana es una célula de *Agrobacterium* sp., más preferentemente, la célula de *Agrobacterium* comprende un plásmido Ti desactivado.

Además de las numerosas tecnologías para transformar plantas o células vegetales, el tipo de célula, tejido, órgano que se pone en contacto con las

construcciones extrañas también pueden variar. Prácticamente todos los tejidos vegetales se pueden transformar durante la desdiferenciación usando técnicas adecuadas comprendidas en la materia. Un experto en el campo de la transformación de plantas entenderá que están disponibles múltiples metodologías para la producción

5 de plantas transformadas, y que estas se pueden modificar y especializar para adaptarse a las diferencias biológicas entre diferentes especies de plantas. Independientemente de la técnica de transformación concreta utilizada, el nucleótido de interés se puede incorporar a los vectores binarios o el sistema de vectores binarios de la presente invención adaptado para expresar la secuencia de nucleótidos de

10 interés en una célula vegetal incluyendo en el vector un promotor vegetal. Además de los promotores vegetales, se pueden usar promotores de diferentes fuentes eficazmente en células vegetales para expresar genes extraños. Por ejemplo, promotores de origen bacteriano, tal como el promotor de octopina sintasa, el promotor de nopalina sintasa, el promotor de manopina sintasa; promotores de origen vírico,

15 tales como los promotores de 35S y 19S del CaMV, un promotor del virus baciliforme de la caña de azúcar, y similares, se pueden utilizar. Los promotores derivados de plantas incluyen, pero no se limitan a, promotor de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (RuBisCO), promotor de la beta-conglicinina, promotor de la cruciferina, promotor de la faseolina, promotor de la alcohol

20 deshidrogenasa, promotores de choque térmico, promotor del factor de despolimerización de la actina, y promotores específicos de tejidos. Los promotores pueden contener también determinados elementos potenciadores de secuencias que pueden mejorar la eficacia de la transcripción. Los potenciadores típicos incluyen, pero no se limitan a, alcohol deshidrogenasa1 (ADH1-intrón 1 y ADH1-intrón 6). Se pueden

25 usar promotores constitutivos. Los promotores constitutivos dirigen la expresión génica continua en casi todos los tipos de células y en casi todo momento (por ejemplo, promotor de la actina, promotor de la ubiquitina, promotor 35S de la CaMV). Los promotores específicos de tejidos son responsables de la expresión génica en células específicas, tejidos o tipos de órganos. Los ejemplos de otros promotores que se

30 pueden usar incluyen donde son activos durante una etapa determinada del desarrollo de la planta, así como activos en tejidos y órganos vegetales específicos. Los ejemplos de dichos promotores incluyen, pero no se limitan a, promotores que son específicos de la raíz, polen, embriones, seda de maíz, fibra de algodón, endospermo de la semilla, y floema. En una realización adicional, el promotor es un promotor inducible.

Un promotor inducible se "activa" o aumenta la expresión de los genes en respuesta a una señal específica, tal como un estímulo físico (por ejemplo, la temperatura, genes promotores de choque térmico; luz, promotor RuBisCO); hormonas (por ejemplo, glucocorticoides); antibióticos (por ejemplo, tetraciclina); metabolitos o compuestos  
5 químicos (por ejemplo, etanol); y estrés (por ejemplo, sequía). También se pueden usar otros elementos deseables para la transcripción y traducción que funcionan en plantas, tales como, por ejemplo, secuencias líder en 5' no traducidas, secuencias de terminación de la transcripción del ARN y secuencias señal de la adición de poli-  
10 adenilato. Se puede usar cualquier elemento adicional conocido en la materia y funcional en plantas.

El método de transformación biológica descrito aquí se puede utilizar para introducir una o más secuencias de interés (transgén) en células eucariotas, donde la célula eucariota se selecciona del grupo que consiste en una célula de levadura, una célula fúngica, una célula vegetal, una célula de insecto, y una célula animal,  
15 preferentemente, la célula eucariota es una célula vegetal.

*Agrobacterium* es un método extremadamente ventajoso para la transformación de eucariotas, como alternativa, los vectores binarios o el sistema de vectores divulgado en la presente invención se pueden introducir en células eucariotas usando cualesquiera métodos físicos, tal como un bombardeo o partículas o microproyectiles,  
20 electroporación, u otras formas de captación directa de ADN tales como la captación de ADN mediada por liposomas, o el método de vortización. En una realización preferida, los métodos físicos para la transformación de células vegetales se han revisado en Oard J.H., Biotech. Adv. 1991, 9, 1-11.

La presente invención se refiere además a un sistema vegetal transformado, a células regeneradas o a una planta regenerarse a partir de la misma, a su progenie o  
25 semillas de las mismas generados de acuerdo con los métodos descritos anteriormente en el presente documento.

En una realización concreta de la presente invención, este sistema vegetal transformado se caracteriza por modificaciones individuales o múltiples del genoma de la célula vegetal, epigenoma, transcriptoma o metaboloma, y por que puede  
30 comprender o no comprender cualesquiera segmentos de secuencia del vector anteriormente mencionado, sistema de vector, y sus casetes de ADN-T. En este sentido, un componente de los sistemas de repeticiones palindrómicas cortas separadas regularmente entre sí y agrupadas (CRISPR)/proteína asociada a CRISPR

(Cas) procedentes de bacterias y archaea se pueden usar para dirigirse a secuencias específicas en genomas eucariotas, y en genomas vegetales (Murovec J., *et al.*, Plant Biotechnol. J. 2017, doi:10.1111/pbi.12736). Este documento presenta un método para modificar el material genómico en células eucariotas, preferentemente en una célula vegetal, basándose en el uso de vectores binarios de la invención junto con componentes de los sistemas CRISPR/Cas que proporcionan una herramienta eficaz y relativamente sencilla para generar modificaciones en el ADN genómico de sitios seleccionados, sin necesidad de integración o mantenimiento de transgenes en genomas de células eucariotas. Los sistemas CRISPR/Cas y sus derivados se pueden usar para, sin limitación, mutagénesis dirigida, direccionamiento génico, sustitución génica, delección dirigida, inversión dirigida, translocación dirigida, y/o inserción dirigida en uno o varios sitios del genoma. Las aplicaciones de los sistemas CRISPR/Cas también incluyen la regulación epigenética y transcripcional, la obtención de imágenes celulares y el direccionamiento de patógenos. Esta tecnología puede utilizarse para acelerar la velocidad de los estudios genéticos funcionales en eucariotas, preferentemente en plantas, y para diseñar plantas mediante ingeniería genética con características mejoradas, incluida una calidad nutricional mejorada, mayor resistencia a enfermedades y estrés, y aumento en la producción de compuestos comercialmente valiosos.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para administración *in vitro* de al menos una secuencia de nucleótidos de interés a al menos un célula u organismo eucariota, que comprende:

- (a) insertar al menos una secuencia de nucleótidos de interés en los vectores binarios o en el sistema de vectores binarios de la invención,
- (b) introducir los vectores binarios o el sistema de vectores binarios, de la etapa (a) en al menos una célula u organismo eucariota.

En una realización preferida del método para administración *in vitro* de al menos una secuencia de nucleótidos de interés en al menos una célula u organismo eucariota, el organismo eucariota se selecciona del grupo que consiste en levaduras, hongos, insectos y animales.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para transformar células eucariotas que comprende la etapa de introducir en la célula eucariota el vector pLX basado en pBBR1, el vector pLX basado en RK2, el sistema de vectores binarios, o la célula hospedadora divulgados en la presente invención.



Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para obtener una planta o célula vegetal diseñada mediante ingeniería genética que comprende la etapa de introducir los vectores binarios, preferentemente el vector pLX basado en pBBR1, vector pLX basado en RK2, el sistema vector, o la célula hospedadora bacteriana de la invención, en una célula vegetal.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una planta o célula vegetal diseñada mediante ingeniería genética que se puede obtener por el método anteriormente divulgado.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para obtener *in vitro* una célula u organismo eucariota diseñado mediante ingeniería genética, que comprende la etapa de introducir los vectores binarios, preferentemente los vectores binarios basados en pBBR1 o en RK2 o el sistema de vectores binarios en una célula u organismo eucariota. En una realización preferida, la célula u organismo eucariota se selecciona del grupo que consiste en una levadura, un hongo, un insecto y un animal.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula u organismo eucariota diseñado mediante ingeniería genética que se puede obtener por el método anteriormente divulgado.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso *in vitro* o *ex vivo* de los vectores binarios, preferentemente, el vector binario pLX basado en pBBR1, el vector binario pLX basado en RK2, el sistema de vectores binarios, la célula bacteriana hospedadora, las células cultivadas, la planta o célula vegetal diseñada mediante ingeniería genética que se puede obtener por el método anteriormente divulgado, o la célula u organismo eucariota diseñado mediante ingeniería genética que se puede obtener por el método anteriormente divulgado:

- a) para inactivación génica específica del sitio;
- b) para edición del genoma específica del sitio;
- c) para interferencia específica de la secuencia de ADN;
- d) para edición del epigenoma específica del sitio;
- e) para modulación transcripcional específica del sitio; o
- f) para diseño mediante ingeniería del genoma multiplexado;

con la condición de que el uso no comprende un proceso para modificar la identidad genética de la línea germinar de seres humanos.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un kit que comprende uno o más de los componentes descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el kit

comprende el vector binario, el sistema de vectores binarios, la célula hospedadora o el cultivo celular divulgados en el presente documento, e instrucciones para utilizar el kit. Los componentes o elementos se pueden proporcionar individualmente o en combinaciones, y se pueden proporcionar en cualquier recipiente adecuado, tal como un vial, un frasco, o un tubo. Por "kit" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un producto que contiene los diferentes reactivos necesarios para llevar a cabo los métodos de la invención envasados de forma que permiten el transporte y el almacenamiento. Los materiales adecuados para envasar componentes del kit incluyen vidrio, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), frascos, viales, papel, sobres y similares. Adicionalmente, los kits de la invención pueden incluir instrucciones para el uso simultáneo, secuencial o separado de los diferentes componentes que tienen uso en el kit. Dichas instrucciones pueden estar en forma de material impreso o en la forma de un dispositivo electrónico capaz de almacenar instrucciones de manera que pueda leer un sujeto, tal como un medio de almacenamiento electrónico (discos magnéticos, cintas, y similares), medios ópticos (CD- ROM, DVD) y similares. De manera adicional o como alternativa, los medios pueden incluir direcciones de Internet que proporcionan dichas instrucciones.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos científicos y técnicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se comprende comúnmente por parte del experto en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden utilizar en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende", "incluye" y sus variaciones no están previstas para excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Los objetos adicionales, ventajas y características de la invención serán evidentes para los expertos en la materia tras examinar la descripción, o se pueden aprender mediante la práctica de la invención. Los ejemplos siguientes, dibujos y listado de secuencias se proporcionan a modo de ejemplo y no están previstos como una limitación de la presente invención.

30

## **EJEMPLOS**

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada. Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento tienen un carácter meramente ilustrativo y los expertos en la materia

reconocerán varios reactivos o parámetros que se pueden alterar sin separarse del espíritu de la invención o el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

5

### Construcciones de ADN

A menos que se indique otra cosa, se usaron métodos de clonación molecular convencionales (Sambrook J. & Russel D.W., Molecular cloning: a laboratory manual - 3ª edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001). Las construcciones de ADN se generaron usando partes químicamente sintetizadas y disponibles (**Tabla 1**). El aislado Ke\_125 del *virus del mosaico marrón de la yuca ugandesa* se obtuvo de la DSMZ (PV-0912). Los ácidos nucleicos se purificaron usando kits de purificación basados en cromatografía en columna. Como alternativa, el ADN genómico de muestras de plantas se extrajo según el procedimiento descrito por Edwards y colaboradores (Edwards K., *et al.*, Nucleic Acids Res. 1991, 19, 1349). Las reacciones de la PCR se realizaron con Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Fermentas o New England BioLabs), y se trataron con Dnpi para eliminar los moldes de plásmidos, si es necesario. Los casetes de ADN-Ts T-DNA\_1 sintéticos (SEQ ID NO: 1) para la serie pLX-B y la serie pLX-R, y T-DNA\_2 (SEQ ID NO: 2) para pLX-Z4 se obtuvieron de GeneArt. Los fragmentos de ADN solapantes se purificaron con gel y se unieron usando mezclas maestras de ensamblajes de ADN isoterms en una etapa hechos por los inventores (Gibson D.G., *et al.*, Nat. Methods. 2009, 6, 343–345) o NEBuilder HiFi (New England BioLabs). Las reacciones de digestión-ligadura en una etapa se realizaron mediante endonucleasas de restricción de tipo IIS (BsaI o BsmBI, New England BioLabs) y T4 Ligasa (Promega) como se ha descrito (Sarrion-Perdigones A., *et al.*, Plant Physiol. 2013, 162, 1618-1631).

20

25

Los datos completos de los plásmidos divulgados en la presente invención se recogen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Lista de plásmidos**

Nombre del plásmido	Origen / orígenes	Uso	Referencia
pSEVA431	pBBR1	Origen de la parte	<a href="http://seva.cnb.csic.es/">http://seva.cnb.csic.es/</a>

Tabla 1. Lista de plásmidos

Nombre del plásmido	Origen / orígenes	Uso	Referencia
pSEVA631	pBBR1	Origen de la parte	<a href="http://seva.cnb.csic.es/">http://seva.cnb.csic.es/</a>
pSEVA221	RK2	Origen de la parte	<a href="http://seva.cnb.csic.es/">http://seva.cnb.csic.es/</a>
pSN.5-TagRFP-T	pVS1+ColE1	Origen de la parte	Pasin F., <i>et al.</i> , Plant Methods. 2014, 10, 22
pSN.5-mTFP1	pVS1+ColE1	Origen de la parte	Pasin F., <i>et al.</i> , Plant Methods. 2014, 10, 22
pSN.5-mNeon	pVS1+ColE1	Origen de la parte	Pasin F., <i>et al.</i> , Plant Methods. 2014, 10, 22
pGGF003	pUC	Origen de la parte	Lampropoulos A., <i>et al.</i> , PLoS One. 2013, 8, e83043
pGGC011	pUC	Origen de la parte	Lampropoulos A., <i>et al.</i> , PLoS One. 2013, 8, e83043
p35Tunos-vec01-NAT1	pUC	Origen de la parte	Touriño A., <i>et al.</i> , Span. J. Agric. Res. 2008, 6, 48–58
pSN-PPV	RK2	Origen de la parte	Pasin F., <i>et al.</i> , PLoS Pathog. 2014, 10, e1003985
pSN-PPV-TagRFP-T2A	RK2	Origen de la parte	Pasin F., <i>et al.</i> , PLoS Pathog. 2014, 10, e1003985
pSN2-ccdB	pVS1+ColE1	Vector binario de ADN-T, fines de clonación	Pasin F., <i>et al.</i> , PLoS Pathog. 2014, 10, e1003985
GB0639	pVS1+ColE1	Vector binario de ADN-T, ensayo	Vazquez-Vilar M., <i>et al.</i> , Plant Methods. 2016, 12, 1-12

Tabla 1. Lista de plásmidos

Nombre del plásmido	Origen / orígenes	Uso	Referencia
		CRISPR/Cas9	
GB1108	pVS1+ColE1	Vector binario de ADN-T, ensayo	Vazquez-Vilar M., <i>et al.</i> , <i>Plant Methods</i> . 2016, 12, 1-12
		CRISPR/Cas9	
GB1181	pVS1+ColE1	Origen de la parte	Vazquez-Vilar M., <i>et al.</i> , <i>Plant Methods</i> . 2016, 12, 1-12
GB0460	pSa+pUC	Origen de la parte	Sarrion-Perdigones A., <i>et al.</i> , <i>Plant Physiol</i> . 2013, 162, 1618–1631.
pDGB3_alpha1	pVS1+ColE1	Vector binario de ADN-T, fines de clonación	Vazquez-Vilar M., <i>et al.</i> , <i>Nucleic Acids Res</i> . 2017, 45, 2196–2209
pLX-B2 (SEQ ID NO: 3)	pBBR1	Vector binario de ADN-T, fines de clonación	Presente divulgación
pLX-B3 (SEQ ID NO: 4)	pBBR1	Vector binario de ADN-T, fines de clonación	Presente divulgación
pLX-B4 (SEQ ID NO: 5)	pBBR1	Vector binario de ADN-T, fines de clonación	Presente divulgación
pLX-R2 (SEQ ID NO: 6)	RK2	Vector binario de ADN-T, fines de clonación	Presente divulgación
pLX-R3 (SEQ ID NO: 7)	RK2	Vector binario de ADN-T, fines de clonación	Presente divulgación

**Tabla 1. Lista de plásmidos**

<b>Nombre del plásmido</b>	<b>Origen / orígenes</b>	<b>Uso</b>	<b>Referencia</b>
pLX-R4 (SEQ ID NO: 8)	RK2	Vector binario de ADN-T, fines de clonación	Presente divulgación
pLX-Z4 (SEQ ID NO: 9)	RK2	Vector binario de ADN-T, fines de clonación	Presente divulgación
pLX-B2 $\alpha$ 2 (SEQ ID NO: 10)	pBBR1	Vector binario de ADN-T, fines de clonación	Presente divulgación
pLX-B3 $\Omega$ 1 (SEQ ID NO: 11)	pBBR1	Vector binario de ADN-T, fines de clonación	Presente divulgación
pLX-B3 $\Omega$ 2 (SEQ ID NO: 12)	pBBR1	Vector binario de ADN-T, fines de clonación	Presente divulgación
pLX-B2-TagRFP-T (SEQ ID NO: 13)	pBBR1	Vector binario de ADN-T, expresión transitoria	Presente divulgación
pLX-B3-TagRFP-T (SEQ ID NO: 14)	pBBR1	Vector binario de ADN-T, expresión transitoria	Presente divulgación
pLX-B4-TagRFP-T (SEQ ID NO: 15)	pBBR1	Vector binario de ADN-T, expresión transitoria	Presente divulgación
pLX-R2-TagRFP-T (SEQ ID NO: 16)	RK2	Vector binario de ADN-T,	Presente divulgación

**Tabla 1. Lista de plásmidos**

<b>Nombre del plásmido</b>	<b>Origen / orígenes</b>	<b>Uso</b>	<b>Referencia</b>
pLX-R3-TagRFP-T (SEQ ID NO: 17)	RK2	expresión transitoria Vector binario de ADN-T,	Presente divulgación
pLX-R4-TagRFP-T (SEQ ID NO: 18)	RK2	expresión transitoria Vector binario de ADN-T,	Presente divulgación
pLX-B2-XT1-XT2- hCas9 (SEQ ID NO: 19)	pBBR1	expresión transitoria Vector binario de ADN-T, ensayo CRISPR/Cas9	Presente divulgación
pLX-B2-NptII-DsRED (SEQ ID NO: 20)	pBBR1	Vector binario de ADN-T, expresión transitoria y estable de DsRED	Presente divulgación
pLX-PPV (SEQ ID NO: 21)	pBBR1	Vector binario de ADN-T, agroinoculación vírica	Presente divulgación
pLX-UCBSV (SEQ ID NO: 22)	pBBR1	Vector binario de ADN-T, agroinoculación vírica	Presente divulgación
pLX-B2-P <sub>CRC</sub> :mTTFP1	pBBR1	Vector binario de	Presente divulgación

**Tabla 1. Lista de plásmidos**

<b>Nombre del plásmido</b>	<b>Origen / orígenes</b>	<b>Uso</b>	<b>Referencia</b>
(SEQ ID NO: 23)		ADN-T, expresión estable	
pLX-Z4-P <sub>mas</sub> :RFP- ALCR (SEQ ID NO: 24)	RK2	Vector binario de ADN-T, expresión transitoria	Presente divulgación
pLX-B2-P <sub>EtOH</sub> :mNEON (SEQ ID NO: 25)	pBBR1	Vector binario de ADN-T, expresión transitoria	Presente divulgación
pSN.5-P <sub>PAP85</sub> :RFP (SEQ ID NO: 26)	pVS1+ColE1	Vector binario de ADN-T, expresión estable	Presente divulgación
GB1686 (SEQ ID NO: 27)	pVS1+ColE1	Vector binario de ADN-T, expresión transitoria y estable de DsRED	Presente divulgación
pLX-TuMV (SEQ ID NO: 28)	pBBR1	Vector binario de ADN-T, agroinoculación vírica	Presente divulgación

Los datos de los plásmidos de la presente invención son los siguientes:

- pLX-B2 (SEQ ID NO: 3) es un vector binario de ADN-T de acuerdo con la presente invención (vector pLX basado en pBBR1) y comprende el origen de replicación del plásmido pBBR1 (SEQ ID NO: 105). Las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) origen pBBR1 (SEQ ID NO: 105), amplificado a partir de pSEVA631, usando cebadores X198\_F/X199\_R ((SEQ



ID NO: 42)/X199\_R (SEQ ID NO: 43)); (ii) gen *nptI*, de pSEVA221, usando X192\_F (SEQ ID NO: 36)/X193\_R (SEQ ID NO: 37); (iii) casete sintético T-DNA\_1 (SEQ ID NO: 1).

- 5       • pLX-B3 (SEQ ID NO: 4) es un vector binario de ADN-T de acuerdo con la presente invención (vector pLX basado en pBBR1) y comprende el origen de replicación del plásmido pBBR1 (SEQ ID NO: 105). Las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) origen pBBR1 (SEQ ID NO: 105) amplificado a partir de pSEVA631, usando cebadores X198\_F/X199\_R (SEQ ID NO: 42/SEQ ID NO: 43); (ii) gen *aadA*, de pSEVA431, usando cebadores  
10       X194\_F/X195\_R (SEQ ID NO: 38/SEQ ID NO: 39); (iii) casete sintético T-DNA\_1 (SEQ ID NO: 1).
- pLX-B4 (SEQ ID NO: 5) es un vector binario de ADN-T de acuerdo con la presente invención (vector pLX basado en pBBR1) y comprende el origen de replicación del plásmido pBBR1 (SEQ ID NO: 105). Las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) origen pBBR1 (SEQ ID NO: 105),  
15       amplificado a partir de pSEVA631, usando cebadores X198\_F/X199\_R (SEQ ID NO: 42/SEQ ID NO: 43); (ii) gen *aacC1*, de pSEVA631, usando X196\_F/X197\_R (SEQ ID NO: 40/SEQ ID NO: 41); (iii) casete sintético T-DNA\_1 (SEQ ID NO: 1).
- 20       • pLX-R2 (SEQ ID NO: 6) es un vector binario de ADN-T de acuerdo con la presente invención (vector pLX basado en RK2) y comprende el origen de replicación del plásmido RK2 (SEQ ID NO: 106). Las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) origen RK2 (SEQ ID NO: 106), amplificado a partir de pSEVA221, usando cebadores X200\_F/X201\_R (SEQ  
25       ID NO: 44/SEQ ID NO: 45); (ii) gen *nptI*, de pSEVA221, usando X192\_F/X193\_R (SEQ ID NO: 36/SEQ ID NO: 37); (iii) casete sintético T-DNA\_1 (SEQ ID NO: 1).
- pLX-R3 (SEQ ID NO: 7) es un vector binario de ADN-T de acuerdo con la presente invención (vector pLX basado en RK2) y comprende el origen de replicación del plásmido RK2 (SEQ ID NO: 106). Las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) origen RK2 (SEQ ID NO: 106), amplificado a partir de pSEVA221, usando cebadores X200\_F/X201\_R (SEQ  
30       ID NO: 44/SEQ ID NO: 45); (ii) gen *aadA*, de pSEVA431, usando

X194\_F/X195\_R (SEQ ID NO: 38/SEQ ID NO: 39); (iii) casete sintético T-DNA\_1 (SEQ ID NO: 1).

- 5

• pLX-R4 (SEQ ID NO: 8) es un vector binario de ADN-T de acuerdo con la presente invención (vector pLX basado en RK2) y comprende el origen de replicación del plásmido RK2 (SEQ ID NO: 106). Las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) origen RK2 (SEQ ID NO: 106), amplificado a partir de pSEVA221, usando cebadores X200\_F/X201\_R (SEQ ID NO: 44/SEQ ID NO: 45); (ii) gen *aacC1*, de pSEVA631, usando X196\_F/X197\_R (SEQ ID NO: 40/SEQ ID NO: 41); (iii) casete sintético T-DNA\_1 (SEQ ID NO: 1).
- 10

• pLX-Z4 (SEQ ID NO: 9) es un vector binario de ADN-T de acuerdo con la presente invención (derivado de pLX-R4 con el casete T-DNA\_2 (SEQ ID NO: 2), y sin sitios BsmBI en los genes RK2-*trfA* y *aacC1* genes) y comprende el origen de replicación del plásmido RK2 (SEQ ID NO: 107). Las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) *aacC1\_3'*, amplificado a partir de pLX-R4 (SEQ ID NO: 8), usando cebadores X295\_F/X296\_R (SEQ ID NO: 73/SEQ ID NO: 74); (ii) *aacC1\_RK2*, de pLX-R4 (SEQ ID NO: 8), usando X297\_F/X298\_R (SEQ ID NO: 75/SEQ ID NO: 76);(iii) RK2\_5', de pLX-R4 (SEQ ID NO: 8), usando X299\_F/X300\_R (SEQ ID NO: 77/SEQ ID NO: 78); (iv) casete sintético T-DNA\_2 (SEQ ID NO: 2).
- 15

• pLX-B2 $\alpha$ 2 (SEQ ID NO: 10) es un derivado de pLX-B2 con el casete de clonación GoldenBraid alpha2 (Sarrion-Perdigones A., *et al.*, Plant Physiol. 2013, 162, 1618–1631) y comprende el origen de replicación del plásmido pBBR1 (SEQ ID NO: 105). Las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) cadena principal, amplificado a partir de pLX-B2 (SEQ ID NO: 3), usando cebadores X210\_R/X321\_F (SEQ ID NO: 46/SEQ ID NO: 89); (ii) casete de clonación *lacZ $\alpha$* , amplificado usando X322\_F/X323\_R (SEQ ID NO: 90/SEQ ID NO: 91).
- 20

• pLX-B3 $\Omega$ 1 (SEQ ID NO: 11) es un derivado de pLX-B3 con el casete de clonación GoldenBraid omega1 (Sarrion-Perdigones A., *et al.*, Plant Physiol. 2013, 162, 1618–1631) y comprende el origen de replicación del plásmido pBBR1 (SEQ ID NO: 105). Las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) cadena principal, amplificado a partir de pLX-B3 (SEQ

- ID NO: 4), usando cebadores X324\_R/X325\_F (SEQ ID NO: 92/SEQ ID NO: 93); (ii) casete de clonación *lacZα*, amplificado usando X326\_F/X327\_R (SEQ ID NO: 94/SEQ ID NO: 95).
- 5 • pLX-B3Ω2 (SEQ ID NO: 12) es un derivado de pLX-B3 con el casete de clonación GoldenBraid omega2 (Sarrion-Perdigones A., *et al.*, Plant Physiol. 2013, 162, 1618–1631) y comprende el origen de replicación del plásmido pBBR1 (SEQ ID NO: 105). Las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) cadena principal, amplificado a partir de pLX-B3 (SEQ ID NO: 4), usando cebadores X324\_R/X325\_F (SEQ ID NO: 92/SEQ ID NO: 93); (ii) casete de clonación *lacZα*, amplificado usando X328\_F/X329\_R (SEQ ID NO: 96/SEQ ID NO: 34).
  - 10 • pLX-B2-TagRFP-T (SEQ ID NO: 13) es un derivado de pLX-B2 con el promotor 35S de CaMV, TagRFP-T y unidad del terminador de la transcripción de la nopalina sintasa ( $P_{35S}:RFP:T_{nos}$ ). Las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) cadena principal, amplificado a partir de pLX-B2 (SEQ ID NO: 3), usando cebadores X210\_R/X211\_F (SEQ ID NO: 46/SEQ ID NO: 47); (ii)  $P_{35S}:RFP:T_{nos}$ , de pSN.5-TagRFP-T, usando X218\_F/X219\_R (SEQ ID NO: 51/SEQ ID NO: 52).
  - 15 • pLX-B3-TagRFP-T (SEQ ID NO: 14) es un derivado de pLX-B3 con  $P_{35S}:RFP:T_{nos}$ . Las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) cadena principal, amplificado a partir de pLX-B3 (SEQ ID NO: 4), usando cebadores X210\_R/X211\_F (SEQ ID NO: 46/SEQ ID NO: 47); (ii)  $P_{35S}:RFP:T_{nos}$ , de pSN.5-TagRFP-T, usando X218\_F/X219\_R (SEQ ID NO: 51/SEQ ID NO: 52).
  - 20 • pLX-B4-TagRFP-T (SEQ ID NO: 15) es un derivado de pLX-B4 con  $P_{35S}:RFP:T_{nos}$ . Las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) cadena principal, amplificado a partir de pLX-B4 (SEQ ID NO: 5), usando cebadores X210\_R/X211\_F (SEQ ID NO: 46/SEQ ID NO: 47); (ii)  $P_{35S}:RFP:T_{nos}$ , de pSN.5-TagRFP-T, usando X218\_F/X219\_R (SEQ ID NO: 51/SEQ ID NO: 52).
  - 25 • pLX-R2-TagRFP-T (SEQ ID NO: 16) es un derivado de pLX-R2 con  $P_{35S}:RFP:T_{nos}$ . Las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) cadena principal, amplificado a partir de pLX-R2 (SEQ ID NO: 6), usando
  - 30

- cebadores X210\_R/X211\_F (SEQ ID NO: 46/SEQ ID NO: 47); (ii) P<sub>35S</sub>:RFP:T<sub>nos</sub>, de pSN.5-TagRFP-T, usando X218\_F/X219\_R (SEQ ID NO: 51/SEQ ID NO: 52).
- 5 • pLX-R3-TagRFP-T (SEQ ID NO: 17) es un derivado de pLX-R3 con P<sub>35S</sub>:RFP:T<sub>nos</sub>. Las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) cadena principal, amplificado a partir de pLX-R3 (SEQ ID NO: 7), usando cebadores X210\_R/X211\_F (SEQ ID NO: 46/SEQ ID NO: 47); (ii) P<sub>35S</sub>:RFP:T<sub>nos</sub>, de pSN.5-TagRFP-T, usando X218\_F/X219\_R (SEQ ID NO: 51/SEQ ID NO: 52).
- 10 • pLX-R4-TagRFP-T (SEQ ID NO: 18) es un derivado de pLX-R4 con P<sub>35S</sub>:RFP:T<sub>nos</sub>. Las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) cadena principal, amplificado a partir de pLX-R4 (SEQ ID NO: 8), usando cebadores X210\_R/X211\_F (SEQ ID NO: 46/SEQ ID NO: 47); (ii) P<sub>35S</sub>:RFP:T<sub>nos</sub>, de pSN.5-TagRFP-T, usando X218\_F/X219\_R (SEQ ID NO: 51/SEQ ID NO: 52).
- 15 • pLX-B2-XT1-XT2-hCas9 (SEQ ID NO: 19) es un derivado de pLX-B2 con unidades de transcripción ARNsg de XT1, ARNsg de XT2 y hCas9. Las unidades de transcripción se transfirieron desde el vector GB1108 hasta pLX-B2 realizando una reacción de restricción-ligadura que incluye BsmBI (New England BioLabs) y T4 Ligasa (Promega). La mezcla de reacción se sometió a 20 30 ciclos de 7 min cada uno (3 min a 37°C y 4 min a 16°C). Los clones se seleccionaron sobre placas de LB kanamicina, y mediante ensayo con enzimas de restricción.
- 25 • pLX-B2-NptII-DsRED (SEQ ID NO: 20) es un derivado de pLX-B2 con las unidades de transcripción P<sub>nos</sub>:NptII:T<sub>nos</sub> y P<sub>35S</sub>:DsRED:T<sub>35S</sub>. Las unidades de transcripción se transfirieron desde los vectores GB0460 y GB1181 hasta pLX-B2 realizando una reacción de restricción-ligadura que incluye BsaI (New England BioLabs) y T4 Ligasa (Promega). La mezcla de reacción se sometió a 30 30 ciclos de 7 min cada uno (3 min a 37°C y 4 min a 16°C). Los clones se seleccionaron sobre placas de LB kanamicina, y mediante ensayo con enzimas de restricción.
- 30 • pLX-PPV (SEQ ID NO: 21) es un derivado de pLX-B2 con un casete de clonación de ADNc del *virus de la sharka* marcado con GFP (P<sub>35S</sub>:PPV:T<sub>nos</sub>).

pSN-PPV digerido con Scal/XbaI se mezcló con pLX-B2 digerido con Scal/NheI. Los fragmentos se ligaron usando T4 ADN ligasa (New England BioLabs).

- 5

• pLX-UCBSV (SEQ ID NO: 22) es un derivado de pLX-B2 con un casete de clonación de ADNc del *virus del mosaico marrón de la yuca ugandesa* ( $P_{35S}$ :UCBSV:T<sub>nos</sub>). El ARN total purificado de las plantas infectadas con el aislado Ke\_125 (PV-0912, DSMZ) de UCBSV se usó en una reacción de síntesis de ADNc. Esta incluyó X122\_R, X123\_R (SEQ ID NO: 32/SEQ ID NO: 33), cebadores aleatorios y componentes del kit comercial (High Capacity

10

cDNA reverse transcription kit, Applied Biosystems). La muestra de ADNc se usó en las reacciones de la PCR: (i) 5UTR-P3, usando cebadores X240\_F/X241\_R (SEQ ID NO: 59/SEQ ID NO: 60); (ii) P3-NIb, usando X242\_F/X243\_R (SEQ ID NO: 61/SEQ ID NO: 62); (iii) NIb-3UTR, usando X244\_F/X245\_R (SEQ ID NO: 63/SEQ ID NO: 64). La cadena principal del

15

pLX-B2 con  $P_{35S}$  y T<sub>nos</sub> se amplificó a partir de pLX-PPV usando X238\_R/X239\_F (SEQ ID NO: 57/SEQ ID NO: 58). Los fragmentos de RT y de PCR se unieron mediante ensamblaje Gibson. Las secuencias del clon de ADNc del UCBSV se determinaron mediante secuenciación Sanger usando los cebadores 1989\_F (SEQ ID NO: 29), X241\_R (SEQ ID NO: 60), X244\_F (SEQ

20

ID NO: 63), X245\_R (SEQ ID NO: 64), X253\_R (SEQ ID NO: 65), X254\_F (SEQ ID NO: 66), X255\_R (SEQ ID NO: 67), X256\_F (SEQ ID NO: 68), X257\_F (SEQ ID NO: 69), X258\_F (SEQ ID NO: 70), X259\_R (SEQ ID NO: 71), X260\_R (SEQ ID NO: 72).
- 25

• pLX-B2- $P_{CRC}$ :mTFP1 (SEQ ID NO: 23) es un derivado de pLX-B2 con un promotor de semillas de *A. thaliana* AT4G28520 del gen C de la crucifera, una proteína fluorescente cian (mTFP1) y una unidad de terminación de la transcripción AT4G28520 ( $P_{CRC}$ :mTFP1:T<sub>CRC</sub>). Las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) cadena principal, amplificado a partir de pLX-B2 usando cebadores X210\_R/X211\_F (SEQ ID NO: 46/SEQ ID NO: 47); (ii)

30

$P_{CRC}$ , a partir del ADN genómico de *A. thaliana* Col-0 usando X220\_F/X221\_R (SEQ ID NO: 53/SEQ ID NO: 54); (iii) mTFP1, de pSN.5-mTFP1, usando X212\_F/X213\_R (SEQ ID NO: 48/SEQ ID NO: 49); (iv) T<sub>CRC</sub>, a partir del ADN genómico de *A. thaliana* Col-0 usando X222\_F/X223\_R (SEQ ID NO: 55/SEQ ID NO: 56).

- 5 pLX-Z4-P<sub>mas</sub>:RFP-ALCR (SEQ ID NO: 24) es un derivado de pLX-Z4 con el péptido 2A con TagRFP-T, *virus de Thoesa asigna* (Donnelly M.L.L., *et al.*, J. Gen. Virol. 2001, 82, 1027–1041), secuencia de codificación de AlcR de *A. nidulans* flanqueada por el promotor y el terminador de la manopina sintasa (P<sub>mas</sub>:RFP-2A-ALCR:T<sub>mas</sub>). Las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) cadena principal, amplificada a partir de pLX-Z4, usando cebadores X210\_R/X211\_F (SEQ ID NO: 46/SEQ ID NO: 47); (ii) P<sub>mas</sub>, de pGGF003, usando X301\_F/X302\_R (SEQ ID NO: 79/SEQ ID NO: 80); (iii) RFP-2A, de pSN-PPV-TagRFP-T2A, usando X216\_F/X303\_R (SEQ ID NO: 50/SEQ ID NO: 81); (iv) AlcR\_5', de pGGC011, usando X304\_F/X305\_R (SEQ ID NO: 82/SEQ ID NO: 83); (v) AlcR\_3', de pGGC011, usando X306\_F/X307\_R (SEQ ID NO: 84/SEQ ID NO: 85); (vi) T<sub>mas</sub>, de pGGF003, usando X308\_F/X309\_R (SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87).
- 15 pLX-B2-P<sub>EtOH</sub>:mNEON (SEQ ID NO: 25) es un derivado de pLX-B2 con la secuencia mNeonGreen bajo un promotor sintético sensible a etanol (P<sub>EtOH</sub>:NEON:T<sub>nos</sub>). Las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) cadena principal, amplificado a partir de pLX-B2 usando cebadores X210\_R/X211\_F (SEQ ID NO: 46/SEQ ID NO: 47); (ii) NEON:T<sub>nos</sub>, de pSN.5-mNeon, usando X310\_F/X219\_R (SEQ ID NO: 88/SEQ ID NO: 52); (iii) fragmento P<sub>EtOH</sub> sintético (SEQ ID NO: 35).
- 20 pSN.5-P<sub>PAP85</sub>:RFP (SEQ ID NO: 26) es un derivado de pSN2-ccdB con un promotor de semillas de *A. thaliana* AT3G22640, RFP y unidad del terminador de la transcripción de la nopalina sintasa (P<sub>PAP85</sub>:RFP:T<sub>nos</sub>). Para generar el vector pSN.5-P<sub>PAP85</sub>:RFP, las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) cadena principal, pSN2-ccdB digerido con XbaI/PmlI; (ii) P<sub>PAP85</sub>, a partir del ADN genómico de *A. thaliana* Col-0 usando X228\_F/X229\_R (SEQ ID NO: 98/SEQ ID NO: 99); (iii) RFP:T<sub>nos</sub>, de pSN.5-TagRFP-T, usando X216\_F/X80\_R (SEQ ID NO: 50/SEQ ID NO: 97).
- 25 GB1686 (SEQ ID NO: 27) es un derivados de pDGB3\_alpha1 con las unidades de transcripción P<sub>nos</sub>:NptII:T<sub>nos</sub> y P<sub>35S</sub>:DsRED:T<sub>35S</sub>. Las unidades de transcripción se transfirieron desde los vectores GB0460 y GB1181 hasta pDGB3\_alpha1 realizando una reacción de restricción-ligadura que incluye BsaI (New England BioLabs) y T4 Ligasa (Promega). La mezcla de reacción se

sometió a 30 ciclos de 7 min cada uno (3 min a 37°C y 4 min a 16°C). Los clones se seleccionaron sobre placas de LB kanamicina, y mediante ensayo con enzimas de restricción.

- 5 • pLX-TuMV (SEQ ID NO: 28) es un derivado de pLX-B2 con el casete P<sub>35S</sub>:TuMV:T<sub>nos</sub> de p35Tunos-vec01-NAT1. Para generar el vector pLX-TuMV, las siguientes partes se unieron mediante ensamblaje Gibson: (i) cadena principal, amplificada a partir de pLX-PPV usando cebadores X333\_R/X334\_F (SEQ ID NO: 100/SEQ ID NO: 101); (ii) p35Tunos-vec01-NAT1 digerido con XmaI/SalI.
- 10 Los cebadores se sintetizaron por Sigma-Aldrich, y sus secuencias se relacionan en la Tabla 2.

**Tabla 2. Lista de los cebadores y enlazadores de ensamblaje**

ID	Secuencia	SEQ ID NO:
1989_F	GATTGATGTGATTTCTCCACTGACG	29
2050_F	GCCATTGTCCGAAATCTCACG	30
2051_R	CTGGAAATGCGATTCTCTTAGC	31
X122_R	CGTCAATCGTTAGAGC	32
X123_R	CGACCTTGCACTTCA	33
X329_R	CGCATCCTTGTCCGGTCTCCAGCGAGAGACGTCA CTCATTAG	34
X192_F	CGACTTGCGACATGCGGTCCCTTTGCAATCAACTAT TAGAAAAATTCATCC	36
X193_R	AACCGCATAACCGCCAATCCGATCTTGTGTCTCAA AATCTCTGATGTTAC	37
X194_F	CGACTTGCGACATGCGGTCCCTTTGTTATTTGCCGA CTACCTTGGTGA	38
X195_R	AACCGCATAACCGCCAATCCGATCGAACCTTGACC GAACGCAGC	39
X196_F	CGACTTGCGACATGCGGTCCCTTTGCAATTTACCCA ACAACCTCCGC	40
X197_R	AACCGCATAACCGCCAATCCGATCTTGACATAAGC CTGTTCCGGTTC	41

**Tabla 2. Lista de los cebadores y enlazadores de ensamblaje**

<b>ID</b>	<b>Secuencia</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
X198_F	GATCGGATTGGCGGTTATGCGGTTCTACCGGCGC GGCAG	42
X199_R	GGAAGACCACCGAACTGATGATGGCCCCCTACGG GCTTGCTCTC	43
X200_F	GATCGGATTGGCGGTTATGCGGTTGCGATGCAGG TGGCTGCTGA	44
X201_R	GGAAGACCACCGAACTGATGATGGGTAGAAAAGA TCAAAGGATCTTCTTG	45
X210_R	TGAGACGGTTTCGACCAGG	46
X211_F	GTCAGGAGACGGGACAAGGA	47
X212_F	ATGGTTTCTAAAGGTGAAGAGAC	48
X213_R	TTATGCTCCTTTATCGTCGTC	49
X216_F	ATGGTTTCAAAGGGAGAAGAG	50
X218_F	GTAGCCTGGTCGAAACCGTCTCACCAGTACGCAC GATTCAAGG	51
X219_R	CGCATCCTTGTCCTCCTGACGAGATCGAGTA ACATAGATGACACC	52
X220_F	GTAGCCTGGTCGAAACCGTCTCATAACGAACGCT CATGCTAAG	53
X221_R	TTGTAGTCTCTTCACCTTTAGAAACCATTTTCTTTTT GTTTGTTGTGAG	54
X222_F	GGATGACGACGATAAAGGAGCATAATGCACTGGA GGTCAAGGAAG	55
X223_R	CGCATCCTTGTCCTCCTGACATAGCTCGATA GAATCATTGCT	56
X238_R	GTCATATTTATTTTCTCTCCAAATGAAATGAACT TCC	57
X239_F	GAAATACACCTTATAAAAGTACAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAATGC	58
X240_F	GTTCATTTCAATTTGGAGAGGAAAATAAATATGACA	59



**Tabla 2. Lista de los cebadores y enlazadores de ensamblaje**

<b>ID</b>	<b>Secuencia</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
	TAAGAATACATAA	
X241_R	CTCTTCCTTTTCGACCTTGCACTTCA	60
X242_F	TTGAAGTGCAAGGTGCGAAAGGAAGAG	61
X243_R	AAAGAAGTATCAAACCTACTACCATCACAATC	62
X244_F	GATTGTGATGGTAGTAGGTTTGATACTTCTT	63
X245_R	TTTTTTTTTTTTTGTACTTTTATAAGGTGTATTTCTA CACCAAACAAAAGGATATGG	64
X253_R	CTTTCGTAACAGCTTGCTTTCTCA	65
X254_F	CTTTGGTTTAGACAAGCAATGTGTG	66
X255_R	CCACTATTATTTCCACGATGCTTC	67
X256_F	CAGAGGTGAAGTCTATTCTTGGCAT	68
X257_F	AGTTTGGTGGAGTTTTGGATAGC	69
X258_F	ATACACACGCTTGAGATAATGGATG	70
X259_R	ATCGCCACTGATACAATTCAAAG	71
X260_R	AGGACCAAATTCTCATAAGTCTCTCT	72
X295_F	CAATTTACCCAACAACCTCCGC	73
X296_R	TGAGTTCGGCGATGTAGCCACCT	74
X297_F	GGTGGCTACATCGCCGAACCTCA	75
X298_R	CGTTCGCGTCGGCTAGAACAGGAG	76
X299_F	TGTTCTAGCCGACGCGAACGCT	77
X300_R	GTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTG	78
X301_F	GTAGCCTGGTCGAAACCGTCTCATTTTTCAAATCA GTGCGCAAGA	79
X302_R	CAGCTCTTCTCCCTTTGAAACCATTGTTGTTACCC GATTTGGTG	80
X303_R	TGGCCCTGGATTTTCCTCAA	81
X304_F	TTGAGGAAAATCCAGGGCCAATGGCAGATACACG CCGAC	82
X305_R	TCCAGCACAGATTGCGTGAGAGAA	83
X306_F	CTCTCACGCAATCTGTGCTGGATG	84

**Tabla 2. Lista de los cebadores y enlazadores de ensamblaje**

<b>ID</b>	<b>Secuencia</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
X307_R	AGCTACAAGAAGCTGTCAACTTTCCCA	85
X308_F	GGAAAGTTGACAGCTTCTTGTAGCTCTTGGACTCC CATGTTGG	86
X309_R	GCATCCTTGTCCCGTCTCCTGACGATAATTTATTT GAAAATTCATAAG	87
X310_F	CAACATTACAATTACTATTTACAATTACAATGGTGA GCAAGGGAGAGGAG	88
X321_F	GAGACGGGACAAGGATGCG	89
X322_F	CCTGGTCGAAACCGTCTCAGTCAGGAGAGAGACC AAAAGCAAAAAC	90
X323_R	CGCATCCTTGTCCCGTCTCCAGCGAGAGACCTCA CTCATTAG	91
X324_R	TGAGACCGTTTTGACCAGG	92
X325_F	GAGACCGGACAAGGATGCG	93
X326_F	CCTGGTCGAAACCGTCTCAGGAGAGAGACGAAAA GCAAAAAC	94
X327_R	CGCATCCTTGTCCGGTCTCCTGACAGCGAGAGAC GTCACTCATTAG	95
X328_F	CCTGGTCGAAACCGTCTCAGTCAGGAGAGAGACG AAAAGCAAAAAC	96
X80_R	CTCAATGCTGCTGCCTTCATCTGGATATGAGCTTC AC	97
X228_F	CCTCGAGTACGTAGGATCCATTTAAATTCCTTCAA GAGAGCAAACCATT	98
X229_R	ATCAGCTCTTCTCCCTTTGAAACCATTTTTTCTTGT TGTTTTGTTG	99
X333_R	CGTGTGCTGCTCCACCATGTTACGAAGATT	100
X334_F	AAAAAAAAAATCGGTTCCCCCTAGAGCAGATCGT TCAAACATTTGGCA	101
Linker_1	CCATCATCAGTTCGGTGGTCTTCC	112

**Tabla 2. Lista de los cebadores y enlazadores de ensamblaje**

ID	Secuencia	SEQ ID NO:
Linker_2	CGACTTGCGACATGCGGTCCTTTG	113
Linker_3	GATCGGATTGGCGGTTATGCGGTT	114

**Condiciones de crecimiento bacteriano**

La cepa DH10B de *E. coli* se usó para la clonación y propagación de plásmidos. Para aumentar los rendimientos de las minipreparaciones de plásmidos, se hicieron crecer cultivos de 10 ml en tubos de 50 ml a 30 o 37°C. Los cultivos nocturnos se aglomeraron mediante centrifugación y se procesaron usando kits de microcolumna comerciales (FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit, Favorgen; Wizard Plus SV Minipreps, Promega). Se usaron volúmenes dobles de soluciones de kit para resuspensión (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 10 mM, 100 µg/ml de RNasa A), lisis (NaOH 0,2 M, 1% SDS) y neutralización (clorhidrato de guanidina 4,09 M, acetato de potasio 0,759 M, ácido acético glacial 2,12 M) para mejorar el aclaramiento de los lisados bacterianos y los rendimientos finales de los plásmidos. Las bacterias se hicieron crecer en medio Luria-Bertani y se usaron antibióticos a concentraciones finales de 100 mg/l de ampicilina, 15 mg/l de cloranfenicol, 20 mg/l de gentamicina, 50 mg/l de kanamicina, 50 mg/l de rifampicina, 100 mg/l de espectinomicina, 100 mg/l de estreptomicina, y 10 mg/l de tetraciclina. Las curvas de crecimiento se midieron en placas de 96 pocillos, mediante el registro de los valores de la absorbancia a DO600 en intervalos de 10 minutos en un lector de placas (Infinite M200, Tecan). El mantenimiento de pTi en la cepa C58C1-313 de *A. tumefaciens* se evaluó mediante amplificación por PCR de un fragmento *repB* usando cebadores 2050\_F/2051\_R (SEQ ID NO: 30/SEQ ID NO: 31).

**Transformación de plantas y agroinoculación**

Los vectores binarios de ADN-T (véase la Tabla 1) se transformaron en células de *A. tumefaciens* por métodos de congelación-descongelación o electroporación. En los ensayos de expresión transitoria y agroinoculación, suspensiones de *A. tumefaciens* se infiltraron mecánicamente en hojas de *N. benthamiana* y *A. thaliana* tal como se ha descrito (Pasin F., *et al.*, Plant Methods. 2014, 10, 22). El método de inmersión floral se usó para transformar de forma estable células de línea germinal de

*A. thaliana* (Clough S.J. y Bent A.F., Plant J. 1998, 16, 735–743). La transformación estable de discos de hojas de *N. benthamiana* se llevó a cabo tal como se ha descrito (Horsch R.B. y Klee H.J., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1986, 83, 4428–4432).

## 5 Detección de proteínas

Las muestras de plantas que expresan proteínas fluorescentes se visualizaron con un estereoscopio de epifluorescencia, microscopio confocal, o se obtuvieron imágenes mediante un barrido con láser (Pasin F., *et al.*, Plant Methods. 2014, 10, 22). La fluorescencia se midió introduciendo discos de hojas en placas de 96 pocillos de fondo plano; en los estudios cinéticos, las placas se precintaron con películas adhesivas ópticas (4311971, Applied Biosystems). La señal de fluorescencia se adquirió en lectores de placas con filtro (VICTOR X5, Perkin Elmer) o monocromador (Infinite M200, Tecan), tal como se ha notificado (Pasin F., *et al.*, Plant Methods. 2014, 10, 22). Los extractos de proteína total se resolvieron mediante SDS-PAGE, y la inmunodetección se llevó a cabo utilizando suero de conejo anti-tRFP (AB234, Evrogen), anti-UCBSV CP (AS-0912, DSMZ), -PPV CP y anti-TuMV CP como anticuerpos primarios. Para el microscopio electrónico, los extractos de plantas se incubaron con rejillas de cobre estabilizadas con carbono y revestidas de colodión, y se tiñeron en negativo con acetato de uranilo al 2%. Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (JEM 1011, Jeol).

## Mutagénesis del genoma dirigida

Las construcciones CRISPR/Cas se expresaron de forma transitoria en hojas de *N. benthamiana*. Para estimar la eficacia de la mutagénesis, se llevó a cabo un ensayo mediante PCR/enzimas de restricción tal como se ha descrito (Vazquez-Vilar M., *et al.*, Plant Methods. 2016, 12, 1–12). En resumen, el ADN genómico se purificó a partir de muestras de hojas infiltradas, y se usó en la reacción de la PCR para amplificar fragmentos de ADN que cubren los sitios diana de las construcciones CRISPR/Cas. Los productos de la PCR resultantes se purificaron y se usaron en reacciones de digestión del ADN que incluían enzimas de restricción, donde el solapamiento entre secuencias diana predijo sitios de edición. Las intensidades de las bandas escindidas y las bandas resistentes a la escisión se estimaron usando el programa informático ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

**Ejemplo 1. Construcción de vectores binarios de ADN-T mediante ensamblaje de partes modulares, y características de clonación de un vector pLX basado en pBBR1**

En el diseño de nuevos vectores binarios de ADN-T, los inventores seleccionan  
5 principios básicos: (i) tamaño reducido, (ii) estabilidad, (iii) origen de replicación con una amplia gama de hospedadores para el mantenimiento en *E. coli* y *A. tumefaciens*, (iv) origen compatible con los vectores binarios de ADN-T de uso más habitual, (v) consistencia con los estándares actuales de biología sintética vegetal, y (vi) la posibilidad de adoptar métodos dependientes del solapamiento para el ensamblaje de  
10 la construcción.

Por lo tanto, para construir los vectores binarios pLX de la presente invención, se ensamblaron partes modulares por métodos de clonación basados en el solapamiento. Se diseñaron secuencias de uniones sintéticas de solapamiento ortogonal conocidas como enlazadores de ensamblaje para permitir el ensamblaje  
15 combinatorio de módulos de ADN (**Tabla 2**). El Módulo 1, 2, y 3 se refieren al casete de ADN-T, el origen de pBBR1 y un marcador seleccionable (genes de resistencia (*R*), tales como *nptI*, *aadA*, y *aacC1*), respectivamente (**Fig. 1**). Cada módulo incluye una o varias partes de ADN, que están flanqueadas por dos enlazadores de ensamblaje diferentes que se muestran como rombos en la Fig. 1. Las partes de los tres módulos  
20 se obtuvieron mediante PCR o se sintetizaron químicamente, y se reunieron mediante ensamblaje de ADN isoterma en una etapa para generar los vectores binarios pLX-B2 (SEQ ID NO: 3), pLX-B3 (SEQ ID NO: 4), y pLX-B4 (SEQ ID NO: 5) (**Fig. 1, Tabla 3**). Los detalles de la generación de pLX-B2, pLX-B3 y el plásmido pLX-B4 se han divulgado anteriormente.

25

Tabla 3. Vectores binarios de ADN-T de la presente invención

Vector	Tamaño en pb	Origen	ADN-T*	Selección bacteriana	Casete	Características de clonación <sup>§</sup>				
						Golden Gate	Golden Braid	Ensamblaje Gibson	Multiplexado	
pLX-B2	3287	pBBR1	octopina	KAN	alpha1	■	■	■	■	■
pLX-B3	3349	pBBR1	octopina	SP	alpha1	■	□	■	■	n.t.
pLX-B4	3165	pBBR1	octopina	GENT	alpha1	■	□	■	■	n.t.
pLX-B2α2	3287	pBBR1	octopina	KAN	alpha2	■	■	■	■	n.t.
pLX-B3Ω1	3349	pBBR1	octopina	SP	omega1	□	■	■	■	n.t.
PLX-B3Ω2	3349	pBBR1	octopina	SP	omega2	□	■	■	■	n.t.
pLX-Z4	3740	RK2	succinamopina	GENT	alpha1	■	□	■	■	■

\* tipo pTi de la fuente del límite derecho e izquierdo, todos los vectores incluyen un segundo límite izquierdo del tipo nopalina; <sup>§</sup> nomenclatura del casete de clonación de acuerdo con los estándares GoldenBraid (Sarrion-Perdigones A., et al., Plant Physiol. 2013, 162, 1618-1631); cuadrado relleno, adecuado; cuadrado sin relleno, no adecuado; n. t., no analizado.

Los vectores binarios pLX de la presente invención facilitan diseños experimentales flexibles porque su replicación es autónoma tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens*. Las características adicionales de los vectores binarios de pLX incluyen diversos marcadores seleccionables, un ADN-T con límites de un pTi de tipo octopina y una segunda secuencia de límite izquierdo que se demostró que reduce la transferencia de la cadena principal (**Fig. 2A**). Se incluyeron terminadores bacterianos sintéticos basados en diferentes cadenas principales (T1, SEQ ID NO: 108; y T2, SEQ ID NO: 109) para aumentar la estabilidad del plásmido.

A fines de clonación, el casete de ADN-T hospeda el gen indicador *lacZα* de *E. coli* flanqueado por los sitios de la endonucleasa de restricción de Tipo IIS (**Fig. 2B**). Las secuencias de los salientes producidos por Bsal o BsmBI concuerdan con la sintaxis propuesta para la biología sintética vegetal; por tanto, los vectores pLX son adecuados para el ensamblaje de unidades transcripcionales eucariotas individuales o múltiples procedentes de bibliotecas de partes de ADN normalizadas. Las partes o las unidades transcripcionales procedentes de bibliotecas de plásmidos se pueden ensamblar en vectores pLX usando estándares Golden Gate y GoldenBraid basados en Bsal (**Fig. 2C**). El casete de ADN-T hospeda regiones de hibridación del cebador divergentes sin similitud de secuencias y estructuras secundarias (flechas, **Fig. 2B**). Estas permiten la linealización de las cadenas de pLX pequeñas mediante PCR inversa, y el posterior uso en la clonación de múltiples fragmentos de solapamiento mediante el ensamblaje Gibson (**Fig. 2C**). Los vectores pLX con replicones compatibles pueden multiplexarse en células de *Agrobacterium* para la administración de multi ADN-T (Multiplexación; **Fig. 2C**). Por lo tanto, los vectores binarios de la presente invención comprenden características que los hacen compatibles con métodos de ensamblaje basados en endonucleasa de restricción de Tipo IIS y en el solapamiento, y la administración de casetes de multiADN-T mediante el multiplexado de vectores binarios con orígenes compatibles (**Tabla 3**).

## **Ejemplo 2. Expresión de transgenes en plantas utilizando la serie de vectores pLX**

Para demostrar que los vectores binarios de la presente invención se pueden usar para administrar construcciones de ADN a células eucariotas, específicamente, células vegetales de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, una unidad de transcripción que comprende secuencias del promotor 35S del *virus del*

*mosaico de la coliflor*, la proteína fluorescente roja RFP (**Fig. 3A**) como indicador, y un terminador de la nopalina sintasa ( $P_{35S}:RFP:T_{nos}$ ) se ensambló en vectores pLX de la presente invención para obtener pLX-B2-TagRFP-T (SEQ ID NO: 13), pLX-B3-TagRFP-T (SEQ ID NO: 14) y pLX-B4-TagRFP-T (SEQ ID NO: 15), respectivamente

5 (**Fig. 3A**). Se divulgan anteriormente detalles para la generación de estos vectores. Se evaluó la expresión transitoria de RFP en hojas de *Nicotiana benthamiana* mediante la administración mediada por *A. tumefaciens*. A 6 dpa, las hojas que se infiltraron con pLX-B2-TagRFP-T (SEQ ID NO: 13), pLX-B3-TagRFP-T (SEQ ID NO: 14) y pLX-B4-TagRFP-T (SEQ ID NO: 15) mostraron una fluorescencia RFP brillante, que estuvo

10 ausente en la muestra del control (**Fig. 3B**). Las imágenes confocales mostraron que la señal de la proteína fluorescente RFP se distribuye en el citosol y en el nucleoplasma de las células vegetales (**Fig. 3C**), de forma consistente con la expresión vegetal genuina. Se confirmó la acumulación de RFP en los extractos de proteína total de las muestras de hojas mediante el análisis de inmunotransferencia

15 (**Fig. 3D**).

En algunas aplicaciones, es deseable la integración estable de los casetes de ADN-T en los genomas de las células eucariotas. Para demostrar la idoneidad de los vectores pLX para mediar la integración estable del transgén en los genomas vegetales, los inventores utilizaron *Arabidopsis thaliana* como planta modelo y el

20 vector pLX-B2- $P_{CRC}:mTFP1$  (SEQ ID NO: 23) (**Fig. 4A**). Se divulgan anteriormente los detalles de su síntesis.

La construcción se insertó en *A. tumefaciens* y se transformó en plantas mediante inmersión floral. De forma consistente con la expresión de mTFP1, fue detectable una fluorescencia de color cian brillante en semillas recogidas de plantas

25 tratadas con *Agrobacterium* (semillas  $T_1$ ). Se seleccionaron las semillas que expresaban mTFP1 con un estereoscopio de epifluorescencia, y se sembraron en suelo. Se confirmó la integración estable del transgén en células de la línea germinal mediante el análisis de las plantas  $T_1$  mediante PCR: se amplificó el promotor endógeno del gen de la cruciferina C ( $P_{CRC}$ ) a partir de plantas transformadas y no

30 transformadas, mientras que la secuencia mTFP1 solamente pudo amplificarse a partir de plantas derivadas de semillas con fluorescencia de color cian. Diversos fenotipos de fluorescencia de semillas  $T_2$  son consistentes con la integración del transgen en el genoma vegetal y su segregación a través de generaciones (**Fig. 4B**).

La presente invención muestra que se pueden administrar casetes de ADN-T



desde vectores pLX a plantas, y que se pueden utilizar vectores pLX para expresar transitoriamente o integrar de forma estable los transgenes en genomas de células eucariotas. Los inventores generaron plantas transgénicas que están "exentas de marcadores-ya que no incluyen genes que confieren resistencia a antibióticos, herbicidas u otros compuestos químicos utilizados en la selección de plantas transgénicas.

### **Ejemplo 3. Mantenimiento estable de casetes de ADN-T en una serie de plásmidos pLX binarios de la invención**

Se pueden insertar copias de ADNc de genomas de virus de ARN en plásmidos para generar clones de infecciones víricas, pero muestran a menudo problemas de inestabilidad, y surgen deleciones de secuencias en estos clones durante su propagación en bacterias. Para ensayar la estabilidad de los vectores binarios de pLX de la presente invención en condiciones desafiantes, los inventores transfirieron la secuencia de ADNc completa de genomas de potivirus en un vector pLX. Los vectores generados se propagaron en *Escherichia coli*, y las bacterias se sometieron a varios ciclos de crecimiento. Se evaluó la estabilidad del vector mediante los ensayos de digestión con enzima de restricción.

Por lo tanto, se obtuvo la secuencia completa de ADNc de un virus de ARN a partir de un vector basado en pBIN19, pSN-PPV (Pasin F., *et al.*, PLoS Pathog. 2014, 10, e1003985), que contiene el promotor 35S del *virus del mosaico de la coliflor*, una copia de ADNc del genoma del *virus de la sharka* (PPV) y las secuencias terminadoras de la nopalina sintasa ( $P_{35S}:PPV:T_{nos}$ ). Como se ha divulgado anteriormente, los inventores generaron pLX-PPV (SEQ ID NO: 21) un derivado de pLX-B2 con el casete  $P_{35S}:PPV:T_{nos}$  procedente de pSN-PPV (**Fig. 5A**). El vector pLX-PPV obtenido (SEQ ID NO: 21) tiene el origen pBBR1 (SEQ ID NO: 105), y es un 38% y 9,3 kb más pequeño que el vector pSN-PPV. Los plásmidos purificados a partir de dos clones independientes de pLX-PPV (In, #A y #B) se digirieron con EcoRI y se resolvieron mediante el gel de agarosa (**Fig. 5B**). En comparación con el perfil de digestión de pSN-PPV, los clones de pLX-PPV mostraron que todas las bandas correspondían con el casete del ADNc vírico de pSN-PPV. Las bandas de ADN de peso molecular elevado son consistentes con las diferencias en las cadenas de pSN-PPV y pLX-PPV, pBIN19 y pLX-B2, respectivamente. Los nuevos clones #A y #B de pLX-PPV (pLX-PPV, In) se transformaron en *E. coli* para evaluar la estabilidad del plásmido. Para

5 cada transformación, se repicaron ocho colonias individuales y se sometieron a seis ciclos de crecimiento (24 h, 37°C). Los plásmidos purificados se digirieron con EcoRI y se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa (pLX-PPV, Out; **Fig. 5B**). El plásmido pLX-PPV no mostró inestabilidad, ya que los perfiles de digestión de los plásmidos input y output fueron idénticos.

Para confirmar adicionalmente los resultados, se obtuvo la secuencia completa de ADNc procedente de un virus de ARN diferente a partir de un vector basado en pUC, p35Tunos-vec01-NAT1, que contiene el promotor 35S del *virus del mosaico de la coliflor*, una copia de ADNc del genoma del *virus del mosaico del repollo* (TuMV) y las  
 10 secuencias terminadoras de la nopalina sintasa (P<sub>35S</sub>:TuMV:T<sub>nos</sub>)(Tourinho A., *et al.*, Span. J. Agric. Res. 2008, 6, 48–58). El vector p35Tunos-vec01-NAT1 no puede replicarse en *A. tumefaciens*, y no incluye los límites del ADN-T para su transformación en plantas. Los inventores generaron pLX-TuMV (SEQ ID NO: 28), un derivado de pLX-B2 con el casete P<sub>35S</sub>:TuMV:T<sub>nos</sub> procedente de p35Tunos-vec01-NAT1 (**Fig. 5C**).  
 15 El vector pLX-TuMV (SEQ ID NO: 28) obtenido como se ha divulgado anteriormente, es solo algo más grande (3% y 0,4 kb) que el vector p35Tunos-vec01-NAT1, pero incluye el origen pBBR1 (SEQ ID NO: 105) y límites del ADN-T adecuados para su administración a plantas mediante la transformación mediada por *Agrobacterium*. El nuevo vector pLX-TuMV (SEQ ID NO: 28) (pLX-TuMV, In) se transformó en *E. coli*  
 20 para evaluar la estabilidad del plásmido. Para cada transformación, se repicaron diez colonias individuales y se sometieron a seis ciclos de crecimiento (24 h, 37°C). Los plásmidos purificados se digirieron con EcoRI y se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa (pLX-TuMV, Out; **Fig. 5D**). En concordancia con los resultados de pLX-PPV, el plásmido pLX-TuMV generado recientemente no mostró inestabilidad, ya que los perfiles de digestión de los plásmidos input y output fueron idénticos.  
 25

El presente ejemplo muestra que los vectores pLX de la presente invención pueden hospedar casetes de ADN-T >10 kb, y que se pueden usar para generar clones que contienen secuencias del genoma vírico. Se ha notificado que copias de ADNc de genomas de virus de ARN producen inestabilidad del plásmido y la pérdida  
 30 de secuencias de inserción parciales o completas. Por el contrario, los vectores pLX que hospedan copias del genoma de ADNc de virus de ARN vegetales no mostraron inestabilidad cuando se propagaron en la bacteria *E. coli*.

#### **Ejemplo 4. Agroinoculación vírica y administración de secuencias exógenas a**

**plantas que utilizan vectores víricos basados en pLX**

Los vectores binarios pLX-PPV (SEQ ID NO: 21) y pLX-TuMV (SEQ ID NO:28) del Ejemplo 3, si se expresan correctamente en plantas, producen un inicio de infección de un *virus de la sharka* (PPV) o *virus del mosaico del repollo* (TuMV) quiméricos, respectivamente. Estos virus quiméricos hospedarían en su genoma la secuencia de codificación de GFP (**Fig. 6A, 6E**), y la fluorescencia GFP podría medirse y visualizarse para demostrar la expresión de la secuencia exógena en plantas mediante vectores de expresión vírica.

Una cepa de *A. tumefaciens* que contiene pLX-PPV (pLX) (SEQ ID NO: 21) se infiltró en plantas de *N. benthamiana*, se utilizó una cepa pSN-PPV (pSN) (Pasin F., *et al.*, PLoS Pathog. 2014, 10, e1003985) como control positivo. Se confirmaron la infección por PPV y la acumulación vírica mediante análisis por inmunotransferencia de las proteínas del revestimiento en muestras de hojas agroinfiltradas y no inoculadas superiores (6 dpa y 14 dpa, respectivamente; **Fig. 6B**). Se confirmó la acumulación de GFP recombinante en muestras de plantas infectadas midiendo la intensidad de la fluorescencia (**Fig. 6C**) y se obtuvo una imagen de las hojas no inoculadas superiores (**Fig. 6D**). Para confirmar adicionalmente los resultados, una cepa de *A. tumefaciens* que contenía pLX-TuMV (SEQ ID NO: 28) se agroinoculó en plantas de *A. thaliana*. En concordancia con los resultados de pLX-PPV, la infección por TuMV y la acumulación vírica en muestras de hojas no inoculadas superiores, se confirmaron mediante el análisis por inmunotransferencia de proteínas del revestimiento de TuMV (**Fig. 6F**). La señal de fluorescencia verde brillante fue detectable en plantas inoculadas (**Fig. 6G**), confirmando la acumulación de GFP recombinante.

Por lo tanto, el presente ejemplo muestra que los vectores pLX binarios de la presente invención se pueden utilizar para diseñar mediante ingeniería genética clones víricos infecciosos, y vectores víricos. Estos se pueden administrar mediante agroinoculación, y utilizarse para introducir secuencias exógenas y expresar proteínas recombinantes en plantas.

**Ejemplo 5. Ensamblaje de la unidad transcripcional en vectores pLX de la invención utilizando estándares de biología sintética vegetal.**

Para demostrar la compatibilidad del vector pLX con los estándares de la biología sintética vegetal, se ensamblaron partes de ADN de bibliotecas publicadas en vectores pLX binarios de la presente invención.

Los plásmidos GB1181 y GB0460 que contienen unidades estandarizadas para administración a plantas de los genes de resistencia a la kanamicina (NptII) y la proteína fluorescente roja (DsRED), respectivamente, se obtuvieron de un depósito público (<https://gbcloning.upv.es/>). Como se ha descrito anteriormente, los inventores ensamblaron las unidades estandarizadas en el vector pLX-B2 (SEQ ID NO: 3), para generar el vector pLX-B2-NptII-DsRED (SEQ ID NO: 20) (**Fig. 7A**). El vector pLX-B2-NptII-DsRED (SEQ ID NO: 20) obtenido es un derivado de pLX-B2 con el origen pBBR1 (SEQ ID NO: 105) y dos unidades de transcripción para la expresión en plantas de NptII y DsRED.

Para confirmar adicionalmente los resultados, los inventores transfirieron las unidades estandarizadas de GB1108 (<https://gbcloning.upv.es/>) al vector pLX-B2 (SEQ ID NO: 3) para generar el vector pLX-B2-XT1-XT2-hCas9 (SEQ ID NO: 19) (**Fig. 7B**). El vector pLX-B2-XT1-XT2-hCas9 (SEQ ID NO: 19) obtenido es un derivado de pLX-B2 con el origen pBBR1 (SEQ ID NO: 105) y cuatro unidades de transcripción para la expresión en planta de NptII, un gen Cas9 de *Streptococcus pyogenes* con optimización de codones humanos (hCas9), y ARN de guía única dirigido a genes endógenos Niben101Scf04205Ctg025 (XT1) y Niben101Scf04551Ctg021 (XT2) de *N. benthamiana*. Se divulgan anteriormente los detalles para la generación del vector pLX-B2-XT1-XT2-hCas9. Para mejorar la flexibilidad de los vectores binarios de la presente invención y facilitar la reutilización de las partes de ADN ensambladas, los inventores generaron los vectores pLX-B2 $\alpha$ 2 (SEQ ID NO: 10), pLX-B3 $\Omega$ 1 (SEQ ID NO: 11) y pLX-B3 $\Omega$ 2 (SEQ ID NO: 12) con casetes de clonación GoldenBraid (Sarrion-Perdigones A., *et al.*, Plant Physiol. 2013, 162, 1618–1631) (**Fig. 7C, Tabla 3**). El vector pLX-B2 $\alpha$ 2 (SEQ ID NO: 10) es un derivado de pLX-B2 con el casete de clonación alfa2; el vector pLX-B3 $\Omega$ 1 (SEQ ID NO: 11) es un derivado de pLX-B3 con el casete de clonación omega 1; y el pLX-B3 $\Omega$ 2 (SEQ ID NO: 12) es un derivado de pLX-B3 con el casete de clonación omega2, se divulgan anteriormente los detalles para su generación. Junto con los plásmidos pLX-B2 de la presente invención, los vectores pLX-B2 $\alpha$ 2, pLX-B3 $\Omega$ 1 y pLX-B3 $\Omega$ 2 incluyen el origen de replicación procedente del plásmido pBBR1 (SEQ ID NO: 105) y un conjunto mínimo de dos casetes de clonación de nivel alfa y dos casetes de clonación de nivel omega con los sitios BsaI y BsmBI convergentes y divergentes (**Tabla 3**). Siguiendo los estándares de GoldenBraid (Sarrion-Perdigones A., *et al.*, Plant Physiol. 2013, 162, 1618–1631), estos casetes de clonación permiten reutilizar partes ensambladas y construir grandes construcciones

multigénicas.

Por lo tanto, basándose en los vectores pLX binarios descritos en la presente invención, los inventores generaron los vectores pLX-B2 $\alpha$ 2 (SEQ ID NO: 10), pLX-B3 $\Omega$ 1 (SEQ ID NO: 11) y pLX-B3 $\Omega$ 2 (SEQ ID NO: 12) (Tabla 3) que incluyen casetes de clonación para facilitar el ensamblaje combinatorio de los elementos de ADN prefabricados, unidades de transcripción en construcciones multigénicas.

### **Ejemplo 6. Clonación directa y ensamblaje de grandes construcciones de ADN-T en la serie de vectores pLX sin plásmidos intermedios.**

Este ejemplo demuestra que los vectores pLX binarios de la presente invención se pueden utilizar para ensamblar grandes construcciones de ADN-T sin etapas de subclonación intermedias.

Los inventores deseaban utilizar los vectores de la presente invención para generar un clon infeccioso del virus vegetal del mosaico marrón de la yuca ugandesa (UCBSV) ya que: (i) el genoma de UCBSV es una molécula de ARN grande de 9,1 kb; (ii) una copia del ADNc del genoma de UCBSV no está disponible en bibliotecas públicas de partes; (iii) la copia de ADNc del genoma de UCBSV contendría varios sitios de endonucleasa de restricción de Tipo IIS, cuya eliminación es necesaria para la domesticación de la parte y la clonación Golden Gate/GoldenBraid; (iv) la mutagénesis de la secuencia del genoma de UCBSV (por ejemplo, para eliminar los sitios Bsal/BsmBI) no es deseable o sus efectos sobre la viabilidad del virus son desconocidos; (v) el ensamblaje correcto del genoma de UCBSV en un vector pLX puede evaluarse fácilmente en plantas; (vi) UCBSV es una amenaza principal para los cultivos alimentarios básicos de yuca, y un clon infeccioso de UCBSV tendría aplicaciones comerciales ya que facilita cribados genéticos de resistencia en plantas.

Los inventores generaron el vector pLX-UCBSV (SEQ ID NO: 22), un derivado de pLX-B2 con un casete de un clon de ADNc del *virus del mosaico marrón de la yuca ugandesa* (P<sub>35S</sub>:UCBSV:T<sub>nos</sub>), mediante ensamblaje en una etapa de tres fragmentos de RT-PCR que abarcan el genoma completo de UCBSV de 9,1 kb (**Fig. 8A**). Se divulgan anteriormente los detalles para la generación del vector pLX-UCBSV.

Una cepa de *A. tumefaciens* que contiene pLX-UCBSV (SEQ ID NO: 22) se infiltró en plantas de *N. benthamiana*. A 12 dpa, las plantas agroinoculadas mostraron una altura reducida (**Fig. 8B**). En hojas superiores no inoculadas, los inventores detectaron partículas filamentosas típicas de viriones potivíridos (**Fig. 8C**), y

confirmaron la acumulación de proteína de revestimiento de UCBSV en análisis de inmunotransferencia (**Fig. 8D**). Estos resultados demostraron que una copia de ADNc de UCBSV se ensambló en vectores pLX para obtener pLX-UCBSV (SEQ ID NO: 22) que es un clon infeccioso del UCBSV que se puede administrar a plantas mediante  
 5 inoculación mediada por *Agrobacterium*.

Por lo tanto, los inventores ensamblaron construcciones de ADN-T grandes en vectores binarios pLX de la presente invención y este ensamblaje no requiere el uso de enzimas de restricción, la domesticación de partes, plásmidos intermedios y etapas de subclonación.

10

**Ejemplo 7. Comparación del vector pLX basado en pBBR1 de la presente invención con los vectores binarios RK2 y pVS1.**

En resumen, los vectores que utilizan el replicón procedente del plásmido RK2 incluyen pBIN19, y sus derivados pEAQ y pCB301 más pequeños (**Fig. 9**). Debido a  
 15 su tamaño reducido, pCB301 se clasifica como un minivector binario. Se utilizó el origen pVS1 en la serie pPZP, y sus derivados de las series pCAMBIA y pLSU. Los vectores pCAMBIA son unos de los vectores más habituales utilizados por los botánicos (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/585.html>). Un replicón pSa mínimo incluye las regiones *ori* y *RepA*. Estos se dividieron y se utilizaron en el sistema de  
 20 plásmido doble pGreen/pSoup: pGreen es un vector de ADN-T binario que hospeda la secuencia pSa-*ori*, y su replicación en *A. tumefaciens* no es autónoma ya que carece del gen pSa-*RepA*. El mantenimiento de pGreen en *A. tumefaciens* requiere la presencia simultánea del plásmido auxiliar pSoup, que proporciona el gen pSa-*RepA* y permite la replicación del vector pGreen binario (**Fig. 9**). La eliminación del gen *RepA*  
 25 permitió, por un lado, mantener el tamaño de pGreen en un mínimo, por la otra, sacrificó la autonomía de replicación del plásmido y promovió la inestabilidad en condiciones no selectivas.

Para demostrar que los vectores binarios pLX de la presente invención se pueden clasificar como minivectores binarios y adicionalmente son útiles para impulsar  
 30 una elevada expresión transitoria en plantas, los inventores compararon los vectores binarios pLX con los vectores binarios mencionados anteriormente conocidos en la materia.

En primer lugar, se comparó el tamaño de la cadena de pLX-B2 (SEQ ID NO: 3) y los mencionados vectores binarios conocidos en la técnica (**Fig. 9**). La cadena

basada en pBBR1 de los vectores pLX de la presente invención es sustancialmente más pequeña que los vectores basados en pBIN y pCAMBIA ampliamente utilizados (pBIN19, pCAMBIA-2300; **Fig. 9**). pLX-B2 (SEQ ID NO: 3) iguala los vectores basados en pGreen, que no son autónomos y requieren pSoup para su replicación en *A. tumefaciens*. Por el contrario, los vectores pLX facilitan diseños experimentales flexibles porque su replicación es autónoma tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens*.

pLX-B2 (SEQ ID NO: 3) se puede clasificar como un minivector binario ya que su tamaño está por debajo del de pCB301, un vector basado en RK2. Aunque más grande que pBBR1, el replicón de RK2 es relativamente pequeño y se ha utilizado previamente para generar minivectores binarios autónomos. Para comparar el comportamiento de los replicones de pBBR1 y RK2, los inventores sustituyeron el módulo de replicación pBBR1 (SEQ ID NO: 105) de los vectores pLX por un origen RK2 mínimo (SEQ ID NO: 106) para construir los vectores pLX-R2 (SEQ ID NO: 6), pLX-R3 (SEQ ID NO: 7) y pLX-R4 (SEQ ID NO: 8). Una unidad de transcripción que comprende el promotor 35S del *virus del mosaico de la coliflor*, RFP y las secuencias del terminador de la nopalina sintasa ( $P_{35S}:RFP:T_{nos}$ ) se insertaron en los vectores pLX-R2, pLX-R3 y pLX-R4 para obtener pLX-R2-TagRFP-T (SEQ ID NO: 16), pLX-R3-TagRFP-T (SEQ ID NO: 17) y pLX-R4-TagRFP-T (SEQ ID NO: 18), respectivamente (**Fig. 10A**). Se divulgan anteriormente los detalles para la generación de estos vectores.

Se evaluó la expresión transitoria de RFP en hojas de *Nicotiana benthamiana* mediante la administración mediada por *A. tumefaciens* de vectores pLX que incluyen los orígenes pBBR1 (**Fig. 3A**) o RK2 (**Fig. 10A**). En comparación con RK2, el uso de vectores pLX basados en pBBR1 conduce a una acumulación significativamente mayor de RFP en ensayos de expresión transitoria en plantas (**Fig. 10B**). El resultado fue independiente de los genes de resistencia utilizados para la selección del plásmido, y no se correlacionaron significativamente con la fluorescencia de *A. tumefaciens* que puede derivarse de una acumulación indeseada de RFP en bacterias (**Fig. 10B**).

Los plásmidos pCAMBIA tienen el origen pVS1, y son uno de los vectores de ADN-T binarios más utilizados habitualmente. Para comparar los vectores pLX y pCAMBIA, los inventores ensamblaron unidades normalizadas para administrar a plantas genes de resistencia a la kanamicina (NptII) y proteína fluorescente roja (DsRED) en vectores derivados de pLX-B2 (SEQ ID NO: 3), y pCAMBIA para obtener

pLX-B2-NptII-DsRED (SEQ ID NO: 20) y GB1686 (SEQ ID NO: 27), respectivamente (**Fig. 7A, 10C**). Las cepas de *Agrobacterium* que contienen pLX-B2-NptII-DsRED (pLX) (SEQ ID NO: 20) o GB1686 (SEQ ID NO: 27) se utilizaron en la transformación transitoria y estable de plantas de *N. benthamiana*. En comparación con GB1686, la  
 5 cadena de pLX-B2 aumentó significativamente la acumulación de DsRED en un ensayo de expresión transitoria. En ensayos de transformación estable, se obtuvieron un número similar de plántulas resistentes a la kanamicina que mostraron fluorescencia DsRED (**Fig. 10C**). El resultado indica que los vectores basados en pLX y pCAMBIA ensayados tienen una eficacia igual de transformación estable (**Fig. 10C**).

10 Por lo tanto, mientras que la eficacia de transformación estable de la presente invención y los vectores comercialmente disponibles es similar, los resultados de la expresión transitoria obtenidos mediante el uso de los vectores binarios basados en pBBR1 de la presente invención son mayores que los obtenidos mediante el uso de vectores binarios basados en RK2 y pVS1.

15

**Ejemplo 8. Administración de CRISPR/Cas y eficacia elevada en la edición del genoma de la planta utilizando la serie de vectores pLX de la presente invención.**

A fin de demostrar que los vectores binarios de la presente invención se pueden usar para administrar construcciones CRISPR/Cas e inducir también la  
 20 mutagénesis dirigida al genoma, se evaluó la expresión transitoria de los componentes de un sistema CRISPR/Cas en hojas de *N. benthamiana* mediante la administración mediada por *A. tumefaciens* del vector pLX-B2-XT1-XT2-hCas9 (pLX) (SEQ ID NO: 19) y GB1108, un vector derivado de pCAMBIA que tiene el origen pVS1 y comprende también unidades de transcripción idénticas de pLX-B2-XT1-XT2-hCas9 (SEQ ID NO:  
 25 19) (**Fig. 7C, 11A**). Se administró el gen hCas9 sin las secuencias de ARNsg como control (CTRL). En muestras infiltradas, se predijo que ocurriría la pérdida de los sitios BsmBI y SpeI en los loci XT1 y XT2 editados, respectivamente. Se confirmó la mutagénesis por la aparición de bandas resistentes a la escisión en los ensayos de PCR/digestión (**Fig. 11B**). En comparación con pDGB3 y consistente con los  
 30 resultados de la expresión transitoria de DsRED, el vector pLX mostró una eficacia de la mutagénesis mayor (**Fig. 11B**).

Por lo tanto, la mutagénesis del genoma obtenida mediante los vectores binarios de la presente invención es mayor que la obtenida mediante el uso de un vector binario basado en pVS1.



**Ejemplo 9. Multiplexación del vector binario de ADN-T utilizando la serie de vectores pLX de la presente invención**

Para demostrar que los vectores generados en el Ejemplo 1 pueden  
 5 multiplexarse con vectores binarios de ADN-T compatibles en células de *A. tumefaciens*, y administrarse a plantas, los inventores diseñaron el plásmido el vector pLX-Z4 (SEQ ID NO: 9). El pLX-Z4 es un novedoso vector de ADN-T de baja similitud de secuencia y compatible con los plásmidos pLX-B2 (SEQ ID NO: 3) y pLX-B3 (SEQ ID NO: 4) (**Fig. 12, Tabla 3**). pLX-B4 (SEQ ID NO: 5) y pLX-Z4 (SEQ ID NO: 9) no son  
 10 compatibles debido a que su selección se basa en el mismo antibiótico, gentamicina. Las características adicionales de pLX-Z4 (SEQ ID NO: 9) incluyen tamaño pequeño, replicación autónoma, y compatibilidad con la clonación dependiente de solapamiento y basada en la endonucleasa de Tipo IIS. El pLX-Z4 obtenido como se divulga anteriormente es un derivado de pLX-R4 mejorado con un casete de T-DNA\_2 (SEQ ID NO: 2), y carece de sitios BsmBI en los genes RK2-*trfA* y *aacC1*. Incorpora el origen de replicación RK2 (SEQ ID NO: 107), los terminadores del fago lambda ( $\lambda$  T1, SEQ ID NO: 110; y  $\lambda$  T2, SEQ ID NO: 111) y las secuencias límite del ADN-T de un pTi de tipo succinamopina, pTiBo542, y una segunda secuencia del límite izquierdo (**Fig. 12A**). A fines de clonación, el casete de ADN-T de pLX-Z4 incluye el indicador *lacZ $\alpha$* , sitios  
 20 BsaI divergente y BsmBI convergente, y regiones de hibridación del cebador sin similitud de secuencias y estructuras secundarias que permiten la linealización de la cadena principal mediante PCR inversa. pLX-B2 (SEQ ID NO: 3) muestra una similitud de la secuencia mínima con la cadena principal de pLX-Z4 (SEQ ID NO: 9) (**Fig. 12B**). Los análisis de secuencias más extensos predijeron que los vectores pLX basados en pBBR1 descritos en los Ejemplos 1 y 5 se multiplexarían con pLX-Z4, y una matriz amplia de vectores binarios usada habitualmente por botánicos (**Fig. 12C**).

Para facilitar la multiplexación del vector, los inventores caracterizaron una cepa de *A. tumefaciens* desactivada (C58C1-313) que es sensible a los antibióticos habitualmente utilizados en la selección de plásmidos: el crecimiento de C58C1-313 se  
 30 inhibió por la presencia de ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina, kanamicina o espectinomocina (**Fig. 13A**). Se amplificó un fragmento pTi-*repB* a partir de células C58C1-313 utilizando los cebadores 2050\_F (SEQ ID NO: 30)/2051\_R (SEQ ID NO: 31), y se secuenció. El análisis filogenético mostró que C58C1-313 hospeda un plásmido Ti de tipo octopina, que se retuvo de forma estable (**Fig. 13B**,

C). Por lo tanto, C58C1-313 es una cepa de *A. tumefaciens* desactivada del tipo octopina que es adecuada para el uso simultáneo de múltiples plásmidos, ya que muestra sensibilidad a varios antibióticos. Para confirmar los resultados, la cepa C58C1-313 se transformó secuencialmente con los derivados de pLX-B2 y pLX-Z4 divulgados en la presente invención, que incluyen, respectivamente, el origen pBBR1 (SEQ ID NO: 105) y el gen de resistencia a la kanamicina o el origen RK2 (SEQ ID NO: 107) y el gen de resistencia a gentamicina (**Fig. 13D**). Una cepa C58C1-313 que hospeda simultáneamente los derivados de pLX-B2 y pLX-Z4 mostró resistencia a la kanamicina y la gentamicina, y creció en un medio suplementado con estos antibióticos (**Fig. 13D**). En las mismas condiciones, se inhibió el crecimiento de la cepa C58C1-313, que no incluye vectores, (CTRL; **Fig. 13D**).

En el Ejemplo 2, el vector pLX-B2-P<sub>CRC</sub>:mTFP1 (SEQ ID NO: 23) con el origen pBBR1 (SEQ ID NO: 105) y resistencia a kanamicina se utilizó para impulsar la expresión de la semilla del mTFP1 con fluorescencia cian. Con esteresocopios de epifluorescencia se pueden tomar imágenes de fluorescencia cian y roja sin solapamiento de la señal. Los inventores generaron el vector pSN.5-P<sub>PAP85</sub>:RFP (SEQ ID NO: 26) (**Fig. 14A**), un derivado de pCAMBIA con el origen pVS1, resistencia a la espectinomomicina y una unidad de transcripción que contiene secuencias de un promotor específico de la semilla de *A. thaliana* procedente de un gen de la proteína de almacenamiento de la semilla (PAP85; AT3G22640), RFP y las terminadoras de la nopalina sintasa (P<sub>PAP85</sub>:RFP:T<sub>nos</sub>). Se divulgan anteriormente los detalles para la generación del vector pSN.5-P<sub>PAP85</sub>:RFP.

Para mostrar que los vectores de la presente invención (Ejemplo 1) pueden multiplexarse con vectores binarios comercialmente disponibles, los inventores utilizaron un sistema de dos vectores/una cepa para transformar *A. thaliana*. Los vectores binarios de ADN-T pLX-B2-P<sub>CRC</sub>:mTFP1 (SEQ ID NO: 23) y pSN.5-P<sub>PAP85</sub>:RFP (SEQ ID NO: 26) se insertaron en *A. tumefaciens* C58C1-313 (**Fig. 14A**), y se transformaron en plantas mediante inmersión floral. De forma consistente con los resultados del Ejemplo 2 y la expresión de mTFP1, la fluorescencia cian fue detectable en semillas recogidas de plantas tratadas con *Agrobacterium* (**Fig. 14B**). El 53% de las semillas que expresan mTFP1 mostraron también fluorescencia roja derivada mediante la expresión de RFP (**Fig. 14B**).

Estos resultados indican que los vectores binarios de la presente invención pueden multiplexarse con vectores compatibles, y utilizarse en un sistema de dos

vectores/una cepa para administrar múltiples y diversos casetes de ADN-T a células vegetales.

**Ejemplo 10. Control de la expresión génica y administración de componentes del circuito sintético a plantas que utilizan la multiplexación de vectores binarios**

5 Los inventores utilizaron un interruptor de la expresión química, para ensayar si los vectores binarios de la presente invención y la estrategia de multiplexación descrita en el Ejemplo 9 podría aplicarse para la administración de componentes del circuito sintético a plantas y para regular la expresión génica. Se seleccionó etanol como inductor químico del interruptor de la expresión debido a su potencial en la investigación fundamental y a las aplicaciones de biotecnología comercial.

10 Se diseñó un novedoso promotor sintético  $P_{EtOH}$  (SEQ ID NO: 35) que está activado por AlcR de *Aspergillus nidulans* en presencia de etanol. El promotor  $P_{EtOH}$  (SEQ ID NO: 35) incluye múltiples sitios de unión al ADN de AlcR derivados de los promotores *alcM*, *alcR*, *aldA*, *alcA*, y un promotor 34S mínimo del *virus del mosaico de la escrofularia* (**Fig. 15A**). Se diseñó una puerta lógica SI sensible a etanol para detectar el etanol como entrada, y para producir una proteína fluorescente verde brillante (NEON salida; **Fig. 15B**). Para evaluar el sistema de dos vectores/una cepa bacteriana para administrar los componentes del circuito sintético, los elementos de la puerta se distribuyeron en los vectores pLX-Z4- $P_{mas}$ :RFP-AlcR seleccionable por gentamicina (SEQ ID NO: 24) y pLX-B2- $P_{EtOH}$ :NEON (SEQ ID NO: 25) seleccionable por kanamicina, que tienen los orígenes RK2 y pBBR1 respectivamente (**Fig. 15C**). pLX-Z4- $P_{mas}$ :RFP-AlcR (SEQ ID NO: 24) codifica RFP (utilizado como control de la expresión) y el factor de transcripción AlcR de *A. nidulans* bajo el promotor de la manopina sintasa ( $P_{mas}$ ), que dirige la expresión constitutiva en plantas; mientras que el pLX-B2- $P_{EtOH}$ :NEON (SEQ ID NO: 25) codifica la secuencia NEON bajo  $P_{EtOH}$ , un promotor sintético activado por AlcR en presencia del inductor (**Fig. 15C**). Se divulgan anteriormente los detalles para la generación del vector.

25 Los plásmidos se introdujeron secuencialmente en C58C1-313 de *A. tumefaciens* y se seleccionaron utilizando medios con gentamicina más kanamicina para obtener la cepa R-AlcR +  $P_{EtOH}$ :NEON. La cepa R-AlcR +  $P_{EtOH}$ :NEON se infiltró en hojas de *N. benthamiana*, y las plantas se trataron con agua o etanol. Como se anticipaba, aunque que la fluorescencia RFP era visible en ambas condiciones, la fluorescencia NEON era significativamente mayor en presencia del inductor de la

puerta lógica (**Fig. 16A**). La modelización del circuito requiere la caracterización cuantitativa de las partes genéticas. Para ensayar si el sistema de expresión de dos vectores/una cepa es compatible con los análisis del rendimiento medio, se recogieron discos de hojas procedentes de hojas infiltradas con R-ALCR + P<sub>EtOH</sub>:NEON, y se colocaron en placas de 96 pocillos para evaluar las respuestas de la puerta lógica. A las 24 h después del tratamiento (hpt), la función de la puerta lógica se mantuvo en los discos de hojas, ya que se detectó fluorescencia NEON solo en presencia de la entrada de la puerta lógica (**Fig. 16B**). La cuantificación de la intensidad de la fluorescencia de salida en discos de hojas intactas mostró una capacidad de respuesta y sensibilidad de la puerta adecuadas, ya que el etanol al 0,1% fue suficiente para estimular una inducción > 200 veces (**Fig. 16C**). La detección de NEON no requiere lisis o etapa de adición de sustrato, lo que permitió medir la cinética de la puerta lógica en un ensayo de lectura continua. En las condiciones ensayadas, la relación de la intensidad de la fluorescencia NEON/RFP fue significativamente mayor que el control del agua a 1,5 hpt y alcanzó una meseta a 15 hpt (**Fig. 16D**).

Los resultados muestran que los vectores binarios pLX basado en pBBR1 y pLX basado en RK2 de la presente invención se pueden utilizar para controlar la expresión génica en plantas, y acoplarse para permitir la administración del multiADN-T de *A. tumefaciens* a un sistema de dos plásmidos/una cepa. El sistema de vectores binarios de la presente invención es adecuado para la administración de componentes del circuito genético, y su caracterización cuantitativa en una escala de rendimiento medio.

**REIVINDICACIONES**

1. Un vector binario que comprende:
  - 5 i. un módulo casete de ADN-T que comprende al menos una secuencia límite derecho y una secuencia límite izquierdo de ADN-T,
  - ii. un módulo origen de replicación que comprende un origen pBBR1 o una variante funcionalmente equivalente del mismo, y
  - iii. al menos un módulo marcador seleccionable.
  
- 10 2. Un vector binario de acuerdo con la reivindicación 1 donde el módulo casete de ADN-T comprende un límite derecho de ADN-T y dos límites izquierdos de ADN-T.
  
3. Un vector binario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde el límite derecho de ADN-T comprende la SEQ ID NO: 102 o la SEQ ID NO:  
15 115, y el borde izquierdo comprende la SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 y/o la SEQ ID NO: 116.
  
4. Un vector binario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la región ADN-T está flanqueada por al menos dos terminadores de la  
20 transcripción.
  
5. Un vector binario de acuerdo con la reivindicación 4 donde el terminador transcripcional comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, y cualquier combinación de las mismas.  
25
  
6. Un vector binario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde los límites de ADN-T flanquean una secuencia de interés.
  
7. Un vector binario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6  
30 donde la región ADN-T comprende un casete de clonación.
  
8. Un vector binario de acuerdo con la reivindicación 7 donde el casete de clonación de ADN T comprende una endonucleasa de restricción de Tipo IIS y sitios de hibridación del cebador compatibles con métodos de clonación de alto rendimiento

basados en endonucleasas y solapamiento.

9. Un vector binario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde el origen pBBR1 comprende la SEQ ID NO: 105.

5

10. Un vector binario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde el marcador seleccionable se selecciona entre cualquiera de la lista que consiste en: genes de resistencia a fármacos, genes de resistencia a herbicidas, genes de resistencia a compuestos tóxicos, genes que codifican productos necesarios para el crecimiento de las células y genes de proteínas fluorescentes.

10

11. Un vector binario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde el marcador seleccionable es un gen de resistencia a fármaco seleccionado entre el grupo que consiste en genes de resistencia a ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, tetraciclina, gentamicina, espectinomicina, bleomicina, fleomicina, estreptomicina, eritromicina y blastidina.

15

12. Un vector binario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 y la SEQ ID NO: 28.

20

13. Un vector binario que comprende

- a) un primer vector binario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y
- b) un segundo vector binario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 donde el módulo origen pBBR1 se ha sustituido por cualquiera de los orígenes de replicación seleccionados de la lista que consiste en: orígenes del grupo de incompatibilidad con el plásmido IncQ, IncW, IncU, pRi, pVS1 e IncP- $\alpha$ .

25

30

14. Un sistema de vectores binarios de acuerdo con la reivindicación 13 donde el

origen de replicación del segundo vector binario se selecciona de orígenes del grupo de incompatibilidad con el plásmido IncP- $\alpha$ .

5 15. Un sistema de vectores binarios de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14 en donde el origen de replicación del segundo vector binario el origen RK2.

10 16. Un sistema de vectores binarios de acuerdo con la reivindicación 15 donde el módulo origen RK2 comprende la SEQ ID NO: 106 o la SEQ ID NO: 107.

15 17. Un sistema de vectores binarios de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 donde el segundo vector binario se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 24.

18. Una célula hospedadora bacteriana que comprende el vector binario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o el sistema de vectores binarios de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17.

20 19. Una célula hospedadora bacteriana de acuerdo con la reivindicación 18 que es *Agrobacterium sp.*, o *Escherichia coli*.

25 20. Un cultivo celular que comprende la célula bacteriana hospedadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19.

21. Método para administrar al menos una secuencia de nucleótidos de interés a al menos una célula vegetal que comprende:

30 (a) insertar al menos una secuencia de nucleótidos de interés en el vector binario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o en el sistema de vectores binarios de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17,

(b) introducir el vector binario o el sistema de vectores binarios de la etapa (a) en al menos una célula hospedadora bacteriana, y

(c) poner en contacto la célula hospedadora de la etapa (b) con al menos

una célula vegetal.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 21, donde la célula bacteriana hospedadora es una célula de *Agrobacterium sp.*

5

23. El método de acuerdo con la reivindicación 23, donde la célula de *Agrobacterium* comprende un plástido Ti desactivado.

24. Método para la administración *in vitro* de al menos una secuencia de nucleótidos de interés a al menos una célula u organismo eucariota, que comprende:

10

(a) insertar al menos una secuencia de nucleótidos de interés en el vector binario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o en el sistema de vectores binarios de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17,

15

(b) introducir el vector binario o el sistema de vectores binarios de la etapa (a) en al menos un célula u organismo eucariota.

25. El método de acuerdo con la reivindicación 24 donde la célula u organismo eucariota se selecciona del grupo que consiste en levaduras, hongos, insectos y animales.

20

26. Método para obtener una planta o célula vegetal diseñada mediante ingeniería genética que comprende la etapa de introducir el vector binario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, el sistema de vectores de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 o la célula bacteriana hospedadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19, en una célula vegetal.

25

27. El método de acuerdo con la reivindicación 26, donde la célula bacteriana hospedadora es una célula de *Agrobacterium sp.*

30

28. El método de acuerdo con la reivindicación 27, donde la célula de *Agrobacterium* comprende un plástido Ti desactivado.

29. Una célula vegetal o planta diseñada mediante ingeniería genética que se



puede obtener por el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28.

5 30. Método para obtener *in vitro* una célula u organismo eucariota diseñado mediante ingeniería genética que comprende la etapa de introducir el vector binario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, el sistema de vectores de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en una célula u organismo eucariota.

10 31. Método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 30, donde el célula u organismo eucariota diseñado mediante ingeniería genética se selecciona del grupo que consiste en una célula de levadura, una célula fúngica, una célula de insecto, y una célula animal.

15 32. Una célula u organismo eucariota diseñado mediante ingeniería genética que se puede obtener por el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30 a 31.

20 33. Uso *in vitro* o *ex vivo* del vector binario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, el sistema de vectores binarios de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, la célula hospedadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19, el cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 20, la planta o célula vegetal diseñada mediante ingeniería genética de acuerdo con la reivindicación 29, o la célula u organismo eucariota diseñado mediante ingeniería  
25 genética de acuerdo con la reivindicación 32:

- a) para inactivación génica específica del sitio;
- b) para edición del genoma específica del sitio;
- c) para interferencia específica de la secuencia de ADN;
- d) para edición del epigenoma específica del sitio;
- 30 e) para modulación transcripcional específica del sitio; o
- f) para diseño mediante ingeniería del genoma multiplexado.

34. Kit que comprende el vector binario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, el sistema de vectores binarios de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, la célula bacteriana hospedadora de acuerdo con

cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19, el cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 20, la planta o célula vegetal diseñada mediante ingeniería genética de acuerdo con la reivindicación 29, o la célula u organismo eucariota diseñado mediante ingeniería genética de acuerdo con la reivindicación 32.

5

10

Fig. 1

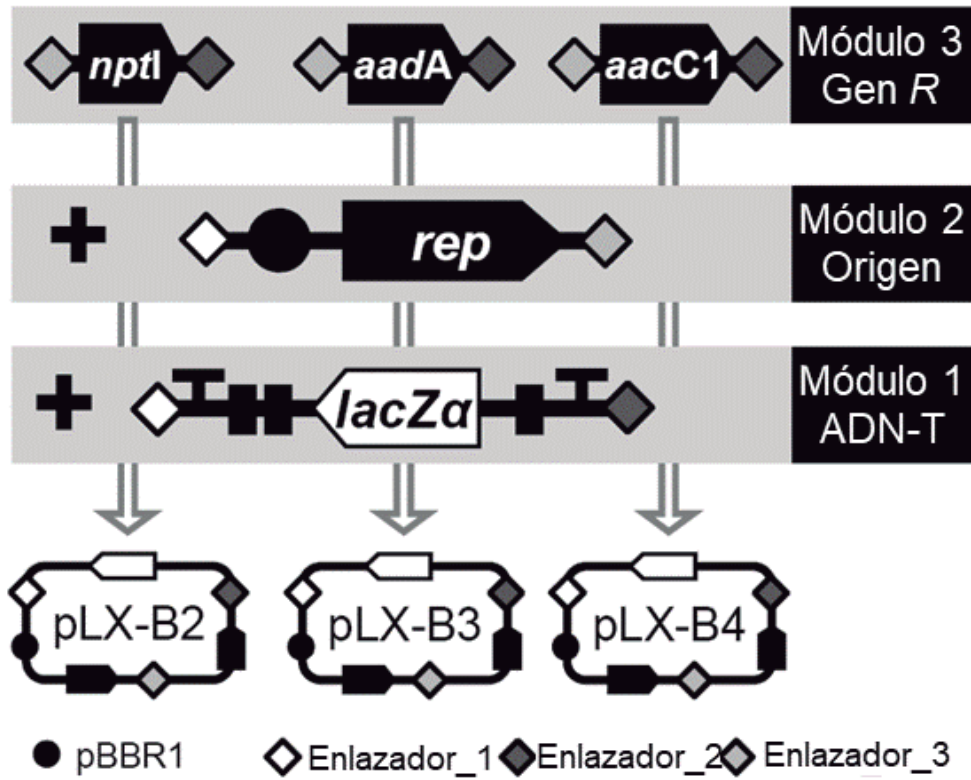


Fig. 2

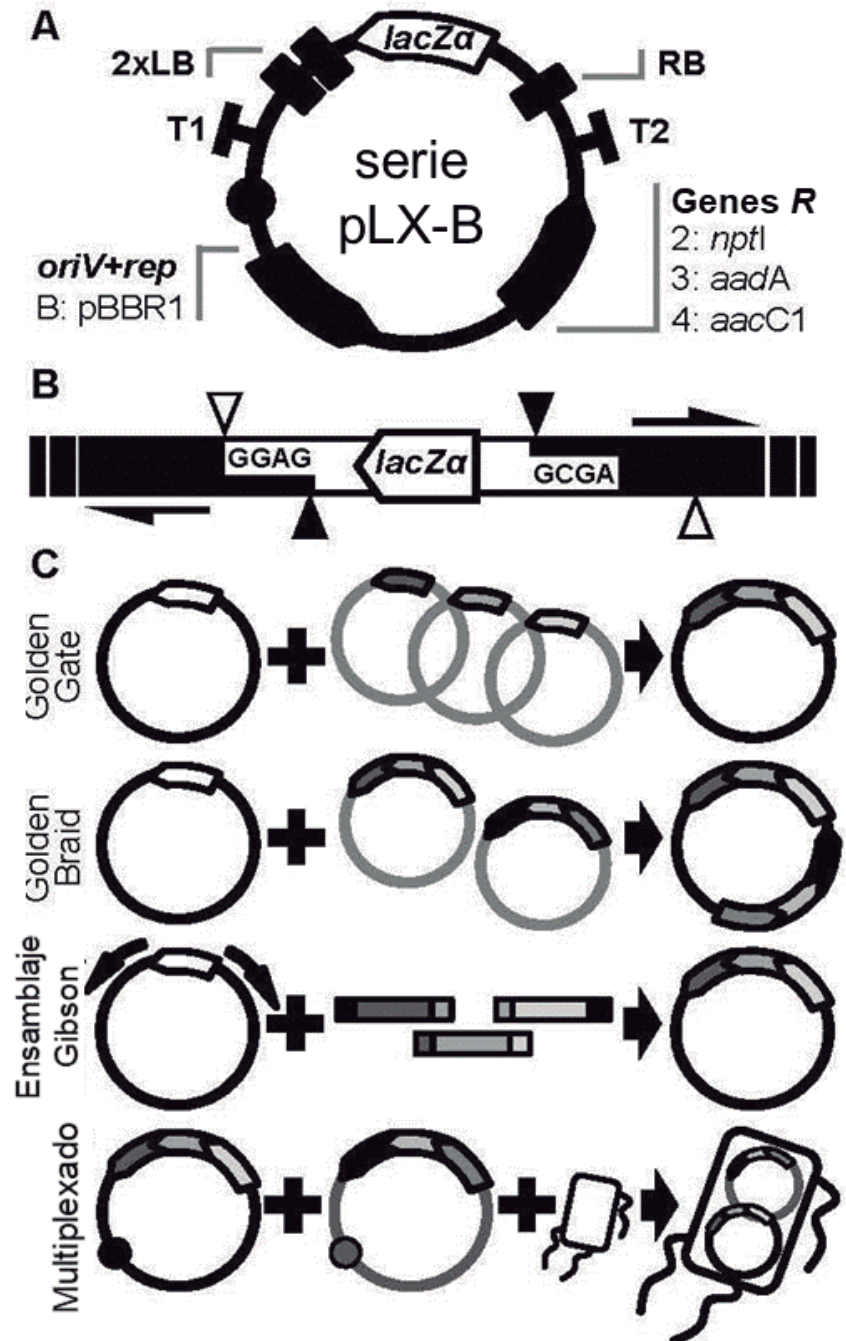


Fig. 3.

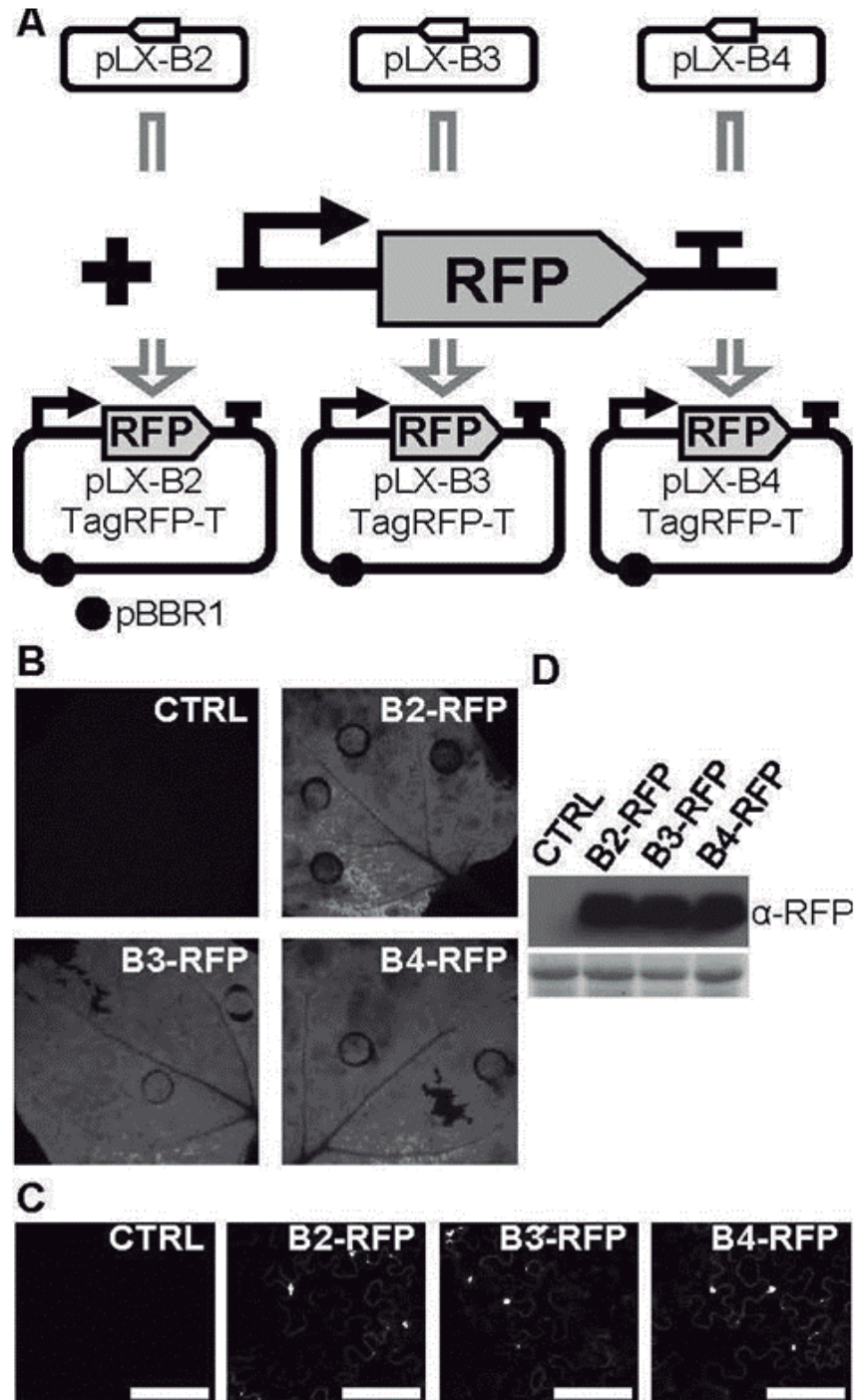


Fig. 4

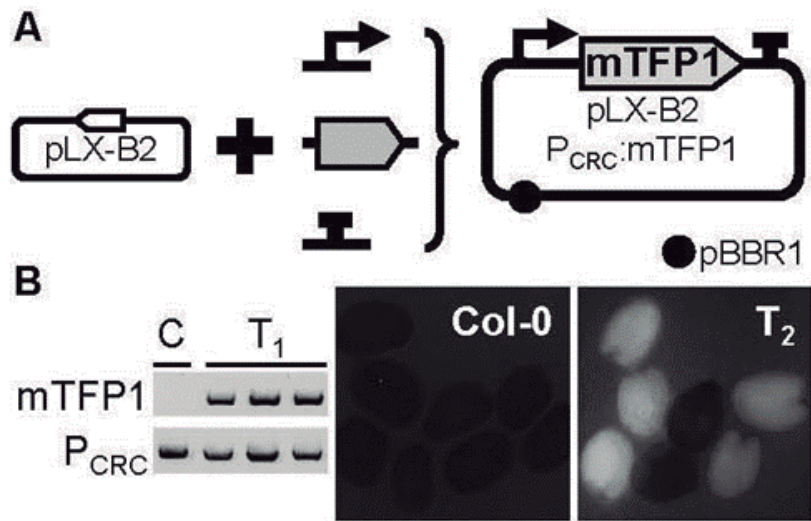


Fig. 5

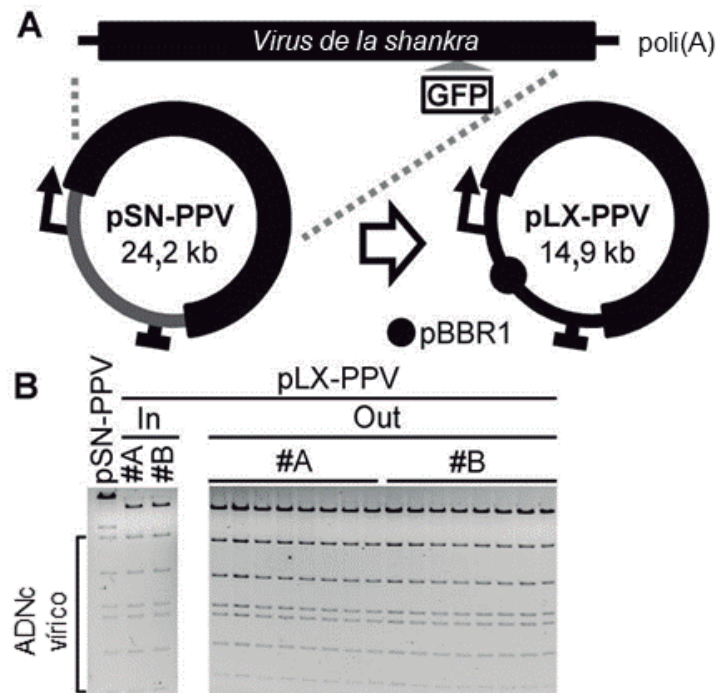


Fig. 5 (cont.)

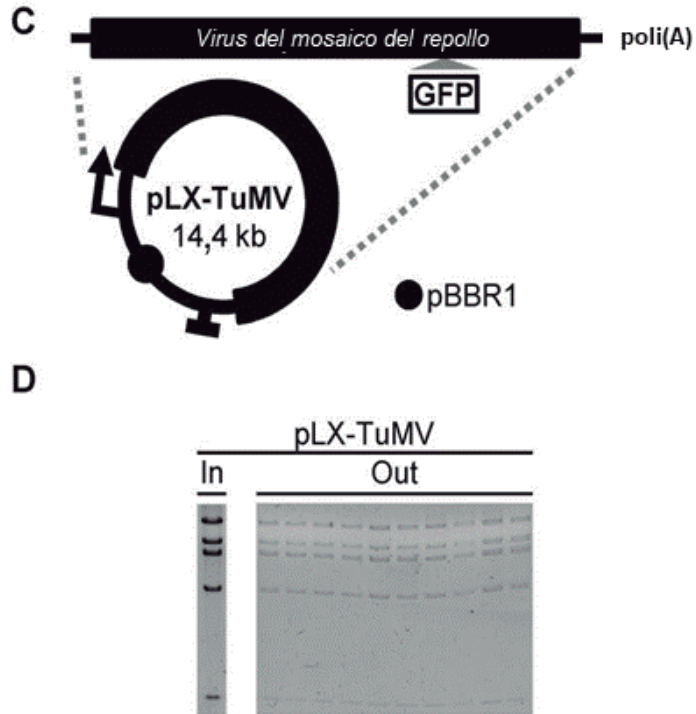


Fig. 6

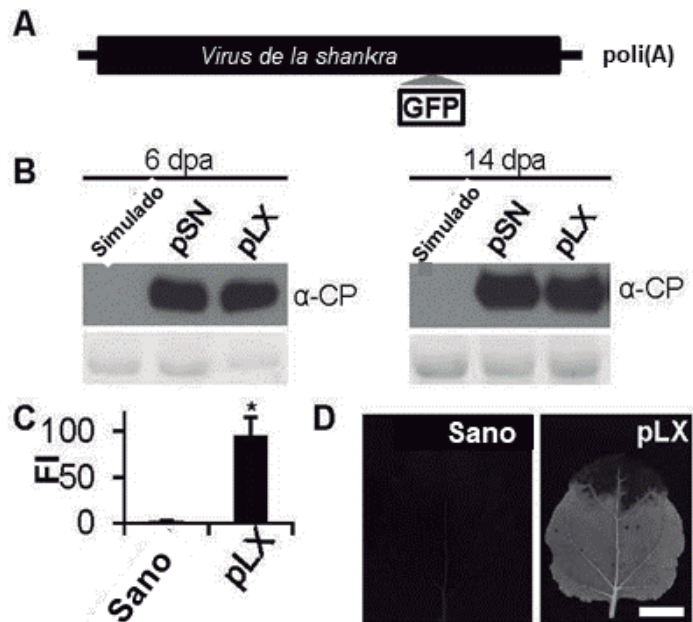


Fig. 6 (cont.)

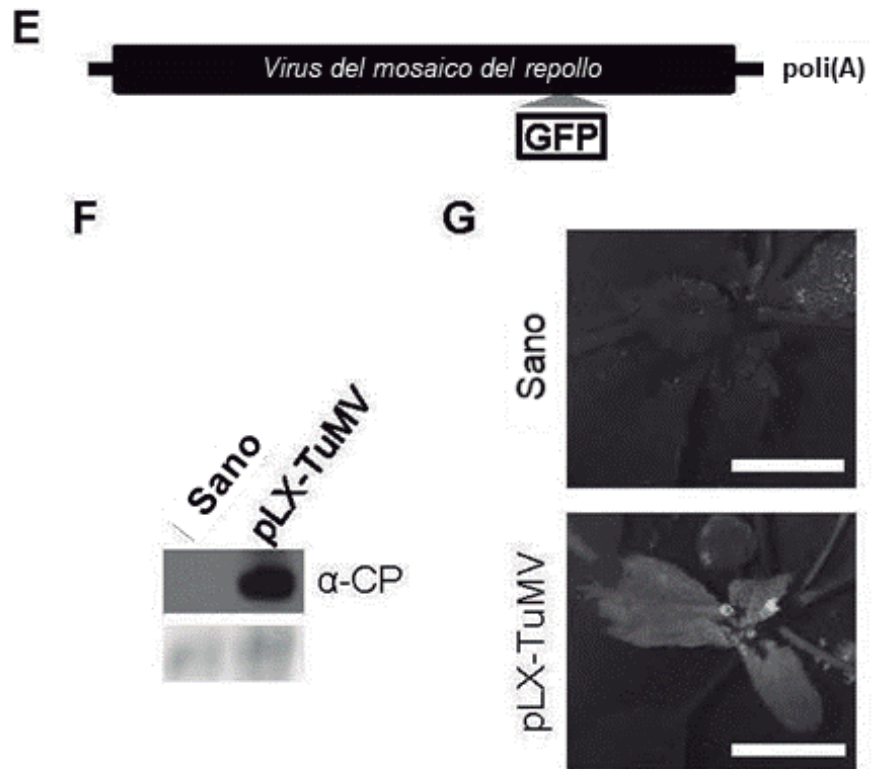




Fig. 7

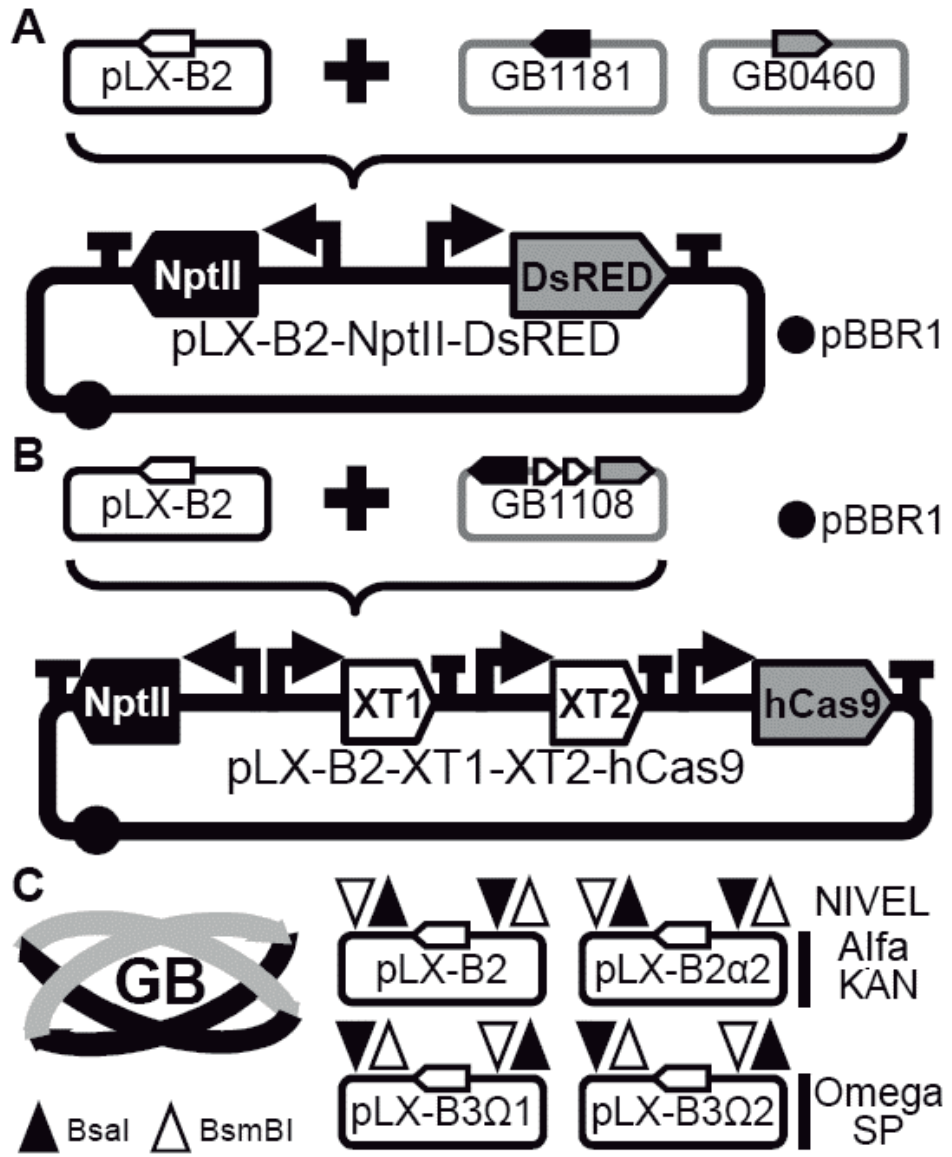


Fig. 8.

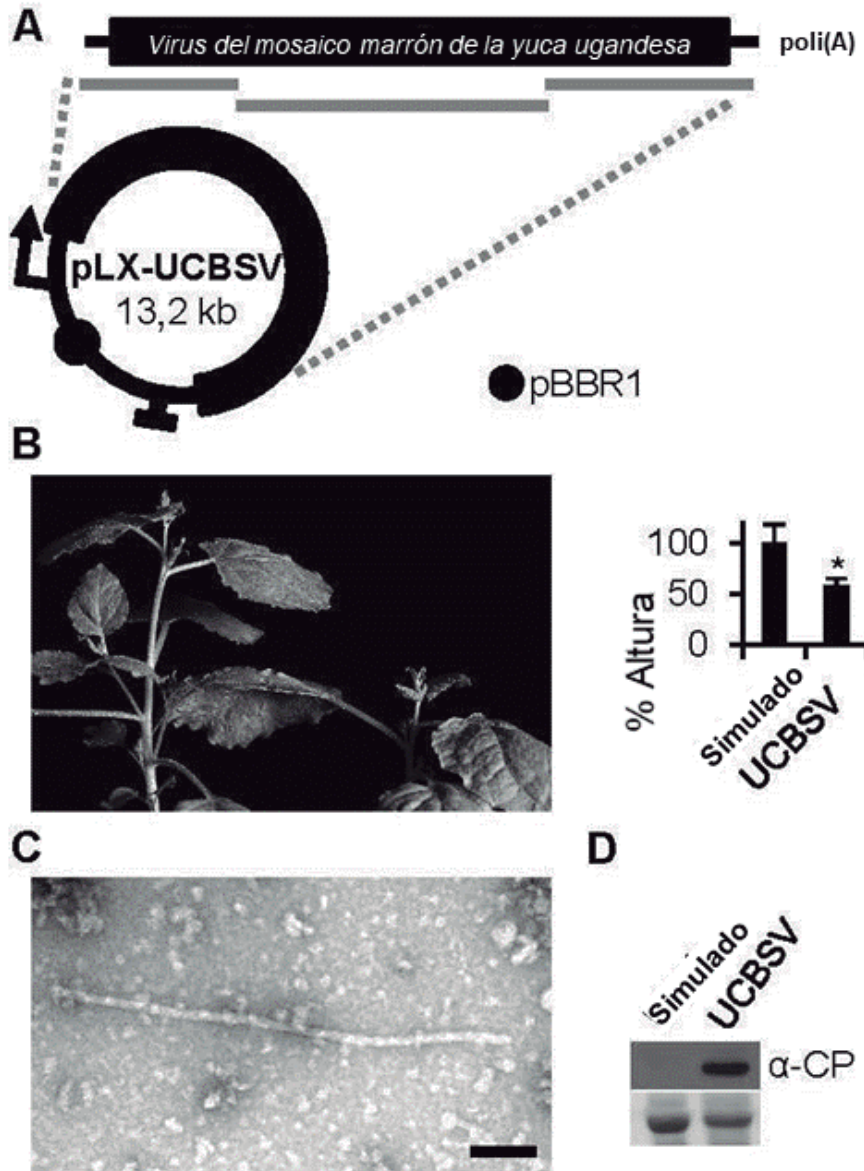


Fig. 9

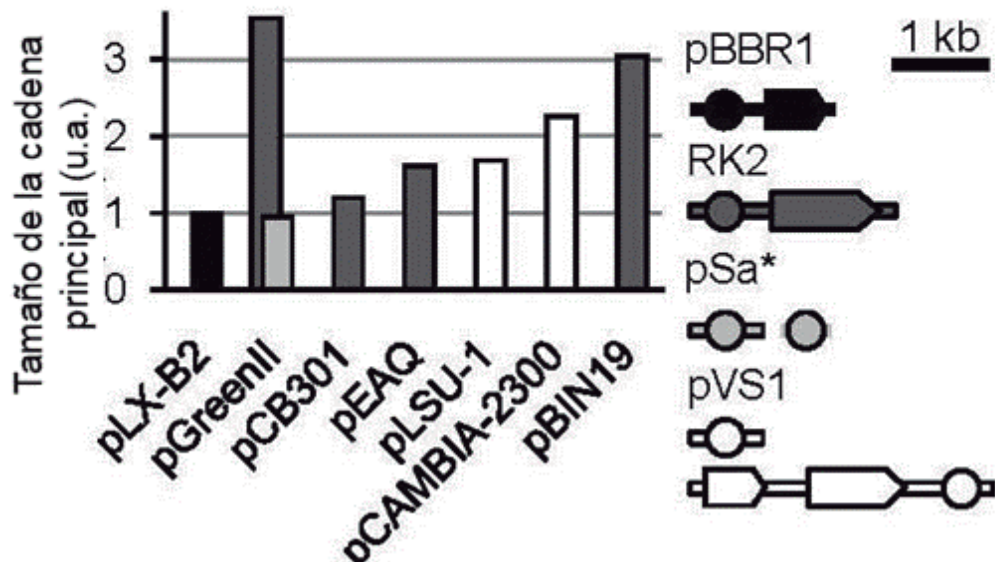


Fig. 10

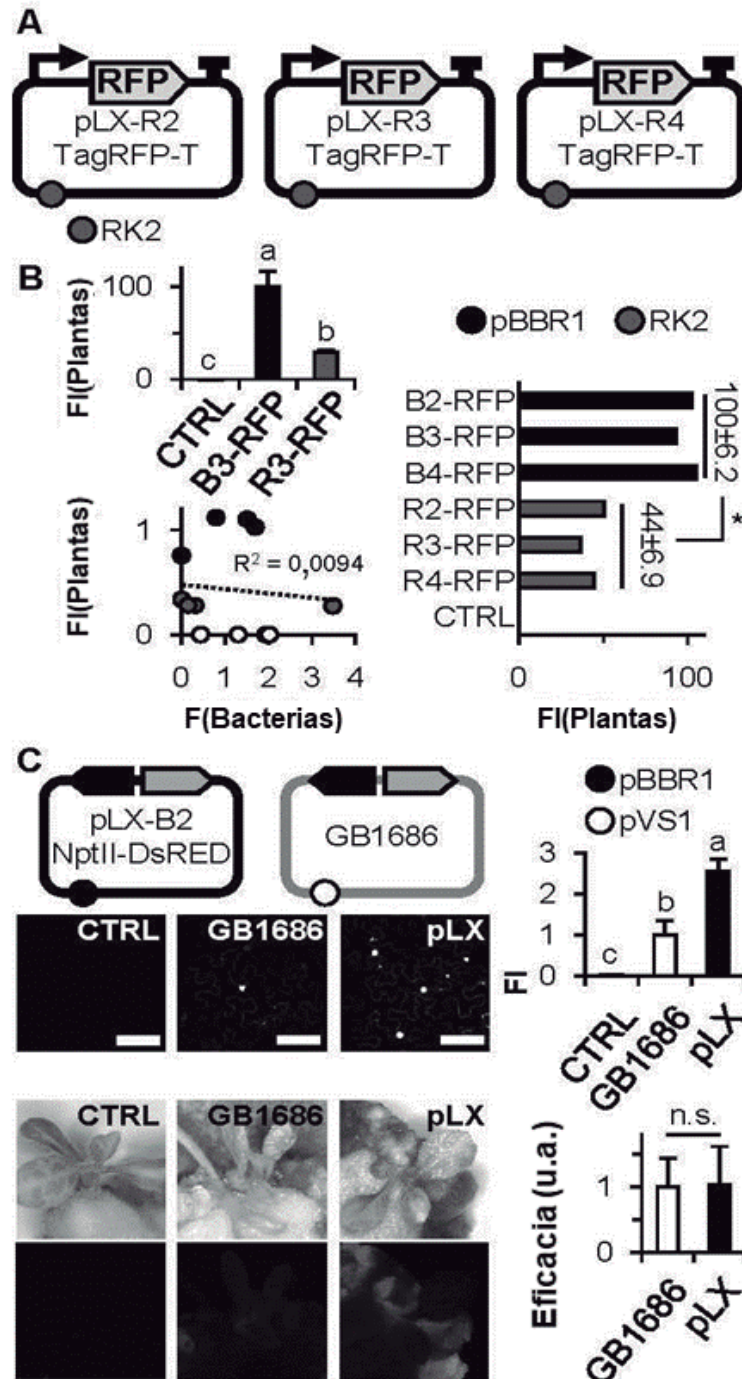


Fig. 11

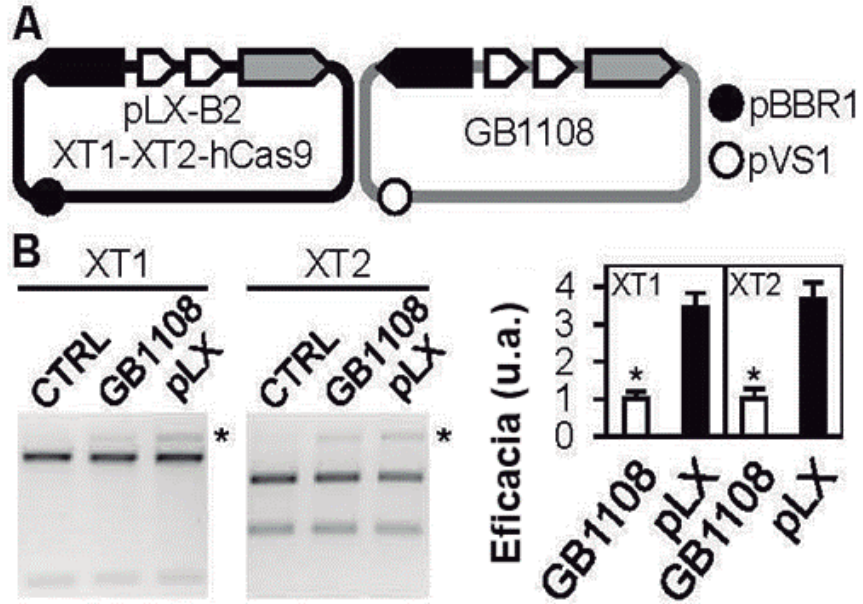


Fig. 12

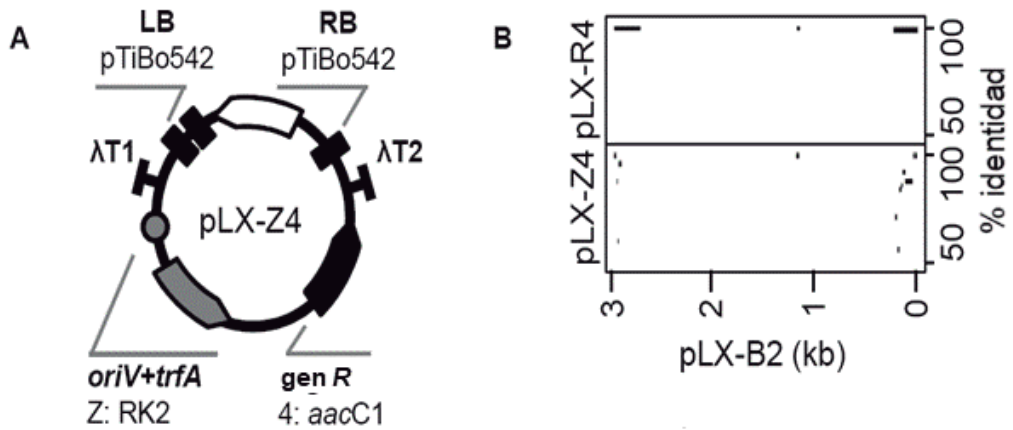


Fig. 12 (cont.)

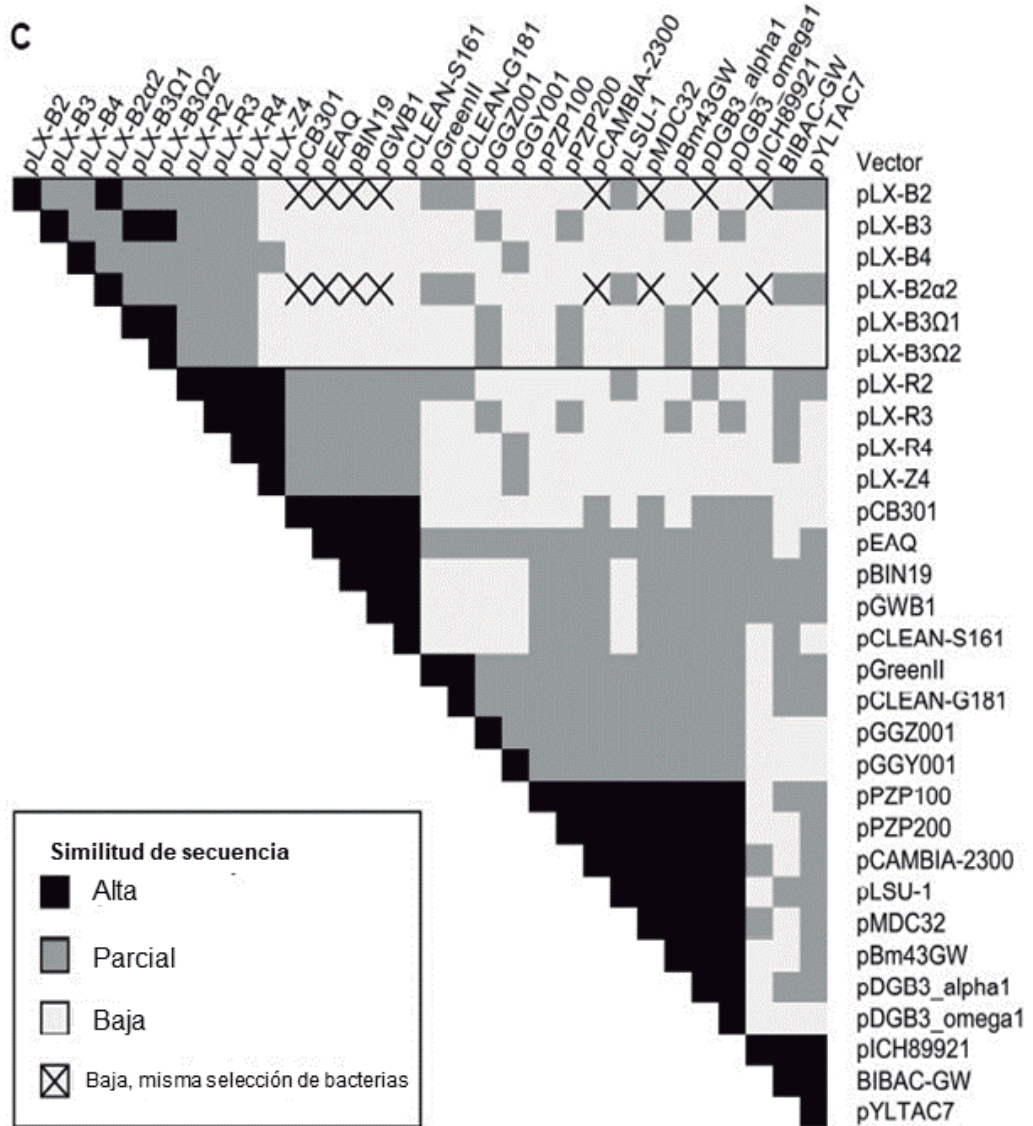
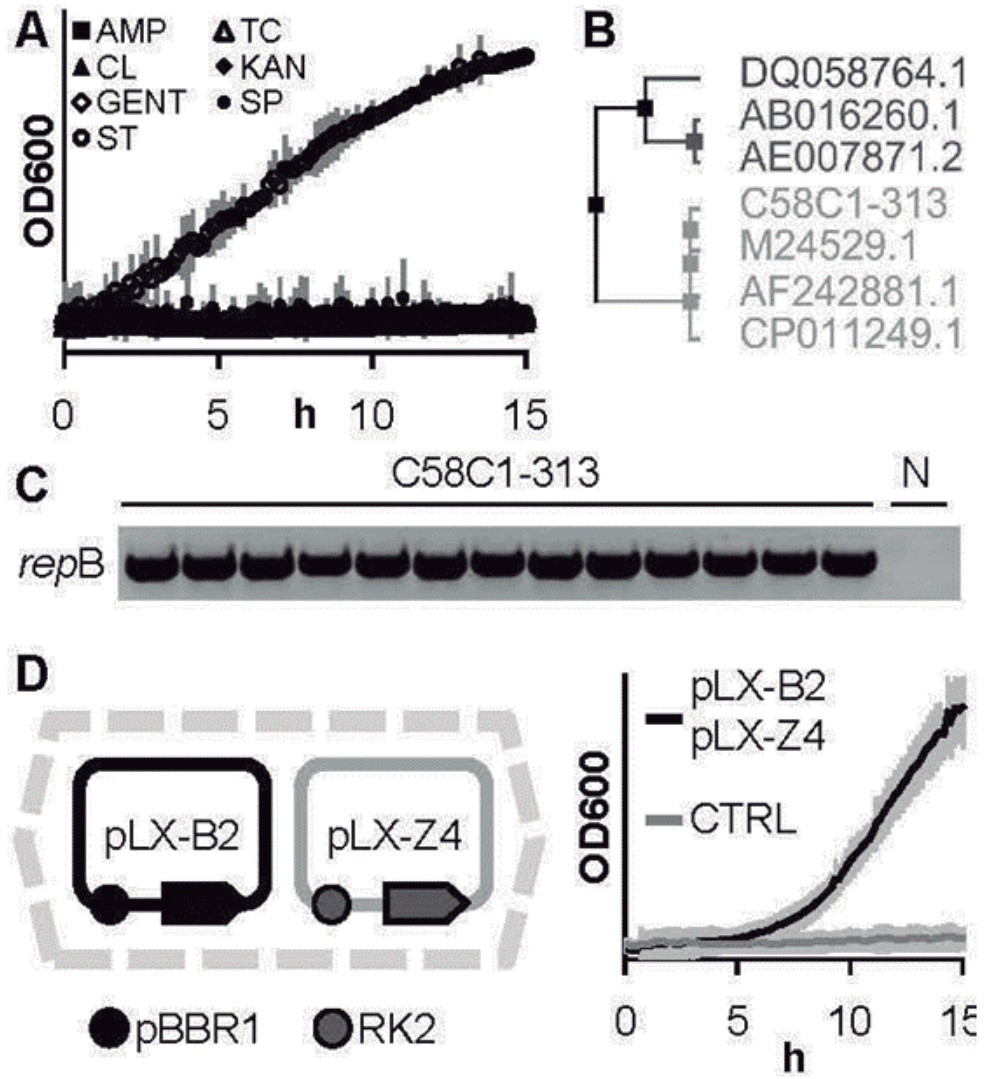


Fig. 13



**Fig. 14**

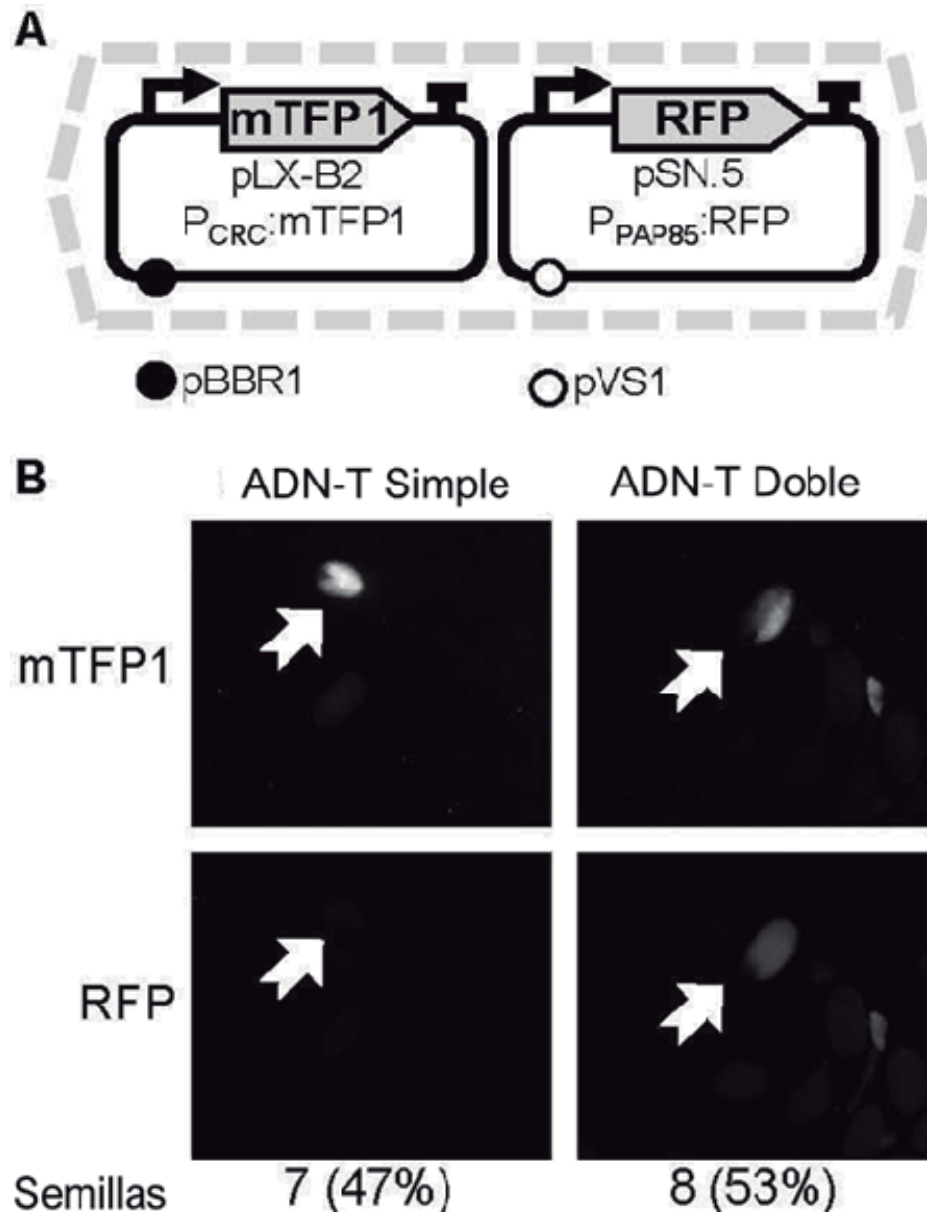
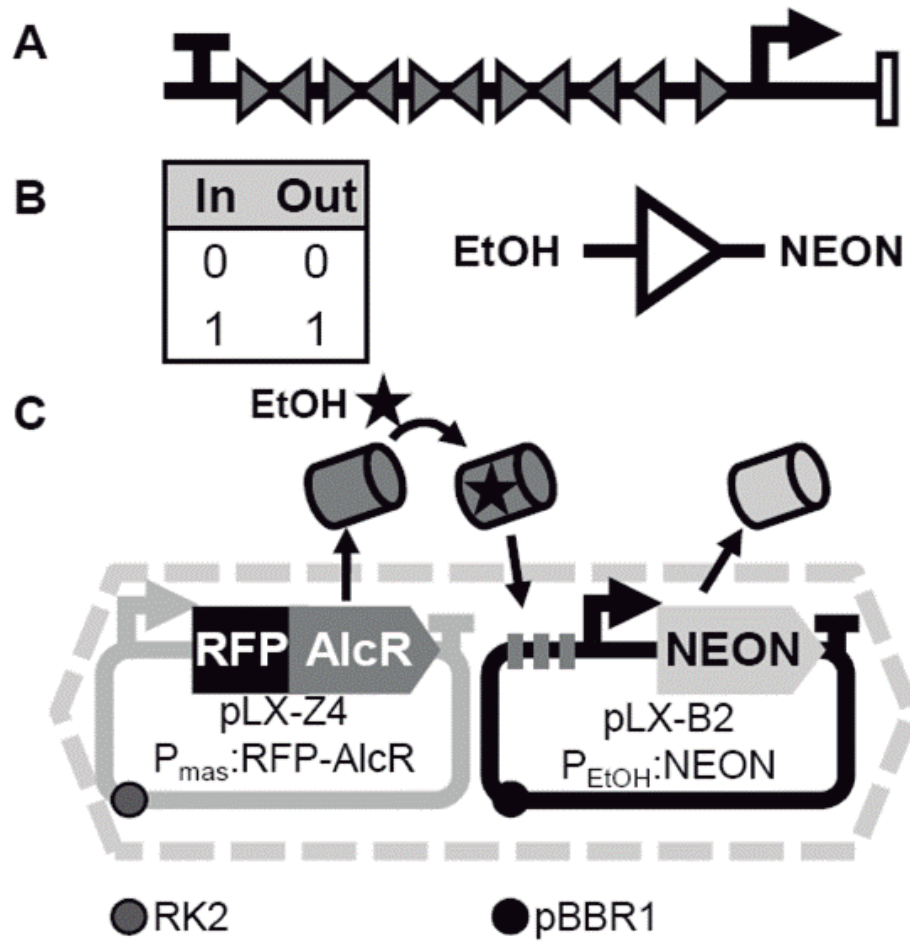
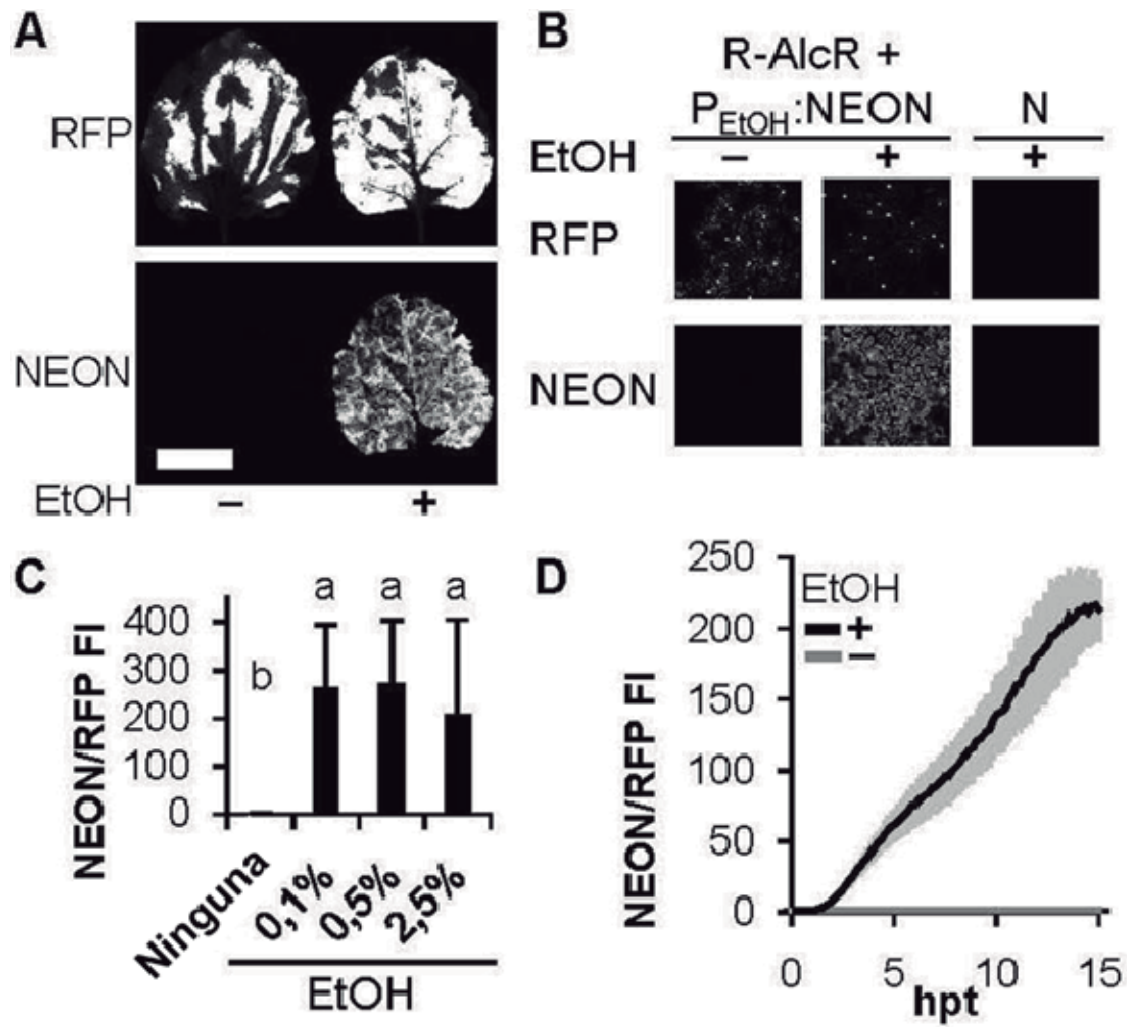




Fig. 15



**Fig. 16**





- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201730792  
 ②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 12.06.2017  
 ③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **C12N15/82** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2017/040343 A1 (PIONEER HI-BRED INT INC [US]; DU PONT [US]) 09/03/2017, páginas 1 - 59; ejemplos 1, 2, 7, 15,	1-11, 13-34
A	THOLE V. et al. The pCLEAN Dual Binary Vector System for <i>Agrobacterium</i> -Mediated Plant Transformation. <i>Plant Physiology</i> , 12/2007, Vol. 145, Páginas 1211-1219. (Todo el documento)	1-34
A	KOMARI T. et al. Binary Vectors and Super-binary Vectors. <i>Methods in Molecular Biology</i> , 2006, Vol. 343, Páginas 15-41. (Todo el documento)	1-34
A	DALEY M. et al. Co-transformation with one <i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants. <i>Plant Cell Reports</i> , 1998, Vol. 17, páginas 489-496. (Todo el documento)	1-34

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
08.03.2018

Examinador  
M. Cumbreño Galindo

Página  
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS, XPESP, XPOAC, EBI, TXTE