

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 033**

51 Int. Cl.:

**A01H 1/00** (2006.01)

**A01H 1/04** (2006.01)

**C12N 9/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/NL2013/050939**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14104878**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13818830 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2938184**

54 Título: **Método para eliminar un ligamiento genético en una planta**

30 Prioridad:

**27.12.2012 US 201261746399 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**21.03.2019**

73 Titular/es:

**KEYGENE N.V. (100.0%)  
P.O. Box 216  
6700 AE Wageningen, NL**

72 Inventor/es:

**BUNDOCK, PAUL y  
STUURMAN, JEROEN**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 705 033 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para eliminar un ligamiento genético en una planta

**Campo de la invención**

5 [0001] La presente divulgación se refiere al campo de las plantas, en particular a los campos de mejora vegetal y genética vegetal. Más en particular, la divulgación concierne la metodología inventiva que puede ser útil en mejorar las propiedades de las plantas.

**Estado de la técnica**

10 [0002] La recombinación produce la nueva ordenación de genes por varios mecanismos tales como distribución y segregación, entrecruzamiento, conversión génica y transformación. La recombinación en plantas puede ocurrir en numerosas etapas en el desarrollo de las plantas. Hay dos clases diferentes principales de recombinación en células vegetales, recombinación homóloga (RH) y unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés). La vía de recombinación RH implica reorganizaciones entre moléculas de ADN que comparten la misma secuencia de ADN, ya sea en el mismo cromosoma o en diferentes. Esto contrasta con la vía de NHEJ, que es capaz de generar reorganizaciones entre cualquier molécula de ADN, independientemente de cualquier homología de ADN entre ellas. Se cree que la vía de RH está activa en todos los tipos diferentes de células vegetales, por ejemplo, la RH juega un papel esencial en la formación de gametos por promoción de cruces entre cromátidas hermanas para la correcta segregación de cromosomas y la recombinación de diferentes alelos parentales (RH meiótica). La vía de RH está activa también en células mitóticas donde está principalmente implicada en la reparación del daño del ADN en un locus que utiliza la información de secuencia presente en el locus homólogo no dañado (RH mitótica). Este puede estar presente en el mismo cromosoma o en uno diferente que el locus dañado. La vía de NHEJ está activa también en células tanto meióticas como mitóticas y es muy eficaz en la unión de extremos de ADN no homólogos. Una de las diferencias principales entre las vías de RH y de NHEJ es la fidelidad del proceso. Mientras que la RH entre secuencias de ADN relacionadas produce una recombinación en la que se conserva la secuencia de ADN de ambas moléculas/ambos locus, la vía de NHEJ genera frecuentemente mutaciones pequeñas en la posición donde ocurre la recombinación, que puede ser mutagénica en sí misma.

25 [0003] La mejora vegetal implica la selección de plantas parentales óptimas que luego se cruzan y la progenie de este cruce con características de crecimiento mejoradas se selecciona. La mejora vegetal ha sido muy exitosa durante los últimos 100 años en la domesticación de una amplia gama de especies de plantas y la mejora significativa del rendimiento y la calidad de productos vegetales.

30 [0004] Esto se ha conseguido a través de la selección de la variación alélica que proporciona mejoras tanto en el cultivo de plantas como en los rasgos de consumo. Típicamente, un cruce se realiza entre dos plantas parentales para producir la progenie híbrida F1 que se autofecunda luego para crear alelos homocigóticos y la progenie resultante F2 se criba para el fenotipo de interés. Cuando las plantas se cruzan para formar el híbrido (F1), la recombinación (cruces) ocurre entre los diferentes cromosomas homólogos de las plantas parentales durante la meiosis, redistribuyendo la información genética aportada por cada progenitor.

35 [0005] La recombinación durante la meiosis (RH meiótica) es un proceso (semi)aleatorio dependiente de la homología que produce gametos masculinos y femeninos que llevan cada uno conjuntos diferentes de alelos de las plantas parentales. Si se desea una combinación particular de locus parentales en la progenie, entonces deben cribarse muchos individuos para seleccionar aquellos que han heredado los alelos parentales deseados. El cribado se puede realizar basado solamente en el fenotipo o, como suele ser el caso, usando marcadores moleculares estrechamente ligados al/a los alelo(s) de interés. Este método de mejora asistida por marcadores (MAB) tiene la ventaja de que las plantas de una población F2 se pueden cribar en una fase de crecimiento temprana de modo que no es necesario mantener poblaciones grandes de plantas maduras y también se pueden cribar para la presencia de muchos marcadores ligados a alelos múltiples. Por lo tanto, está claro que el proceso de recombinación meiótica es el principal impulsor en la mejora vegetal y que los procesos que afectan a esta pueden llevar a cuellos de botella en el proceso de mejora.

40 [0006] Se espera que la población mundial total aumente significativamente en las próximas décadas y hay una comprensión de que el rendimiento de muchos cultivos también debe aumentar utilizando al mismo tiempo la misma área de tierra cultivable y usando menos recursos tales como agua y fertilizante. La mejora vegetal tiene un gran papel a jugar en la mejora del rendimiento de cultivos a través de la introducción de alelos nuevos presentes en el germoplasma. Sin embargo, la mejora vegetal convencional ha llevado a una reducción en la cantidad total de variación alélica presente en las plantas cultivadas, ya sea a través de la selección consciente contra los rasgos que fueron vistos como deletéreos o a través de la pérdida inconsciente de alelos debido a la

falta de presión de selección en la variación que se consideró neutral en ese momento. Debido a la variación alélica reducida en especies cultivadas, es improbable que los alelos nuevos que pueden conferir tales rasgos, como nuevas resistencias bióticas y abióticas, estén presentes en el germoplasma cultivado. Una fuente posible de tales alelos está en el germoplasma silvestre no adaptado. El germoplasma silvestre ha sido de uso general para mejorar el germoplasma de especies cultivadas cuando las condiciones de crecimiento o las preferencias del consumidor cambian y el acervo génico existente no tiene la variación genética necesaria para satisfacer las necesidades cambiantes. El éxito del uso de germoplasma silvestre depende de varios factores, tales como la amplitud de variación a la que se puede acceder a través de cruces (por ejemplo, incompatibilidad de plantas, barreras de especies), la velocidad a la que se puede transferir la nueva variación genética para abordar las necesidades rápidamente cambiantes y, finalmente, cuánta variación se puede transferir a partir de unas especies silvestres sin la transferencia de efectos negativos severos (arrastré por ligamiento). El arrastre por ligamiento puede describirse como la presencia de un ligamiento genético entre dos locus, por ejemplo, uno deseable y el otro indeseable, en el mismo cromosoma. A consecuencia de este ligamiento genético, los dos locus se heredan juntos durante la meiosis normal. Desafortunadamente, con los métodos disponibles en la técnica, eliminar el ligamiento genético entre tales genes deseados y no deseados en una planta, y obtener una planta con solo los genes deseados y los rasgos asociados, ha resultado ser difícil, lento y, en varios casos, imposible.

[0007] La meiosis es responsable de la formación de gametos reducidos (óvulos o polen) que contienen la mitad del complemento genético de la planta parental. Durante la meiosis, la recombinación meiótica ocurre entre los cromosomas parentales dando como resultado una mezcla de alelos parentales de modo que los gametos llevan combinaciones diferentes de locus parentales que producen patrones diferentes de variación genética en las plantas de la progenie. La recombinación meiótica ocurre normalmente entre las regiones eucromáticas de los cromosomas parentales donde hay un alto grado de similitud, tanto a nivel estructural como de ADN. Es bien conocido en la literatura que la recombinación (cruces) entre cromosomas parentales se inhibe en regiones que son estructuralmente diferentes (tales como deleciones, inserciones o inversiones grandes) o falta de identidad de secuencia de ADN. Este es un problema menor cuando los progenitores se derivan a partir de un linaje común y son, por lo tanto, genéticamente similares, pero se convierte en un problema mayor cuando se consideran cruces con germoplasma silvestre que probablemente sea más diverso genéticamente que las líneas cultivadas. En tales casos, las regiones en las que los cruces pueden ocurrir entre los cromosomas del germoplasma silvestre y el germoplasma cultivado se inhiben por las diferencias estructurales anteriormente mencionadas en el ADN. Cuando se realiza un cruce entre líneas de plantas con germoplasma cultivado y silvestre, se seleccionan plantas F2 que llevan los alelos deseados y luego estas se retrocruzan múltiples veces con la línea de planta cultivada, mientras se continúa para seleccionar plantas que llevan el/los alelo(s) de germoplasma silvestre deseado(s), para aumentar el porcentaje del genoma aportado por el progenitor cultivado, mientras se disminuye el porcentaje del genoma del progenitor silvestre. En una situación ideal, esto dará lugar a una planta con el genoma del progenitor cultivado, pero que lleva un locus pequeño (introgresión) del germoplasma silvestre. Como se ha indicado antes, este proceso de retrocruce es completamente dependiente de la recombinación meiótica normal que ocurre entre locus de los dos progenitores. Sin embargo, debido a la presencia de diferencias estructurales y de secuencia entre los progenitores, la recombinación meiótica se puede suprimir, lo que lleva a la presencia de introgresiones grandes del germoplasma silvestre que no pueden reducirse (Canady et al. (2006) *Genetics* 174, 1775-1788).

[0008] Como la recombinación meiótica está suprimida en tales regiones, los retrocruzamientos posteriores no tienen éxito en la disminución del tamaño de las introgresiones. Esto puede ser un problema particular cuando tanto el rasgo positivo deseado como también un rasgo negativo se sitúan en la introgresión, ya que estos no pueden separarse fácilmente usando la recombinación meiótica. Esto explica por qué hay a menudo arrastre por ligamiento que no puede romperse fácilmente en las introgresiones derivadas de germoplasma silvestre. El enfoque tomado normalmente para romper tal arrastre por ligamiento es cribar muchas más plantas de lo normal para un evento de recombinación entre los dos locus. Esto es a veces posible, pero puede ser muy caro y no tiene garantía de éxito, ya que se desconoce el grado de supresión de la recombinación. Hay muchos ejemplos de introgresiones en las que no se produce recombinación adicional a pesar de serios esfuerzos para cribar poblaciones de plantas muy grandes. Varias publicaciones (por ejemplo, WO03/104451 y WO00/54574) han descrito métodos para aumentar la RHM en plantas, que pueden aumentar la probabilidad de obtener los eventos de recombinación raros en regiones de recombinación meiótica suprimida, como en regiones con arrastre por ligamiento. Sin embargo, los métodos descritos en estas publicaciones proponen tratamientos que mejoran la vía de RH entre todos los locus homólogos en la célula, lo que es indeseable en el material de mejora. Además, estos tratamientos también son a menudo intrínsecamente mutagénicos, lo que altera la secuencia de ADN en todo el genoma y llevan a fenotipos imprevisibles. Por ejemplo, la publicación EP0270120 enseña que el arrastre por ligamiento puede romperse por el crecimiento de células vegetales en cultivo de tejidos en un medio que contiene niveles altos de un regulador de crecimiento de plantas mutagénico. Como con las otras publicaciones, afectará al índice de recombinación en todo el genoma y, así, las plantas generadas por este método serán inapropiadas para otra mejora.

[0009] Por lo tanto, hay una necesidad clara en la técnica de una metodología reproducible y más fácil que permita la manipulación del genoma de las plantas, en particular en procesos de mejora, y en particular que permita la rotura/eliminación del ligamiento genético entre dos locus en el mismo cromosoma, en particular donde tales locus están ambos localizados en una parte del cromosoma donde la recombinación está suprimida.

## 5 **Problemas resueltos por la presente invención**

[0010] Sorprendentemente, descubrimos que la necesidad identificada anteriormente en el estado de la técnica puede resolverse usando la vía de NHEJ para inducir un evento de recombinación específicamente solo en la introgresión con el arrastre por ligamiento y evitando alterar los índices de recombinación o de mutación en el resto del genoma. De hecho, en esta invención revelamos un uso nuevo de la vía de NHEJ en la mejora vegetal, específicamente para romper el arrastre por ligamiento. Aquí revelamos un método que se puede aplicar en células vegetales somáticas y permite crear una translocación por NHEJ en cualquier posición específica entre cromosomas homólogos u homeólogos, por ejemplo, en un híbrido F1. La metodología se puede usar para una amplia gama de aplicaciones de mejora, por ejemplo, con el fin de eliminar el arrastre por ligamiento, con el fin de una manipulación dirigida de genomas poliploides, con el fin de la producción de introgresiones a medida, con el fin de un mapeo fino simplificado y con el fin de generar fusiones de genes.

[0011] En más detalle, la invención implica la introducción de roturas de doble cadena, por ejemplo, usando nucleasas específicas de sitio (incluidos sistemas de nucleasa), en células vegetales, incluidos protoplastos vegetales. Las nucleasas específicas de sitio se pueden dirigir a secuencias idénticas específicas en la posición correspondiente en ambos cromosomas homólogos. Estas inducen luego una rotura de doble cadena de ADN en cada cromosoma que, con una frecuencia inesperadamente alta (en aprox. el 0,8% de las células), se vuelven a unir dando como resultado un intercambio de brazos cromosómicos, que conduce a una translocación dirigida inducida. Una importante ventaja adicional de este método es que solo requiere instalaciones de cultivo de tejidos para identificar los eventos de recombinación deseados en vez de cribar grandes poblaciones de plantas para identificar eventos de RH meiótica aleatorios, todo lo cual requiere un invernadero. Por lo tanto, el uso del método para los fines dados anteriormente también puede conducir a una gran reducción de costes en los procesos de mejora mismos.

[0012] El método según la invención puede, por ejemplo, usarse con el fin de:

- a. Romper el arrastre por ligamiento: se han introducido resistencias a virus severos tales como el TMV y el TYCLV a partir de especies silvestres de tomate y los genes que confieren resistencia están presentes en fragmentos de introgresión grandes que son recombinantemente silenciosos. También hay genes en estas introgresiones que afectan negativamente al rendimiento (arrastre por ligamiento), pero no se pueden recombinar separados de la fuente de resistencia. Sin embargo, esta pérdida de rendimiento se acepta, ya que la resistencia viral es muy valiosa. La técnica descrita en la presente se puede usar con el fin de romper el fragmento de introgresión en posiciones definidas, generando así líneas con la resistencia al virus, pero que carecen del arrastre por ligamiento. Todos los tipos de arrastre por ligamiento son un gran problema en mejora y continuará ralentizando y complicando la mejora vegetal en el futuro.
- b. Introgresiones a medida: cualquier región cromosómica de secuencia conocida se puede ligar a cualquier otra secuencia en el cromosoma homólogo. Esto le permite a uno definir el tamaño de la introgresión que uno querría tener en un producto final. De hecho, la introgresión podría comprender un único gen.
- c. Mapeo fino: el mapeo de genes usa la recombinación meiótica para ligar genes a marcadores, pero no es eficaz cuando la recombinación meiótica se suprime o cuando muchos genes están estrechamente ligados. El método descrito en la presente, que conduce a una translocación, puede utilizarse para dividir un fragmento de introgresión en regiones menores que pueden luego ser genotipadas utilizando marcadores o ser fenotipadas. De esta manera, uno puede identificar rápidamente genes causales.
- d. Recombinación intragénica: se necesitan nuevas fuentes de resistencia ya que se desarrollan nuevos biotipos de patógenos. Los genes de resistencia están normalmente presentes en agrupaciones y la recombinación entre estos genera nuevos genes que confieren nuevas resistencias. Sin embargo, estos son eventos de baja frecuencia y difíciles de encontrar. Las translocaciones pueden utilizarse para combinar partes (dominios) de genes de resistencia presentes en agrupaciones en cromosomas diferentes para crear nuevas combinaciones de dominios que confieren nuevas resistencias.
- e. Homocigosidad en especies de poliploidía: varias especies de plantas de poliploidía son aloploidias, lo que significa que los genomas separados no se recombinan durante la meiosis. Esto puede ser problemático cuando uno de los genomas lleva un fenotipo negativo en una posición cromosómica, porque este no puede eliminarse. Se pueden inducir translocaciones entre los genomas y a través de autofecundación se puede crear una situación en la cual brazos cromosómicos enteros se vuelven completamente homocigóticos. Esto también puede usarse para transferir mutaciones inducidas en los cromosomas de un genoma a los cromosomas del otro genoma, que es particularmente útil si tales mutaciones son recesivas (que es casi siempre el caso).

[0013] Con la realización del pensamiento inventivo para aplicar el método descrito en la presente para los varios fines descritos anteriormente, la persona experta será capaz de aplicar en efecto este método para los fines proporcionados anteriormente.

## Resumen

- 5 [0014] En un aspecto se proporciona un método para eliminar el ligamiento genético entre un primer locus A y un segundo locus B presentes en un primer cromosoma vegetal en una planta o célula vegetal, donde se suprime la recombinación (meiótica) entre, e incluyendo, la ubicación de dicho primer locus A y la ubicación de dicho segundo locus B en el cromosoma. El método comprende las etapas de provisión de al menos una célula vegetal que comprende dicho primer cromosoma que comprende dicho primer locus A y dicho segundo locus B y que  
10 comprende además al menos un segundo cromosoma, donde dichos cromosomas son cromosomas homólogos u homeólogos entre sí; introducción de una rotura de doble cadena en el primer cromosoma, donde la rotura de doble cadena en el primer cromosoma se introduce entre dicho primer locus A y dicho segundo locus B, proporcionando así una primera parte del primer cromosoma que comprende el primer locus A y una segunda parte del primer cromosoma que comprende el segundo locus B e introducción de una rotura de doble cadena en el segundo cromosoma, proporcionando así una primera parte del segundo cromosoma y una segunda parte del segundo cromosoma. La rotura de doble cadena en el primer cromosoma y/o la rotura de doble cadena en el segundo cromosoma se introduce por al menos una nucleasa específica de sitio, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en nucleasa de dedo de zinc, meganucleasa, nucleasa efector TAL y el sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN.
- 20 [0015] Opcionalmente, pero en cierta forma de realización preferida, el método comprende además la identificación, utilizando al menos una célula vegetal obtenida, de al menos una célula vegetal donde el ligamiento genético entre el primer locus A y el segundo locus B en el primer cromosoma se ha eliminado y, además, donde la primera parte del primer cromosoma que comprende el primer locus A se liga a la segunda parte del segundo cromosoma.
- 25 [0016] La rotura de doble cadena en el primer cromosoma y/o la rotura de doble cadena en el segundo cromosoma es/son introducida(s) por al menos una nucleasa específica de sitio, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en nucleasa de dedo de zinc, meganucleasa, nucleasa efector TAL (TALENS) y el sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN.
- 30 [0017] En una forma de realización particularmente preferida, el método se realiza donde el primer cromosoma comprende dicho primer locus A y dicho segundo locus B, donde dicho primer locus A está ligado a un rasgo deseable de un primer carácter y dicho segundo locus B está ligado a un rasgo indeseable de dicho primer carácter o un segundo carácter; y donde dicho segundo cromosoma no comprende un locus que es idéntico a dicho segundo locus B ligado a un rasgo indeseable de dicho primer carácter o un segundo carácter, y; una rotura de doble cadena se introduce entre dicho primer locus A y dicho segundo locus B en el primer cromosoma y en un locus o ubicación correspondiente en el segundo cromosoma. Esta forma de realización permite la eliminación del arrastre por ligamiento entre rasgos deseados y no deseados comúnmente visto en las plantas (híbridas).
- 35 [0018] Por consiguiente, también se proporciona un método para suministrar una planta P1 obtenida a partir de una planta P2, donde dicha planta P2 se caracteriza por la presencia de ligamiento genético entre un primer locus A y un segundo locus B en un primer cromosoma, donde se suprime la recombinación (meiótica) entre, e incluyendo, la ubicación de dicho primer locus A y la ubicación de dicho segundo locus B en el cromosoma, y donde dicha planta P1 se caracteriza por la ausencia de dicho ligamiento genético, comprendiendo el método la provisión de al menos una célula vegetal, comprendiendo dicho primer cromosoma dicho primer locus A y dicho segundo locus B y que comprende además al menos un segundo cromosoma, donde dichos cromosomas son cromosomas homólogos u homeólogos entre sí; la introducción de una rotura de doble cadena en el primer cromosoma, donde la rotura de doble cadena en el primer cromosoma se introduce entre dicho primer locus A y dicho segundo locus B, proporcionando así una primera parte del primer cromosoma que comprende el primer locus A y una segunda parte del primer cromosoma que comprende el segundo locus B y la introducción de una rotura de doble cadena en el segundo cromosoma, proporcionando así una primera parte del segundo cromosoma y una segunda parte del segundo cromosoma, y; opcionalmente, la identificación de la al menos una célula vegetal obtenida de al menos una célula vegetal donde se ha eliminado el ligamiento genético entre el primer locus A y el segundo locus B en el primer cromosoma, y además, donde la primera parte del primer cromosoma que comprende el primer locus A se liga a la segunda parte del segundo cromosoma. La planta P1 puede así regenerarse.
- 50 [0019] Según otro aspecto de la invención, está previsto el uso de una nucleasa específica de sitio, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en una nucleasa de dedo de zinc, una meganucleasa, una
- 55

nucleasa efector TAL y el sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN para eliminar el ligamiento genético entre un primer locus A y un segundo locus B presentes en un primer cromosoma, donde se suprime la recombinación (meiótica) entre, e incluyendo, la ubicación de dicho primer locus A y la ubicación de dicho segundo locus B en el cromosoma.

- 5 [0020] Según un aspecto final de la divulgación, se proporciona una planta, parte de planta, fruta o semilla obtenible por u obtenida por el método según la invención, o el uso según la invención.

### Descripción de los dibujos

[0021]

10 Figura 1: Panel de la izquierda: dos cromosomas homólogos se indican dentro de un único protoplasto donde la sección gris claro en un cromosoma representa una introgresión (gris claro) de unas especies silvestres no adaptadas en las que no ocurre la recombinación meiótica (supresión de la recombinación). Las cajas en la introgresión representan el locus que da el fenotipo positivo (negro) y el locus que da el fenotipo negativo. El plásmido que expresa la enzima inductora de la rotura de doble cadena se muestra como un círculo. Las flechas representan las posiciones en el cromosoma en las que se induce una RDC de ADN por la nucleasa específica de sitio. Panel medio: se induce la RDC de ADN en ambos cromosomas homólogos. Panel derecho: reparación de la RDC que conduce a una translocación recíproca. Los locus positivos y negativos ya no están ligados.

15 La figura 2 proporciona la secuencia del locus ALS2 de *Solanum pennellii*. El marco de lectura abierto de ALS2 está subrayado. La secuencia diana para la ZFN se muestra en cursiva y en negrita.

20 La figura 2a muestra los resultados de la prueba de cebadores que amplifican específicamente el locus ALS2 de *Solanum pennellii* (panel de la izquierda) o el locus ALS2 WT (panel de la derecha). L, escalera; BC, línea F1 derivada a partir de un cruce IL7-3 x M82; M82, línea de tomate WT; IL7-3, línea que contiene una introgresión de *S. pennellii* en el cromosoma VII; B, control de agua.

25 La figura 3 muestra deleciones pequeñas inducidas en protoplastos de las líneas IL7-3 y M82. Línea superior, secuencia del sitio diana. Los sitios de unión a ZFN están subrayados. Se muestran las pequeñas deleciones que se encontraron en los protoplastos de M82 e IL7-3. Los guiones representan nucleótidos que faltan.

30 Figura 4: se muestran (arriba) las secuencias de ALS2 de M82 y ALS2 de *S. pennellii* con el sitio de unión a ZFN subrayado y los polimorfismos de nucleótido único (SNP) entre los locus mostrados en negrita y en minúscula. Los sitios de unión a ZFN están subrayados. El primer SNP entre los locus después del sitio de unión a ZFN está 449 bps corriente abajo como se indica. Los cebadores usados para toda la amplificación por PCR fueron 11\_13680 (cebador directo de ALS2 de *S. pennellii*) y 12\_07231 (cebador inverso de ALS2 de M82). M82 y IL7-3, secuencia de productos de PCR clonados derivados de la transfección de protoplastos de las líneas parentales con pKG7402. F1, secuencia de productos de PCR clonados derivados de la transfección de protoplastos de la línea F1 con un pKG7381 (35S::GFP). F1 x ZFN, secuencia de productos de PCR clonados derivados de la transfección de protoplastos de la línea F1 con pKG7402. La presencia de INDEL pequeñas en el sitio de unión a ZFN se representa por nucleótidos que faltan. Los clones #1 y #2 se aislaron utilizando los cebadores 12\_11216 + 12\_11217 en una reacción de PCR no selectiva.

40 La figura 5 muestra esquemáticamente translocaciones dirigidas en *Brassica napus*. 1, se indican los genomas A (gris oscuro) y C (gris claro). El locus que se va a hacer homocigótico se indica mediante un círculo. Una nucleasa específica de sitio se expresa en la célula y se induce una RDC en los 4 cromosomas en la posición de la línea punteada. 2, se produce una translocación dirigida entre los genomas A y C. 3, después de autofecundar, la región de translocación y el locus de interés es homocigótica. 4, parte del brazo cromosómico del genoma C se vuelve homocigótico.

### Descripción

#### Definiciones

50 [0022] A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo sentido que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. La práctica de técnicas convencionales en biología molecular, bioquímica, bioquímica computacional, cultivo celular, ADN recombinante, bioinformática, genómica, secuenciación y campos relacionados es bien conocida por los expertos en la técnica y se discuten, por ejemplo, en las siguientes referencias bibliográficas: Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987 y actualizaciones periódicas; y la serie Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego. Para fines de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

[0023] Como se utiliza en la presente, las formas singulares "un/una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, una referencia a "una" molécula de ADN puede incluir una pluralidad de las mismas moléculas de ADN (por ejemplo, 10's, 100's, 1000's, 10's de miles, 100's de miles, millones, o más moléculas).

5 [0024] El término "y/o" indica que pueden ocurrir uno o más de los casos declarados. En otras palabras, un caso declarado puede ocurrir o solo o en combinación con al menos uno de los casos declarados, hasta con todos los casos declarados. El término y/o divulga cada caso declarado solo, así como la combinación específica de un caso declarado con al menos uno de los otros casos declarados, hasta con todos los casos declarados.

10 [0025] En esta divulgación, "comprende", "que comprende", "que contiene" y "que tiene" y similares pueden tener el significado que se les asigna en la ley de patentes y pueden significar "incluye", "incluyendo" y similares; asimismo, "que consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente" tiene el significado asignado en la ley de patentes y el término es abierto, permitiendo la presencia de más de lo que se recita siempre que no se cambien las características básicas o nuevas de lo que se recita por la presencia de más de lo que se recita, pero excluye formas de realización del estado de la técnica.

15 [0026] Como se utiliza en la presente, el término "alelo(s)" significa cualquiera de una o más formas alternativas de un gen en un locus particular. En una célula diploide de un organismo, los alelos de un gen dado se localizan en una ubicación específica, o locus (plural locus), en un cromosoma. Un alelo está presente en cada cromosoma del par de cromosomas homólogos. Un diploide o una especie de planta puede comprender un gran número de alelos diferentes en un locus particular.

20 [0027] Un "carácter" se refiere a un atributo fenotípico de un organismo. Un carácter se puede manifestar en rasgos diferentes. Por ejemplo, la planta puede ser una planta que tiene el color de las flores como un carácter y siendo las flores rojas o blancas los rasgos A y B del carácter. En la presente invención, el carácter (o rasgo) puede ser cualquiera, siempre que los miembros del organismo que tienen un primer rasgo del carácter puedan ser fenotípicamente distinguidos de los miembros del organismo que tienen un segundo rasgo del carácter. Esto  
25 no se limita solo a diferencias que pueden observarse directamente por inspección de un organismo, sino que también incluye caracteres/rasgos que pueden aparecer en otro análisis del organismo, por ejemplo, en el análisis de la resistencia a ciertas circunstancias o en el análisis de la presencia de metabolitos particulares en tal organismo.

30 [0028] La persona experta entiende que "ligamiento genético" entre locus en el mismo cromosoma se refiere a los locus que se sitúan uno respecto a otro en el mismo cromosoma de manera que normalmente se heredan juntos durante la meiosis. Por ejemplo, los genes cuyos locus están más cerca entre sí tienen menor probabilidad de ser separados en cromátidas diferentes durante el cruce cromosómico y, por lo tanto, se dice que están ligados genéticamente. Otro ejemplo es cuando los locus están ambos situados en el mismo segmento del cromosoma caracterizado por la "supresión de la recombinación (meiótica)" (véase más abajo). También en este  
35 caso, es probable que los locus se hereden juntos durante la meiosis.

[0029] Como se utiliza en la presente, el término "heterocigótico" significa una condición genética existente cuando dos alelos diferentes residen en un locus específico. Por el contrario, como se utiliza en la presente, el término "homocigótico" significa una condición genética existente cuando dos alelos idénticos residen en un locus específico, pero se posicionan individualmente en pares correspondientes de cromosomas homólogos en la célula.  
40

[0030] El término cromosoma "homeólogo" se utiliza para describir la relación de cromosomas similares unidos después de la hibridación entre especies y la aloploidización, y cuya relación fue completamente homóloga en una especie ancestral. Se dice que dos cromosomas son homeólogos cuando derivan de dos genomas diferentes, pero comparten características tales como secuencias de nucleótidos similares, sintenia de orden  
45 génico similar y se colocan en posiciones correspondientes en los cariogramas de ambos genomas.

[0031] El término cromosoma "homólogo" se utiliza para describir la relación de cromosomas similares que se aparean en la meiosis. Dos cromosomas son homólogos entre sí cuando son capaces de formar pares de cromosomas en la meiosis a través de un complejo sinaptonémico.

50 [0032] La reacción enzimática catalizada por una enzima ligasa en la que dos moléculas de ADN de doble cadena se unen de manera covalente es referida como ligamiento. Se dice que la molécula de ADN es "ligada" por esta reacción.

[0033] Como se utiliza en la presente, el término "locus" (plural locus) significa una posición o posiciones específicas o un sitio en un cromosoma donde se localiza un gen o marcador genético.

[0034] El "genotipo" es la composición genética de una célula, un organismo o un individuo (es decir, la composición alélica específica del individuo) normalmente con referencia a un carácter o rasgo específico en consideración.

[0035] Un "fenotipo" es las características o rasgos observables de un organismo tales como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas o fisiológicas, fenología, comportamiento y productos del comportamiento. Los fenotipos resultan de la expresión de los genes, así como la influencia de factores medioambientales y las interacciones entre los dos.

[0036] La presente divulgación es aplicable a una amplia gama de plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Los ejemplos no limitativos incluyen *Cucurbitaceae*, *Solanaceae* y *Gramineae*, maíz (especies de *Zea*), trigo (especies de *Triticum*), cebada (por ejemplo, *Hordeum vulgare*), avena (por ejemplo, *Avena sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), centeno (*Secale cereale*), soja (*Glycine* spp., por ejemplo, *G. max*), algodón (especies de *Gossypium*, por ejemplo, *G. hirsutum*, *G. barbadense*), *Brassica* spp. (por ejemplo, *B. napus*, *B. juncea*, *B. oleracea*, *B. rapa*, etc.), girasol (*Helianthus annuus*), alazor, ñame, mandioca, alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (especies de *Oryza*, por ejemplo, grupo de variedad cultivada de *O. sativa indica* o grupo de variedad cultivada de *japonica*), hierbas de forraje, mijo perla (*Pennisetum* spp., por ejemplo, *P. glaucum*), especies de árboles (*Pinus*, álamo, abeto, plátano, etc.), té, café, palma de aceite, coco, especies vegetales, tales como guisante, calabacín, alubias (por ejemplo, especies de *Phaseolus*), pepino, alcachofa, espárrago, brócoli, ajo, puerro, lechuga, cebolla, rábano, lechuga, nabo, coles de Bruselas, zanahoria, coliflor, achicoria, apio, espinaca, endibia, hinojo, remolacha, plantas de fruto carnoso (uvas, melocotones, ciruelas, fresa, mango, manzana, ciruela, cereza, albaricoque, plátano, mora, arándano, cítrico, kiwi, higos, limón, lima, nectarinas, frambuesa, sandía, naranja, pomelo, etc.), especies ornamentales (por ejemplo, especies de rosa, petunia, crisantemo, lirio, gerbera), hierbas (menta, perejil, albahaca, tomillo, etc.), árboles leñosos (por ejemplo, especies de *Populus*, *Salix*, *Quercus*, *Eucalyptus*), especies de fibras, por ejemplo, lino (*Linum usitatissimum*) y cáñamo (*Cannabis sativa*), u organismos modelo, tal como *Arabidopsis thaliana*.

[0037] Para los fines de la presente invención, el término "recombinación" se utiliza para indicar el proceso por el que se cambia material genético entre dos locus.

[0038] "Supresión de la recombinación (meiótica)": la recombinación meiótica entre dos locus en el mismo cromosoma en un individuo híbrido se suprime cuando se produce menos de un cruce o evento de recombinación en 2000 individuos descendientes después de autofecundar o retrocruzar la planta híbrida.

[0039] En biología, "un rasgo" se refiere a cualquier carácter fenotípico distintivo de un miembro individual de un organismo en comparación con (cualquier) otro miembro individual del mismo organismo. En el contexto de la presente invención, el rasgo puede heredarse, es decir, pasarse a lo largo de las generaciones siguientes del organismo mediante la información genética en el organismo. "Rasgo del mismo carácter" o "rasgo de dicho carácter": cualquiera de un grupo de al menos dos rasgos que existe (o se volvió aparente) para un carácter. Por ejemplo, en caso del carácter "color de la flor", las manifestaciones fenotípicas pueden comprender azul, rojo, blanco, etc. En el ejemplo anterior, azul, rojo y blanco son todos rasgos diferentes del mismo carácter.

[0040] A lo largo de esta solicitud, se citan varias referencias en paréntesis para describir más completamente el estado de la técnica a la que pertenece esta invención. La información bibliográfica completa para cada citación se encuentra al final de la especificación, inmediatamente precedente a las reivindicaciones.

### **Descripción detallada**

[0041] La presente invención proporciona un método nuevo e inventivo para eliminar el ligamiento genético entre locus presente en un cromosoma, haciendo posible dejar de depender de la metodología de mejora tradicional o la mejora asistida por marcadores tradicional. En particular, la metodología descrita en la presente permite lograr la recombinación en células somáticas en partes del cromosoma caracterizadas por tener la recombinación (meiótica) suprimida, es decir, partes que, bajo condiciones meióticas, se heredan normalmente juntas. El método permite, en un aspecto, la translocación cromosómica recíproca (cruce; intercambio) entre cromosomas homólogos y/u homeólogos en células somáticas en áreas o partes del cromosoma que se caracterizan por tener la recombinación (meiótica) suprimida. Esto, por ejemplo, permite por primera vez eliminar eficazmente el ligamiento genético entre dos locus en el mismo cromosoma y ambos situados en tal parte del cromosoma de "recombinación (meiótica) suprimida". Además, el método permite esto en células somáticas, es independiente de la secuencia de ADN y no depende de la meiosis o la mitosis.

[0042] Más en particular, se proporciona un método para eliminar el ligamiento genético entre un primer locus A y un segundo locus B presentes en un primer cromosoma vegetal en una planta o célula vegetal, y donde la recombinación (meiótica) entre, e incluyendo, la ubicación de dicho primer locus A y la ubicación de dicho segundo locus B en el cromosoma está suprimida, comprendiendo el método las etapas de:

- 5 (a) proporcionar al menos una célula vegetal que comprende dicho primer cromosoma que comprende dicho primer locus A y dicho segundo locus B y que comprende además al menos un segundo cromosoma, donde dichos cromosomas son cromosomas homólogos u homeólogos entre sí;
- 10 (b) introducir una rotura de doble cadena en el primer cromosoma, donde la rotura de doble cadena en el primer cromosoma se introduce entre dicho primer locus A y dicho segundo locus B proporcionando así una primera parte del primer cromosoma que comprende el primer locus A y una segunda parte del primer cromosoma que comprende el segundo locus B
- e
- 15 introducir una rotura de doble cadena en el segundo cromosoma, proporcionando así una primera parte del segundo cromosoma y una segunda parte del segundo cromosoma, y;
- (c) opcionalmente, identificar, utilizando al menos una célula vegetal obtenida en la etapa (b), al menos una célula vegetal donde se ha eliminado el ligamiento genético entre el primer locus A y el segundo locus B en el primer cromosoma y, además, donde la primera parte del primer cromosoma que comprende el primer locus A se liga a la segunda parte del segundo cromosoma,

20 y donde la rotura de doble cadena en el primer cromosoma y/o la rotura de doble cadena en el segundo cromosoma se introduce por al menos una nucleasa específica de sitio, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en nucleasa de dedo de zinc, meganucleasa, nucleasa efector TAL y el sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN.

[0043] Con el método, se elimina el ligamiento genético entre los locus A y B, presentes en el mismo cromosoma. En otras palabras, después del método según la invención, es menos probable que los dos locus A y B originales se hereden juntos durante la meiosis posterior y, de hecho, no están presentes juntos en el mismo cromosoma. En una forma de realización preferida, el locus A y el locus B están presentes en el mismo brazo cromosómico.

[0044] El locus A y el locus B en el primer cromosoma pueden ser un gen, un promotor, un marcador genético o cualquier secuencia presente en el primer cromosoma. El locus puede o puede no mapearse como el locus para un rasgo biológico particular. En algunas formas de realización, el locus A y/o el locus B son un gen y/o parte de un gen.

[0045] El método se realiza preferiblemente en un cromosoma presente en una célula vegetal, preferiblemente un protoplasto vegetal y, preferiblemente, en presencia de los otros componentes naturales de tal célula vegetal, incluyendo el conjunto completo de cromosomas de tal célula vegetal.

[0046] En una forma de realización preferida, la célula vegetal es un protoplasto. Los métodos para obtener y mantener protoplastos vegetales están fácilmente disponibles para la persona experta. Se ha observado que el método más eficaz de inducir RDC de ADN (específica de secuencia) en células vegetales es a través del uso de protoplastos vegetales. Los protoplastos son células vegetales individuales que carecen de paredes celulares primarias y secundarias y se generan por incubación de partes vegetales con una mezcla de enzimas derivadas de hongos. Cualquier ADN, tal como plásmidos, puede entonces introducirse en protoplastos por tratamientos químicos, y cualquier gen de interés presente en el plásmido cuya expresión se dirige mediante un promotor vegetal adecuado se puede expresar a altos niveles debido a los miles de copias de plásmido que se introducen en cada célula. La expresión génica es preferiblemente transitoria, durando, por ejemplo, 24-36 horas, ya que el plásmido es incapaz de replicarse y se degrada con el tiempo. Adicionalmente, la integración del plásmido en el genoma de la planta es poco frecuente. /pct

[0047] Los protoplastos vegetales individuales se pueden inducir para dividirse para formar acumulaciones de células indiferenciadas denominadas callos y estas se pueden inducir a su vez para regenerar hojas y brotes que pueden entonces enraizarse para producir plantas. Un sistema basado en protoplastos es ideal para la producción de RDC de ADN utilizando cualquiera de los métodos descritos en la presente. La nucleasa específica de sitio se puede colocar en el plásmido, expresada a un nivel alto, y producir gran cantidad de proteína específica de sitio que es capaz de inducir la RDC de ADN requerida. Los protoplastos se pueden aislar en gran número (millones por día) y transfectar con ADN plasmídico en masa, y los callos derivados de estos protoplastos transfectados se derivan a partir de una célula de protoplasto única y, así, no sufren quimerismo.

[0048] El locus A y el locus B están, sin embargo, caracterizados por el hecho de que están localizados en dicho primer cromosoma en una parte, área o segmento que se caracteriza por el hecho de que la recombinación (meiótica) de esa parte, área o segmento está suprimida. Como se describe en la presente, la "recombinación

meiótica suprimida" pretende indicar que la recombinación meiótica entre los dos locus en el mismo cromosoma en un individuo híbrido es inferior a un cruce o evento de recombinación que ocurre en 2000 individuos descendientes después de autofecundar o retrocruzar la planta híbrida. En una forma de realización preferida, esto es menos de un cruce o evento recombinante que ocurre en 2500, 5000 u 8000 individuos descendientes. Un experto en la técnica es consciente de cómo determinar esto.

[0049] En el método, una rotura de doble cadena se introduce en el primer cromosoma, que comprende dicho primer locus A y dicho segundo locus B. La posición o locus donde se introduce tal rotura de doble cadena está entre dicho primer locus A y el B. Introduciendo una rotura de doble cadena entre los locus A y B, el cromosoma se divide en al menos dos partes, preferiblemente no más de dos partes; una parte que comprende dicho locus A y una parte que comprende dicho locus B. En el contexto de la presente invención, cuando se hace referencia a una primera parte o una segunda parte de dicho cromosoma, esto puede indicar la parte que ahora comprende el centrómero (es decir, que estaba en el cromosoma original hacia (e incluyendo) el centrómero) o la parte que, mediante la introducción de la rotura de doble cadena, ahora está separada del centrómero (es decir, la parte que estaba más lejos del centro del cromosoma, es decir, más cerca al extremo del cromosoma (brazo), en relación con la otra parte que se forma debido a la introducción de una rotura de doble cadena). Si, en el contexto de la presente invención, una primera parte del primer cromosoma se liga a una segunda parte del segundo cromosoma, esto indica que una parte del primer cromosoma que está más cerca al centrómero del primer cromosoma se liga a una parte del segundo cromosoma que está más lejos del centrómero del segundo cromosoma, en relación con la otra parte que se forma debido a la introducción de la rotura de doble cadena en dicho(s) cromosoma(s) o al revés. En otras palabras, en un cromosoma ligado de nuevo que comprende una primera parte de un primer cromosoma y una segunda parte de un segundo cromosoma, en una forma de realización, la primera parte estaba más cerca al centrómero del primer cromosoma y la segunda parte estaba más lejos del centrómero del segundo cromosoma, en relación con la otra parte del mismo cromosoma formado por la introducción de la rotura de doble cadena.

[0050] Sorprendentemente, se descubrió que, cuando se realizan los pasos anteriores, las células vegetales pueden identificarse utilizando técnicas moleculares o, sencillamente, regenerando una planta a partir de tales células, donde el ligamiento genético entre dicho primer locus A y dicho segundo locus B se ha eliminado, y donde se ha producido un cruce (intercambio) entre al menos dos cromosomas homólogos u homeólogos de manera que el locus A está presente de un primer cromosoma y el locus B está presente en dicho segundo cromosoma homólogo u homeólogo. Dicho de otro modo, donde los cromosomas homólogos u homeólogos se han reorganizado de manera que un intercambio o un cruce ocurre entre al menos dos cromosomas, y donde el locus A y el locus B, aunque están situados en un área del cromosoma con recombinación (meiótica) suprimida, se han separado.

[0051] Opcionalmente, por lo tanto, puede identificarse al menos una célula, después de la realización de las etapas anteriores (a) y (b), donde el ligamiento genético entre el primer locus A y el segundo locus B en el primer cromosoma se ha eliminado y donde, además, la primera parte del primer cromosoma que comprende el primer locus A está ligada a la segunda parte del segundo cromosoma. Alternativamente, en algunas formas de realización, las células obtenidas después de la etapa (b) se pueden regenerar en plantas y, opcionalmente, autofecundar después, y las plantas así obtenidas se pueden usar para cribar fenotípicamente la eliminación del ligamiento genético entre los locus A y B, por ejemplo, en el caso de que el locus A y el locus B estén ligados a rasgo(s) particular(es) que pueden observarse.

[0052] Preferiblemente, se realiza la etapa (c) del método anterior, es decir, es parte del método según la invención. La persona experta es, en base a la divulgación en la presente, muy consciente de cómo identificar tal al menos una célula. Por ejemplo, los protoplastos individuales pueden primero propagarse separadamente, después de lo cual, pueden analizarse algunos de los protoplastos propagados (clonales), por ejemplo, usando secuenciación de ADN estándar o técnicas de amplificación o hibridación para la religación de las dos partes de los dos cromosomas, y/o fenotipado de la descendencia, y/o hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

[0053] En una forma de realización preferida, cuando se realiza la etapa (c) anterior, el método comprende además la identificación de aquellas células donde además también la segunda parte del primer cromosoma está ligada a la primera parte del segundo cromosoma. De nuevo, como anteriormente, la persona experta es muy consciente de cómo realizar tal identificación.

[0054] En una forma de realización particularmente preferida de los métodos que se describen en la presente, la célula vegetal seleccionada es tal que el segundo cromosoma no comprende un locus que es idéntico a dicho primer locus A y/o no comprende un locus que es idéntico a dicho segundo locus B. En otras palabras, aunque el segundo cromosoma puede tener un alelo del mismo locus A y/o B, debe tener al menos alguna diferencia de secuencia con el locus/alelo presente en el primer cromosoma. Por ejemplo, el primer cromosoma comprende un locus A o B que puede ser un primer alelo de un gen determinado, y el segundo cromosoma puede comprender

otro alelo para el mismo gen. Preferiblemente, en tal forma de realización, el alelo en el primer cromosoma y el segundo cromosoma están relacionados con un fenotipo diferente.

[0055] En otra forma de realización de los métodos descritos en la presente, la distancia entre dicho primer locus A y dicho segundo locus B presentes en dicho primer cromosoma vegetal está entre un par de bases y la longitud de todo el cromosoma. Como se ha descrito anteriormente, el locus A y el locus B en el primer cromosoma están ambos en (una misma) área/parte/segmento del cromosoma que se caracteriza por una recombinación (meiótica) suprimida. Una ventaja adicional particular de la presente invención es que ahora tales locus pueden separarse fácilmente, mientras que todavía proporcionan plantas supervivientes y normales incluso si tales locus están muy cerca entre sí o muy alejados.

[0056] En los métodos descritos en la presente, la rotura de doble cadena en el primer cromosoma y/o la rotura de doble cadena en el segundo cromosoma se introduce(n) por al menos una nucleasa específica de sitio preferiblemente seleccionada de nucleasa de dedo de zinc, meganucleasa, nucleasa efector TAL (TALEN) y el sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN.

[0057] Mientras que los agentes genotóxicos introducen roturas de ADN y modificaciones de forma aleatoria en todo el genoma, las (endo)nucleasas usadas en la presente invención pueden diseñarse hoy en día racionalmente para reconocer y unirse a una secuencia de ADN específica en la que una RDC de ADN se induce posteriormente.

[0058] Para la presente invención, se prefieren cuatro tecnologías/sistemas de nucleasa para introducir la RDC: (1) meganucleasas, (2) nucleasas de dedo de zinc (ZFN, por sus siglas en inglés), y (3) nucleasas efector TAL (TALEN, por sus siglas en inglés) y (4) el sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN.

[0059] Las meganucleasas, incluyendo tales endonucleasas de asentamiento como I-SceI, se pueden mutar para conferir una afinidad de secuencia de ADN alterada (Belfort y Roberts, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25: 3379-3388; Chevalier y Stoddard, 2001, *Nucleic Acids Res.* 29: 3757-3774) y su actividad se ha declarado en plantas (Kirik, 2000, *EMBO J.* 19, 5562-566). Las meganucleasas a veces también son referidas como endonucleasas de asentamiento LAGLIDADG (LHE; Stoddard et al (2011) *Structure* 19:7-15). Las meganucleasas difieren de las nucleasas de dedo de zinc y las TALEN (véase debajo) en que son proteínas de origen natural dirigidas a los genes que forman homodímeros que comprenden dos subunidades idénticas cada uno de aproximadamente 160 a 200 residuos de aminoácidos de tamaño. Se ha sugerido que también pueden funcionar como un único péptido de dos monómeros de repetición en tándem unidos por una secuencia conectora (Stoddard, 2011). Las meganucleasas generalmente reconocen un sitio diana de aproximadamente 20 a 30 pares de bases. Para una visión general de las meganucleasas y los métodos para evaluar la actividad y las especificidades alteradas de las dianas de las meganucleasas mutadas, se hace referencia a Stoddards et al (2011). Además, el uso de meganucleasas se ha descrito, por ejemplo, en WO2011154159 y EP2522723. La meganucleasa o el par de meganucleasas, así como todas las otras nucleasas usadas en la presente invención, se pueden introducir en la célula vegetal y expresar posteriormente (transitoriamente) en esta y usando métodos muy conocidos por la persona experta. Por ejemplo, a partir de un gen quimérico o un par de genes quiméricos, comprendiendo cada uno un promotor expresable de planta ligado a una región codificante que codifica la meganucleasa o una del par de meganucleasas y, además, ligado de forma operacional a una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación funcional en una célula vegetal.

[0060] Para los fines de la presente invención, el término "nucleasa de dedo de zinc" o "ZFN" se refiere a una molécula proteica quimérica que comprende al menos un dominio de unión a ADN de dedo de zinc eficazmente ligado a al menos una nucleasa capaz de escindir ADN. La escisión por una ZFN en un locus diana produce una rotura de doble cadena (RDC) en ese locus. Las nucleasas de dedo de zinc consisten en dos dominios, una matriz de dominios de dedo de zinc y un dominio de nucleasa, normalmente derivado de la enzima de restricción de tipo IIS FokI. Estas enzimas de restricción de tipo IIS, tal como FokI, reconocen secuencias de ADN específicas y escinden varios pares de bases corriente abajo del sitio de reconocimiento. Cada dominio de dedo de zinc se puede diseñar para reconocer un triplete específico de 3 bps y mediante la unión de un número de estos puede reconocerse específicamente una secuencia de ADN más larga. El dominio FokI debe dimerizarse antes de cortar el ADN y, así, dos proteínas ZFN se diseñan para dirigirse a secuencias en las cadenas de ADN opuestas separadas por una corta región espaciadora de 5-6 bps. La unión de ambas proteínas ZFN a su secuencia diana respectiva lleva a ambos dominios FokI uno frente al otro en la hélice de ADN en la región espaciadora donde se produce entonces una RDC de ADN. Muchos estudios han mostrado que las ZFN son eficaces en la inducción de pequeñas INDEL en una secuencia diana endógena en muchas especies diferentes de plantas (Curtin (2012) *The Plant Genome*, 5, 42-50). Nucleasas de dedo de zinc hechas a medida están disponibles comercialmente bajo el nombre CompoZr de Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/zinc-finger-nuclease-technology.html>). El uso de nucleasas de dedo de zinc en plantas se ha descrito, por ejemplo, en WO03087341 y WO2011052539. La ZFN usada para la presente invención, así como todas las otras nucleasas usadas en la presente invención, se pueden introducir en la célula vegetal y expresar

posteriormente (transitoriamente) en esta, y usando métodos muy conocidos por la persona experta. Por ejemplo, a partir de un gen quimérico o un par de genes quiméricos, comprendiendo cada uno un promotor expresable de planta ligado a una región codificante que codifica la nucleasa de dedo de zinc o una del par de nucleasas de dedo de zinc y, además, ligado de forma operacional a una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación funcional en una célula vegetal. La publicación US2012/0196370 enseña que las ZFN pueden utilizarse para crear deleciones definidas en un genoma eucariota. En este enfoque, las ZFN cuyos sitios diana están separados por hasta 120 Kbps se introducen en células junto con una molécula "donadora" lineal que tiene en ambos extremos una región de homología de secuencia de cada uno de los sitios diana de ZFN separados. Después del tratamiento de líneas celulares animales con estos reactivos, podrían entonces amplificarse los productos donde la región entre los sitios diana de ZFN se habían sustituido por la molécula donadora, produciendo una deleción eficaz de la secuencia intercalada. En este caso, la vía de RH mitótica se usa debido a las regiones de homología de secuencia presentes en los extremos de la molécula donadora. La publicación sugiere que la molécula donadora es esencial para, primero, dirigir la precisión de la reacción de RH mitótica y, segundo, para aumentar la frecuencia de la reacción de RH mitótica. Se piensa que esto es necesario debido a que la frecuencia de translocaciones obtenidas cuando solo se utilizan las ZFN es demasiado baja para la aplicación práctica. A diferencia de lo que se enseña en la literatura, los inventores actuales descubrieron que se pueden producir translocaciones específicas entre cromosomas vegetales cuando solo un único par de ZFN se utiliza para generar las RDC. A diferencia de la publicación US2012/0196370, nuestros experimentos utilizan la vía de NHEJ para generar translocaciones, ya que observamos pequeñas deleciones en los puntos de fusión del cromosoma que son características de esta vía de recombinación. Cuando una RDC de ADN se induce en solo uno de los cromosomas vegetales, los extremos del ADN se vuelven a unir por la vía de NHEJ, que da como resultado deleciones pequeñas. La frecuencia de estas pequeñas deleciones (presentes en un 10% de las células) se compone de dos componentes, la eficiencia de corte del par de ZFN y la eficiencia a la que se repara la RDC por la vía de NHEJ. En este caso, se induce una única RDC en un cromosoma de modo que los extremos del ADN están muy cerca, dando como resultado el 10% de eficiencia. Sin embargo, para que una translocación ocurra, las RDC deben producirse en dos cromosomas que están espacialmente separados en el núcleo y la interacción de estos extremos del ADN es improbable, lo que da como resultado una frecuencia de formación de translocación muy baja. Sin embargo, hemos encontrado que la eficiencia de formación de translocación (0,8%) en células vegetales por la vía de NHEJ es inesperadamente alta, solo 12 veces inferior a la reparación de extremos de ADN adyacentes y, por lo tanto, permite el aislamiento fácil de células individuales que se han sometido a este proceso de recombinación. Además, nuestro método en células vegetales no requiere una molécula "donadora", ya que la frecuencia y la precisión de la formación de translocación que utiliza la vía de NHEJ es ya suficientemente alta, según nuestra invención, para la aplicación práctica. Así, el método según la invención no necesita usar tal molécula donadora lineal o polinucleótido donador como se describe en US2012/0196370.

[0061] Las TALEN son nucleasas específicas de sitio derivadas de efectores TAL producidos por especies de *Xanthomonas* que causan una variedad de diferentes enfermedades de las plantas. Durante la infección de una planta por especies de *Xanthomonas*, las proteínas de efector TAL se introducen en la célula vegetal. Los efectores TAL consisten en un número de dominios proteicos que se repiten, cada uno de los cuales es capaz de reconocer específicamente y unirse a uno de los 4 nucleótidos de ADN (A, T, G, C). Las diferentes combinaciones de estos dominios están presentes en efectores TAL diferentes y cada uno se une a una secuencia de ADN única en el genoma de las plantas, frecuentemente en los promotores de genes de las plantas. patógeno Una vez unido al ADN de la planta, el efector TAL influye en la expresión génica de las plantas para mejorar la patogenicidad bacteriana. Se han identificado los dominios específicos para cada nucleótido y se pueden producir matrices de estos dominios que tienen alta afinidad de unión por cualquier secuencia de ADN (Christian, 2010 Genetics 186: 757-761; Cermak et al., 2011, Nucleic Acids Res 39: e82; Bogdanove y Voytas, 2011, Science 333: 1843-1846; Boch, 2011, Nature Biotechnology 29: 135-136). TALEN comerciales hechas a medida están disponibles de Collectis Bioresearch (<http://www.collectis-bioresearch.com/genome-customization/genomic-scissors/talen>). Estas matrices se fusionan entonces con el dominio de nucleasa de FokI para crear una TALEN y, similar a la ZFN, dos proteínas TALEN se utilizan para inducir una RDC de ADN en una región espaciadora en la secuencia diana. Varios artículos han descrito el uso de las TALEN para crear mutaciones en las especies de secuencias diana (Curtin (2012) The Plant Genome, 5, 42-50). Las TALEN usadas para la presente invención, así como todas las demás nucleasas usadas en la presente invención, se pueden introducir en la célula vegetal y expresar posteriormente (transitoriamente) en esta, y usando métodos muy conocidos por la persona experta. Por ejemplo, a partir de un gen quimérico o un par de genes quiméricos, comprendiendo cada uno un promotor expresable de planta ligado operativamente a una región codificante que codifica la nucleasa TALEN o una de un par de nucleasas TALEN y, además, ligado de forma operacional a una región de ADN implicada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación funcional en una célula vegetal. El uso de efector TAL (TALEN) se ha descrito, por ejemplo, en WO201107224.

[0062] La tecnología CRISPR (también referida en la presente como el sistema CRISPR Cas9/crRNA/tracrRNA) se deriva de bacterias donde se usa como un sistema para defenderse contra los patógenos moleculares invasores tales como plásmidos y bacteriófagos. Los locus específicos en el genoma bacteriano consisten en

matrices de secuencias cortas derivadas de los genomas de patógenos moleculares que son el resultado de infecciones precedentes. Se producen ARN pequeños (crARN) a partir de estos locus que interactúan con el tracrARN y estas moléculas de ARN juntas dirigen entonces la proteína Cas9 a la secuencia complementaria específica en el genoma del patógeno molecular. La proteína Cas9 tiene actividad de nucleasa y es capaz de producir una rotura de doble cadena de ADN (RDC) específica en la secuencia diana en el genoma patógeno que entonces se degrada. La expresión de la proteína Cas9 (nucleasa), tracrARN y crARN (los componentes del sistema CRISPR) que se dirigen a una secuencia genómica en las células de plantas y animales crea RDC dirigidas a la secuencia diana genómica que a menudo se repara incorrectamente por la maquinaria de ADN celular, dando como resultado una inserción o deleción pequeña (INDEL) (Feng et al. (2013) Cell Res. 1: 4; Li et al. (2013) Nat. Biotech. 31: 689-691; Nekrasov et al. (2013) Nat. Biotech. 31: 691-693; Shan et al. (2013) Nat. Biotech. 31: 686-688). Una INDEL en la secuencia codificante de un gen o incluso en un intrón lleva a menudo a la pérdida de función génica. Para fines prácticos, el tracrARN y el crARN se combinan normalmente en un ARN guía quimérico (sgARN); esta combinación de ARN se incluye en la definición del sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN.

[0063] Las nucleasas específicas de sitio pueden inducir RDC dirigidas a una alta eficiencia y, así, pueden identificarse fácilmente plantas que contienen INDEL en la secuencia diana. La ingeniería genómica a través del uso de nucleasas específicas de sitio tales como los sistemas CRISPR tiene muchas aplicaciones, especialmente en las especies de poliploidía, y es cada vez más importante para la mejora de cultivos.

[0064] Aunque en principio se pueden usar una o más de las nucleasas discutidas anteriormente, solas o en combinación, se prefiere que la rotura de doble cadena en el primer cromosoma y/o la rotura de doble cadena en el segundo cromosoma se introduzca mediante la misma nucleasa específica de sitio, la misma nucleasa de dedo de zinc, la misma meganucleasa, la misma nucleasa efector TAL o el mismo el sistema de nucleasa Cas9/crARN/tracrARN. En otras palabras, se prefiere dirigirse a una secuencia tanto en el primer como en el segundo cromosoma que pueda ser diana de la misma nucleasa, por ejemplo, debido a que la secuencia diana es idéntica. Reconocer tal diana tanto en el primer cromosoma como en el segundo cromosoma entra en las habilidades de la persona experta y no será difícil, ya que el primer y el segundo cromosoma son cromosomas homólogos u homeólogos que comparten partes del cromosoma que tienen altos niveles de identidad, por ejemplo, el 100%.

[0065] Estará claro a la persona experta, y basado en la divulgación en la presente, en una forma de realización preferida de los métodos descritos en la presente se introduce no más de una rotura de doble cadena en el primer cromosoma y se introduce no más de una rotura de doble cadena en el segundo cromosoma.

[0066] En otra forma de realización preferida de los métodos según la invención:

- i. el primer cromosoma comprende dicho primer locus A y dicho segundo locus B, donde dicho primer locus A está ligado a un rasgo deseable de un primer carácter y dicho segundo locus B está ligado a un rasgo indeseable de dicho primer carácter o un segundo carácter; y
- ii. donde dicho segundo cromosoma no comprende un locus que es idéntico a dicho segundo locus B ligado a un rasgo indeseable de dicho primer carácter o un segundo carácter, y;
- iii. se introduce una rotura de doble cadena entre dicho primer locus A y dicho segundo locus B en el primer cromosoma y en un locus o ubicación correspondiente en el segundo cromosoma.

[0067] Esta forma de realización del método según la invención proporciona la superación del arrastre por ligamiento. El método proporciona la separación de un locus A que está ligado a un rasgo favorable a partir de un locus B que está ligado a un rasgo desfavorable. Tanto el locus A como el B pueden ser un marcador genético ligado a dicho rasgo deseado (A) o no deseado (B) o pueden ser (estar en) el gen que está ligado causalmente al rasgo deseado o no deseado. Los rasgos asociados o ligados al locus A y B pueden o pueden no ser del mismo carácter.

[0068] Como se describió anteriormente, en una forma de realización particularmente preferida de los métodos descritos en la presente, la célula vegetal seleccionada es una tal que el segundo cromosoma no comprende un locus que es idéntico a dicho primer locus A y/o no comprende un locus que es idéntico a dicho segundo locus B. En otras palabras, aunque el segundo cromosoma puede tener un alelo del mismo locus A y/o B, debe tener al menos alguna diferencia de secuencia con el locus/alelo presente en el primer cromosoma. Por ejemplo, el primer cromosoma comprende un locus A o B que puede ser un primer alelo de un gen determinado, y el segundo cromosoma puede comprender otro alelo para el mismo gen. En el contexto de la presente forma de realización, la persona experta entiende que el segundo cromosoma, preferiblemente, no proporciona un locus que es idéntico a dicho locus B no deseado en el primer cromosoma, o comprende un locus B que es una variante alélica no deseada de tal locus B no deseado. En otras palabras, por este método según la invención, el primer cromosoma se modifica de manera que el locus B no deseado originalmente presente en el cromosoma

se elimina y se reemplaza por una parte correspondiente del cromosoma obtenido del segundo cromosoma, y sin contener dicho locus B ligado a un rasgo no deseado.

5 [0069] Los ejemplos no limitativos de rasgos indeseables pueden ser un rasgo seleccionado del grupo que consiste en: un rasgo que influye negativamente en el rasgo deseable del primer carácter, rendimiento reducido, resistencia reducida a enfermedad o plagas, crecimiento reducido, tamaño reducido, cantidad reducida de semillas, resistencia reducida al estrés, incluyendo estrés por sal, calor, frío, agua y sequía. Sin embargo, como se entenderá, cualquier rasgo de un carácter se puede considerar indeseable, dependiendo del fin de los criadores o persona experta, solo o relativo al rasgo deseado asociado al locus A.

10 [0070] En otra forma de realización, el método comprende además la regeneración de una planta a partir de una célula vegetal obtenida después de la etapa (b) o la etapa (c) y la generación de semillas de dicha planta regenerada por autofecundación o cruce con otra planta y el cultivo de una planta a partir de la semilla obtenida y, opcionalmente, el cribado de dicha planta obtenida para la eliminación del ligamiento genético. Como se ha explicado anteriormente, la persona experta conoce muy bien cómo ejecutar estas etapas y cómo cribar para la eliminación del ligamiento genético.

15 [0071] Preferiblemente, la célula vegetal provista es una célula vegetal somática, preferiblemente un protoplasto, y/o una célula vegetal obtenida a partir de un híbrido. La célula vegetal se puede obtener de cualquier planta adecuada, por ejemplo, como se describe específicamente en la presente. La célula vegetal se puede derivar de, por ejemplo, una planta diploide, triploide, tetraploide, pentaploide, hexaploide, octaploide, decaploide, dodecaploide o anfidiplóide.

20 [0072] En línea con la divulgación en la presente, y teniendo en cuenta todas las preferencias y modificaciones discutidas en la presente y en posesión de la persona experta, también se proporciona un método para suministrar una planta P1 obtenida a partir de una planta P2, donde dicha planta P2 se caracteriza por la presencia de ligamiento genético entre un primer locus A y un segundo locus B en un primer cromosoma, donde la recombinación (meiótica) entre, e incluyendo, la ubicación de dicho primer locus A y la ubicación de dicho  
25 segundo locus B en el cromosoma está suprimida, y donde dicha planta P1 se caracteriza por la ausencia de dicho ligamiento genético, comprendiendo el método:

(a) proporcionar al menos una célula vegetal que comprende dicho primer cromosoma que comprende dicho primer locus A y dicho segundo locus B, y que comprende además al menos un segundo cromosoma, donde dichos cromosomas son cromosomas homólogos u homeólogos entre sí;

30 (b) introducir una rotura de doble cadena en el primer cromosoma, donde la rotura de doble cadena en el primer cromosoma se introduce entre dicho primer locus A y dicho segundo locus B proporcionando así una primera parte del primer cromosoma que comprende el primer locus A y una segunda parte del primer cromosoma que comprende el segundo locus B

35 e introducir una rotura de doble cadena en el segundo cromosoma, proporcionando así una primera parte del segundo cromosoma y una segunda parte del segundo cromosoma, y;

40 (c) opcionalmente, identificar, utilizando al menos una célula vegetal obtenida en la etapa b), al menos una célula vegetal donde se ha eliminado el ligamiento genético entre el primer locus A y el segundo locus B en el primer cromosoma y, además, donde la primera parte del primer cromosoma que comprende el primer locus A está ligada a la segunda parte del segundo cromosoma,

y donde la rotura de doble cadena en el primer cromosoma y/o la rotura de doble cadena en el segundo cromosoma se introduce por al menos una nucleasa específica de sitio, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en nucleasa de dedo de zinc, meganucleasa, nucleasa efector TAL y el sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN.

45 [0073] De nuevo, se realiza preferiblemente la etapa (c).

[0074] Según otro aspecto, se proporciona el uso de una nucleasa específica de sitio, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en una nucleasa de dedo de zinc, una meganucleasa, una nucleasa efector TAL y el sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN, para eliminar el ligamiento genético entre un primer locus A y un segundo locus B presentes en un primer cromosoma, donde la recombinación (meiótica) entre, e incluyendo,  
50 la ubicación de dicho primer locus A y la ubicación de dicho segundo locus B en el cromosoma está suprimida. Preferiblemente, se proporciona el uso donde dicho primer locus A está ligado a un rasgo deseable de un primer carácter y dicho segundo locus B está ligado a un rasgo indeseable de dicho primer carácter o un segundo carácter.

[0075] También está provisto el uso de una nucleasa específica de sitio, preferiblemente seleccionada a partir de una nucleasa de dedo de zinc, una meganucleasa, una nucleasa efector TAL y el sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN, para eliminar el arrastre por ligamiento.

5 [0076] En un último aspecto, se proporciona una planta, parte de planta, fruta o semilla obtenible por u obtenida por unos métodos o usos según la invención. En una forma de realización preferida, se proporciona un grupo de al menos 2 de tales plantas, partes de planta, frutas o semillas.

[0077] En resumen, la invención descrita, en una forma de realización no limitativa, implica inducir cruces entre cromosomas parentales homólogos u homeólogos en los protoplastos vegetales somáticos a través del uso de nucleasas específicas de sitio que pueden inducir una RDC de ADN específica en la misma secuencia en ambos cromosomas. Esto se puede conseguir aislando protoplastos vegetales e introduciendo después la nucleasa específica de sitio presente en un plásmido en los protoplastos mediante un tratamiento químico. La proteína de nucleasa específica de sitio se produce entonces en el protoplasto e induce la RDC de ADN. Se cree que el sistema NHEJ puede reparar estas RDC ligando los extremos libres de ADN de los diferentes cromosomas, dando como resultado un intercambio de los brazos cromosómicos, conocido también como una translocación recíproca. Las nucleasas específicas de sitio se pueden diseñar para inducir la RDC en cualquier secuencia deseada y, así, se puede inducir una translocación recíproca en cualquier punto a lo largo de los cromosomas homólogos parentales. Una gran ventaja sobre la recombinación meiótica es que la unión de extremos de ADN utilizando el método según la invención es independiente de las secuencias y, por lo tanto, usando este método no hay limitación en las regiones que pueden ser diana o intercambiadas. Por lo tanto, este enfoque es ideal para romper el arrastre por ligamiento en, por ejemplo, introgresiones que, debido a diferencias de secuencia, no se recombinan durante la meiosis (están suprimidas). Hay muchos ejemplos de rasgos importantes en especies de cultivo comercialmente importantes, tal como la resistencia vírica al TMV y al TYLCV en el tomate, que se sitúan en fragmentos de introgresión grandes con arrastre por ligamiento severo que tiene un efecto negativo en el rendimiento de las plantas. Como estas resistencias son valiosas, se aceptan las pérdidas de rendimiento, pero será muy beneficioso tanto para los criadores como para los cultivadores de plantas romper tal arrastre por ligamiento para aumentar adicionalmente el rendimiento de las plantas.

[0078] La capacidad para crear plantas que contienen introgresiones con un tamaño definido también es de gran uso para los criadores de plantas en general. Las poblaciones de plantas, cada una con una introgresión definida a partir de una especie de una planta silvestre no adaptada, se pueden producir y usar para la mejora de cultivos y descubrimiento de genes. Los genes responsables de rasgos nuevos se pueden mapear de manera más eficaz separando la introgresión en la que se encuentran en partes más pequeñas y repitiendo esto hasta que se haya definido la posición del gen de interés. Como la generación de translocaciones dirigidas es independiente de la secuencia, se pueden generar genotecas de introgresión de plantas con mayor rapidez y precisión, todas las regiones genómicas pueden representarse por igual. Esto reduce la necesidad de cribar grandes poblaciones F2 para los cruces deseados, lo que significa que se requieren menos instalaciones tales como espacio de invernadero. Este método también puede aplicarse a la mejora de especies aloploidoides tales como tabaco, colza o trigo. Las especies de plantas aloploidoides son frecuentemente el resultado de un evento de hibridación antiguo entre dos o más especies de plantas diploides mediante el cual los diferentes genomas separados no se recombinan durante la meiosis. Por ejemplo, *Brassica napus* consiste en un genoma A y C que se no mezcla durante la meiosis. Por lo tanto, una región cromosómica particular en cualquiera de los genomas no puede hacerse completamente homocigótica a través de la autofecundación. Los protoplastos de *B. napus* se pueden aislar y transfectar con una construcción plasmídica que lleva una nucleasa específica de sitio que induce una RDC en la misma posición en ambos cromosomas A y C. La célula puede entonces generar una translocación recíproca entre los genomas A y C que no se podría conseguir a través de la recombinación meiótica. Las plantas regeneradas después pueden entonces autofecundarse e identificarse las plantas que son completamente homocigóticas para la translocación en ambos genomas. Las translocaciones dirigidas también pueden ser muy útiles para la manipulación de secuencias de ADN a nivel génico. Si se ha identificado un promotor específico que es más activo en una especie de planta silvestre no adaptada que en la especie cultivada, entonces pueden utilizarse las translocaciones dirigidas para transferir el promotor activo al genoma de la especie cultivada. Esto se puede conseguir cruzando las dos especies para producir una línea F1, aislando los protoplastos de esta, y expresando entonces una nucleasa específica de sitio en estos protoplastos que induce una RDC en ambos cromosomas homólogos en una posición justo antes del inicio de transcripción del gen de interés. La translocación dirigida resultante unirá las secuencias corriente arriba, incluyendo el promotor activo, al gen de interés alterando así su patrón y su nivel de transcripción. De forma similar, se pueden diseñar nucleasas específicas de sitio para introducir RDC en intrones de genes presentes en cromosomas homólogos diferentes. Una translocación dirigida entre estas RDC resultará en el intercambio de dominios de genes entre los cromosomas homólogos y la formación de genes quiméricos que contienen dominios de cada cromosoma. En este caso, las deleciones pequeñas producidas por el sistema NHEJ se sitúan en el intrón mismo y, así, es improbable que se inhiba la función del gen.

60 **Ejemplos**

**Ejemplo 1****Inducción de una translocación dirigida en el cromosoma VII en protoplastos de tomate**

[0079] La disposición experimental para generar translocaciones dirigidas en las células de tomate se muestra en la figura 1. El enfoque usa una nucleasa específica de sitio, en este ejemplo una nucleasa de dedo de zinc, que induce una rotura de doble cadena (RDC) de ADN en la misma posición genómica o correspondiente en los dos cromosomas homólogos. Una translocación entre los cromosomas puede formarse entonces cuando se reparan estas dos RDC uniendo los extremos de ADN del otro cromosoma, intercambiando así los brazos cromosómicos. Para detectar la formación de translocaciones, se diseñaron cebadores de PCR que amplifican específicamente el sitio de corte de la ZFN en cada cromosoma. Una vez que se ha formado una translocación, estas uniones pueden amplificarse específicamente usando diferentes combinaciones de estos cebadores directos e inversos. Para el diseño de cebadores específicos, deben estar presentes diferencias de secuencia flanqueando el sitio de corte de la ZFN en cada cromosoma. Esto se consiguió usando una línea de tomate que lleva una introgresión en el cromosoma VII de la especie de tomate silvestre *Solanum pennellii*. Esta región de introgresión contiene el sitio diana de la ZFN en el gen ALS2 de *S. pennellii* (SpALS2) y también diferencias de secuencia suficientes con el ALS2 de tipo salvaje (WT ALS2) para posibilitar el diseño de cebadores específicos. El experimento se realizó creando un híbrido F1 heterocigótico para el locus ALS por cruce del tomate WT (M82) con la línea IL7-3 de introgresión del cromosoma VII de *S. pennellii*. Los protoplastos se produjeron entonces a partir de este híbrido F1 y se transfectoron con una construcción plasmídica que expresa la ZFN que induce la RDC tanto en el locus ALS2 WT como en el SpALS2. Utilizando nuestro enfoque de PCR fuimos capaces de detectar células en las que se había producido una translocación recíproca. Sorprendentemente, tales eventos fueron detectables a una frecuencia relativamente alta (0,8%) que fue inesperada debido a que las RDC de ADN se hallaban en cromosomas diferentes. Esta es la primera evidencia declarada de que las nucleasas específicas de sitio son capaces de inducir translocaciones recíprocas en células vegetales y una demostración de que tales eventos ocurren a una frecuencia relativamente alta. Luego continuamos cultivando protoplastos vegetales individuales hasta callos y genotipando estos callos mediante el uso de PCR para identificar aquellos con la translocación deseada. Tales callos se pueden regenerar en plantas y mostrarían una pérdida de ligamiento entre los marcadores que flanquean el fragmento de introgresión. Este enfoque puede utilizarse para reducir el tamaño de un fragmento de introgresión en los protoplastos vegetales somáticos de una manera independiente de la homología.

**Construcción de nucleasa de dedo de zinc**

[0080] Para nuestros experimentos se utilizó el plásmido pKG7402. Este plásmido contiene 2 genes de nucleasa de dedo de zinc diseñados para unirse e inducir una rotura de doble cadena de ADN en los genes de la acetolactato sintasa (ALS) de tomate (ALS1 y ALS2). ALS1 se localiza en el brazo corto del cromosoma III y ALS2 se localiza en el brazo largo del cromosoma VII.

**Material vegetal**

[0081] Se usó la línea de *Solanum lycopersicum* (IL7-3) que contiene una introgresión de la especie de tomate silvestre *Solanum pennellii* en el cromosoma VII. Este fragmento de introgresión es de aproximadamente 56 cM en tamaño y constituye la mayor parte del brazo largo de este cromosoma (Eshed, Y y Zamir, D. (1995) Genetics 141: 1147-1162) e incluye el gen ALS2 de *S. pennellii*. Se retrocruzaron plantas homocigóticas para este fragmento de introgresión con la línea parental (M82) y se recogieron semillas F1. Estas se esterilizaron entonces y se germinaron en el medio sintético (MS20: medio MS + vitaminas (Duchefa) 4,4 g/l, sacarosa 20 g/l, microagar 8 g/l) en frascos altos con un fotoperiodo de 16/8 h de 2000 lux a 25°C y 60-70% HR. Las líneas parentales M82 e IL7-3 homocigótica se trataron también de la misma manera y se mantuvieron como plantas estériles en cultivo de tejidos. Después de 3-4 semanas, las hojas maduras se cosecharon para la producción de protoplastos.

**Aislamiento y transfección de protoplastos**

[0082] El aislamiento y la regeneración de protoplastos de hojas de tomate se ha descrito previamente (Shahin (1985) Theor. Appl. Genet. 69: 235-240; Tan (1987) Theor. Appl. Genet. 75: 105-108; Tan (1987) Plant Cell Rep. 6: 172-175) y las soluciones requeridas pueden encontrarse en estas publicaciones. Brevemente, se colocó 1 g de hojas recién cosechadas en un plato con 5 ml de CPW9M y, utilizando una cuchilla de escalpelo, cortadas cada mm en perpendicular al tallo principal. Estas se transfirieron a una placa fresca de 25 ml de solución enzimática (CPW9M con 2% de celulosa onozuka RS, 0,4% de macerozima onozuka R10, 2,4-D (2 mg/ml), NAA (2 mg/ml), BAP (2 mg/ml), pH 5,8) y la digestión continuó durante toda la noche a 25°C a oscuras. Los protoplastos se liberaron entonces colocándolos en un agitador orbital (40-50 rpm) durante 1 hora. Los protoplastos se separaron de los residuos celulares pasándolos a través de un tamiz de 50 µm y lavando el tamiz

2x con CPW9M. Los protoplastos se centrifugaron a 85 g, el sobrenadante se descartó y luego se recogió en la mitad de volumen de CPW9M. Los protoplastos se recogieron finalmente en 3 ml de CPW9M y entonces se añadieron 3 ml de CPW18S cuidadosamente para evitar la mezcla de las dos soluciones. Los protoplastos se centrifugaron a 85 g durante 10 minutos y los protoplastos viables flotando en la capa interfásica se recogieron utilizando una pipeta Pasteur larga. El volumen de protoplastos se aumentó a 10 ml añadiendo CPW9M y el número de protoplastos recuperados se determinó en un hemocitómetro. Para la transfección con una construcción plasmídica, la suspensión de protoplastos se centrifuga a 85x g durante 10 minutos a 5°C. El sobrenadante se descarta y el sedimento de protoplastos se resuspendió a una concentración final de  $10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$  en medio de lavado KCl. En un tubo de 10 mL, se mezclaron suavemente pero íntegramente 250  $\mu\text{L}$  de suspensión de protoplastos +/-40  $\mu\text{g}$  de ADN de plásmido puro y 250  $\mu\text{l}$  de solución de PEG (40% PEG4000 (Fluka #81240), 0,1 M de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0,4 M de manitol). Después de 20 min. de incubación a temperatura ambiente, se añaden gota a gota 5 mL de 0,275 M de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  frío. La suspensión de protoplastos se centrifuga durante 10 min a 85x g a 4°C y se descarta el sobrenadante. Después del tratamiento con PEG, los protoplastos de tomate se incluyeron en la solución de alginato para la regeneración. Se añadieron 2 ml de solución de alginato (manitol 90 g/l,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  140 mg/l, alginato-Na 20 g/l (Sigma A0602)) y se mezclaron íntegramente por inversión. 1 ml de esto se puso en capa uniformemente en una placa de Ca-agar (72,5 g/l manitol, 7,35 g/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 8 g/l agar) y se dejó polimerizar. Los discos de alginato se transfirieron entonces a placas de Petri de 4 cm con 4 ml de medio de cultivo K8p y se incubaron a oscuras a 30°C durante 7 días. Los discos de alginato se cortaron entonces en tiras gruesas de 5 mm y se pusieron en capa sobre medio de regeneración sólido TM-DB (TM2 basal 2,5 g/l (Duchefa), vitaminas Nitsch 110 mg/l, sacarosa 50 g/l, microagar 8 g/l, 2,4-D 0,2 mg/l, BAP 0,5 mg/l, pH 5,8) durante 3 semanas. Los callos regenerados se recogieron entonces con pinzas y se colocaron individualmente en medio GM-ZG (MS macro+micro en polvo (Duchefa) 4,3 g/l, vitaminas Nitsch 110 mg/l, manitol 36,4 g/l, sacarosa 2,5 g/l, microagar 8 g/l, zeatina 1 mg/l, GA3 1 mg/l, pH 5,8). Se tomaron entonces muestras de estos para el aislamiento de ADN cuando habían alcanzado aproximadamente 7 mm. Tras la regeneración de los brotes, los callos se transfirieron a medio MS-ZI (MS + vitaminas (Duchefa) 4,4 g/l, sacarosa 20 g/l, microagar 8 g/l, zeatina 2 mg/l, IAA 0,1 mg/l, pH 5,8). Después de 2-3 semanas, los brotes se extirparon y se transfirieron a medio de enraizamiento (MS + vitaminas (Duchefa) 4,4 g/l, sacarosa 20 g/l, microagar 8 g/l, 0,5 mg/ml IBA, pH 5,8) y, posteriormente, al invernadero.

#### Secuenciación del locus ALS2 de *S. pennellii*

[0083] El ADN cromosómico se aisló de la línea homocigótica IL7-3 (DNeasy kit, Qiagen) y el kit Genome Walker (Clontech) se usó para determinar la secuencia del locus ALS2 de *S. pennellii* según las instrucciones del fabricante. Brevemente, 500 ng de ADN genómico se digirieron durante toda la noche con una enzima de restricción (DraI, EcoRV, PvuII o StuI) y se ligaron los adaptadores Genome Walker. Los cebadores anidados específicos de ALS2 11\_11533 (5'-TGGGAATGGTGGTTCAGTGGGAGGA-3') y 11\_11534 (5'-GGTGGTTCAGTGGGAGGATCGATTCT-3'), diseñados en una secuencia conservada en el ORF de ALS2 de *S. lycopersicum*, se usaron para amplificar el extremo 3' del locus ALS2 de *S. pennellii*. Correspondientemente, el par de cebadores anidados 11\_11536 (5'-CGTAGCTCCCGGACCAGATGTAGCA-3') y 11\_11537 (5'-ATGTAGCAATACAACACCAGGGAACCCA-3') se usaron para amplificar el extremo 5' del locus ALS. Los productos de PCR se escindieron del gel y se secuenciaron. En base a estas secuencias, se diseñaron cebadores adicionales (11\_13680 (TCACCCCTTCACCTTACC) y 11\_13681 (CCTTCACATTTAACCAAAGC)) que amplificaron la región intercalada y se usaron para completar la secuenciación del locus (figura 2). De esta manera, se demostró que el sitio diana de la ZFN en ALS2 estaba conservado en ambas líneas M82 y IL7-3.

#### Diseño de cebadores específicos del locus ALS2

[0084] El alineamiento de las secuencias del ALS2 de *S. pennellii* y M82 nos permitió identificar diferencias de secuencia que podrían aprovecharse para el diseño de cebadores específicos que amplificarían selectivamente solo uno de los alelos y que amplificarían un producto de PCR que incluye el sitio diana de la ZFN. Para amplificar el locus ALS2 de *S. pennellii* usamos los cebadores 11\_13680 + 11\_13681 y, para el locus ALS2 de M82, se usaron los cebadores 09Q136 (GAAAGGGAAGGGGTTAAGG) y 12\_07231 (CTTCAGTAGAGCCCTTGC). Los resultados se muestran en la figura 2a y muestran que estos cebadores amplificaron una banda del tamaño correcto en las líneas parentales IL7-3 y M82 y que ambos locus estaban presentes en la línea F1 derivada a partir de un cruce de estos dos progenitores (línea BC).

#### Inducción de INDEL en el locus ALS2 de *S. pennellii*

[0085] Los protoplastos se aislaron tanto de la línea IL7-3 como de plantas M82 y se transfectaron con el plásmido pKG7402 o con un plásmido que lleva un casete 35S::GFP (pKG7381). Después de 12 horas, los protoplastos transfectados con pKG7381 se observaron bajo el microscopio de fluorescencia para evaluar la expresión de GFP. Esta fue equivalente tanto en los protoplastos IL7-3 como en los M82 (datos no mostrados), lo que demuestra que la introgresión de *S. pennellii* en la línea IL7-3 no afectó la transformación. Después de 48 horas, los protoplastos se cosecharon por centrifugación y el ADN genómico se aisló utilizando el kit DNeasy

(Qiagen). Se realizó entonces una reacción de PCR en este ADN usando los cebadores 09Q132 (CTTGTGGAGGCACTTGAA) y 09Q133 (CCGGACCAGATGTAGCAATA) que amplifican un fragmento del locus ALS2 de 205 bps que incluye el sitio diana de la ZFN. El producto de PCR se purificó y se clonó entonces en un vector (pCR2.1:Blunt; Invitrogen) y se transformó en células de *E. coli* One Shot Chemically Competent (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante y sembradas en placas en medio LB suplementado con 50 µg/ml de canamicina (Duchefa). Se realizó posteriormente una PCR en 96 colonias bacterianas individuales usando los mismos cebadores, y los productos de la PCR resultantes se analizaron mediante análisis de la curva de fusión de alta resolución en un equipo Roche Light Cycler para identificar productos de la PCR con características de fusión aberrantes. Tales clones se tomaron entonces para la secuenciación y los resultados se muestran en la figura 3. Para ambas líneas, IL7-3 y M82, aproximadamente el 10% de los productos de la PCR derivados de la población de protoplastos transfectados contenían una INDEL en el sitio diana de la ZFN. El tamaño de estas INDEL en ambas líneas fue comparable también y, así, se puede concluir que el locus ALS2 de *S. pennellii* sirve de diana de manera tan eficaz como el locus ALS2 de M82. Como control, también analizamos 96 productos de la PCR derivados de la transfección con pKG7381. Ninguno de estos mostró características de fusión aberrantes y, cuando se secuenciaron dos, no mostraron ninguna alteración de la secuencia (datos no mostrados).

### Translocaciones dirigidas en el locus ALS2 en protoplastos de tomate

[0086] Los protoplastos se aislaron de plantas F1 cultivadas *in vitro* (derivadas a partir de un cruce M82 x IL7-3). Además, también aislamos protoplastos de plantas cultivadas *in vitro* M82 e IL7-3. Los protoplastos se transfectaron con 40 µg de plásmido pKG7402 (o 40 µg de pKG7381 como control) y se mantuvieron en medio líquido durante 48 horas. Los protoplastos de cada transfección se cosecharon entonces mediante centrifugación (800 rpm, 10 minutos) y luego se aisló ADN genómico de estas poblaciones de protoplastos utilizando el kit DNeasy (Qiagen). Para detectar la presencia de translocaciones en la población de protoplastos, se usaron combinaciones de los cebadores específicos del locus. Por ejemplo, la combinación del cebador de ALS2 de *S. pennellii* (11\_13680) y del cebador de M82 (12\_07231) solo debería amplificar cromosomas que han experimentado una translocación y producirán un producto de PCR que incluye la unión de la translocación en la posición del sitio diana de la ZFN. Se realizó una reacción de PCR usando estos cebadores en todas las muestras de ADN de protoplastos utilizando las siguientes condiciones de ciclado {95°C 2'; [95°C 30", 60°C 30", 72°C 2']x40; 72°C 5'} en una reacción consistente en 1 µl de ADN genómico de protoplastos, 5 µl de 5x tampón Herculase Fusion (Agilent), 0,3 µl de 100 mM dNTPs, 1,25 µl de cebador 11\_13680, 1,25 µl de cebador 12\_07231, 0,25 µl de enzima Herculase II Fusion (Agilent) y 15,95 µl de agua. La electroforesis de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1% mostró que todas las muestras produjeron una banda del tamaño esperado, pero que la intensidad de la banda era más intensa en las muestras de plantas F1 tratadas con pK7402 (datos no mostrados). Como observamos un producto de PCR en las muestras de control, esto sugirió que la combinación de cebadores 11\_13680 + 12\_07231 fue capaz de generar un producto de PCR inespecífico de los locus ALS2 de *S. pennellii* y M82 inalterados, pero que el producto de PCR de los protoplastos F1 tratados pueden ser más intensos, ya que además contiene productos de PCR generados de las uniones de translocación. Los productos de PCR de 2,2 kbps tanto de los tratamientos como de los controles se escindieron del gel y se purificaron utilizando el kit de aislamiento Qiagen Gel. Los productos de PCR se clonaron entonces utilizando el kit de ligamiento Zero Blunt PCR (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante, y los plásmidos resultantes que contenían los productos clonados se purificaron de células *E. coli* TOP10 y se secuenciaron los productos de PCR completos de 2,2 kbps. Los resultados se muestran en la figura 4. Los cebadores fueron, de hecho, capaces de amplificar un producto de PCR de ALS2 de las muestras de control, pero la secuenciación mostró que estos siempre se derivaron del locus ALS2 WT (M82) o del locus SpALS2 (IL7-3). El análisis de dos productos de PCR derivados de los protoplastos F1 transfectados con el plásmido de control (pKG7381) mostró que ambos locus se han amplificado en esta reacción de PCR. Todos los productos de PCR de los controles mostraron la secuencia esperada. Los productos de PCR derivados de los protoplastos híbridos F1 tratados con pKG7402 mostraron todos una pequeña INDEL en el sitio de unión a ZFN, similar a aquellos que habíamos observado anteriormente cuando los protoplastos de las líneas parentales se trataron con pKG7402. Sin embargo, para cada uno de estos productos de PCR de 2,2 kbp, los SNP corriente arriba del sitio de unión a ZFN indicaron que esta era la secuencia de ALS2 de *S. pennellii* mientras que los SNP corriente abajo del sitio de unión a ZFN derivaron de la secuencia de ALS2 de M82, como esperaríamos para un fragmento de unión de translocación. Por lo tanto, esto proporcionó buena evidencia de que en la población de protoplastos había células presentes que habían experimentado una translocación dirigida al locus ALS2 entre la introgresión de *S. pennellii* y el cromosoma VII de M82 WT, dando como resultado un intercambio de brazos cromosómicos y la rotura del ligamiento en el fragmento de introgresión.

[0087] Para cuantificar cuántos protoplastos en la población tratada contenían una translocación dirigida, intentamos cuantificar el número de productos de PCR que tienen esta organización de ALS2 quimérica característica *S. pennellii*/M82. Realizamos una PCR en el ADN genómico utilizando los cebadores 12\_1216 (CTTCCACCCTTCTTCCCAAATC) y 12\_11217 (TGCCAACTCCTGCACATTCA). Estos cebadores no son específicos y amplifican por tanto un producto de 1,3 kbps de ambos locus ALS2 WT y SpALS2. Tal reacción PCR consiste así en SpALS2, ALS2 WT y productos de translocación dirigida. Para determinar las cantidades

relativas de cada uno de estos productos en la reacción PCR, y así la eficiencia del proceso de translocación dirigida mismo, los productos de la reacción de PCR se clonaron y genotiparon. El producto de PCR de 1,3 kbps incluye el sitio de unión a ZFN y dos sitios de restricción diagnósticos situados en cada lado. Corriente arriba del sitio de unión a ZFN, un cambio A→G en la secuencia de ALS2 de *S. pennellii* crea un sitio de restricción *HindIII*. Corriente abajo del sitio de unión a ZFN un cambio C→A en la secuencia ALS2 de *S. pennellii* crea un sitio *MseI*. Estos sitios se usaron como una base para un ensayo CAPS para genotipar productos de PCR para la secuencia ALS2 que flanquea el sitio de unión a ZFN. El producto de PCR de 1,3 kbps se clonó utilizando el kit de ligamiento Zero Blunt PCR según las instrucciones del fabricante. Las colonias bacterianas individuales se resuspendieron entonces en 50 µl de agua, se calentaron a 95°C durante 5 minutos y, luego, 1 µl de esto se usó en una PCR anidada con los cebadores 09Q132 + 09Q133 o con 09R037 + 09R040 que se digirieron posteriormente con *HindIII* o *MseI*, respectivamente. La presencia o ausencia de ambos sitios *HindIII* y *MseI* era indicativa de un locus ALS2 inalterado (bien SpALS2 o bien ALS2 WT), mientras que un producto de PCR clonado que solo tiene uno de estos productos de PCR pueden derivar de un evento de translocación dirigida. En total, 249 colonias bacterianas se genotiparon para la presencia de solo uno de estos sitios de restricción y cinco se identificaron finalmente. Para confirmación, se secuenciaron los productos de PCR de 1,3 kbps de estos cinco clones. De los cinco productos de PCR, encontramos dos que tenían la organización esperada (figura 4). El primero, el clon #1, mostró la secuencia ALS2 de *S. pennellii* corriente arriba del sitio de unión a ZFN y la secuencia ALS2 de M82 corriente abajo. Para el clon #2, esto estaba invertido. Por lo tanto, podemos concluir que la eficiencia de formación de translocación dirigida en nuestra disposición experimental es aproximadamente de 2 en 249 (0,8%). Esto sugiere que solo un número limitado de protoplastos necesita cribarse para aislar células con translocaciones dirigidas.

#### Aislamiento de plantas de tomate con translocaciones dirigidas

[0088] Los protoplastos se aislaron de hojas de la línea híbrida F1 y se transfectaron con 40 µg de plásmido pKG7402. Para mayor desarrollo, se incluyeron entonces en los discos de alginato que se incubaron luego en 4 ml de medio K8p durante 7 días. Los discos se cortaron entonces en tiras de 5 mm que se colocaron luego en medio TM-DB sólido (2-4D, BAP) para mayor desarrollo de los microcallos. Después de 3 semanas de crecimiento, se recogieron 800 callos con fórceps y se transfirieron a medio TM-DB fresco. Hemos mostrado que las uniones de translocación siempre contienen una INDEL pequeña en el sitio de corte de ZFN y, así, primero cribamos todos los callos para esta. Para genotipificar, se raspó un pequeño fragmento de tejido de cada callo en desarrollo utilizando una punta de pipeta de plástico y luego se resuspendió en 20 µl de tampón de dilución del kit Phire Plant Direct PCR (Thermo Scientific). Para la PCR directa en este material, se tomó 1 µl de la dilución y se mezcló con 10 µl 2x de tampón de reacción, 2 µl de los cebadores 12\_11216 y 12\_11217 (5 pmol), 0,2 µl de la polimerasa Phire y agua hasta un volumen de reacción final de 20 µl. Las condiciones de PCR usadas fueron; 98°C 5 min, {98°C 5 segundos, 62°C 5 segundos, 72°C 1,5 minutos} x40, 72°C 5 min. Estos productos de PCR se diluyeron entonces 200x en agua y 1 µl de esto se usó en una PCR anidada para amplificar el sitio de corte de ZFN (1 µl de producto de PCR, 5 µl de tampón de reacción 10x, 0,5 µl de dNTPs (20 mM), 1 µl de 09Q132 (5 pmol), 1µl de 09Q133 (5 pmol), 0,2 µl de AmpliTaq (5 U/µl) y 41,3 µl de agua con las condiciones de ciclado 94°C 2 min, {94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 30 segundos} x30, 72°C 5 min. Esto genera fragmentos de PCR de 200 bps, incluyendo el sitio de corte de ZFN, que se pueden cribar para la presencia de INDEL. Estas reacciones de PCR se realizaron también en el material de la línea F1 para generar productos de PCR de control. Para detectar callos con INDELS en el sitio de corte de ZFN, 4 µl de cada producto de PCR de 200 bps se mezclaron con 4 µl del producto de PCR de control y 1 µl de ambos TE y LC Green. Las características de fusión de esta mezcla se determinaron entonces utilizando el protocolo Gene Scanning del Light Cycler de Roche. Identificamos 53 muestras con características de fusión aberrantes indicativas de una INDEL en el sitio de corte de ZFN. Los productos de 1,3 kbps de estos 53 callos se clonaron entonces utilizando el kit de clonación Zero Blunt PCR (Invitrogen). Posteriormente, 4 colonias bacterianas de cada ligación se genotiparon para la presencia de los sitios *HindIII* y *MseI* como se ha descrito anteriormente. A partir de un callo único, TT1 y TT2, fuimos capaces de mostrar que todos los clones bacterianos evaluados carecían de uno de los sitios de restricción, lo que demuestra que esta célula había experimentado una translocación dirigida recíproca. Estos clones se secuenciaron y fuimos capaces de mostrar que, similar a las secuencias derivadas de los protoplastos, se había producido una translocación dirigida en estos callos. La frecuencia a la que se identificaron estos callos (0,25%) está en el mismo rango determinado previamente y permanece inesperadamente alta.

#### Análisis de marcadores de los RFPL que flanquean la introgresión de *S. pennellii*

[0089] Los callos TT1 y TT2 pueden después transferirse a medio de germinación y los brotes posteriores inducirse para formar raíces. Las plantas se transfieren luego al invernadero para un genotipificado adicional. La semilla se recoge de la planta TT1 y se germina en suelo. El material de las hojas se cosecha de las plántulas y se aísla el ADN. Para demostrar que los marcadores TG20 y TG143 ya no están ligados en la progenie, las plántulas se analizan para la presencia de estos marcadores. La autofecundación de las plantas F1, donde los dos marcadores están presentes en el mismo cromosoma flanqueando la introgresión, se esperaría que diera progenies donde el 25% carece de cualquiera de los marcadores y el 75% son positivas para ambos

5 marcadores. En una planta que contiene una translocación dirigida, el ligamiento entre los marcadores ya se ha roto en los protoplastos. Cuando la progenie de tales plantas se analiza, esperaríamos que el 50% tuviera ambos marcadores (en este caso situados en cromosomas diferentes), el 25% contuviera solo el marcador TG20 y el 25% contuviera solo el marcador TG143. El análisis de segregación de marcadores se puede realizar en la progenie de las plantas TT1 y TT2. Por lo tanto, la expresión transitoria de una nucleasa específica de sitio tal como una ZFN en protoplastos de tomate puede inducir translocaciones dirigidas recíprocas que dan plantas viables y se pueden transmitir a la generación siguiente. Este método puede utilizarse para romper cualquier forma de ligamiento entre dos secuencias de ADN en una manera independiente de secuencia.

### **Ejemplo 2**

#### **Rotura del arrastre por ligamiento en el locus TYLCV**

10 [0090] El virus del rizado amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) es una enfermedad de tomate devastadora provocada por un begamovirus y transmitida por la mosca blanca. La infección por TYLCV es común en regiones cálidas (sub)tropicales y esto limita el crecimiento del tomate en estas regiones. La resistencia a la infección por TYLCV se ha encontrado en varias especies de tomate silvestre (Ji et al. (2007) en Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease (Czosnek, H., ed). Países Bajos: Springer, págs. 343-362). Actualmente, cinco locus de resistencia se usan en la mejora, Ty1 a Ty5. El locus Ty1 de *S. chilense* LA1969 fue el primer locus de resistencia en ser mapeado y está ligado al locus Ty3 en el cromosoma 6 y se ha incorporado en varias variedades disponibles comercialmente. Sin embargo, el locus de resistencia Ty1 sufre arrastre por ligamiento, ya que está acompañado de rasgos indeseables como la autonecrosis. El locus Ty1 se sitúa en la región pericentromérica del cromosoma 6 y se localiza en un fragmento de introgresión de 17MB que sufre una supresión severa de la recombinación. Verlaan et al. (2011, Plant J 68: 1096-1103) estudió la recombinación en el locus Ty1 en 3000 plantas F2, pero no pudieron detectar ningún evento de recombinación en su población en la mayoría del fragmento de introgresión. Esto parece deberse a varias reorganizaciones cromosómicas en *S. chilense* LA1969 que inhiben la recombinación en esta región durante la meiosis. Como la producción de translocaciones dirigidas es independiente de la homología, esto puede utilizarse para reducir el tamaño del locus Ty1 para romper el arrastre por ligamiento y simplificar el mapeo fino del locus Ty1.

15 [0091] Se han identificado varios BAC de *S. lycopersicum* que están presentes en el fragmento de introgresión Ty1 (Verlaan et al., 2011, Plant J 68: 1096-1103). Usamos la secuencia de uno de estos (H208D24, disponible en: <http://solgenomics.net/maps/physical/cloneinfo.pl?id=77280>) para identificar genes que probablemente representan secuencias de copia única en el genoma del tomate. Este BAC lleva el homólogo del tomate del gen de *A. thaliana* PRH75 (Plant RNA Helicase 75, At5g62190) anotado como Unigene SGN U268902. Aunque este BAC se eligió de forma arbitraria, cualquier otra secuencia en la región de introgresión que esté presente en ambos cromosomas también podría usarse para ejecutar estos experimentos. Para identificar diferencias de nucleótidos en este locus entre *S. lycopersicum* y *S. chilense* LA1969, se puede realizar Genome Walking en este locus en ambas especies de plantas. Esto permite el diseño de cebadores de PCR específicos para los dos locus SGN U268902. Posteriormente, se puede diseñar una construcción TALEN que se una y corte entre los sitios de cebadores para validar su actividad.

20 [0092] Una línea de planta heterocigota para la introgresión Ty1 se cultiva entonces *in vitro* y los protoplastos se aíslan y se transfectan con el ADN del plásmido TALEN. Los protoplastos de tomate se regeneran entonces en callos y se criban utilizando combinaciones de los cebadores específicos del locus SGN U268902 para identificar callos que contienen uniones de translocación. Estos se regeneran entonces en plantas y se autofecundan y se determina la segregación de marcadores que flanquean el locus SGN U268902. Entonces es posible demostrar que el tamaño del fragmento de introgresión Ty1 se había reducido y estas plantas se pueden analizar además para la pérdida de arrastre por ligamiento y para una evaluación de las frecuencias de recombinación en los fragmentos de introgresión acortados.

### **Ejemplo 3**

#### **Creación de una introgresión de un tamaño definido en el material de mejora de tomate y mapeo fino de un gen responsable de la maduración temprana de los frutos**

25 [0093] Puede identificarse una línea de tomate, ER43, que lleva un locus en el cromosoma I responsable de la maduración temprana de los frutos. A través del análisis de marcadores, se puede establecer que el locus está localizado entre los marcadores AFLP MM101 y MM107, que están separados por 527 kbps. La secuencia completa de esta región está disponible y, así, se puede seleccionar una serie de secuencias diana distanciadas por 100 kbps que, en base al análisis BLAST, son secuencias de copia única en el genoma del tomate. Se diseñan cebadores que flanquean estas secuencias diana y se usan para amplificar los locus correspondientes en la línea de tomate MoneyMaker (disponible en: <http://www.seedaholic.com/tomato-cherry-fox-organic-seeds->

1.html) para confirmar, en primer lugar, que las secuencias diana son idénticas en ambas líneas y, en segundo lugar, para identificar diferencias de secuencia alrededor de estas secuencias diana en las dos líneas de tomate que se pueden aprovechar para el diseño de cebadores específicos. Posteriormente, se diseñan cinco construcciones TALEN para producir RDC en estas secuencias diana. Las secuencias TALEN se sintetizan entonces y se clonan en una construcción plasmídica fusionando la TALEN con una secuencia promotora que está activa en los protoplastos de tomate, tal como el promotor de tomate AA6. Los protoplastos de las líneas ER43 y Moneymaker se transfectan con cada plásmido TALEN, se incuban durante 24 horas en un medio líquido adecuado y luego se cosechan por centrifugación. El ADN genómico se aísla entonces de cada población de protoplastos transfectados y cada una de las cinco secuencias diana se amplifica luego usando cebadores específicos de cromosoma. Los productos de PCR se analizan entonces para la presencia de INDEL en la secuencia diana, que estarían presentes en alrededor del 10% de cada lote de protoplastos tratados. Esto demostrará que las construcciones TALEN están activas en la célula y son capaces de inducir RDC en las secuencias diana de ambas líneas de tomate. Las líneas ER43 y Moneymaker se cruzan luego para producir una línea F1 que se mantiene bajo condiciones estériles en cultivo de tejidos y se usan para la producción de protoplastos. Estos protoplastos se transfectan luego con las construcciones TALEN y se cultivan 1000 callos derivados de cada transfección y luego se genotipan para la presencia de una translocación en la secuencia diana usando combinaciones diferentes de los cebadores de PCR específicos de cromosoma. Los callos que contienen estas translocaciones dirigidas se regeneran luego en plantas y luego se autofecundan para crear plantas F2 que son homocigóticas para cada translocación. Estas se fenotipan luego para identificar el fragmento cromosómico que lleva el locus de maduración temprana. Luego se construye un mapa físico de esta región y puede identificarse el gen responsable del fenotipo de maduración temprana.

#### **Ejemplo 4**

##### **Translocaciones dirigidas en *Brassica napus***

[0094] La colza, o canola (*Brassica napus*) es una especie anfidiplóide formada de la hibridación interespecífica de *Brassica rapa* (el genoma A) y *Brassica oleraceae* (el genoma C). La mejora de pedigrí selectiva se ha usado intensivamente para mejorar tanto el rendimiento como la calidad de las semillas en este cultivo. La mejora de pedigrí implica la selección y la endogamia de individuos F2 superiores y de generaciones posteriores resultantes de cruces entre pares de variedades de cultivo establecidas. Sin embargo, debido al número limitado de plantas F2 cribadas, los productos finales del proceso de mejora contienen a menudo grandes cantidades de los genomas parentales que proporcionan un efecto negativo en los rasgos agronómicos. Esto se ha demostrado en el tipo "Tapidor" de *B. napus* que, incluso después de generaciones múltiples de retrocruces, todavía tenían un 29% de uno de los genomas parentales (Sharpe y Lydiat, 2001, Genome 46: 461-468). Es posible calcular la probabilidad de que un individuo F2 hipotético, derivado a partir de un F1 que lleva distintos alelos donadores y de élite en todas las unidades genómicas, no contenga ningún genotipo donador fijo. Se ha estimado que esto ocurre aproximadamente una vez en 81825 plantas F2 (Sedcole, T.R. (1977) Crop Sci. 17: 667-668). En cambio, los programas de mejora de pedigrí en la colza, generalmente, solo seleccionan entre 1000 y 2000 plantas F2, lo que resulta en la selección de un individuo que contiene una gran cantidad de genotipo donador no ligado. Combinados con la práctica de producción de haploides duplicados para aumentar la velocidad de mejora, los genotipos parentales pueden volverse homocigóticos y fijarse muy rápidamente, incluso cuando no están ligados al locus de interés.

[0095] Debido a la naturaleza anfidiplóide de *B. napus*, la recombinación meiótica entre los genomas A y C se evita durante la meiosis. Este es también el caso para otras especies anfidiplóides tales como tabaco (*Nicotiana tabacum*), trigo duro (*Triticum durum*), trigo común (*Triticum aestivum*) y algodón (*Gossypium hirsutum*). Considerando un ejemplo en *B. napus*, se pueden introducir rasgos agronómicamente importantes de las líneas parentales en líneas comerciales a través de un programa de mejora que causa que el locus parental, normalmente en un estado homocigótico, esté presente en uno de los genomas (por ejemplo, en el genoma A). Sin embargo, debido a las restricciones en la recombinación entre los genomas durante la meiosis, el locus correspondiente no cambia en el genoma C. Si esta región también lleva algunos fenotipos negativos o se reduce la eficacia del fenotipo conferido por el locus parental en el genoma A, entonces esto no puede resolverse fácilmente a través de la mejora convencional. Por inducción de una translocación dirigida entre los genomas A y C usando nucleasas dirigidas de sitio, es posible producir una planta que es homocigótica para el locus parental en ambos genomas A y C (esquemáticamente mostrados en la figura 5). Otra posible aplicación de esta tecnología en poliploides es la transferencia de mutaciones inducidas por mutágenos entre genomas para crear líneas completamente homocigóticas. La selección por mutación es un método común de mejora de plantas. Esto implica el tratamiento de plantas, normalmente semillas, con un mutágeno tal como etilmetanosulfato (EMS) que genera cambios de C a T en todo el genoma. Luego las poblaciones mutadas de plantas se cultivan, se autofecundan y, en la siguiente generación (M2), las plantas se criban para fenotipos alterados (cribado directo) o se seleccionan en base a mutaciones inducidas en el gen de interés cuando la secuencia es conocida (cribado inverso). En muchos casos, se requiere una mutación que confiere un fenotipo de pérdida de función (completa) y esto requiere la identificación de dos líneas de plantas, llevando cada una una mutación nula en el gen de

interés en uno de los genomas. Entonces, estas plantas se pueden cruzar, autofecundar las F1 e identificar las plantas F2 que son homocigóticas para ambas mutaciones nulas en ambos genomas. Este es un enfoque muy lento y costoso y se vuelve más difícil con especies como el trigo hexaploide cuando se trata de tres genomas. Para evitar tener que aislar mutaciones independientes en cada genoma y luego realizar cruces, revelamos que se pueden inducir translocaciones dirigidas para transferir una mutación (nula) inducida entre genomas y alcanzar rápidamente un estado homocigótico (figura 5).

[0096] Los experimentos se enfocan en la inducción de una translocación dirigida entre el cromosoma 8 de *B. napus* de los genomas A y C. La línea "Tapidor" de *B. napus* se selecciona para estos experimentos, ya que lleva un fragmento de introgresión grande en el cromosoma 8 del genoma A de la línea "Bronowski" de *B. napus* que contiene muchas diferencias de secuencia con la región correspondiente en el cromosoma 8 del genoma C. Luego, un gen único presente en ambos genomas A y C se identifica y se secuencia en la línea "Tapidor" para identificar las diferencias de secuencia. En base a estas, se diseñan cebadores que solo amplifican el locus del genoma A o C. Para inducir una RDC de ADN en los locus en los genomas A y C, se diseña una construcción TALEN. Los locus A y C se criban para una secuencia idéntica a ambos y se diseñan las TALEN para unir y cortar en esta secuencia. Las TALEN se clonan en un vector plasmídico con un promotor vegetal constitutivo (35S) y se introducen en protoplastos de *B. napus* "Tapidor" usando transfección con PEG. Después de 48 horas, se aísla ADN de los protoplastos y los cebadores específicos de locus se utilizan para generar productos de PCR que se secuencian para demostrar que la construcción TALEN es capaz de inducir INDEL en el sitio diana. El experimento se repite luego y los callos de *B. napus* individuales se regeneran y se genotipan para la presencia de translocaciones dirigidas usando combinaciones de los cebadores específicos del locus del genoma A y C. Se pueden identificar callos individuales que tienen translocaciones dirigidas en las posiciones esperadas y también INDEL de diferentes tamaños en el cromosoma 8 (por ejemplo, 4 bps en el genoma A, 3 bps en el genoma C) que representan INDEL diferentes en las uniones de translocación en los cromosomas híbridos A y C. Las plantas se regeneran luego a partir de estos callos y se cultivan hasta la madurez. La generación siguiente se criba luego para plántulas que son homocigóticas para estas INDEL y estas son homocigóticas también para el resto del brazo cromosómico.

### **Ejemplo 5**

#### **Fusión de dominios de locus utilizando translocaciones dirigidas**

[0097] La línea de plantas IR3 tiene una fuerte resistencia a una amplia gama de insectos debido a la presencia de un compuesto insecticida a alta concentración en sus tricomas. Esta alta concentración se consigue por una alta expresión de uno de los genes (IK4) implicados en la síntesis bioquímica de este compuesto. La alta expresión se consigue por un promotor nuevo que conduce a una alta activación transcripcional de una manera específica de tricomas. La línea de plantas IR12 también contiene el gen IK4, pero es susceptible a ser alimento de los insectos. El análisis molecular ha demostrado que el gen IK4 no se expresa en los tricomas de IR12 y que esto se debe a diferencias de nucleótidos en el promotor del gen IK4 en la línea IR12 que lleva a su inactivación. El objetivo de estos experimentos fue restaurar la alta expresión específica de tricomas del gen IK4 en la línea IR12 por inducción de una translocación dirigida entre las líneas, dando como resultado la fusión del promotor IR3 con el gen IK4 de la línea IR12. Se identifica una secuencia diana situada 20 bps corriente arriba del ORF de IK4 y se diseña una TALEN para crear una RDC en este sitio. La TALEN se clona entonces detrás de un promotor adecuado para la expresión en plantas y el plásmido resultante se transfecta luego en protoplastos de ambas líneas IR3 e IR12. Como se describe en el ejemplo 3, de esta manera somos capaces de confirmar que la expresión de TALEN es capaz de inducir una RDC en la secuencia objetivo en ambas líneas de plantas. Después se forma una línea F1 por cruce de las líneas IR3 e IR12 y se usa entonces para producir protoplastos que se transfectan luego con la construcción de la TALEN. Como se describe en otros ejemplos, los cebadores específicos que amplifican el locus IR3 o el IR12 se usan en combinaciones diferentes para identificar callos en los que se ha producido una translocación dirigida. Estos callos se regeneran luego en plantas y se retrocruzan luego con la planta IR12 parental varias veces, seleccionando la translocación dirigida en cada generación, para alcanzar una situación donde la planta es isogénica al IR12 parental excepto por la translocación deseada. Utilizando una RT-PCR cuantitativa se puede mostrar que, en esta línea, la fusión precisa del promotor IR3 con el gen IK4 de IR4 ha restaurado la alta expresión de IK4 en los tricomas y el fenotipado posterior demuestra que esta planta muestra una fuerte resistencia a una amplia gama de insectos. Este ejemplo demuestra que las translocaciones pueden utilizarse para fusionar promotores u otras secuencias reguladoras con genes de otra línea y conseguir así patrones de expresión nuevos que proporcionan fenotipos valiosos.

### **EXAMPLE6**

#### **Creación de marcos de lectura abiertos nuevos utilizando translocaciones dirigidas**

[0098] La resistencia a patógenos fúngicos la confiere a menudo la clase de genes con repeticiones ricas en leucina (LRR, por sus siglas en inglés) situados en las agrupaciones de genes de resistencia distribuidos en todo el genoma de las plantas. La línea de plantas M17 contiene un gen de resistencia LRR (LRR12) que confiere resistencia específica a la raza 1 del patógeno fúngico que causa la enfermedad del tizón tardío. La línea de plantas P15 lleva una agrupación de genes de resistencia similar localizada en la misma posición en el cromosoma. En P15, el gen de resistencia más similar en secuencia a LRR12, denominado LRR63, se localiza en la misma posición en la agrupación, pero tiene una secuencia de aminoácidos diferente. Como consecuencia, el gen LRR63 confiere resistencia a la raza fúngica 2 pero no a la raza 1. Ninguno de estos genes de resistencia confiere resistencia a la raza fúngica 3. Nuestra hipótesis es que se puede conseguir una resistencia nueva a la raza fúngica 3 por combinación de dominios de los genes LRR12 y LRR63. Se conoce la secuencia de ambos de estos genes y los intrones se analizan en busca de secuencias que estaban presentes en ambos LRR12 y LRR63. Luego se diseña una nucleasa específica de sitio que es capaz de inducir una RDC en esta secuencia diana. La nucleasa específica de sitio se clona entonces detrás de un promotor que proporciona la expresión en protoplastos vegetales y el plásmido resultante se usa entonces para transfectar protoplastos de ambas líneas de plantas M17 y P15. Como se describe con más detalle en los otros ejemplos incluidos en la presente, somos capaces de demostrar que la nucleasa específica de sitio es capaz de producir RDC en las secuencias diana de los intrones en ambos LRR12 y LRR63. Una línea F1 se produce luego por cruce de las líneas M17 y P15 y se mantiene en condiciones estériles en cultivo de tejidos. Los protoplastos se aíslan luego de la línea F1 y se transfectan con el plásmido que codifica la nucleasa específica de sitio. Los protoplastos individuales se regeneran luego en callos y estos se genotipan con combinaciones de cebadores específicos diseñados para LRR12 o LRR63 para detectar callos en los que se ha producido una translocación dirigida. Como la translocación se ha dirigido a un intrón, las INDEL pequeñas que se producen durante la translocación solo eliminan parte de la secuencia del intrón y, por lo tanto, no afectan al marco de lectura abierto del gen. La translocación produce la fusión de dominios del gen LRR12 con dominios del gen LRR63, creando un gen nuevo que confiere nuevas resistencias. Los callos con la translocación se regeneran en plantas y se puede demostrar que el marco de lectura abierto quimérico nuevo se compone de dominios tanto de LRR12 como de LRR63 y que proporciona una nueva resistencia a la raza fúngica 3. Este ejemplo demuestra cómo pueden utilizarse translocaciones dirigidas para unir dominios de distintos genes para crear genes nuevos que confieren importantes nuevos fenotipos.

### **Ejemplo 7**

#### **Inducción simultánea de translocaciones dirigidas e inhibición de la meiosis**

[0099] Las translocaciones dirigidas se pueden inducir entre cromosomas homeólogos en un híbrido F1 utilizando nucleasas específicas de sitio. Los callos individuales se pueden regenerar después para producir plantas que luego proceden a través de la meiosis normal, lo que conduce a una población F2 normal con segmentos genómicos de ambas plantas parentales. Luego se requiere un retrocruzamiento extenso para obtener líneas isogénicas para el fenotipado que puede llevar años e implica ciclos múltiples de cribado de la población. Se puede obtener una línea isogénica en una única generación cuando los cruces meióticos se inhiben en la planta original, lo que permite a los cromosomas parentales segregarse de forma aleatoria en los gametos. La mayoría de gametos serán no viables debido al número anormal de cromosomas, pero un pequeño porcentaje contendrá todos los cromosomas del progenitor deseado y, cuando se use en un retrocruce directo con el progenitor requerido, generarán una línea isogénica en una única generación. La translocación dirigida que se va a producir puede ser cualquiera de aquellas descritas en los ejemplos 1 a 6. Se pueden producir protoplastos de plantas F1 y transfectarse simultáneamente con dos plásmidos. El primer plásmido lleva una nucleasa específica de sitio, dirigida por un promotor activo en los protoplastos vegetales, que produce la translocación dirigida deseada como ya se ha descrito. El segundo plásmido lleva una nucleasa específica de sitio diferente, dirigida por un segundo promotor activo en los protoplastos vegetales que está diseñado para crear una RDC en un gen, Dmc1, implicado en la formación de cruces durante la meiosis. La reparación de esta RDC producirá INDEL pequeñas en el gen meiótico que conducen a una pérdida completa de función del gen. Se seleccionan luego los callos que contienen la translocación dirigida deseada y estos se criban luego para mutaciones INDEL homocigóticas adicionales en la secuencia diana de Dmc1. Estos callos se regeneran luego en plantas y se retrocruzan con la planta parental original. Se puede demostrar que las plantas derivadas de este cruce contienen la translocación deseada, pero, por otro lado, son isogénicas con el progenitor de retrocruce. Así, este método se puede aplicar para generar líneas que contienen translocaciones dirigidas y que, de otro modo, son isogénicas también para una de las líneas parentales sin la necesidad de un programa de retrocruces extenso.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

##### **[0100]**

<110> Keygene N.V.

# ES 2 705 033 T3

<120> Método para eliminar un ligamiento genético en una planta

<130> P31411PC00

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> cebador ALS2

<400> 1  
tggaatggt ggttcagtgg gagga 25

15 <210> 2  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador ALS2

20 <400> 2  
ggtggtcag tggaggatc gattct 26

<210> 3  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> cebador ALS2

<400> 3  
cgtagctccc ggaccagatg tagca 25

30 <210> 4  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador ALS2

35 <400> 4  
atgtagcaat acaaacacca gggaacca 29

40 <210> 5  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador adicional

# ES 2 705 033 T3

	<400> 5 tcacccttc accttacc	18
5	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador adicional 2	
10	<400> 6 ccttcacatt taaccaaagc	20
	<210> 7 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebadores ALS2	
	<400> 7 gaaaggaag gggtaagg	19
20	<210> 8 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador als2	
25	<400> 8 cttcagtaga gcccttgc	18
30	<210> 9 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador pcr	
35	<400> 9 cttgtggagg cacttgaa	18
	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> más cebadores	
	<400> 10 ccggaccaga tgtagcaata	20
	<210> 11 <211> 22	

ES 2 705 033 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador

5 <400> 11  
ctccaccct tctccaaa tc 22

<210> 12  
<211> 20  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> cebador

<400> 12  
15 tgccaactcc tgacattca 20

**REIVINDICACIONES**

1. Método para eliminar un ligamiento genético entre un primer locus A y un segundo locus B presentes en un primer cromosoma vegetal en una planta o célula vegetal, comprendiendo el método:

- 5 (a) proporcionar al menos una célula vegetal que comprende dicho primer cromosoma que comprende dicho primer locus A y dicho segundo locus B y que comprende además al menos un segundo cromosoma, donde dichos cromosomas son cromosomas homólogos u homeólogos entre sí; e  
 (b) introducir una rotura de doble cadena en el primer cromosoma, donde la rotura de doble cadena en el primer cromosoma se introduce entre dicho primer locus A y dicho segundo locus B proporcionando así una primera parte del primer cromosoma que comprende el primer locus A y una segunda parte del primer cromosoma que comprende el segundo locus B e introducir una rotura de doble cadena en el segundo cromosoma en un locus o ubicación correspondiente, proporcionando así una primera parte del segundo cromosoma y una segunda parte del segundo cromosoma, y además, donde la primera parte del primer cromosoma que comprende el primer locus A se liga a la segunda parte del segundo cromosoma;

15 donde la rotura de doble cadena en el primer cromosoma se introduce por una nucleasa específica de sitio, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en nucleasa de dedo de zinc, meganucleasa, nucleasa efector TAL y una nucleasa específica de sitio del sistema CRISPR y donde la rotura de doble cadena en el segundo cromosoma se introduce por una nucleasa específica de sitio, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en nucleasa de dedo de zinc, meganucleasa, nucleasa efector TAL y una nucleasa específica de sitio del sistema CRISPR.

20 2. Método según la reivindicación 1 donde el método comprende además una etapa (c) de identificación, utilizando al menos una célula vegetal obtenida en la etapa (b), de al menos una célula vegetal donde el ligamiento genético entre el primer locus A y el segundo locus B en el primer cromosoma se ha eliminado.

25 3. Método según la reivindicación 2 donde en la etapa c) se identifican las células vegetales donde se ha eliminado el ligamiento genético entre el primer locus A y el segundo locus B en el primer cromosoma y, además, donde la primera parte del primer cromosoma que comprende el primer locus A está ligada a la segunda parte del segundo cromosoma y, además, donde la segunda parte del primer cromosoma está ligada a la primera parte del segundo cromosoma.

30 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde dicho segundo cromosoma no comprende un locus que es idéntico a dicho primer locus A y/o no comprende un locus que es idéntico a dicho segundo locus B.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la rotura de doble cadena en el primer cromosoma y/o la rotura de doble cadena en el segundo cromosoma se introducen por la misma nucleasa específica de sitio, la misma nucleasa de dedo de zinc, la misma meganucleasa, la misma nucleasa efector TAL o la misma nucleasa específica de sitio del sistema CRISPR.

35 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde se introduce no más de una rotura de doble cadena en el primer cromosoma y se introduce no más de una rotura de doble cadena en el segundo cromosoma.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde

- 40 i. el primer cromosoma comprende dicho primer locus A y dicho segundo locus B, donde dicho primer locus A está ligado a un rasgo deseable de un primer carácter y dicho segundo locus B está ligado a un rasgo indeseable de dicho primer carácter o un segundo carácter; y donde dicho segundo cromosoma no comprende un locus que es idéntico a dicho segundo locus B ligado a un rasgo indeseable de dicho primer carácter o un segundo carácter.

45 8. Método según la reivindicación 7 donde el rasgo indeseable del primer o segundo carácter es un rasgo seleccionado del grupo que consiste en: un rasgo que influye negativamente en el rasgo deseable del primer carácter, reduce el rendimiento, reduce la resistencia a enfermedades o plagas, reduce el crecimiento, reduce el tamaño, reduce la cantidad de semillas, reduce la resistencia al estrés, incluyendo estrés por sal, calor, frío, agua y sequía.

50 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la célula vegetal proporcionada es una célula vegetal somática, preferiblemente un protoplasto, y/o una célula vegetal obtenida a partir de un híbrido.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la planta es un diploide, triploide, tetraploide, pentaploide, hexaploide, octaploide, decaploide, dodecaploide o un anfiploide.

5 11. Método para proporcionar una planta P1 obtenida a partir de una planta P2, donde dicha planta P2 está **caracterizada por** la presencia de ligamiento genético entre un primer locus A y un segundo locus B en un primer cromosoma y donde dicha planta P1 está **caracterizada por** la ausencia de dicho ligamiento genético, comprendiendo el método:

(a) proporcionar al menos una célula vegetal que comprende dicho primer cromosoma que comprende dicho primer locus A y dicho segundo locus B y que comprende además al menos un segundo cromosoma, donde dichos cromosomas son cromosomas homólogos u homeólogos entre sí;

10 (b) introducir una rotura de doble cadena en el primer cromosoma, donde la rotura de doble cadena en el primer cromosoma se introduce entre dicho primer locus A y dicho segundo locus B proporcionando así una primera parte del primer cromosoma que comprende el primer locus A y una segunda parte del primer cromosoma que comprende el segundo locus B e introducir una rotura de doble cadena en el segundo cromosoma en un locus o ubicación correspondiente, proporcionando así una primera parte del segundo cromosoma y una segunda parte del segundo cromosoma y, además, donde la primera parte del primer cromosoma que comprende el primer locus A se liga a la segunda parte del segundo cromosoma; y

15 (c) regenerar dicha planta P1,

y donde la rotura de doble cadena en el primer cromosoma se introduce por una nucleasa específica de sitio, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en nucleasa de dedo de zinc, meganucleasa, nucleasa efector TAL y una nucleasa específica de sitio del sistema CRISPR y donde la rotura de doble cadena en el

20 segundo cromosoma se introduce por una nucleasa específica de sitio, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en nucleasa de dedo de zinc, meganucleasa, nucleasa efector TAL y una nucleasa específica de sitio del sistema CRISPR.

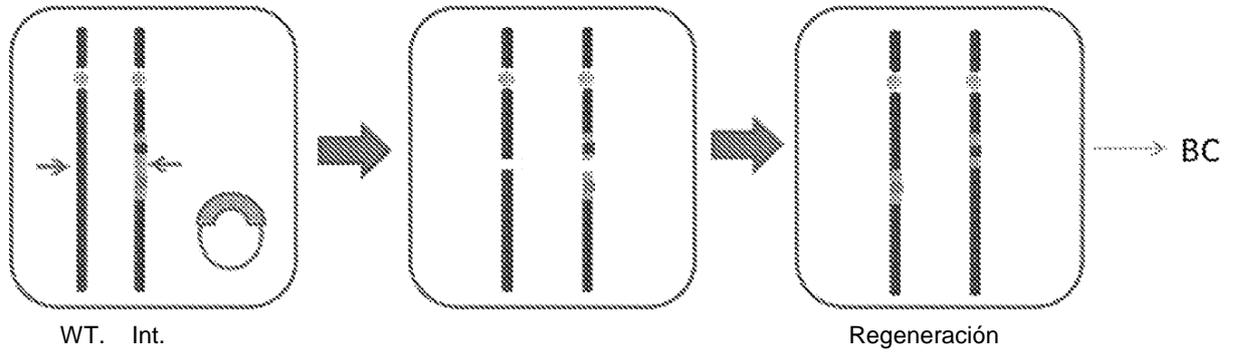
25 12. Método según la reivindicación 11 donde antes de regenerar dicha planta P1, el método comprende además un paso de identificación, utilizando al menos una célula vegetal obtenida en la etapa (b), de al menos una célula vegetal donde el ligamiento genético entre el primer locus A y el segundo locus B en el primer cromosoma se ha eliminado.

30 13. Uso de una nucleasa específica de sitio, preferiblemente seleccionado de una nucleasa de dedo de zinc, una meganucleasa, una nucleasa efector TAL y una nucleasa específica de sitio del sistema CRISPR para eliminar el ligamiento genético entre un primer locus A y un segundo locus B presentes en un primer cromosoma en una planta o célula vegetal.

14. Uso según la reivindicación 13 donde dicho primer locus A está ligado a un rasgo deseable de un primer carácter y dicho segundo locus B está ligado a un rasgo indeseable de dicho primer carácter o un segundo carácter.

35 15. Uso de una nucleasa específica de sitio, preferiblemente seleccionada de una nucleasa de dedo de zinc, una meganucleasa, una nucleasa efector TAL y una nucleasa específica de sitio del sistema CRISPR, para eliminar el arrastre por ligamiento en una planta o célula vegetal.

Figura 1

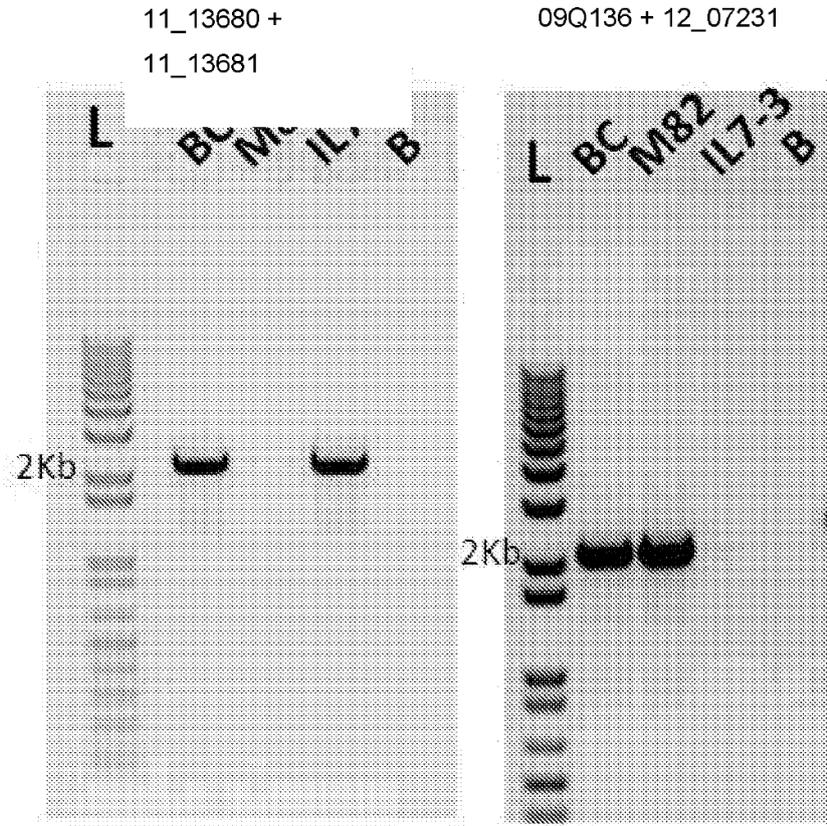


**Figura 2**

CCTCAACAACAATGGCGGCTGCATCTCCATCTCCTTGTTTTTCCAAAACCTACCTCCATCTTCATCAAA  
 ATCTTCCACCCTTCTTCCCAAATCTACCTTTACTTTCCACAATCACCTAAAAAAGCATCACCCCTTCAC  
 CTTACACACACCCAACATCATAGCCGTTTCACTGTTTCAAATGTCATCCTATCAACCACGACGCATGACG  
 ACGTTTCTGAACCCGAAATCTTTGTTTCCCGTTTCGCCCCTGACGAACCCAGAAAGGGTTGTGATGTTCT  
 TGTGGAGGCACTTGAAGGGAAGGGGTTAAGGATGTGTTGCATACCCAGGAGGTGCTTCCATGGAGATT  
 CATCAGGCTTTGACACGTTCAAATATTATTCGTAATGTGC**TGCCACGTC**AIGAAC**AGGGTGGTG**TGTTG  
 CTGCAGAGGGTTACGCACGGGCTACTGGGTTCCCTGGTGTGTTGATTGCTACATCTGGTCCGGGAGCTAC  
 GAATCTTGTAGCGGTCTTGTGATGCTTTGTTGGATAGTATCCCGATTGTTGCTATTACCGGTCAAGTG  
 CCGAGGAGGATGATTGGTACTGATGCGTTTCAGGAACTCCTATTGTTGAGGTAACGAGATCCATTACGA  
 AGCATAATTATCTGTTATGGATGTAGAGGATATTCCTAGGGTTGTTGTTGAAGCGTTTTTTCTAGCGAA  
 ATCAGGACGGCCTGGACCTGTTTTGATTGATGTTCCCTAAGGATATTCAGCAACAATTGGTGATACCTAAT  
 TGGGATCAGCCAATGAGGTTGCCTGGTTACATGTCTAGGTTGCCTAAATTACCTAATGAGATGCTTTTGG  
 AACAAATTGTTAGGCTGATTTACAGAGTCAAAGAAGCCTGTTTTGTATGTGGGTGGTGGGTGTTACAGTC  
 GAGTGAGGAGCTGAGACGCTTTGTGGAGCTTACCGGTATTCCCTGTGGCGACTACTTTGATGGGTCTTGGA  
 GCTTTTCCAAGTGGGGATGAGCTTTCTCTTCAAATGTTGGGTATGCATGGGACTGTGTATGCTAATATAG  
 CGTGGATAGTAGTGATTTGTTGCTTGCATTTGGGGTGAGGTTTGTGATCGAGTTACTGGTAAATTGGA  
 AGCTTTTGTAGCCGAGCTAAGATTGTCCATATTGATATTGATTCCGGCTGAGATTGGAAAGAACAAGCAA  
 CCTCATGTTTCCATCTGTGCAGATATCAAGTTGGCATTACAGGGTTTGAATTCCATATTCGAGAGTAAAA  
 AAGGTAAGCTGAAGTTGGACTTTTCTGCTTGGAGCGAGGAGTTAACGGAGCAGAAGGTGAAGTACCCATT  
 GAATTTTAAGACTTTCGGTGAAGCCATCCCTCCCAATATGCTATTACAGGTTCTTGATGAGTTAACTAAC  
 GGAATGCCATCATTAGTACTGGTGTGGGGCAACACCAATGTGGGCTGCCAACACTACAAGTACAAAA  
 AGCCACGCCAATGGCTTACATCTGGTGGATTAGGAGCAATGGGATTTGGTTTGCCTGCTGCTATAGGTGC  
 GGCTGTTGGAAGACCGGGTGAGATTGTGGTTGATATTGATGGTGATGGGAGTTTTATCATGAATGTGCAG  
 GAGTTGGCAACAATTAAGGTGGAGAATCTCCAGTTAAGATTATGTTGCTGAATAATCAACACTTGGGAA  
 TGCTGGTTACAGTGGGAGGATCGATTCTATAAGGCTAACAGAGCACACACTTACTTGGGTAATCCTGCTAA  
 TGAGGAAGAGATCTTCCCTAATATGCTGAAATTTGCAGAGGCTTGTGGCGTACCTGCTGCAAGAGTGTCA  
 CACAGGGATGATCTTAGAGCTGCCATTCAAAGATGTTAGACACTCCTGGGCCATACTTGTTGGATGTGA  
 TTGTACCTCATCAGGAGCATGTTCTACCGATGATTCCAGTGGCGGTGCTTTCAAAGATGTGATTACGGA  
 GGGTGATGGGAGACGTTCCCTATTGACTTTGAGAAGCTACATAACTAGTTCAAGGCATTGTATTATCTAAA  
 ATAAACTTAATATTTATGTTTACTTAAAAGTTTTTCATTGTGTGAAGGATTTTAGAATTTCTTGTTCTAT  
 TGGCAGCACCAATTAAGTATTTGGAGCTCTATTTAGTATGACTAAGATTAATTACAAGTGAAGTAGTTAA  
 GTTCGATAAATCAGCTTGTACATTCTATGTTAATTTGGTGAACATGAATTCATTTGGGAGAAGGCTAT  
 GTCCAGCTTAAGGGCTCAAATTTTTTCCAGAGAGTGTGATTCAAAGGTGAATGCCAAAATCAGATTAGCA  
 CAAGTTTGCAGAGTTATATTACGCCATCTTCTGTTTTTCCAGCTAATGCTGTTGCAAGGGCTCTACTGAA  
 GAAGGCCCTCTATTTTATTTCTTGATGAGGTAATCTTTGACCCCTTTTGTCCCGTGTGTCCGTTGACTT  
 TTACCATGTATGCTCTGCGTTACAGTTCTGTGGGTGACCTTGGTATCTTCTTATTCACTGTAAATGTTGG  
 TTTAAGCCTGAATTACCTAGGGGATTCCCAGTTCGTTTACACAGGGGTTTACATAAGATCAGCTCAGTT  
 CTCCGGAGAAGTTCTAGCAATCTTGGAGAGCCTATTTTCATCTCTGCATGTGAATCTTAGGGCAGTTAATG

CCAAGGATATCAGAGTGAAGATTATAGTGGATGACACCATTTTGCCTTCATCATTAGCAACAACACCTAC  
AGAAGATGGAAAAGAGAACGGTGCAGGAAATGGGAAAAGTTTCACAAATGGGGCAAGACGAAGAGAATCC  
TTAAAGATGCTGGCAAATCTGTTGGTGGTGGCATAAAGGAAGTGATGTCTGGGAAGTCATCAGGGAAATC  
TAAAGAGGAAGTAGAATCATCAGAGACCGAAAGAATGAGCTCTGTGGAATCTGATATTTCTGATGCAGAG  
TCTCAACCTTCATCAGTTGATTCACCTCCAGTTGTAGCGCCTTC

Figura 2a



**Figura 3**

ALS2	AATGTGCTGCCACGTCATGAACAGGGTGGTGTGTTTGC
M82 (1)	AATGTGCTGCCACGTCA---ACAGGGTGGTGTGTTTGC
M82 (2)	AATGTGCTGCCACGTCA----CAGGGTGGTGTGTTTGC
M82 (3)	AATGTGCTGCCACGTCA-GAACAGGGTGGTGTGTTTGC
M82 (4)	AATGTGCTGCCACGTGATG---AGGGTGGTGTGTTTGC
M82 (5)	AATGTGCTGCCACGTC-----GGGTGGTGTGTTTGC
IL7-3 (1)	AATGTGCTGCCACGTCA-----GGGTGGTGTGTTTGC
IL7-3 (2)	AATGTGCTGCCACGTCA---ACAGGGTGGTGTGTTTGC

Figura 4

```

M82 ALS2      CATCAgCCTTTGACACGTTCaAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACGTCATGAACAGGGTGGTG-446bps-TCaGAG
S.pennilii ALS2 CATCAaGCTTTGACACGTTGgAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACGTCATGAACAGGGTGGTG-446bps-TCgGAG

M82          CATCAgCCTTTGACACGTTCaAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACGTCATGAACAGGGTGGTG-446bps-TCaGAG
IL7-3       CATCAaGCTTTGACACGTTGgAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACGTCATGAACAGGGTGGTG-446bps-TCgGAG

F1          CATCAgCCTTTGACACGTTCaAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACGTCATGAACAGGGTGGTG-446bps-TCaGAG
F1          CATCAaGCTTTGACACGTTGgAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACGTCATGAACAGGGTGGTG-446bps-TCgGAG

F1 x EFN    CATCAaGCTTTGACACGTTGgAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACGTCa-----GGGTGGTG-446bps-TCaGAG
F1 x EFN    CATCAaGCTTTGACACGTTGgAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACGTCa-----GGGTGGTG-446bps-TCaGAG
F1 x EFN    CATCAaGCTTTGACACGTTGgAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACGTCa-----GGGTGGTG-446bps-TCaGAG
F1 x EFN    CATCAaGCTTTGACACGTTGgAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACGTCa---ACAGGGTGGTG-446bps-TCaGAG
F1 x EFN    CATCAaGCTTTGACACGTTGgAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACGTCa---CAGGGTGGTG-446bps-TCaGAG

Clon #1     CATCAaGCTTTGACACGTTGgAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACGTCa-----AGGGTGGTG-446bps-TCaGAG
Clon #2     CATCAgCCTTTGACACGTTCaAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACGTCAT---CAGGGTGGTG-446bps-TCgGAG
    
```

Figura 5

