

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 953 523**

51 Int. Cl.:

A01H 1/00 (2006.01)

A01H 1/04 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 18203170 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2023 EP 3491915**

54 Título: **Método para inducir una translocación dirigida 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:

14.11.2023

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

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 953 523 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 inducir una translocación dirigida en una planta

5 Campo de la invención

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

10

Estado de la técnica

[0002] La recombinación da como resultado la nueva disposición de los genes mediante diversos mecanismos, como la distribución y la segregación, el entrecruzamiento, la conversión génica y la transformación. La recombinación en plantas puede ocurrir en numerosas etapas en el desarrollo de la planta. Hay dos clases diferentes principales de recombinación en células vegetales, recombinación homóloga (RH) y unión de extremos no homólogos (UEHN). La vía de recombinación de RH implica reordenamientos entre moléculas de ADN que comparten la misma secuencia de ADN, ya sea en el mismo cromosoma o en cromosomas diferentes. Esto contrasta con la vía de UEHN, que es capaz de generar reordenamientos 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 diferentes tipos de células vegetales. Por ejemplo, la RH juega un papel esencial en la formación de gametos al promover cruces entre cromátidas hermanas para la segregación cromosómica correcta y la recombinación de diferentes alelos parentales (RH meiótica). La vía de RH también está activa en las células mitóticas, donde participa principalmente en la reparación del daño del ADN en un locus utilizando la información de la secuencia presente en el locus homólogo no dañado (RH mitótica). Esto puede estar presente en el mismo cromosoma o en uno diferente que el locus dañado. La vía de UENH también está activa tanto en células meióticas como mitóticas y es muy eficaz para unir extremos de ADN no homólogos. Una de las principales diferencias entre las vías de RH y UENH es la fidelidad del proceso. Mientras que la RH entre secuencias de ADN relacionadas da como resultado una recombinación en la que se conserva la secuencia de ADN de ambas moléculas/locus, la vía de UENH a menudo genera pequeñas mutaciones en la posición donde se produce la recombinación, lo que en sí mismo puede ser mutagénico.

30

[0003] El fitomejoramiento implica la selección de plantas progenitoras óptimas que luego se cruzan y se selecciona la progenie de este cruce con características de crecimiento mejoradas. El fitomejoramiento ha tenido mucho éxito durante los últimos 100 años en la domesticación de una amplia gama de especies de plantas y en la mejora significativa del rendimiento y la calidad de los productos vegetales.

35

[0004] Esto se ha logrado a través de la selección de la variación alélica que proporciona mejoras tanto en el cultivo de plantas como en las características de consumo. Por lo general, se realiza un cruce entre dos plantas progenitoras para producir la progenie híbrida F1 que luego se autofecunda para crear alelos homocigóticos y la progenie F2 resultante se selecciona para el fenotipo de interés. Cuando las plantas se cruzan para formar el híbrido (F1), se producen recombinaciones (cruces) entre los diferentes cromosomas homólogos de las plantas progenitoras durante la meiosis, barajando la información genética aportada por cada progenitor.

40

[0005] La recombinación durante la meiosis (RH meiótica) es un proceso (semi) aleatorio, dependiente de la homología, que produce gametos masculinos y femeninos, cada uno de los cuales porta diferentes conjuntos de alelos de las plantas progenitoras. Si se desea una combinación particular de locus progenitores en la progenie, entonces se deben cribar muchos individuos para seleccionar aquellos que han heredado los alelos progenitores deseados. La detección se puede realizar basándose únicamente en el fenotipo, o como suele ser el caso, mediante el uso de marcadores moleculares estrechamente enlazados a los alelos de interés. Este enfoque de reproducción asistida por marcadores (MAB) tiene la ventaja de que las plantas de una población F2 pueden examinarse en una etapa temprana de crecimiento, de modo que no es necesario mantener grandes poblaciones de plantas maduras y también pueden examinarse para detectar la presencia de muchos marcadores enlazados a múltiples alelos. Por lo tanto, está claro que el proceso de recombinación meiótica es el principal impulsor del fitomejoramiento y que los procesos que lo afectan pueden provocar cuellos de botella en el proceso de mejoramiento.

50

55

[0006] Se espera que la población mundial total aumente significativamente en las próximas décadas y se reconoce que el rendimiento de muchos cultivos también debe aumentar al mismo tiempo que se utiliza la misma área de tierra cultivable y se usan menos recursos, como agua y fertilizantes. El fitomejoramiento tiene un papel importante que desempeñar en la mejora del rendimiento de los cultivos mediante la introducción de nuevos alelos presentes en el germoplasma. Sin embargo, el fitomejoramiento convencional ha llevado a una reducción en la cantidad total de variación alélica presente en los cultivos, ya sea a través de una selección consciente contra rasgos que se consideraban perjudiciales o a través de la pérdida inconsciente de alelos debido a la falta de presión de selección sobre la variación que se consideraba neutral en ese momento. Debido a la variación alélica reducida en las especies cultivadas, es improbable que los nuevos alelos que pueden conferir

60

65

características tales como nuevas resistencias bióticas y abióticas estén presentes en el germoplasma cultivado. Una fuente probable de dichos alelos se encuentra en el germoplasma salvaje no adaptado. El germoplasma salvaje se ha utilizado ampliamente para mejorar el germoplasma de las especies cultivadas cuando cambian las condiciones de crecimiento o las preferencias del consumidor y el acervo genético existente no tiene la variación genética necesaria para satisfacer las necesidades cambiantes. El éxito del uso de germoplasma salvaje depende de varios factores, como la amplitud de la variación a la que se puede acceder a través del cruzamiento (por ejemplo, incompatibilidad de plantas, barreras entre especies), la velocidad a la que se puede transferir la nueva variación genética para abordar las necesidades que cambian rápidamente y, finalmente, cómo se puede transferir mucha variación de una especie salvaje sin la transferencia de efectos negativos severos (*arrastre por ligamiento*). El arrastre por ligamiento puede describirse como la presencia de enlace genético entre dos locus, por ejemplo, uno deseable y el otro indeseable, en el mismo cromosoma. Como consecuencia de este enlace genético, los dos locus se heredan juntos durante la meiosis normal. Desafortunadamente, con los métodos disponibles en la técnica, eliminar el enlace genético entre tales genes deseados y no deseados en una planta y obtener una planta con solo los genes deseados y las características asociadas ha resultado ser difícil, requiere mucho tiempo y en varios casos ha sido 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 progenitora. Durante la meiosis, se produce una recombinación meiótica entre los cromosomas parentales que da como resultado una mezcla de alelos parentales de modo que los gametos portan diferentes combinaciones de locus parentales que producen diferentes patrones de variación genética en las plantas de la progenie. La recombinación meiótica generalmente ocurre 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 (entrecruzamientos) entre los cromosomas parentales se inhibe en regiones que son estructuralmente diferentes (tales como grandes deleciones, inserciones o inversiones) o carecen de identidad de secuencia de ADN. Esto es un problema menor cuando los progenitores se derivan de un linaje común y, por lo tanto, son genéticamente similares, pero se convierte en un problema mayor cuando se consideran cruces con germoplasma salvaje que probablemente sea genéticamente más diverso que las líneas cultivadas. En dichos casos, las regiones en las que pueden ocurrir entrecruzamientos entre los cromosomas del germoplasma salvaje y el germoplasma cultivado son inhibidas por las diferencias estructurales antes mencionadas en el ADN. Cuando se realiza un cruce entre líneas de plantas con germoplasma cultivado y salvaje, se seleccionan plantas F2 que portan los alelos deseados y luego se retrocruzan varias veces con la línea de plantas cultivadas, mientras se continúa seleccionando plantas que portan los alelos de germoplasma salvaje deseados, para aumentar el porcentaje del genoma aportado por el progenitor cultivado mientras se disminuye el porcentaje del genoma del progenitor salvaje. En una situación ideal, esto dará como resultado una planta con el genoma del progenitor cultivado pero con un pequeño locus (introgresión) del germoplasma salvaje. Como se indicó anteriormente, este proceso de retrocruzamiento depende completamente de la recombinación meiótica normal que se produce entre los locus de los dos progenitores. Sin embargo, debido a la presencia de diferencias estructurales y de secuencia entre los progenitores, la recombinación meiótica puede suprimirse, lo que lleva a la presencia de grandes introgresiones del germoplasma salvaje que no pueden reducirse (Canady et al. (2006) Genetics 174, 1775-1788).

[0008] A medida que se suprime la recombinación meiótica en dichas regiones, los retrocruzamientos posteriores no logran disminuir el tamaño de la introgresión. Esto puede ser un problema particular cuando tanto el rasgo positivo deseado como también un rasgo negativo se encuentran en la introgresión, ya que estos no se pueden separar fácilmente mediante la recombinación meiótica. Esto explica por qué a menudo existe un arrastre por ligamiento que no se puede romper fácilmente en las introgresiones derivadas de germoplasma salvaje. El enfoque que generalmente se toma para romper ese arrastre por ligamiento es cribar muchas más plantas de lo normal para un evento de recombinación entre los dos locus. Esto a veces es 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 más recombinación a pesar de los serios esfuerzos para cribar poblaciones de plantas muy grandes. Varias publicaciones (por ej. WO03/104451 y WO00/54574) han descrito métodos para mejorar la recombinación homóloga meiótica en plantas que pueden aumentar la posibilidad de obtener 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 la RH entre todos los locus homólogos en la célula, lo que no es deseable en el material de mejoramiento. Además, estos tratamientos también suelen ser inherentemente mutagénicos, lo que altera la secuencia de ADN en todo el genoma y conduce a fenotipos impredecibles. Por ejemplo, la publicación EP0270120 enseña que el arrastre por ligamiento puede romperse mediante el crecimiento de células vegetales en cultivo de tejidos en un medio que contiene altos niveles de un regulador mutagénico del crecimiento de plantas. Al igual que con las otras publicaciones, la tasa de recombinación en todo el genoma se verá afectada y, por lo tanto, las plantas generadas por este método no serían adecuadas para el mejoramiento posterior.

[0009] Por lo tanto, existe una clara necesidad en la técnica de una metodología reproducible y más fácil que permita la manipulación del genoma de las plantas, en particular en los procesos de mejoramiento, y en

particular que permita romper/eliminar el enlace genético entre dos locus en el mismo cromosoma, en particular donde dichos locus están localizados en una parte del cromosoma donde se suprime la recombinación.

Problemas resueltos por la presente invención

5

[0010] Sorprendentemente, descubrimos que la necesidad identificada anteriormente en el estado de la técnica puede resolverse mediante el uso de la vía de UENH para inducir un evento de recombinación específicamente solo en la introgresión con el arrastre por ligamiento y evitando alterar las tasas de recombinación o mutación en el resto del genoma. De hecho, en esta invención desvelamos un uso novedoso de la vía de UENH en el cultivo de plantas, específicamente para romper el arrastre por ligamientos. Aquí describimos un método que se puede aplicar en células vegetales somáticas y permite crear una translocación por UENH en cualquier posición específica entre cromosomas homólogos u homeólogos, por ejemplo, en un híbrido F1. La metodología se puede utilizar para una amplia gama de aplicaciones de mejoramiento, por ejemplo, con el propósito de eliminar el arrastre por ligamiento, con el propósito de manipulación dirigida de genomas poliploides, con el propósito de producir introgresiones personalizadas, con el propósito de simplificar el mapeo de precisión y con el propósito de generar fusiones de genes.

10

15

20

25

[0011] Más detalladamente, la invención implica la introducción de roturas de doble cadena, por ejemplo utilizando nucleasas específicas del sitio (incluidos los sistemas de nucleasas), en células vegetales, incluidos los protoplastos vegetales. Las nucleasas específicas del sitio pueden apuntar a secuencias idénticas específicas en la posición correspondiente en ambos cromosomas homólogos. Estos luego inducen una ruptura de doble cadena de ADN en cada cromosoma que, con una frecuencia alta inesperada (en aproximadamente el 0.8 % de las células), se vuelven a unir, lo que da como resultado un intercambio de brazos cromosómicos, lo que conduce a una translocación dirigida inducida. Una ventaja adicional importante de este método es que solo requiere instalaciones de cultivo de tejidos para identificar los eventos de recombinación deseados en lugar de cribar grandes poblaciones de plantas para identificar eventos aleatorios de RH meiótica, todo lo cual requiere un invernadero. Por lo tanto, el uso del método para los fines indicados anteriormente también puede conducir a una gran reducción de costes en los propios procesos de mejoramiento.

30

El método según la invención se puede utilizar, por ejemplo, con el fin de:

35

40

45

50

55

60

a. Rotura del arrastre por ligamiento: Se ha introducido resistencia a virus graves como el TMV y el TYCLV a partir de especies de tomates silvestres y los genes que confieren resistencia están presentes en grandes fragmentos de introgresión que son recombinacionalmente silenciosos. También hay genes en estas introgresiones que afectan negativamente el rendimiento (arrastre por ligamiento) pero que no pueden recombinarse lejos de la fuente de resistencia. Sin embargo, esta pérdida de rendimiento se acepta ya que la resistencia al virus es muy valiosa. La técnica descrita en este documento se puede utilizar con el fin de romper el fragmento de introgresión en posiciones definidas, generando así líneas con resistencia al virus pero que carecen del arrastre por ligamiento. Todas las formas de arrastre por ligamiento son un gran problema en el mejoramiento y continuarán frenando y complicando el mejoramiento de plantas en el futuro.

b. Introgresiones a medida: cualquier región cromosómica de secuencia conocida puede enlazarse a cualquier otra secuencia en el cromosoma homólogo. Esto permite definir el tamaño de la introgresión que se desea tener en un producto final. De hecho, la introgresión podría comprender un solo gen.

c. Mapeo de precisión: el mapeo de genes utiliza la recombinación meiótica para enlazar genes a marcadores, pero no es eficaz cuando se suprime la recombinación meiótica o cuando muchos genes están estrechamente enlazados. El método descrito en el presente documento, que conduce a la translocación, puede usarse para dividir un fragmento de introgresión en regiones más pequeñas que luego pueden genotiparse usando marcadores o fenotiparse. De esta forma, se pueden identificar rápidamente los genes causales.

d. Recombinación intragénica: se necesitan nuevas fuentes de resistencia a medida que evolucionan nuevos biotipos de patógenos. Los genes de resistencia normalmente están presentes en grupos 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 se pueden usar para combinar partes (dominios) de genes de resistencia presentes en agrupaciones en diferentes cromosomas para crear nuevas combinaciones de dominios que confieren nuevas resistencias.

e. Homocigosidad en especies con poliploidía: varias especies de plantas con 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 tiene un fenotipo negativo en una posición cromosómica, porque no se puede eliminar. Se pueden inducir translocaciones entre los genomas y, a través de la autofecundación, se puede crear una situación en la que los brazos de cromosomas completos se vuelven completamente homocigóticos. Esto también se puede usar para transferir mutaciones inducidas en los cromosomas de un genoma a los cromosomas del otro genoma, lo que es particularmente útil si dichas mutaciones son recesivas (lo que casi siempre es el caso).

65

[0012] Con la realización de la idea inventiva de aplicar el método descrito en el presente documento para los diversos fines descritos anteriormente, el experto en la materia podrá aplicar este método para los fines indicados anteriormente.

Resumen

- 5 [0013] En un aspecto, se proporciona un método para eliminar el enlace genético entre un primer locus A y un segundo locus B presente en un primer cromosoma vegetal en una planta o célula vegetal, donde se suprime la recombinación (meiótica) entre la ubicación de dicho primer locus A y la ubicación de dicho segundo locus B en el cromosoma, ambas incluidas. El método comprende los pasos de proporcionar al menos una célula vegetal que comprende dicho primer cromosoma que comprende dicho primer locus A y dicho segundo locus B y que además comprende al menos un segundo cromosoma, en el que dichos cromosomas son cromosomas homólogos u homeólogos entre sí; 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, 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 introducen mediante al menos una nucleasa específica del sitio, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en nucleasa con dedos de zinc, meganucleasa, nucleasa efectora TAL y el sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN.
- 10
- 15
- 20 [0014] Opcionalmente, pero en cierta realización preferida, el método comprende además identificar mediante la célula vegetal obtenida al menos una célula vegetal donde se ha eliminado el enlace 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.
- 25 [0015] La rotura de doble cadena en el primer cromosoma y/o la rotura de doble cadena en el segundo cromosoma se introducen mediante al menos una nucleasa específica del sitio, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en nucleasa con dedos de zinc, meganucleasa, nucleasa efectora TAL (TALENS) y el sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN.
- 30 [0016] En una 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 vinculado a un rasgo deseable de un primer carácter y dicho segundo locus B está vinculado a un rasgo indeseable de dicho primer carácter o un segundo carácter; y donde dicho segundo cromosoma no comprende un locus idéntico a dicho segundo locus B vinculado a un rasgo indeseable de dicho primer carácter o un segundo carácter, y 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. Esta realización permite la eliminación del arrastre por ligamiento entre los rasgos deseados y no deseados que se ven comúnmente en las plantas (híbridas).
- 35
- 40 [0017] Por consiguiente, también se proporciona un método para proporcionar una planta P1 obtenida de una planta P2, donde dicha planta P2 se caracteriza por la presencia de un enlace genético entre un primer locus A y un segundo locus B en un primer cromosoma, donde se suprime la recombinación (meiótica) entre la ubicación de dicho primer locus A y la ubicación de dicho segundo locus B en el cromosoma, ambas incluidas, y donde dicha planta P1 se caracteriza por la ausencia de dicho enlace genético, donde el método comprende proporcionar al menos una célula vegetal que comprenda dicho primer cromosoma que comprende dicho primer locus A y dicho segundo locus B y que además comprenda al menos un segundo cromosoma, donde dichos cromosomas son cromosomas homólogos u homeólogos entre sí; 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, proporcionando así una primera parte del segundo cromosoma y una segunda parte del segundo cromosoma, y opcionalmente, identificar a partir de la célula vegetal obtenida al menos una célula vegetal donde se ha eliminado el enlace 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 ligado a la segunda parte del segundo cromosoma. La planta P1 puede así regenerarse.
- 45
- 50
- 55 [0018] Según otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de una nucleasa específica del sitio, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en una nucleasa con dedos de zinc, una meganucleasa, una nucleasa efectora TAL y el sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN para eliminar el enlace genético entre un primer locus A y un segundo locus B presente en un primer cromosoma, donde se suprime la recombinación (meiótica) entre la ubicación de dicho primer locus A y la ubicación de dicho segundo locus B en el cromosoma, ambas incluidas.
- 60
- 65 [0019] Según un aspecto final, se proporciona una planta, una parte de una planta, un fruto o una semilla obtenible u obtenida mediante el método según la invención, o el uso según la invención.

Descripción de los dibujos

[0020]

5 Figura 1: Panel izquierdo: se indican dos cromosomas homólogos dentro de un solo protoplasto con la sección gris claro en un cromosoma que representa una introgresión (gris claro) de una especie salvaje no adaptada en la que no se produce la recombinación meiótica (supresión de la recombinación). Los recuadros 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 rotura de doble cadena se muestra como un círculo. Las flechas representan las posiciones en el cromosoma en las que la nucleasa específica del sitio induce una rotura de doble cadena de ADN. Panel central: se induce una rotura de doble cadena de ADN en ambos cromosomas homólogos. Panel derecho: reparación de rotura de doble cadena que conduce a una translocación recíproca. Los locus positivos y negativos ya no están enlazados.

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

15 La figura 2a muestra los resultados de las pruebas de cebadores que amplifican específicamente el locus ALS2 de *Solanum pennellii* (panel izquierdo) o el locus de tipo salvaje ALS2 (panel derecho). L, escalera; BC, línea F1 derivada de un cruce IL7-3 x M82; M82, línea de tomate de tipo salvaje; IL7-3, línea que contiene la introgresión *S. pennellii* en el cromosoma VII; B, control de agua.

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

25 Figura 4: Las secuencias ALS2 de M82 y ALS2 de *S. pennellii* se muestran (arriba) con el sitio de unión ZFN subrayado y los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) entre los locus que se muestran en negrita y minúsculas. Los sitios de unión de ZFN están subrayados. El primer SNP entre los locus después del sitio de unión a ZFN está 449 pb corriente abajo, como se indica. Los cebadores utilizados para toda la amplificación por PCR fueron 11_13680 (cebador directo ALS2 de *S. pennellii*) y 12_07231 (cebador inverso ALS2 de M82). M82 e IL7-3, secuencia de productos de PCR clonados derivados de la transfección de protoplastos de las líneas progenitoras con pKG7402. F1, secuencia de productos PCR clonados derivados de la transfección de protoplastos de la línea F1 con un pKG7381 (35S::GFP). F1 xZFN, secuencia de productos de PCR clonados derivados de la transfección de protoplastos de la línea F1 con pKG7402. La presencia de pequeños INDEL en el sitio de unión de ZFN está representada por nucleótidos faltantes. Los clones n.º 1 y n.º 2 se aislaron utilizando los cebadores 12_11216 + 12_11217 en una reacción de PCR no selectiva.

30 La figura 5 muestra esquemáticamente las translocaciones dirigidas en *Brassica napus*. 1, se indican los genomas A (gris oscuro) y C (gris claro). El locus que se va a convertir en homocigótico se indica con un círculo. Una nucleasa específica del sitio se expresa en la célula e induce una rotura de doble cadena en los 4 cromosomas en la posición de la línea de puntos. 2, se produce una translocación dirigida entre los genomas A y C. 3, después de la autofecundación, la región de translocación y el locus de interés son homocigóticos. 4, parte del brazo cromosómico del genoma C se vuelve homocigótico.

Descripción

Definiciones

45 [0021] A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que los entendidos comúnmente por los expertos en la técnica 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 son bien conocidas por los expertos en la técnica y se analizan, por ejemplo, en la siguiente bibliografía: Sambrook et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2.ª 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 los fines de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

50 [0022] Tal como se usa en este documento, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique 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, 100, 1000, 10 de miles, 100 de miles, millones de moléculas o más).

60 [0023] El término "y/o" indica que uno o más de los casos mencionados pueden ocurrir. En otras palabras, un caso establecido puede ocurrir solo o en combinación con al menos uno de los casos establecidos, hasta con todos los casos establecidos. El término "y/o" revela cada caso establecido en solitario, así como la combinación específica de un caso indicado con al menos uno de los otros casos indicados, hasta con todos los casos indicados.

65

[0024] En esta descripción, "comprende", "que comprende", "que contiene" y "que tiene" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la ley de patentes y pueden significar "que incluye", "incluyendo" y similares; "que consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente" también tiene el significado atribuido en la ley de patentes y el término es abierto, lo que permite la presencia de más de aquello que se enumera siempre que las características básicas o novedosas de lo que se enumera no cambien por la presencia de más de lo que se enumera, pero excluye realizaciones de la técnica anterior.

[0025] Tal como se usa en el presente documento, el término "alelo(s)" se refiere a cualquiera de una o varias formas alternativas de un gen en un locus particular. En una célula diploide de un organismo, los alelos de un gen dado están ubicados en una ubicación específica, o locus en un cromosoma. Un alelo está presente en cada cromosoma del par de cromosomas homólogos. Una especie de planta o diploide puede comprender una gran cantidad de alelos diferentes en un locus particular.

[0026] Un "carácter" se relaciona con una cualidad fenotípica de un organismo. Un carácter puede manifestarse en diferentes rasgos. Por ejemplo, la planta puede ser una planta, que tiene el color de la flor como carácter, y las flores rojas o blancas son los rasgos A y B del carácter. Dentro de la presente invención, el carácter (o rasgo) puede ser cualquiera, siempre que los miembros del organismo que tengan un primer rasgo del carácter puedan distinguirse fenotípicamente de los miembros del organismo que tengan un segundo rasgo del carácter. Esto no se limita solo a las diferencias que pueden observarse directamente mediante la inspección de un organismo, sino que también incluye caracteres/rasgos que pueden hacerse evidentes en un análisis posterior del organismo, por ejemplo, en el análisis de la resistencia a ciertas circunstancias, o en el análisis de la presencia de metabolitos particulares en dicho organismo.

[0027] El experto en la materia entiende que "enlace genético" entre locus en el mismo cromosoma se refiere a aquellos locus que están situados de manera relativa en el mismo cromosoma de manera que normalmente se heredan juntos durante la meiosis. Por ejemplo, es menos probable que los genes cuyos locus están más cerca entre sí se separen en diferentes cromátidas durante el cruce cromosómico y, por lo tanto, se dice que están genéticamente enlazados. Otro ejemplo es cuando los locus están ubicados en el mismo segmento del cromosoma caracterizado por la "supresión de la recombinación (meiótica)" (ver más adelante). También en este caso, es probable que los locus se hereden juntos durante la meiosis.

[0028] Tal como se usa en el presente documento, el término "heterocigótico" se refiere a una condición genética que existe cuando dos alelos diferentes residen en un locus específico. Por el contrario, tal como se usa en el presente documento, el término "homocigótico" se refiere a una condición genética que existe cuando dos alelos idénticos residen en un locus específico, pero se colocan individualmente en los pares correspondientes de cromosomas homólogos en la célula.

[0029] El término cromosoma "homeólogo" u "homólogo" se utiliza para describir la relación de cromosomas similares reunidos después de la hibridación y la aloploidización entre especies, y cuya relación era completamente homóloga en una especie ancestral. Se dice que dos cromosomas son homeólogos cuando se derivan de dos genomas diferentes, pero comparten características tales como secuencias de nucleótidos similares, sintenia de orden de genes similar y se colocan en posiciones correspondientes en los cariogramas de ambos genomas.

[0030] El término cromosoma "homólogo" se usa para describir la relación de cromosomas similares que se emparejan en la meiosis. Dos cromosomas son homólogos entre sí cuando son capaces de formar pares de cromosomas en meiosis a través de un complejo sinaptonémico.

[0031] La reacción enzimática catalizada por una enzima ligasa en la que dos moléculas de ADN de doble cadena se unen covalentemente se denomina ligación. Se dice que la molécula de ADN está "ligada" por esta reacción. Tal como se usa en el presente documento, el término "locus" significa un lugar o lugares específicos o un sitio en un cromosoma donde se localiza un gen o marcador genético.

[0032] El "genotipo" es la composición genética de una célula, un organismo o un individuo (es decir, la composición alélica específica del individuo) generalmente con referencia a un carácter o rasgo específico bajo consideración.

[0033] Un "fenotipo" son las características o rasgos observables de un organismo, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas o fisiológicas, fenología, comportamiento y productos del comportamiento. Los fenotipos surgen de la expresión de los genes así como de la influencia de factores ambientales y las interacciones entre los dos.

[0034] La divulgación actual es aplicable a una amplia gama de plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Los ejemplos no limitantes incluyen *Cucurbitaceae*, *Solanaceae* y *Gramineae*, maíz (especie *Zea*), trigo (especie *Triticum*), cebada (p. ej., *Hordeum vulgare*), avena (p. ej., *Avena sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), centeno (*Secale cereale*), soja (*Glicina* spp, p. ej., *G. máx.*), algodón (p. ej., especie *Gossypium*, p. ej.,

G. hirsutum, *G. barbadense*), *Brassica* spp. (p. ej., *B. napus*, *B. juncea*, *B. oleracea*, *B. rapa*, etc.), girasol (*Helianthus annuus*), cártamo, ñame, mandioca, alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (especie *Oriza*, p. ej., grupo de cultivares de *O. sativa indica* o grupo de cultivares de japónica), pastos forrajeros, mijo perla (*Pennisetum* spp., p. ej., *P. glaucum*), especies de árboles (*pino*, álamo, abeto, plátano, etc.), té, café, aceite de palma, coco, especies vegetales, como guisantes, calabacines, judías (p. ej., especie *Phaseolus*), pepino, alcachofa, espárragos, brócoli, ajo, puerro, lechuga, cebolla, rábano, lechuga, nabo, coles de Bruselas, zanahoria, coliflor, achicoria, apio, espinacas, escarola, hinojo, remolacha, plantas con frutos carnosos (uvas, melocotón, ciruela, fresa, mango, manzana, ciruela, cereza, albaricoque, plátano, mora, arándano, cítricos, kiwi, higo, limón, lima, nectarina, frambuesa, sandía, naranja, pomelo, etc.), especies ornamentales (p. ej., rosa, petunia, crisantemo, lirio, especies de gerbera), hierbas (menta, perejil, albahaca, tomillo, etc.), árboles leñosos (p. ej., especies de *Populus*, *Salix*, *Quercus*, *Eucalyptus*), especies de fibras, p. ej., linaza (*Linum usitatissimum*) y cáñamo (*Cannabis sativa*), u organismos modelo, tales como *Arabidopsis thaliana*.

[0035] A los efectos de la presente invención, el término "recombinación" se utiliza para indicar el proceso mediante el cual se intercambia material genético entre dos locus.

[0036] "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 evento de cruce o recombinación por cada 2000 individuos descendientes después de la autofecundación o el retrocruzamiento de la planta híbrida.

[0037] En biología, "un rasgo" se refiere a cualquier carácter distintivo fenotípico de un miembro individual de un organismo en comparación con (cualquier) otro miembro individual del mismo organismo. Dentro del contexto de la presente invención, el rasgo se puede heredar, es decir, se puede transmitir a las siguientes generaciones del organismo por medio de la información genética en el organismo. "Rasgo del mismo carácter" o "rasgo de dicho carácter": cualquiera dentro de un grupo de al menos dos rasgos que existen (o se hacen aparentes) para un carácter. Por ejemplo, en el 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 rasgos diferentes del mismo carácter.

[0038] A lo largo de esta solicitud, se citan varias referencias entre paréntesis para describir más completamente el estado de la técnica al que se refiere esta invención. La información bibliográfica completa de cada cita se encuentra al final de la especificación, inmediatamente antes de las reivindicaciones.

Descripción detallada

[0039] La invención actual proporciona un método nuevo e inventivo para eliminar el enlace genético entre los locus presentes en un cromosoma, lo que hace posible que ya no se dependa de la metodología de reproducción clásica o la reproducción clásica asistida por marcadores. En particular, la metodología descrita en el presente documento permite lograr la recombinación en las células somáticas en partes del cromosoma caracterizadas por tener recombinación (meiótica) suprimida, es decir, partes que, en condiciones meióticas, normalmente se heredan juntas. El método permite, en un aspecto, la translocación cromosómica recíproca (entrecruzamiento, intercambio) entre cromosomas homólogos y/o homeólogos en células somáticas en áreas o partes del cromosoma que se caracterizan por tener suprimida la recombinación (meiótica). Esto, por ejemplo, permite, por primera vez, eliminar de manera eficiente el enlace genético entre dos locus en el mismo cromosoma y ambos ubicados en dicha parte de "recombinación (meiótica) suprimida" del cromosoma. Además, el método permite esto en células somáticas, es independiente de la secuencia de ADN y no depende de la meiosis o la mitosis.

[0040] Más en particular, se proporciona un método para eliminar el enlace genético entre un primer locus A y un segundo locus B presente en un primer cromosoma vegetal en una planta o célula vegetal, y donde se suprime la recombinación (meiótica) entre la ubicación de dicho primer locus A y la ubicación de dicho segundo locus B en el cromosoma, ambas incluidas, donde el método comprende los pasos de:

(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 además comprende al menos un segundo cromosoma, en el que dichos cromosomas son cromosomas homólogos u homeólogos entre sí;

(b) introducir una ruptura de doble cadena en el primer cromosoma, donde la ruptura 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, 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 el paso (b) al menos una célula vegetal donde se ha eliminado el enlace 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,

5 y donde la rotura de doble cadena en el primer cromosoma y/o la rotura de doble cadena en el segundo cromosoma se introducen mediante al menos una nucleasa específica del sitio, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en nucleasa con dedos de zinc, meganucleasa, nucleasa efectora TAL y el sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN.

10 [0041] Con el método se elimina el enlace 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 realización preferida, el locus A y el locus B están presentes en el mismo brazo cromosómico.

15 [0042] 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 ser o no mapeado como el locus de un rasgo biológico particular. En algunas realizaciones, el locus A y/o el locus B son un gen y/o parte de un gen.

20 [0043] El método se realiza preferentemente en un cromosoma presente en una célula vegetal, preferentemente un protoplasto vegetal y preferentemente en presencia de otros componentes naturales de dicha célula vegetal, incluido el conjunto completo de cromosomas de dicha célula vegetal.

25 [0044] En una realización preferida, la célula vegetal es un protoplasto. Los métodos para obtener y mantener protoplastos de plantas están fácilmente disponibles para los expertos. Se encontró que el método más eficaz para inducir roturas de doble cadena de ADN (específicos de secuencia) en células vegetales es mediante el uso de protoplastos vegetales. Los protoplastos son células vegetales individuales que carecen de paredes celulares primarias y secundarias y se generan incubando partes de plantas con una mezcla de enzimas derivadas de hongos. Cualquier ADN, como los plásmidos, se puede introducir en los protoplastos mediante tratamientos químicos y cualquier gen de interés presente en el plásmido cuya expresión esté impulsada por un promotor vegetal adecuado se puede expresar en niveles altos debido a las miles de copias de plásmidos que entran a cada célula. La expresión génica es preferiblemente transitoria, con una duración de, p. ej., 24-36 horas, ya que el plásmido no puede replicarse y se degrada con el tiempo. Además, la integración del plásmido en el genoma de la planta es poco frecuente. /pct

35 [0045] Puede inducirse la división de los protoplastos de plantas individuales para formar grupos de células indiferenciadas llamados callos y en los que, a su vez, puede inducirse la regeneración de hojas y brotes que luego pueden enraizarse para producir plantas. Un sistema basado en protoplastos es ideal para la producción de roturas de doble cadena de ADN usando cualquiera de los métodos descritos en este documento. La nucleasa específica del sitio puede colocarse en el plásmido, expresarse a un alto nivel y producir una gran cantidad de proteína específica del sitio que es capaz de inducir la rotura de doble cadena de ADN requerida. Los protoplastos pueden aislarse en grandes cantidades (millones por día) y transfectarse con ADN de plásmido en masa, y los callos derivados de estos protoplastos transfectados derivan de una sola célula de protoplasto y, por lo tanto, no sufren quimerismo.

45 [0046] Sin embargo, el locus A y el locus B se caracterizan porque están localizados en dicho primer cromosoma en una parte, área o segmento que se caracteriza porque se suprime la recombinación (meiótica) de esa parte, área o segmento. Como se describe en este documento, "recombinación meiótica suprimida" significa que la recombinación meiótica entre los dos locus en el mismo cromosoma en un individuo híbrido es inferior a un evento de cruce o recombinación que se produce por cada 2000 individuos descendientes después de la autofecundación o el retrocruzamiento de la planta híbrida. En una realización preferida, esto es inferior a un evento de cruce o recombinante que se produce por cada 2500, 5000 u 8000 individuos descendientes. Un experto en la técnica sabe cómo determinar esto.

55 [0047] En el método, se introduce una rotura de doble cadena en el primer cromosoma, que comprende dicho primer locus A y dicho segundo locus B. La posición o locus donde se introduce dicha rotura de doble cadena está entre dicho primer locus A y B. Al introducir una doble rotura de cadena entre el 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 o 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, por la introducción de la ruptura de la doble cadena, ahora está separada del centrómero (es decir, la parte que estaba más alejada del centro del cromosoma, es decir, más cerca del final 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 está ligada a una segunda parte del segundo cromosoma, esto indica que una parte del primer cromosoma que está más cerca del centrómero del primer cromosoma está ligada a una parte del segundo cromosoma que está más alejada del centrómero del segundo cromosoma, con respecto a la otra parte que se forma debido a la introducción de la rotura de la doble cadena en

dicho(s) cromosoma(s) o viceversa. En otras palabras, en un cromosoma religado que comprende una primera parte de un primer cromosoma y una segunda parte de un segundo cromosoma, en una realización, la primera parte estaba más cerca del centrómero del primer cromosoma y la segunda parte estaba más alejada del centrómero del segundo cromosoma, en relación con la otra parte del mismo cromosoma formado por la introducción de la rotura de doble cadena.

[0048] Sorprendentemente, se descubrió que, al realizar los pasos anteriores, las células vegetales pueden identificarse utilizando técnicas moleculares, o simplemente regenerando una planta a partir de dichas células, donde se ha eliminado el enlace genético entre dicho primer locus A y dicho segundo locus B, y donde se ha producido un entrecruzamiento (intercambio) entre los (al menos) dos cromosomas homólogos u homeólogos de manera que el locus A está presente en 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 porque se produjo un intercambio o entrecruzamiento entre los (al menos) dos cromosomas, y donde el locus A y el locus B, aunque están situados en una zona del cromosoma con recombinación (meiótica) suprimida, se han separado.

[0049] Opcionalmente, por lo tanto, se puede identificar al menos una célula, después de realizar los pasos anteriores (a) y (b) donde se ha eliminado el enlace 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. Alternativamente, en algunas realizaciones, las células obtenidas después del paso (b) pueden regenerarse en plantas y, opcionalmente, autofecundarse posteriormente, y las plantas así obtenidas pueden usarse para seleccionar fenotípicamente la eliminación del enlace genético entre los locus A y B, por ejemplo en caso de que el locus A y el locus B estén vinculados a rasgos particulares que pueden observarse.

[0050] Preferiblemente se realiza el paso (c) del método anterior, es decir, es parte del método según la invención. El experto en la materia es, según la divulgación del presente documento, muy consciente de cómo identificar dicha célula. Por ejemplo, los protoplastos individuales se pueden propagar primero por separado, después de lo cual se pueden analizar algunos de los protoplastos (clonales) propagados, por ejemplo, utilizando 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 fluorescente in situ (FISH).

[0051] En una realización preferida, cuando se realiza el paso (c) anterior, el método comprende además la identificación de aquellas células en las que además la segunda parte del primer cromosoma está ligada a la primera parte del segundo cromosoma. De nuevo, como anteriormente, el experto en la materia es muy consciente de cómo realizar dicha identificación.

[0052] En una realización particularmente preferida de los métodos descritos en el presente documento, la célula vegetal seleccionada es tal que el segundo cromosoma no comprende un locus idéntico a dicho primer locus A y/o no comprende un locus idéntico a dicho segundo locus B. En otras palabras, aunque el segundo cromosoma pueda 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 determinado gen, y el segundo cromosoma puede comprender otro alelo para el mismo gen. Preferiblemente, en dicha realización, el alelo en el primer cromosoma y el segundo cromosoma están relacionados con un fenotipo diferente.

[0053] En otra realización de los métodos descritos en el presente documento, 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 del cromosoma completo. 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 la supresión de la recombinación (meiótica). Una ventaja adicional particular de la presente invención es que ahora dichos locus pueden separarse fácilmente, al mismo tiempo que proporcionan plantas supervivientes y normales, incluso si dichos locus están muy cerca uno del otro o muy alejados.

[0054] En los métodos descritos en el presente documento, la rotura de la doble cadena en el primer cromosoma y/o la rotura de la doble cadena en el segundo cromosoma se introducen mediante al menos una nucleasa específica del sitio seleccionada preferentemente entre nucleasa con dedos de zinc, meganucleasa, nucleasa efectora TAL (TALENs) y el sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN.

[0055] Mientras que los agentes genotóxicos introducen roturas y modificaciones del ADN de forma aleatoria en todo el genoma, las (endo)nucleasas utilizadas en la presente invención pueden hoy en día diseñarse racionalmente para reconocer y unirse a una secuencia de ADN específica en la que posteriormente se induce una rotura de doble cadena de ADN.

[0056] Para la presente invención, se prefieren cuatro tecnologías/sistemas de nucleasas para introducir la rotura de doble cadena: (1) meganucleasas, (2) nucleasas con dedos de zinc (ZFN) y (3) nucleasas efectoras TAL (TALEN) y (4) el sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN .

5 [0057] Las meganucleasas, incluyendo las endonucleasas autodirigidas como I-SceI, pueden mutarse 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 se ha informado de su actividad en plantas (Kirik, 2000, *EMBO J.* 19, 5562-566). Las meganucleasas también se denominan a veces endonucleasas homing LAGLIDADG (LHE; Stoddard et al (2011) *Structure* 19:7-15). Las meganucleasas se diferencian de las nucleasas con dedos de zinc y las TALEN (ver más adelante) en que son proteínas dirigidas a genes de origen natural que forman homodímeros que comprenden dos subunidades idénticas, cada una con un tamaño de aproximadamente 160 a 200 residuos de aminoácidos. Se ha sugerido que también pueden funcionar como un solo péptido de dos monómeros repetidos en tándem unidos por una secuencia enlazadora (Stoddard, 2011). Las meganucleasas generalmente reconocen un sitio objetivo de aproximadamente 20 a 30 pares de bases. Para obtener una descripción general de las meganucleasas y los métodos para evaluar la actividad de las meganucleasas mutadas y las especificidades de objetivo alteradas, 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 demás nucleasas usadas en la presente invención pueden introducirse en la célula vegetal y posteriormente (transitoriamente) expresarse en ella, y usando métodos bien conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, a partir de un gen quimérico o un par de genes quiméricos, cada uno de los cuales comprende un promotor expresable en plantas enlazado a una región codificante que codifica la meganucleasa o una de las del par de meganucleasas, y además operativamente enlazado a una región de ADN involucrada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación funcional en una célula vegetal.

25 [0058] Para los fines de la presente invención, el término "nucleasa con dedos de zinc" o "ZFN" se refiere a una molécula de proteína quimérica que comprende al menos un dominio de unión al ADN con dedos de zinc unido de manera efectiva a al menos una nucleasa capaz de escindir el ADN. La escisión por un ZFN en un locus objetivo da como resultado una rotura de doble cadena en ese locus. Las nucleasas con dedos de zinc constan de dos dominios, una matriz de dominios con dedos de zinc y un dominio de nucleasa, generalmente derivados de la enzima de restricción de tipo IIS FokI. Estas enzimas de restricción de tipo IIS, 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 puede diseñarse para reconocer un triplete específico de 3 pb y, al unir varios de estos, se puede reconocer específicamente una secuencia de ADN más larga. El dominio FokI debe dimerizarse antes de cortar el ADN, por lo que se diseñan dos proteínas ZFN para apuntar a secuencias en las cadenas de ADN opuestas separadas por una región espaciadora corta de 5-6 pb. La unión de ambas proteínas ZFN a su respectiva secuencia diana hace que ambos dominios FokI se sitúen enfrentados en la hélice de ADN en la región espaciadora donde luego se produce una rotura de doble cadena de ADN. Muchos estudios han demostrado que la ZFN es eficaz para inducir pequeños INDEL en una secuencia diana endógena en muchas especies de plantas diferentes (Curtin (2012) *The Plant Genome*, 5, 42-50). Las nucleasas con dedos de zinc hechas a medida están disponibles comercialmente con el nombre CompoZr de Sigma-Aldrich. (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/zinc-finger-nuclease-technology.html>). El uso de nucleasas con dedos de zinc en plantas se ha descrito, por ejemplo, en WO03087341 y WO2011052539. La ZFN usada para la presente invención, así como todas las demás nucleasas usadas en la presente invención pueden introducirse en la célula vegetal y posteriormente (transitoriamente) expresarse en ella, y usando métodos bien conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, de un gen quimérico o un par de genes quiméricos, cada uno de los cuales comprende un promotor expresable en plantas vinculado a una región codificante que codifica la nucleasa con dedos de zinc o una de las del par de nucleasas con dedos de zinc, y además operativamente enlazado a una región de ADN involucrada en la transcripción, terminación y poliadenilación funcional en una célula vegetal. La publicación US2012/0196370 muestra que las ZFN pueden usarse para crear deleciones definidas en un genoma eucariótico. En este enfoque, las ZFN cuyos sitios diana están separados por hasta 120 Kbps y se introducen en las células junto con una molécula "donante" lineal que tiene en cada extremo una región de homología de secuencia para cada uno de los sitios diana ZFN separados. Después del tratamiento de las líneas de células animales con estos reactivos, los productos podrían amplificarse por lo que la región entre los sitios diana de ZFN había sido reemplazada por la molécula donante, produciendo una deleción efectiva de la secuencia intermedia. En este caso se utiliza la vía de RH mitótica debido a las regiones de homología de secuencia presentes en los extremos de la molécula donante. La publicación sugiere que la molécula donante es esencial, en primer lugar, para impulsar la precisión de la reacción de RH mitótica y, en segundo lugar, para aumentar la frecuencia de la reacción de RH mitótica. Se cree que esto es necesario porque la frecuencia de las translocaciones obtenidas cuando solo se usan las ZFN es demasiado baja para una aplicación práctica. En contraste con lo que se enseña en la literatura, los inventores actuales descubrieron que se pueden producir translocaciones específicas entre cromosomas de plantas cuando solo se usa un par de ZFN para generar las roturas de doble cadena. A diferencia de la publicación US2012/0196370 nuestros experimentos utilizan la vía de UENH para generar translocaciones mientras observamos en los puntos de fusión cromosómica pequeñas deleciones que son características de esta vía de recombinación. Cuando se induce una rotura de doble cadena de ADN en solo uno de los cromosomas de la planta, los extremos del ADN se vuelven a unir mediante la vía de

UENH, lo que da como resultado pequeñas deleciones. La frecuencia de estas pequeñas deleciones (presentes en el 10 % de las células) está formada por dos componentes, la eficiencia de corte del par ZFN y la eficiencia con la que se repara la rotura de doble cadena por la vía de UENH. En este caso, se induce una sola rotura de doble cadena en un cromosoma para que los extremos del ADN estén muy cerca, lo que da como resultado una eficiencia del 10 %. Sin embargo, para que ocurra una translocación, las roturas de doble cadena deben producirse en dos cromosomas que están espacialmente separados en el núcleo y es poco probable que la interacción de estos extremos de ADN dé como resultado una frecuencia muy baja de formación de translocaciones. Sin embargo, hemos encontrado que la eficiencia de la formación de translocaciones (0.8 %) en células vegetales mediante la vía de UENH es inesperadamente alta, solo 12 veces menor que la reparación de extremos de ADN adyacentes y, por lo tanto, permite un fácil aislamiento de células individuales que han sufrido este proceso de recombinación. Además, nuestro método en células vegetales no requiere una molécula "donante" ya que la frecuencia y la precisión de la formación de translocaciones usando la vía de UENH ya son lo suficientemente altas según nuestra invención para una aplicación práctica. Por lo tanto, el método según la invención no necesita usar dicha molécula donante lineal o polinucleótido donante como se describe en US2012/0196370

[0059] Las TALEN son nucleasas específicas de sitio derivadas de efectores TAL producidos por la especie *Xanthomonas* que causan una variedad de diferentes enfermedades en las plantas. Durante la infección de una planta por la especie *Xanthomonas*, las proteínas efectoras TAL se introducen en la célula vegetal. Los efectores TAL consisten en una serie de dominios de proteínas repetidos, cada uno de los cuales puede reconocer y unirse específicamente a uno de los 4 nucleótidos de ADN (A, T, G, C). Diferentes combinaciones de estos dominios están presentes en diferentes efectores TAL y cada uno se une a una secuencia de ADN única en el genoma de la planta, a menudo en promotores de genes de plantas. Una vez unido al ADN de la planta, el efector TAL influye en la expresión génica de la planta para mejorar la patogenicidad bacteriana. Se han identificado los dominios específicos para cada nucleótido y se pueden producir matrices de estos dominios que tienen una 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). Los TALEN comerciales personalizados están disponibles en Collectis Bioresearch. (<http://www.collectis-bioresearch.com/genome-customization/genomic-scissors/talen>). Luego, estas matrices se fusionan con el dominio de nucleasa de FokI para crear un TALEN y, de manera similar a ZFN, se usan dos proteínas TALEN para inducir una rotura de doble cadena de ADN en una región espaciadora en la secuencia diana. Varios artículos han descrito el uso de TALEN para crear mutaciones en la especie de la secuencia diana (Curtin (2012) *The Plant Genome*, 5, 42-50). Las TALENS usadas para la presente invención, así como todas las demás nucleasas usadas en la presente invención pueden introducirse en la célula vegetal y posteriormente (transitoriamente) expresarse en ella, y usando métodos bien conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, a partir de un gen quimérico o un par de genes quiméricos, cada uno de los cuales comprende un promotor expresable en plantas operativamente enlazado a una región codificante que codifica la nucleasa TALENS o una de las del par de nucleasas TALENS, y además operativamente enlazado a una región de ADN involucrada en la terminación de la transcripción y la poliadenilación funcional en una célula vegetal. El uso del efector TAL (TALENS) se ha descrito, por ejemplo, en WO201107224.

[0060] La tecnología CRISPR (también denominada en este documento como el sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN) se deriva de bacterias donde se utiliza como un sistema para defenderse contra patógenos moleculares invasores como plásmidos y bacteriófagos. Los locus específicos en el genoma bacteriano consisten en conjuntos de secuencias cortas derivadas de los genomas de patógenos moleculares que son el resultado de infecciones previas. Los pequeños ARN (crARN) se producen a partir de estos locus que interactúan con el tracrARN y estas moléculas de ARN juntas dirigen luego 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 ruptura de doble cadena de ADN específica en la secuencia objetivo en el genoma del patógeno que luego se degrada. La expresión de la proteína Cas9 (nucleasa), tracrARN y crARN (los componentes del sistema CRISPR) dirigidos a una secuencia genómica en las células vegetales y animales crea roturas de doble cadena dirigidas a la secuencia genómica diana que a menudo son reparadas incorrectamente por la maquinaria de ADN celular, dando lugar a una pequeña inserción o supresión (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; Nekrasov et al. (2013) *Nat. Biotech.* 31: 686-688). Un INDEL en la secuencia de codificación de un gen o incluso en un intrón a menudo conduce a la pérdida de la función del gen. Para fines prácticos, el tracrARN y el crARN generalmente se combinan en un ARN guía quimérico (sgARN); esta combinación de ARN está incluida en la definición del sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN.

[0061] Las nucleasas específicas del sitio pueden inducir roturas de doble cadena dirigidas con una alta eficiencia y, por lo tanto, las plantas que contienen INDEL en la secuencia diana pueden identificarse fácilmente. La ingeniería del genoma mediante el uso de nucleasas específicas del sitio, como los sistemas CRISPR, tiene muchas aplicaciones, especialmente en especies con poliploidía, y se está volviendo cada vez más importante para la mejora de cultivos.

[0062] 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 sean introducidas por la misma nucleasa específica del sitio, la misma nucleasa con dedos de zinc, la misma meganucleasa, la misma nucleasa efectora TAL o el mismo sistema de nucleasa Cas9/crARN/tracrARN. En otras palabras, se prefiere apuntar a una secuencia tanto en el primer como en el segundo cromosoma que puede ser objetivo de la misma nucleasa, por ejemplo porque la secuencia diana es idéntica. Reconocer dicho objetivo tanto en el primer cromosoma como en el segundo cromosoma está dentro de las habilidades de los expertos, y no será difícil ya que el primer y el segundo cromosoma son cromosomas homólogos u homeólogos que comparten partes del cromosoma con altos niveles de identidad, p. ej., 100 %.

[0063] Quedará claro para el experto en la materia, y con base en la descripción del presente documento, en una realización preferida de los métodos descritos en el presente documento, no se introduce más de una rotura de doble cadena en el primer cromosoma y no más de una rotura de doble cadena en el segundo cromosoma.

En otra 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 vinculado a un rasgo deseable de un primer carácter y dicho segundo locus B está vinculado a un rasgo indeseable de dicho primer carácter o segundo carácter; y
- ii. donde dicho segundo cromosoma no comprende un locus que sea idéntico a dicho segundo locus B vinculado 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.

Esta realización del método según la invención permite superar el arrastre por ligamiento. El método proporciona la separación de un locus A que está vinculado a un tratamiento favorable de un locus B que está vinculado a un rasgo desfavorable. Tanto el locus A como el B pueden ser un marcador genético vinculado a dicho rasgo deseado (A) o no deseado (B) o pueden ser (o estar en) el gen que está causalmente vinculado al rasgo deseado o no deseado. Los rasgos asociados o vinculados con los locus A y B pueden o no ser del mismo carácter.

[0064] Como se ha descrito anteriormente, en una realización particularmente preferida de los métodos descritos en el presente documento, la célula vegetal seleccionada es tal que el segundo cromosoma no comprende un locus idéntico a dicho primer locus A y/o no comprende un locus idéntico a dicho segundo locus B. En otras palabras, aunque el segundo cromosoma pueda 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 determinado gen, y el segundo cromosoma puede comprender otro alelo para el mismo gen. En el contexto de la realización actual, el experto entiende que el segundo cromosoma preferiblemente no proporciona un locus idéntico a dicho locus B no deseado en el primer cromosoma, o comprende un locus B que es una variante alélica no deseada de dicho locus B no deseado. En otras palabras, mediante este método según la invención, el primer cromosoma se modifica de tal 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 que no contiene dicho locus B vinculado a un rasgo no deseado.

[0065] Los ejemplos no limitantes 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 enfermedades o plagas, crecimiento reducido, tamaño reducido, cantidad reducida de semillas, resistencia reducida contra el estrés, incluyendo estrés por sal, calor, frío, agua y sequía. Sin embargo, como se entenderá, cualquier rasgo de un carácter puede considerarse indeseable, dependiendo del propósito de los criadores o del experto, solo o en relación con el rasgo deseado asociado al locus A.

[0066] En una realización adicional, el método comprende además regenerar una planta a partir de una célula vegetal obtenida después del paso (b) o el paso (c) y generar semillas a partir de dicha planta regenerada por autofecundación o cruce con otra planta y hacer crecer una planta a partir de la semilla obtenida y opcionalmente, cribar dicha planta obtenida para la eliminación del enlace genético. Como se explicó anteriormente, el experto en la materia es muy consciente de cómo realizar estos pasos y cómo detectar la eliminación del enlace genético.

[0067] Preferiblemente, la célula vegetal proporcionada es una célula vegetal somática, preferiblemente un protoplasto y/o una célula vegetal obtenida de un híbrido. La célula vegetal se puede obtener de cualquier planta adecuada, por ejemplo, como se describe específicamente en el presente documento. La célula vegetal puede proceder, por ejemplo, de una planta diploide, triploide, tetraploide, pentaploide, hexaploide, octaploide, decaploide, dodecaploide o anfiploide.

[0068] En consonancia con la divulgación del presente documento, y teniendo en cuenta todas las preferencias y modificaciones discutidas en el presente documento y en posesión del experto en la materia, también se

proporciona un método para proporcionar una planta P1 obtenida a partir de una planta P2, en el que dicha planta P2 se caracteriza por la presencia de un enlace 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 enlace genético, donde el método comprende

(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 además comprende al menos un segundo cromosoma, en el que dichos cromosomas son cromosomas homólogos u homeólogos entre sí;

(b) introducir una ruptura de doble cadena en el primer cromosoma, donde la ruptura 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, 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 el paso (b) al menos una célula vegetal donde se ha eliminado el enlace 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 introducen mediante al menos una nucleasa específica del sitio, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en nucleasa con dedos de zinc, meganucleasa, nucleasa efectora TAL y el sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN.

[0069] De nuevo, preferiblemente se realiza el paso (c).

[0070] Según otro aspecto, se proporciona el uso de una nucleasa específica del sitio, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en una nucleasa con dedos de zinc, una meganucleasa, una nucleasa efectora TAL y el sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN para eliminar el enlace genético entre un primer locus A y un segundo locus B presente en un primer cromosoma, donde se suprime la recombinación (meiótica) entre la ubicación de dicho primer locus A y la ubicación de dicho segundo locus B en el cromosoma, ambas incluidas. Preferiblemente, se proporciona para el uso donde dicho primer locus A está vinculado a un rasgo deseable de un primer carácter y dicho segundo locus B está vinculado a un rasgo indeseable de dicho primer carácter o segundo carácter.

[0071] También se proporciona para el uso de una nucleasa específica del sitio, preferiblemente seleccionada entre una nucleasa con dedos de zinc, una meganucleasa, una nucleasa efectora TAL y el sistema CRISPR Cas9/crARN/tracrARN para eliminar el arrastre por ligamiento.

[0072] En un último aspecto, se proporciona una planta, una parte de una planta, un fruto o una semilla obtenible u obtenida mediante métodos o usos según la invención. En una realización preferida, se proporciona un grupo de al menos dos de dichas plantas, partes de plantas, frutos o semillas.

[0073] En resumen, la invención divulgada, en una realización no limitante, implica la inducción de entrecruzamientos entre cromosomas parentales homólogos u homeólogos en protoplastos de plantas somáticas mediante el uso de nucleasas específicas del sitio que pueden inducir una rotura de doble cadena de ADN específica en la misma secuencia en ambos cromosomas. Esto se puede lograr aislando protoplastos de plantas y luego introduciendo la nucleasa específica del sitio presente en un plásmido en los protoplastos mediante un tratamiento químico. La proteína nucleasa específica del sitio se produce luego en el protoplasto e induce las roturas de doble cadena de ADN. Se cree que el sistema de UENH puede reparar estas roturas de doble cadena al unir los extremos libres de ADN de los diferentes cromosomas, lo que da como resultado un intercambio de brazos cromosómicos, también conocido como translocación recíproca. Las nucleasas específicas del sitio pueden diseñarse para inducir roturas de doble cadena en cualquier secuencia deseada y, por lo tanto, puede inducirse una translocación recíproca en cualquier punto a lo largo de los cromosomas parentales homólogos. Una gran ventaja sobre la recombinación meiótica es que la unión de extremos de ADN usando el método según la invención es independiente de la secuencia y, por lo tanto, usando este enfoque no hay limitación en las regiones que se pueden dirigir o intercambiar. Por lo tanto, este enfoque es ideal para romper el arrastre por ligamiento; por ejemplo, las introgresiones que, debido a diferencias de secuencia, no se recombinan durante la meiosis (se suprimen). Hay muchos ejemplos de rasgos importantes en especies de cultivos comercialmente importantes, como la resistencia vírica al TMV y al TYLCV en el tomate, que se encuentran en grandes fragmentos de introgresión con un arrastre por ligamiento severo que tiene un efecto negativo en el rendimiento de la planta. Dado que estas resistencias son valiosas, se aceptan las pérdidas de rendimiento, pero será muy beneficioso tanto para los fitomejoradores como para los cultivadores romper ese arrastre por ligamiento para aumentar aún más el rendimiento de la planta.

[0074] La capacidad de crear plantas que contengan introgresiones con un tamaño definido también es de gran utilidad para los fitomejoradores en general. Las poblaciones de plantas, cada una de las cuales contiene una introgresión definida de una especie de planta salvaje no adaptada, se pueden producir y utilizar para la mejora de cultivos y el descubrimiento de genes. Los genes responsables de los rasgos nuevos se pueden mapear de manera más eficiente dividiendo 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. Dado que la generación de translocaciones dirigidas es independiente de la secuencia, las bibliotecas de introgresión de plantas se pueden generar de manera más rápida y precisa y todas las regiones genómicas se pueden representar de manera igualitaria. Esto disminuye la necesidad de examinar grandes poblaciones de F2 para los cruces deseados, lo que significa que se requieren menos instalaciones, como, por ejemplo, espacio de invernadero. Este método también se puede aplicar a la cría de especies aloploidoides como el tabaco, la colza o el trigo. Las especies de plantas aloploidoides son a menudo el resultado de un antiguo evento de hibridación entre dos o más especies de plantas diploides en las que los diferentes genomas separados no se recombinan durante la meiosis. Por ejemplo, *Brassica napus* consta de genomas A y C que no se mezclan durante la meiosis. Por lo tanto, una región cromosómica particular en cualquiera de los genomas no puede volverse completamente homocigótica a través de la autofecundación. Los protoplastos de *B. napus* se pueden aislar y transfectar con un constructo de plásmido que porta una nucleasa específica del sitio que induce una rotura de doble cadena en la misma posición en los cromosomas A y C. Entonces, la célula puede generar una translocación recíproca entre los genomas A y C que no sería posible lograr a través de la recombinación meiótica. Las plantas regeneradas posteriores pueden luego autofecundarse con cualquier planta que sea completamente homocigótica para la translocación en ambos genomas identificados. Las translocaciones dirigidas también pueden ser muy útiles para la manipulación de secuencias de ADN a nivel genético. Si se ha identificado un promotor específico que es más activo en una especie de planta salvaje no adaptada que en la especie cultivada, se pueden usar translocaciones dirigidas para transferir el promotor activo al genoma de la especie cultivada. Esto se puede lograr cruzando las dos especies para producir una línea F1, aislando los protoplastos de esta y luego expresando una nucleasa específica del sitio en estos protoplastos que induce una rotura de doble cadena en ambos cromosomas homólogos en una posición justo antes del inicio de transcripción del gen de interés. La translocación dirigida resultante unirá las secuencias aguas arriba, incluido el promotor activo, al gen de interés, lo que alterará su patrón y nivel de transcripción. De forma similar, pueden diseñarse nucleasas específicas del sitio para introducir roturas de doble cadena en intrones de genes presentes en diferentes cromosomas homólogos. Una translocación dirigida entre estas roturas de doble cadena dará como resultado el intercambio de dominios génicos entre los cromosomas homólogos y la formación de genes quiméricos que contienen dominios de cada cromosoma. En este caso, las pequeñas deleciones producidas por el sistema de UENH están ubicadas en el propio intrón y, por lo tanto, es poco probable que inhiban la función del gen.

Ejemplos

Ejemplo 1

Inducción de una translocación dirigida en el cromosoma VII en los protoplastos del tomate

[0075] La configuración experimental para generar translocaciones dirigidas en células de tomate se muestra en la figura 1. El enfoque utiliza una nucleasa específica del sitio, en este ejemplo, una nucleasa con dedos de zinc, que induce una rotura de doble cadena de ADN en la misma posición genómica o en su correspondiente en ambos cromosomas homólogos. Entonces se puede formar una translocación entre los cromosomas cuando estas dos roturas de doble cadena se reparan 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 ZFN en cada cromosoma. Una vez que se ha formado una translocación, estas uniones se pueden amplificar específicamente usando diferentes combinaciones de estos cebadores directos e inversos. Para un diseño de cebador específico, deben existir diferencias de secuencia que flanqueen el sitio de corte de ZFN en cada cromosoma. Esto se logró mediante el uso de una línea de tomate con una introgresión en el cromosoma VII de la especie de tomate silvestre *Solanum pennellii*. Esta región de introgresión contiene el sitio objetivo de ZFN en el gen ALS2 de *S. pennellii* (*SpALS2*) y también suficientes diferencias de secuencia con el tipo salvaje ALS2 (WT ALS2) para hacer posible el diseño de cebadores específicos. El experimento se realizó creando un heterocigoto híbrido F1 para el locus ALS cruzando el tomate WT (M82) con la línea IL7-3 de introgresión del cromosoma VII de *S. pennellii*. Luego se produjeron protoplastos a partir de este híbrido F1 y se transfectaron con un constructo de plásmido que expresa la ZFN que induce la rotura de doble cadena tanto en el locus WT ALS2 como en el *SpALS2*. Usando nuestro enfoque de PCR, pudimos detectar células en las que se había producido una translocación recíproca. Sorprendentemente, dichos eventos fueron detectables a una frecuencia relativamente alta (0.8 %), lo cual fue inesperado porque las roturas de doble cadena de ADN estaban ubicadas en diferentes cromosomas. Esta es la primera evidencia notificada de que las nucleasas específicas del sitio son capaces de inducir translocaciones recíprocas en células vegetales y una demostración de que dichos eventos ocurren con una frecuencia relativamente alta. Luego pasamos a cultivar protoplastos de plantas individuales hasta conseguir callos y genotipamos estos callos usando PCR para identificar aquellos con la translocación deseada. Dichos callos pueden regenerarse en plantas

y mostrarían una pérdida de enlace entre los marcadores que flanquean el fragmento de introgresión. Este enfoque puede usarse para disminuir el tamaño de un fragmento de introgresión en protoplastos de plantas somáticas de una manera independiente de la homología.

5 Constructo de nucleasa con dedos de zinc

[0076] Para nuestros experimentos se utilizó el plásmido pKG7402. Este plásmido contiene dos genes de nucleasa con dedos de zinc diseñados para unirse e inducir una rotura de doble cadena de ADN en los genes de la acetolactato sintasa (ALS) del tomate (ALS1 y ALS2). ALS1 se encuentra en el brazo corto del cromosoma III y ALS2 se encuentra en el brazo largo del cromosoma VII.

Material vegetal

[0077] Se utilizó la línea (IL7-3) de *Solanum lycopersicum* que contiene una introgresión de la especie silvestre de tomate *Solanum pennellii* en el cromosoma VII. Este fragmento de introgresión tiene un tamaño aproximado de 56 cM y constituye la mayor parte del brazo largo de este cromosoma (Eshed, Y & Zamir, D. (1995) Genetics 141: 1147-1162) e incluye el gen ALS2 de *S. pennellii*. Las plantas homocigóticas para este fragmento de introgresión se retrocruzaron con la línea progenitora (M82) y se recolectaron semillas F1. Estas se esterilizaron luego y germinaron en medio sintético (MS20: medio MS + vitaminas (Duchefa) 4.4 g/l, sacarosa 20g/l, microagar 8 g/l) en frascos altos en un fotoperiodo de 16/8 h de 2000 lux a 25° C y 60-70 % de HR. Las líneas progenitoras M82 y homocigóticas IL7-3 también se trataron de la misma manera y se mantuvieron como plantas estériles en cultivo tisular. Después de 3-4 semanas, se recolectaron las hojas maduras para la producción de protoplastos.

Aislamiento y transfección de protoplastos

[0078] 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 se pueden encontrar en estas publicaciones. En resumen, se colocó 1 g de hojas recién cosechadas en un plato con 5 ml de CPW9M y, utilizando una cuchilla de bisturí, se cortaron perpendicularmente al tallo principal cada milímetro. Estos se transfirieron a una placa fresca de 25 ml de solución enzimática (CPW9M que contenía 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 prosiguió durante la noche a 25 °C en ausencia de luz. A continuación, los protoplastos se liberaron colocándolos en un agitador orbital (40-50 rpm) durante 1 hora. Los protoplastos se separaron de los desechos celulares pasándolos a través de un tamiz de 50 µm y lavando el tamiz 2x con CPW9M. Los protoplastos se centrifugaron a 85 g, se descartó el sobrenadante y luego se recogieron en la mitad del volumen de CPW9M. Los protoplastos finalmente se tomaron en 3 ml de CPW9M y luego se añadieron cuidadosamente 3 ml de CPW18S para evitar mezclar las dos soluciones. Los protoplastos se centrifugaron a 85 g durante 10 minutos y los protoplastos viables que flotaban en la capa de interfase se recogieron usando una pipeta Pasteur larga. El volumen de protoplastos se aumentó a 10 ml mediante la adición de CPW9M y se determinó el número de protoplastos recuperados en un hemocitómetro. Para la transfección con un constructo de plásmido, la suspensión de protoplastos se centrifuga a 85x g durante 10 minutos a 5°C. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento de protoplastos hasta una concentración final de 106 ml-1 en medio de lavado de KCl. En un tubo de 10 ml, 250 µl de suspensión de protoplastos +/-40 µg de ADN plasmídico puro y 250 µl de solución de PEG (40 % PEG4000 (Fluka #81240), Ca(NO₃)₂ 0.1 M, manitol 0.4 M) se mezclan suave pero completamente. Después de 20 min de incubación a temperatura ambiente, se añaden gota a gota 5 ml de Ca(NO₃)₂ 0.275 M 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 del tomate se incluyeron en una solución de alginato para su regeneración. Se añadieron 2ml de solución de alginato (90g/l de manitol, 140mg/l de CaCl₂.2H₂O, 20g/l de alginato-Na (Sigma A0602)) y se mezclaron completamente por inversión. 1 ml de esta solución se depositó uniformemente en una placa de Ca-agar (72.5 g/l de manitol, 7.35 g/l de CaCl₂.2H₂O, 8 g/l de agar) y se dejó polimerizar. A continuación, los discos de alginato se transfirieron a placas de Petri de 4 cm que contenían 4 ml de medio de cultivo K8p y se incubaron en ausencia de luz a 30 °C durante 7 días. Luego, los discos de alginato se cortaron en tiras de 5 mm de grosor y se colocaron en capas sobre medio de regeneración sólido TM-DB (2.5 g/l de TM2 basal (Duchefa), 110 mg/l de vitaminas Nitsch, 50 g/l de sacarosa, 8 g/l de microagar, 0,2 mg/l de 2,4-D, 0.5 mg/l de BAP, pH 5.8) durante 3 semanas. A continuación, los callos regenerados se recogieron con pinzas y se colocaron individualmente en medio GM-ZG (4.3 g/l de MS macro+micro polvo (Duchefa), 110 mg/l de vitaminas Nitsch, 36.4 g/l de manitol, 2.5 g/l de sacarosa, 8 g/l de microagar, 1 mg/l de zeatina, 1 mg/l de GA3, pH 5.8). Luego, se tomaron muestras para el aislamiento del ADN cuando habían alcanzado aproximadamente 7 mm. Tras la regeneración de los brotes, los callos se transfirieron a medio MS-ZI (4,4 g/l de MS + vitaminas (Duchefa), 20 g/l de sacarosa, 8 g/l de microagar, 2 mg/l de zeatina, 0.1 mg/l de IAA, pH 5.8). Después de 2-3 semanas, los brotes se escindieron y se transfirieron a medio de enraizamiento (4,4 g/l de MS + vitaminas (Duchefa), 20 g/l de sacarosa, 8 g/l de microagar, 0.5 mg/ml de IBA, pH 5.8) y posteriormente al invernadero.

Secuenciación del locus ALS2 de *S. pennellii*

[0079] El ADN cromosómico se aisló de la línea homocigótica IL7-3 (kit DNeasy, Qiagen) y se utilizó el kit Genome Walker (Clontech) para determinar la secuencia del locus ALS2 de *S. pennellii* según las instrucciones del fabricante. En resumen, se digirieron 500 ng de ADN genómico durante 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 ALS2 ORF de *S. lycopersicum*, se utilizaron para amplificar el extremo 3' del locus ALS2 de *S. pennellii*. En consecuencia, el par de cebadores anidados 11_11536 (5'-CGTAGCTCCCGACCAGATGTAGCA-3') y 11_11537 (5'-ATGTAGCAATACAAACACCAGGAACCCA-3') se usaron para amplificar el extremo 5' del locus ALS. Los productos de PCR se escindieron del gel y se secuenciaron. Con base en estas secuencias, se diseñaron cebadores adicionales (11_13680 (TCACCCCTTCACCTTACC) y 11_13681 (CCTTCACATTTAACCAAAGC)) que amplificaron la región intermedia y se usaron para completar la secuenciación del locus (Figura 2). De esta forma se demostró que el sitio diana de ZFN en ALS2 se conservaba tanto en la línea M82 como en la IL7-3.

15 Diseño de cebadores específicos del locus ALS2

[0080] La alineación de la secuencia ALS2 de *S. pennellii* y de 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 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 progenitoras IL7-3 y M82 y que ambos locus estaban presentes en la línea F1 derivada de un cruce de estos dos progenitores (línea BC).

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

[0081] Los protoplastos se aislaron tanto de la línea IL7-3 como de las plantas M82 y se transfectaron con el plásmido pKG7402 o con un plásmido que porta un casete 35S::GFP (pKG7381). Después de 12 horas, los protoplastos transfectados con pKG7381 se observaron bajo el microscopio fluorescente para evaluar la expresión de GFP. Esto fue equivalente en los protoplastos de IL7-3 y de M82 (datos no mostrados), lo que demuestra que la introgresión de *S. pennellii* en la línea IL7-3 no afectó a la transformación. Después de 48 horas, los protoplastos se recogieron por centrifugación y el ADN genómico se aisló utilizando el kit DNeasy (Qiagen). Luego se realizó una reacción de PCR en este ADN utilizando los cebadores 09Q132 (CTTGTGGAGGCACTTCAA) y 09Q133 (CCGACCAGATGTAGCAATA) que amplifican un fragmento de 205 pb del locus ALS2 que incluye el sitio diana de ZFN. El producto de PCR se purificó y clonó entonces en un vector (pCR2.1:Blunt, Invitrogen) y se transformó en células químicamente competentes de One Shot de *E. coli* (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante y se sembraron en medio LB suplementado con 50 µg/ml de kanamicina (Duchefa). Posteriormente se realizó una PCR en 96 colonias bacterianas individuales utilizando los mismos cebadores, y los productos de PCR resultantes se analizaron mediante análisis de curva de fusión de alta resolución en un aparato Roche Light Cycler para identificar productos de PCR con características de fusión aberrantes. A continuación, dichos clones se tomaron para la secuenciación y los resultados se muestran en la figura 3. Para las líneas IL7-3 y M82, aproximadamente el 10 % de los productos de PCR derivados de la población de protoplastos transfectados contenían un INDEL en el sitio diana de ZFN. El tamaño de estos INDEL en ambas líneas también fue comparable, por lo que podemos concluir que el locus ALS2 de *S. pennellii* se puede dirigir con tanta eficacia como el locus ALS2 de M82. Como control, también analizamos 96 productos de PCR derivados de la transfección de pKG7381. Ninguno de estos mostró características de fusión aberrantes y cuando se secuenciaron dos, no mostraron ninguna alteración en la secuencia (datos no mostrados).

50 Translocaciones dirigidas en el locus ALS2 en protoplastos de tomate

[0082] Los protoplastos se aislaron de plantas F1 cultivadas in vitro (derivadas de un cruce M82 x IL7-3). Además, también aislamos protoplastos de plantas M82 e IL7-3 cultivadas in vitro. 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 recolectaron luego por centrifugación (800 rpm, 10 minutos) y luego se aisló el 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 cebadores específicos de locus. Por ejemplo, la combinación del cebador ALS2 de *S. pennellii* (11_13680) y el cebador M82 (12_07231) solo deben amplificar los cromosomas que han sufrido una translocación y generarán un producto de PCR que incluye la unión de translocación en la posición del sitio diana de ZFN. Se realizó una reacción de PCR usando estos cebadores en todas las muestras de ADN de protoplastos usando las siguientes condiciones de ciclo {95 °C 2'; [95 °C 30", 60 °C 30", 72 °C 2']x40; 72 °C 5'} en una reacción que consiste en 1 µl de ADN de protoplasto genómico, 5 µl de tampón Herculase Fusion 5x (Agilent), 0.3 µl de dNTP 100 mM, 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 fue mayor en las muestras de plantas F1 tratadas con pK7402 (datos no mostrados). Dado que 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 específico a partir de los locus ALS2 inalterados de *S. pennellii* y M82, pero que el producto de PCR de los protoplastos F1 tratados puede ser más fuerte ya que además contiene productos de PCR generados a partir de uniones de translocación. Los productos de PCR de 2.2 kbps de los tratamientos y los controles se escindieron del gel y se purificaron utilizando el kit de aislamiento de gel Qiagen. Luego, los productos de PCR se clonaron utilizando el kit de ligación de PCR Zero Blunt (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y los plásmidos resultantes que contenían los productos clonados se purificaron a partir de células TOP10 de *E. coli* y se secuenciaron los productos de PCR de 2.2 kbps completos. Los resultados se muestran en la figura 4. De hecho, los cebadores pudieron amplificar un producto de PCR ALS2 de las muestras de control, pero la secuenciación mostró que siempre se derivaban del locus WT ALS2 (M82) o del locus SpALS2 (IL7-3). El análisis de dos productos de PCR derivados de los protoplastos F1 transfectedados con el plásmido de control (pKG7381) mostró que ambos locus se habían amplificado en esta reacción de PCR. Todos los productos de PCR de los controles mostraron la secuencia esperada. Todos los productos de PCR derivados de los protoplastos híbridos F1 tratados con pKG7402 mostraron un INDEL pequeño en el sitio de unión a la ZFN, similar a los que habíamos observado anteriormente cuando los protoplastos de las líneas progenitoras se trataron con pKG7402. Sin embargo, para cada uno de estos productos de PCR de 2.2 kbps, los SNP aguas arriba del sitio de unión de ZFN indicaron que esto era una secuencia ALS2 de *S. pennellii*, mientras que los SNP aguas abajo del sitio de unión de ZFN se derivaron de la secuencia ALS2 de M82, como cabría esperar para un fragmento de unión de translocación. Por lo tanto, esto proporcionó una buena evidencia de que en la población de protoplastos había células que habían sufrido una translocación dirigida en el locus ALS2 entre la introgresión de *S. pennellii* y el cromosoma VII de WT M82 que da como resultado un intercambio de brazos cromosómicos y la ruptura del enlace en el fragmento de introgresión.

[0083] Para cuantificar cuántos protoplastos en la población tratada contenían una translocación específica, intentamos cuantificar la cantidad de productos de PCR que tienen esta característica organización quimérica ALS2 de *S. pennellii*/M82. Realizamos una PCR en el ADN genómico utilizando los cebadores 12_11216 (CTTCCACCCTTCTCCCAAATC) y 12_11217 (TGCCAACCTCTGCACATTCA). Estos cebadores no son específicos y, por lo tanto, amplifican un producto de 1.3 kbps tanto del locus WT ALS2 como del SpALS2. Dicha reacción de PCR por lo tanto consiste en SpALS2, WT ALS2 y productos de translocación dirigidos. Para determinar las cantidades relativas de cada uno de estos productos en la reacción de PCR y, por lo tanto, la eficacia del propio proceso de translocación dirigido, se clonaron y genotiparon los productos de la reacción de PCR. El producto de PCR de 1.3 kbps incluye el sitio de unión a la ZFN y dos sitios de restricción de diagnóstico ubicados a ambos lados. Aguas arriba del sitio de unión de ZFN, un cambio A→G en la secuencia ALS2 de *S. pennellii* crea un sitio de restricción *HindIII*. Aguas abajo del sitio de unión de ZFN, un cambio C→A en la secuencia ALS2 de *S. pennellii* crea un sitio *MseI*. Estos sitios se usaron como base para un ensayo CAPS para genotipar productos de PCR para la secuencia ALS2 que flanquea el sitio de unión de ZFN. El producto de PCR de 1.3 kbps se clonó usando el kit de ligación de PCR Zero Blunt según las instrucciones del fabricante. A continuación, las colonias bacterianas individuales se resuspendieron en 50 µl de agua, se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y luego se utilizó 1 µl de esta solución en una PCR anidada con los cebadores 09Q132 + 09Q133 o con 09R037 + 09R040 que posteriormente se digirieron con *HindIII* o *MseI* respectivamente. La presencia o ausencia de los sitios *HindIII* y *MseI* fueron indicativos de un locus ALS2 inalterado (ya sea SpALS2 o WT ALS2), mientras que un producto de PCR clonado que tiene solo uno de estos productos de PCR puede haberse derivado de un evento de translocación dirigido. En total, se genotiparon 249 colonias bacterianas por la presencia de uno solo de estos sitios de restricción y finalmente se identificaron cinco. Por 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* aguas arriba del sitio de unión de ZFN y la secuencia ALS2 de M82 aguas abajo. Para el clon #2 esto se invirtió. Por lo tanto, podemos concluir que la eficiencia de la formación de translocaciones dirigidas en nuestra configuración experimental es de aproximadamente 2 en 249 (0.8%). Esto sugiere que solo es necesario cribar un número limitado de protoplastos para aislar células con translocaciones específicas.

Aislamiento de plantas de tomate con translocaciones dirigidas

[0084] Se aislaron protoplastos de hojas de la línea híbrida F1 y se transflectaron con 40 µg de plásmido pKG7402. Para su posterior desarrollo, se incluyeron en discos de alginato que luego se incubaron en 4 ml de medio K8p durante 7 días. Los discos se cortaron entonces en tiras de 5 mm que luego se colocaron en medio sólido TM-DB (2-4D, BAP) para un 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 un pequeño INDEL en el sitio de corte de ZFN y, por lo tanto, primero cribamos todos los callos para detectar esto. Para el genotipado, se raspó un pequeño trozo de tejido de cada callo en desarrollo con una punta de pipeta de plástico y luego se resuspendió en 20 µl de tampón de dilución del kit de PCR directa de plantas Phire (Thermo Scientific). Para la PCR directa en este material, se tomó 1 µl de la dilución y se mezcló con 10 µl de tampón de reacción 2x, 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

utilizadas fueron; 98 °C 5 minutos, {98 °C 5 segundos, 62 °C 5 segundos, 72 °C 1.5 minutos} x40, 72 °C 5 minutos. Estos productos de PCR luego se diluyeron 200x en agua y 1 µl de esta disolución 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 dNTP (20 mM), 1 µl de 09Q132 (5 pmol), 1 µl de 09Q133 (5 pmol), 0.2 µl AmpliTaq (5U/µl) y 41.3 µl de agua con las condiciones de ciclo 94°C 2 min, {94°C 30 seg, 55°C 30 seg, 72°C 30 seg} x30, 72 °C 5 min. Esto genera fragmentos de PCR de 200 bps que incluyen el sitio de corte de ZFN que se puede cribar para detectar la presencia de INDEL. Estas reacciones de PCR también se llevaron a cabo en material de la línea F1 para generar productos de PCR de control. Para detectar callos con INDEL en el sitio de corte de ZFN, se mezclaron 4 µl de cada producto de PCR de 200 bps con 4 µl del producto de PCR de control y 1 µl de TE y LC Green. Luego se determinaron las características de fusión de esta mezcla utilizando el protocolo de escaneo de genes del LightCycler de Roche. Identificamos 53 muestras con características de fusión aberrantes indicativas de un INDEL en el sitio de corte de ZFN. Los productos de 1,3 kbps de estos 53 callos se clonaron luego con el kit de clonación PCR Zero Blunt (Invitrogen). Posteriormente, 4 colonias bacterianas de cada ligación fueron genotipadas para determinar la presencia de los sitios *HindIII* y *MseI* como se ha descrito anteriormente. A partir de un solo callo, TT1 y TT2, pudimos demostrar que todos los clones bacterianos probados carecían de uno de los sitios de restricción, lo que demuestra que esta célula había sufrido una translocación dirigida recíproca. Estos clones fueron secuenciados y pudimos demostrar que, de manera similar a las secuencias derivadas de los protoplastos, se había producido una translocación dirigida en estos callos. La frecuencia con la que se identificaron estos callos (0.25 %) se encuentra en el mismo rango determinado previamente y sigue siendo inesperadamente alta.

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

[0085] Los callos TT1 y TT2 pueden luego transferirse al medio de cultivo y los brotes subsiguientes pueden inducirse a formar raíces. Las plantas se transfieren entonces al invernadero para realizar un genotipado adicional. La semilla se recoge de la planta TT1 y se germina en la tierra. El material foliar se recolecta de las plántulas y se aísla el ADN. Para demostrar que los marcadores TG20 y TG143 ya no están unidos en la progenie, se analiza la presencia de estos marcadores en las plántulas. Cabe esperar que la autofecundación de las plantas F1, donde los dos marcadores están presentes en el mismo cromosoma que flanquea la introgresión, dé una progenie en la que el 25 % carece de cualquiera de los marcadores y el 75 % es positivo para ambos marcadores. En una planta que contiene una translocación dirigida, el enlace entre los marcadores ya se ha roto en los protoplastos. Cuando se analiza la progenie de dichas plantas, esperaríamos que el 50 % tuviera ambos marcadores (en este caso ubicados en diferentes cromosomas), el 25 % solo el marcador TG20 y el 25 % 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 del sitio, como una ZFN en protoplastos de tomate, puede inducir translocaciones dirigidas recíprocas que dan plantas viables y pueden transmitirse a la siguiente generación. Este enfoque se puede utilizar para romper cualquier forma de enlace entre dos secuencias de ADN de forma independiente de la secuencia.

EJEMPLO 2

Rotura del arrastre por ligamiento en el locus de TYLCV

[0086] El virus del rizado amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) es una devastadora enfermedad del tomate causada por un begamovirus y transmitida por la mosca blanca. La infección por TYLCV es común en las regiones cálidas (sub)tropicales y esto limita el crecimiento del tomate en estas regiones. Se ha encontrado resistencia a la infección por TYLCV en varias especies de tomates silvestres (Ji et al. (2007) en Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease (Czosnek, H., ed). Países Bajos: Springer, págs. 343-362). Actualmente, se utilizan en el mejoramiento cinco locus de resistencia, de Ty1 a Ty5. El locus Ty1 de LA1969 de *S. chilense* fue el primer locus de resistencia que se mapeó y está vinculado al locus Ty3 en el cromosoma 6 y se ha incorporado a diferentes variedades disponibles comercialmente. Sin embargo, el locus de resistencia Ty1 sufre de arrastre por ligamiento, ya que se acompaña de rasgos indeseables como la autonecrosis. El locus Ty1 está ubicado en la región pericentromérica del cromosoma 6 y se encuentra en un fragmento de introgresión de 17 MB que sufre una supresión severa de la recombinación. Verlaan et al. (2011, Plant J 68: 1096-1103) estudiaron 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 varios reordenamientos cromosómicos en LA1969 de *S. chilense* que inhiben la recombinación en esta región durante la meiosis. Dado que la producción de translocaciones dirigidas es independiente de la homología, esto se puede usar para disminuir el tamaño del locus Ty1 para romper el arrastre por ligamiento y simplificar el mapeo preciso del locus Ty1.

[0087] 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 ellos (H208D24, disponible en: http://solgenomics.net/maps/physical/clone_info.pl?id=77280) para identificar genes que probablemente representen secuencias de una sola copia en el genoma del tomate. Este BAC porta el tomate homólogo del gen PRH75 (ARN Helicasa 75 de planta, At5g62190) de *A. thaliana* anotado como Unigene SGN U268902. Si bien

este BAC se eligió arbitrariamente, también podría usarse cualquier otra secuencia en la región de introgresión que esté presente en ambos cromosomas para realizar estos experimentos. Para identificar las diferencias de nucleótidos en este locus entre LA1969 de *S. lycopersicum* y de *S. chilense* se puede realizar caminata genómica en este locus en ambas especies vegetales. Esto permite diseñar cebadores de PCR específicos para los dos locus SGN U268902. Posteriormente, se puede diseñar una construcción TALEN que se une y corta entre los sitios del cebador para validar su actividad.

[0088] Luego se cultiva una línea de plantas heterocigótica para la introgresión de Ty1 *in vitro* y los protoplastos se aíslan y transfectan con el ADN del plásmido TALEN. A continuación, los protoplastos de tomate se regeneran en callos y se analizan utilizando combinaciones de cebadores específicos del locus SGN U268902 para identificar los callos que contienen uniones de translocación. Estos luego se regeneran 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 de Ty1 se ha reducido y estas plantas pueden seguir analizándose para determinar 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 tamaño definido en material de cultivo de tomate y mapeo fino de un gen responsable de la maduración temprana de la fruta

[0089] Se puede identificar una línea de tomate, ER43, que lleva un locus en el cromosoma I responsable de la maduración temprana de la fruta. Mediante el análisis de marcadores se puede establecer que el locus se ubica entre los marcadores AFLP MM101 y MM107, los cuales están separados por 527 kbps. La secuencia completa de esta región está disponible y, por lo tanto, se puede seleccionar una serie de secuencias diana espaciadas por 100 kbps que, según el análisis BLAST, son secuencias de copia única en el genoma del tomate. Los cebadores se diseñan flanqueando estas secuencias diana y se utilizan 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 sean idénticas en ambas líneas y, en segundo lugar, identificar las diferencias de secuencia alrededor de estas secuencias diana en las dos líneas de tomate que pueden aprovecharse para el diseño de cebadores específicos. Posteriormente, se diseñan cinco constructos TALEN para producir roturas de doble cadena en estas secuencias diana. A continuación, las secuencias TALEN se sintetizan y clonan en un constructo plasmídico que fusiona TALEN con una secuencia promotora activa en los protoplastos de tomate, como, por ejemplo, el promotor AA6 de tomate. 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 recolectan mediante centrifugación. A continuación, el ADN genómico se aísla de cada población de protoplastos transfectados y cada una de las cinco secuencias diana se amplifica utilizando cebadores específicos de cromosomas. Luego, los productos de PCR se analizan para detectar la presencia de INDEL en la secuencia diana, que estaría presente en alrededor del 10 % de cada lote de protoplastos tratados. Esto demostrará que los constructos TALEN están activos en la célula y pueden inducir roturas de doble cadena en las secuencias diana de ambas líneas de tomate. Luego se cruzan las líneas ER43 y Moneymaker para producir una línea F1 que se mantiene en condiciones estériles en cultivo tisular y se usa para la producción de protoplastos. Estos protoplastos luego se transfectan con los constructos TALEN y se cultivan 1000 callos derivados de cada transfección y luego se genotipan para detectar la presencia de una translocación en la secuencia diana usando diferentes combinaciones de cebadores de PCR específicos de cromosomas. Los callos que contienen estas translocaciones dirigidas luego se regeneran en plantas y se autofecundan para crear plantas F2 que son homocigóticas para cada translocación. Estos luego se fenotipan para identificar el fragmento cromosómico que porta el locus de maduración temprana. Luego se construye un mapa físico de esta región y se puede identificar el gen responsable del fenotipo de maduración temprana.

EJEMPLO 4

Translocaciones dirigidas en *Brassica napus*

[0090] La colza o canola (*Brassica napus*) es una especie anfidiplóide formada a partir de la hibridación interespecífica de *Brassica rapa* (el genoma A) y *Brassica oleraceae* (el genoma C). El mejoramiento selectivo de pedigrí se ha utilizado intensamente para mejorar tanto el rendimiento como la calidad de la semilla en este cultivo. El mejoramiento de pedigrí implica la selección y la endogamia de individuos F2 superiores y de generaciones posteriores resultantes de cruces entre pares de cultivares establecidos. Sin embargo, debido al número limitado de plantas F2 cribadas, los productos finales del proceso de mejoramiento a menudo contienen grandes cantidades de los genomas progenitores que tienen un efecto negativo en las características agronómicas. Esto se ha demostrado en *B. napus* tipo "Tapidor" que incluso después de varias generaciones de retrocruzamiento todavía contenía el 29 % de uno de los genomas progenitores (Sharpe & Lydiate, 2001, Genome 46: 461-468). Es posible calcular la probabilidad de que un hipotético individuo F2, derivado de un F1 que porta alelos de élite y donantes distintos en todas las unidades genómicas, no contenga ningún genotipo de donante hijo. Se ha estimado que esto ocurre aproximadamente una vez cada 81 825 plantas F2 (Sedcole, T. R.

(1977) Crop Sci. 17: 667-668). Por el contrario, los programas de mejoramiento de pedigrí en colza generalmente solo seleccionan entre 1000 y 2000 plantas F2, lo que da como resultado la selección de un individuo que contiene una gran cantidad de genotipo donante no enlazado. Combinado con la práctica de producir haploides dobles para aumentar la velocidad de mejoramiento, los genotipos progenitores pueden volverse homocigóticos y hijos muy rápidamente, incluso cuando no están enlazados al locus de interés.

[0091] 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 de otras especies de anfidiplóides como el tabaco (*Nicotiana tabacum*), trigo duro (*Triticum durum*), trigo común (*Triticum aestivum*) y algodón (*Gossypium hirsutum*). Considerando un ejemplo en *B. napus*, los rasgos importantes desde el punto de vista agronómico de las líneas progenitoras pueden introducirse en las líneas comerciales a través de un programa de mejoramiento que da como resultado que el locus progenitor, generalmente en un estado homocigótico, esté presente en uno de los genomas (por ejemplo, en el genoma A). Sin embargo, debido a las restricciones sobre la recombinación entre los genomas durante la meiosis, el locus correspondiente en el genoma C no cambia. Si esta región también porta algunos fenotipos negativos, o disminuye la eficacia del fenotipo conferido por el locus progenitor en el genoma A, entonces esto no se puede resolver fácilmente a través del mejoramiento convencional. Al inducir una translocación dirigida entre los genomas A y C usando nucleasas dirigidas al sitio, es posible producir una planta que sea homocigótica para el locus progenitor en los genomas A y C (se muestra esquemáticamente 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. El mejoramiento por mutación es un método común de mejoramiento de plantas. Implica el tratamiento de plantas, generalmente semillas, con un mutágeno como el metanosulfato de etilo (EMS) que genera cambios de C a T en todo el genoma. A continuación, las poblaciones de plantas mutadas se cultivan, se autofecundan y, en la generación siguiente (M2), las plantas se criban para detectar fenotipos alterados (cribado directo) o se seleccionan sobre la base de mutaciones inducidas en el gen de interés cuando se conoce la secuencia (cribado inverso). En muchos casos se requiere una mutación que confiere un fenotipo de pérdida (completa) de la función y esto requiere la identificación de dos líneas de plantas, cada una con una mutación nula en el gen de interés en uno de los genomas. Estas plantas pueden luego cruzarse, la F1 autofecundada y las plantas F2 identificadas que son homocigóticas para ambas mutaciones nulas en ambos genomas. Este es un enfoque caro, que consume mucho tiempo 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, divulgamos que se pueden inducir translocaciones dirigidas para transferir una mutación inducida (nula) entre genomas y alcanzar rápidamente un estado homocigótico (figura 5).

[0092] Los experimentos se centran en inducir una translocación dirigida entre los genomas A y C de *B. napus* cromosoma 8. Se selecciona la línea "Tapidor" de *B. napus* para estos experimentos ya que porta un gran fragmento de introgresión 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. A continuación, se identifica y se secuencian un gen único presente en los genomas A y C en la línea "Tapidor" para identificar las diferencias de secuencia. En base a estos, se diseñan cebadores que solo amplifican el locus del genoma A o C. Para inducir una rotura de ADN en los locus de los genomas A y C, se diseña un constructo TALEN. Los locus A y C se criban en busca de una secuencia idéntica a ambos y los TALEN están diseñados para unirse y cortar en esta secuencia. Los TALEN se clonan en un vector plasmídico con un promotor vegetal constitutivo (35S) y se introducen en protoplastos "Tapidor" de *B. napus* mediante transfección con PEG. Después de 48 horas, el ADN se aísla de los protoplastos y los cebadores específicos de locus se utilizan para generar productos de PCR que se secuencian para demostrar que el constructo TALEN es capaz de inducir INDEL en el sitio diana. A continuación, se repite el experimento y los callos de *B. napus* individuales se regeneran y se genotipan para determinar la presencia de translocaciones dirigidas mediante el uso de combinaciones de 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 pb en el genoma A, 3 pb en el genoma C) que representan diferentes INDEL en las uniones de translocación en los cromosomas híbridos A y C cromosomas. Las plantas se regeneran entonces a partir de estos callos y se cultivan hasta la madurez. A continuación, se criba la próxima generación en busca de plántulas que sean homocigóticas para estos INDEL y que también sean homocigóticas para el resto del brazo cromosómico.

EJEMPLO 5

Fusión de dominios de locus mediante translocaciones dirigidas

[0093] La línea de plantas IR3 tiene una fuerte resistencia a una amplia gama de insectos debido a la presencia de un compuesto insecticida en alta concentración en sus tricomas. Esta alta concentración se consigue mediante una alta expresión de uno de los genes (IK4) implicados en la síntesis bioquímica de este compuesto. La alta expresión se logra mediante un nuevo promotor que impulsa una alta activación transcripcional de una manera específica para los tricomas. La línea de plantas IR12 también contiene el gen IK4, pero es susceptible a la alimentación de 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 conducen a su inactivación. El objetivo de estos experimentos era restaurar la alta expresión específica de tricomas del gen IK4 en la línea IR12 mediante la inducción de una translocación dirigida entre las líneas, lo que resultó en la fusión del promotor IR3 con el gen IK4 de la línea IR12. Se identifica una secuencia objetivo ubicada 20 bps aguas arriba del ORF de IK4 y se diseña un TALEN para crear una rotura de doble cadena en este sitio. A continuación, el TALEN se clona tras un promotor adecuado para la expresión vegetal y el plásmido resultante se transfecta a protoplastos de las líneas IR3 e IR12. Como se describe en el ejemplo 3, de esta manera podemos confirmar que la expresión del TALEN es capaz de inducir una rotura de doble cadena en la secuencia diana en ambas líneas de plantas. Se crea entonces una línea F1 cruzando las líneas IR3 e IR12 y luego se usa para producir protoplastos que luego se transfectan con el constructo TALEN. Como se describe en otros ejemplos, los cebadores específicos que amplifican los locus IR3 o IR12 se utilizan en diferentes combinaciones para identificar los callos en los que se ha producido una translocación dirigida. Estos callos entonces se regeneran en plantas y luego se retrocruzan con la planta progenitora IR12 varias veces, seleccionando la translocación dirigida en cada generación, para llegar a una situación en la que la planta es isogénica para el progenitor IR12 excepto por la translocación deseada. Mediante RT-PCR cuantitativa se puede demostrar que en esta línea la fusión precisa del promotor IR3 con el gen IR4 IK4 ha restaurado la expresión alta de IK4 en los tricomas y el posterior fenotipado demuestra que esta planta muestra una fuerte resistencia a una amplia gama de insectos. Este ejemplo demuestra que las translocaciones se pueden usar para fusionar promotores u otras secuencias reguladoras con genes de otra línea y así lograr nuevos patrones de expresión que proporcionen fenotipos valiosos.

EJEMPLOS

Creación de marcos de lectura abiertos novedosos utilizando translocaciones dirigidas

[0094] La resistencia a los patógenos fúngicos a menudo es conferida por la clase de genes repetidos ricos en leucina (LRR) ubicados en grupos de genes de resistencia distribuidos por todo el genoma de la planta. La línea de plantas M17 contiene un gen de resistencia LRR (LRR12) que confiere resistencia específica a la raza 1 del hongo patógeno que causa la enfermedad del tizón tardío. La línea de plantas P15 porta un grupo de genes de resistencia similar ubicado en la misma posición en el cromosoma. En P15, el gen de resistencia más similar en secuencia a LRR12, llamado LRR63, está ubicado en la misma posición en el grupo pero tiene una secuencia de aminoácidos diferente. Como consecuencia, el gen LRR63 confiere resistencia frente 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 lograr una nueva resistencia a la raza fúngica 3 mediante la combinación de dominios de los genes LRR12 y LRR63. Se conoce la secuencia de ambos genes y se analizan los intrones en busca de secuencias que estaban presentes tanto en LRR12 como en LRR63. A continuación, se diseña una nucleasa específica del sitio que puede inducir una rotura de doble cadena en esta secuencia diana. La nucleasa específica del sitio luego se clona tras un promotor que proporciona expresión en protoplastos de plantas y el plásmido resultante luego se usa para transfectar protoplastos de las líneas de plantas M17 y P15. Como se describe con más detalle en los otros ejemplos incluidos en el presente documento, podemos demostrar que la nucleasa específica del sitio puede producir roturas de doble cadena en las secuencias diana del intrón tanto en LRR12 como en LRR63. Luego se produce una línea F1 cruzando las líneas M17 y P15 y se mantiene en condiciones estériles en cultivo tisular. A continuación, los protoplastos se aíslan de la línea F1 y se transfectan con el plásmido que codifica la nucleasa específica del sitio. Luego, los protoplastos individuales se regeneran 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. Dado que la translocación se ha dirigido a un intrón, los pequeños INDEL que se producen durante la translocación solo eliminan parte de la secuencia del intrón y, por lo tanto, no afectan el marco de lectura abierto del gen. La translocación da como resultado la fusión de dominios del gen LRR12 con dominios del gen LRR63, creando un nuevo gen que confiere nuevas resistencias. Los callos con la translocación se regeneran en plantas y se puede demostrar que el nuevo marco de lectura abierto quimérico está formado por dominios de LRR12 y LRR63 y que proporciona una nueva resistencia a la raza fúngica 3. Este ejemplo demuestra cómo se pueden utilizar translocaciones dirigidas para unir dominios de diferentes genes para crear nuevos genes que confieren nuevos fenotipos importantes.

EJEMPLO 7

Inducción simultánea de translocaciones dirigidas e inhibición de la meiosis

[0095] Se pueden inducir translocaciones dirigidas entre cromosomas homólogos en un híbrido F1 usando nucleasas específicas del sitio. Los callos individuales pueden entonces regenerarse para producir plantas que luego pasan por una meiosis normal que conduce a una población F2 normal con segmentos genómicos de ambas plantas progenitoras. Luego, se requiere un retrocruzamiento extenso para obtener líneas isogénicas para el fenotipado, lo que puede llevar años e implica múltiples rondas de cribado de población. Se puede obtener una línea isogénica en una sola generación cuando se inhiben los cruces meióticos en la planta original, lo que permite que los cromosomas progenitores se segreguen aleatoriamente en los gametos. La mayoría de los gametos no serán viables debido a un número anormal de cromosomas, pero un pequeño porcentaje contendrá

5 todos los cromosomas del progenitor deseado y cuando se use en un retrocruzamiento directo con el progenitor
requerido generará una línea isogénica en una sola generación. La translocación dirigida que se va a producir
puede ser cualquiera de las descritas en los ejemplos 1 a 6. Los protoplastos pueden producirse a partir de
plantas F1 y transfectarse simultáneamente con dos plásmidos. El primer plásmido porta una nucleasa específica
de sitio, impulsada por un promotor activo en protoplastos de plantas, que produce la translocación dirigida
deseada como ya se ha descrito. El segundo plásmido porta una nucleasa específica de sitio diferente,
impulsada por un segundo promotor activo en protoplastos de plantas que está diseñado para crear una rotura
de doble cadena en un gen, Dmc1, involucrado en la formación de cruces durante la meiosis. La reparación de
esta rotura de doble cadena producirá pequeños INDEL en el gen meiótico que conducen a una pérdida
10 completa de la función del gen. A continuación, se seleccionan los callos que contienen la translocación dirigida
deseada y luego se criban en busca de mutaciones INDEL homocigóticas adicionales en la secuencia diana de
Dmc1. Estos callos luego se regeneran en plantas y se retrocruzan con la planta progenitora original. Puede
demostrarse que las plantas derivadas de este cruce contienen la translocación deseada pero, por lo demás, son
isogénicas con el progenitor del retrocruzamiento. Por lo tanto, este método se puede aplicar para generar líneas
15 que contengan translocaciones dirigidas y que, por lo demás, también sean isogénicas para una de las líneas
progenitoras sin necesidad de un extenso programa de retrocruzamiento.

REIVINDICACIONES

1. Método para inducir una translocación dirigida entre un primer locus A y un segundo locus B presentes en un primer cromosoma vegetal en una planta o célula vegetal, donde el primer locus A y el segundo locus B presentes en el primer cromosoma vegetal presentan arrastre por ligamiento entre sí, donde el método comprende los pasos de:

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

(b) introducir una ruptura de doble cadena en el primer cromosoma, donde la ruptura de doble cadena en el primer cromosoma se introduce entre el primer locus A y el 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, proporcionando así una primera parte del segundo cromosoma y una segunda parte del segundo cromosoma, donde la primera parte del primer cromosoma que comprende el primer locus A está ligada a la segunda parte del segundo cromosoma por unión de extremos no homólogos; e

(c) identificar opcionalmente, usando la célula vegetal obtenida en el paso (b), al menos una célula vegetal que comprende una translocación entre el primer locus A y el segundo locus B en el primer cromosoma,

donde la rotura de doble cadena en el primer cromosoma y/o la rotura de doble cadena en el segundo cromosoma se introducen mediante al menos una nucleasa específica del sitio, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en nucleasa con dedos de zinc, meganucleasa, nucleasa efectora TAL y una nucleasa específica del sitio del sistema CRISPR.

2. Método según la reivindicación 1, donde el método se usa con alguno de los fines siguientes:

i) romper el arrastre por ligamiento;

ii) introgresiones a medida;

iii) mapeo preciso;

iv) recombinación intragénica;

v) generación de fusiones de genes; y

vi) manipulación dirigida de genomas vegetales aloploidoides, diploides, triploides, tetraploides, pentaploides, hexaploides, octaploides, decaploides, dodecaploides o anfiploides,

donde preferiblemente el método se usa con al menos uno de los fines de recombinación intragénica y generación de fusiones génicas.

3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde en el paso c) se identifican células vegetales que comprenden la translocación 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.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la identificación en el paso c) comprende el cultivo de tejidos.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde se aísla la célula vegetal que comprende la translocación dirigida.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el método comprende además un paso de regeneración de una planta a partir de la célula vegetal obtenida después del paso (b) o después del paso (c) de la reivindicación 1.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el segundo cromosoma no comprende un locus idéntico a dicho primer locus A y/o no comprende un locus idéntico a dicho segundo locus B.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde se utilizan una o varias nucleasas específicas del sitio para introducir la rotura de doble cadena en el primer cromosoma y la rotura de doble cadena en el segundo cromosoma.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el locus A y/o el locus B forman parte de un gen, preferentemente de un promotor.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde no se introduce más de una rotura de doble cadena en el primer cromosoma y no se introduce más de una rotura de doble cadena en el segundo cromosoma.

5 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la identificación en el paso (c) de la reivindicación 1 comprende la secuenciación y/o la amplificación selectiva de partes ligadas del primer cromosoma, y/o el fenotipado de la descendencia, y/o la hibridación fluorescente in situ (FISH).

10 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la célula vegetal proporcionada es al menos una de las siguientes

i) una célula vegetal somática, preferentemente un protoplasto, y/o una célula vegetal obtenida a partir de un híbrido; y

15 ii) obtenida de una planta diploide, triploide, tetraploide, pentaploide, hexaploide, octaploide, decaploide, dodecaploide o anfidiplóide.

20 13. Método para proporcionar una planta P1 obtenida a partir de una planta P2, donde dicha planta P2 se caracteriza por la presencia de un primer locus A y un segundo locus B en un primer cromosoma, donde el primer locus A y el segundo locus B en la planta P2 presentan arrastre por ligamiento entre sí, y donde dicha planta P1 se caracteriza por la presencia de una translocación dirigida entre el primer locus A y el segundo locus B, donde el método comprende

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

(b) introducir una ruptura de doble cadena en el primer cromosoma, donde la ruptura de doble cadena en el primer cromosoma se introduce entre el primer locus A y el 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

30 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) identificar opcionalmente, usando la célula vegetal obtenida en el paso (b), al menos una célula vegetal que comprende una translocación entre el primer locus A y el segundo locus B en el primer cromosoma, y además,

35 donde la primera parte del primer cromosoma que comprende el primer locus A está ligada a la segunda parte del segundo cromosoma por unión de extremos no homólogos, y

(d) regenerar dicha planta P1,

y donde la rotura de doble cadena en el primer cromosoma y/o la rotura de doble cadena en el segundo cromosoma son introducidas por al menos una nucleasa específica del sitio,

40 preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en nucleasa con dedos de zinc, meganucleasa, nucleasa efectora TAL y nucleasa específica del sitio del sistema CRISPR.

45 14. Uso de al menos una nucleasa con dedos de zinc, una meganucleasa, una nucleasa efectora TAL y una nucleasa específica del sitio del sistema CRISPR para inducir una translocación dirigida entre un primer locus A y un segundo locus B que están presentes en un primer cromosoma vegetal y presentan arrastre por ligamiento entre sí, lo que da como resultado un intercambio de brazos cromosómicos con un segundo cromosoma homólogo u homeólogo en una planta o célula vegetal.

50 15. Uso según la reivindicación 14, donde la translocación dirigida tiene al menos uno de los fines siguientes:

i) rotura del arrastre por ligamiento;

ii) introgresiones a medida;

iii) mapeo preciso;

iv) recombinación intragénica;

55 v) generación de fusiones de genes; y

vi) manipulación dirigida de genomas poliploides,

donde preferiblemente el método se usa con al menos uno de los fines de recombinación intragénica y generación de fusiones génicas.

60

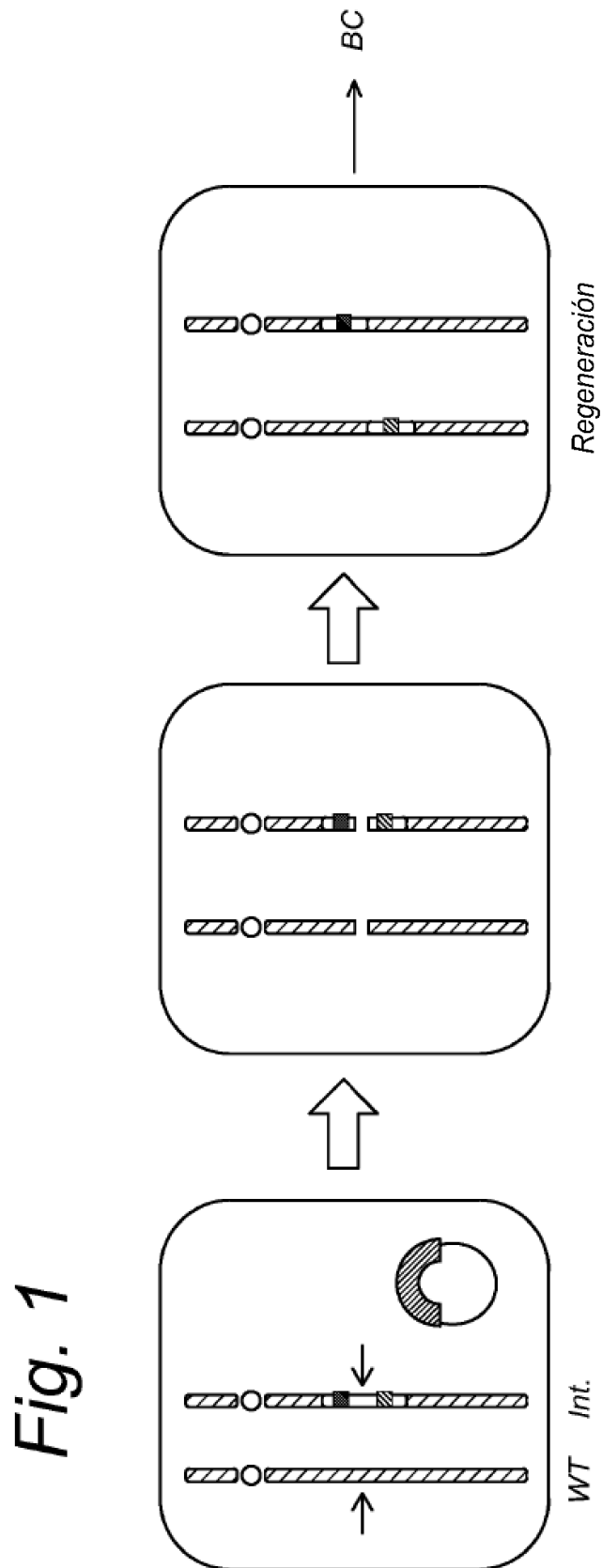


Fig. 1

Fig. 2

CCTCAACAACAATGGCGGCTGCATCTCCATCTCCTTGTTTTTC
 CAAAACCCTACCTCCATCTTCATCAAAATCTTCCACCCTTCTT
 CCCAAATCTACCTTTACTTTCCACAATCACCCCTAAAAAAGCAT
 CACCCCTTACCTTACACACACCCCAACATCATAGCCGTTTCAC
 TGTTTCAAATGTCATCCTATCAACCACGACGCATGACGACGTT
 TCTGAACCCGAAATCTTTGTTTCCCGTTTCGCCCTGACGAAC
 CCAGAAAGGGTTGTGATGTTCTTGTGGAGGCACTTGAAAGGGA
 AGGGGTAAAGGATGTGTTTGCATACCCAGGAGGTGCTTCCATG
 GAGATTCATCAGGCTTTGACACGTTCAAATATTATTCGTAATG
 TGC**TGCCACGTC**ATGAAC**AGGGTGGT**GTTTGTGCTGCAGAGGG
 TTACGCACGGGCTACTGGGTTCCCTGGTGTTTGTATTGCTACA
 TCTGGTCCGGGAGCTACGAATCTTGTTAGCGGTCTTGCTGATG
 CTTTGTGGATAGTATCCCGATTGTTGCTATTACCGGTCAAGT
 GCCGAGGAGGATGATTGGTACTGATGCGTTTCAGGAAACTCCT
 ATTGTTGAGGTAACGAGATCCATTACGAAGCATAAATTATCTTG
 TTATGGATGTAGAGGATATTCCTAGGGTTGTTTCGTGAAGCGTT
 TTTTCTAGCGAAATCAGGACGGCCTGGACCTGTTTTGATTGAT
 GTTCCTAAGGATATTCAGCAACAATTGGTGATACCTAATTGGG
 ATCAGCCAATGAGGTTGCCTGGTTACATGTCTAGGTTGCCTAA
 ATTACCTAATGAGATGCTTTTGGAAACAAATTGTTAGGCTGATT
 TCAGAGTCAAAGAAGCCTGTTTTGTATGTGGGTGGTGGGTGTT
 CACAGTCCAGTGAGGAGCTGAGACGCTTTGTGGAGCTTACGGG
 TATTCTGTGGCGAGTACTTTGATGGGTCTTGGAGCTTTTCCA
 AGTGGGGATGAGCTTTCTCTTCAAATGTTGGGTATGCATGGGA
 CTGTGTATGCTAATTATGCGGTGGATAGTAGTGATTTGTTGCT
 TGCATTTGGGGTGAGGTTTGATGATCGAGTTACTGGTAAATTG
 GAAGCTTTTGTAGCCGAGCTAAGATTGTCCATATTGATATTG
 ATTCGGCTGAGATTGGAAAGAACAAGCAACCTCATGTTTCCAT
 CTGTGCAGATATCAAGTTGGCATTACAGGGTTTGAATTCCATA
 TTCGAGAGTAAAAAAGGTAAGCTGAAGTTGGACTTTTCTGCTT
 GGAGGCAGGAGTTAACGGAGCAGAAGGTGAAGTACCCATTGAA
 TTTTAAGACTTTCGGTGAAGCCATCCCTCCCAATATGCTATT
 CAGGTTCTTGATGAGTTAACTAACGGAAATGCCATCATTAGTA
 CTGGTGTGGGGCAACACCAAATGTGGGCTGCCCAACACTACAA
 GTACAAAAAGCCACGCCAATGGCTTACATCTGGTGGATTAGGA
 GCAATGGGATTTGGTTTGCCTGCTGCTATAGGTGCGGCTGTTG
 GAAGACCGGGTGAGATTGTGGTTGATATTGATGGTGATGGGAG
 TTTTATCATGAATGTGCAGGAGTTGGCAACAATTAAGGTGGAG
 AATCTCCAGTTAAGATTATGTTGCTGAATAATCAACACTTGG
 GAATGGTGGTTCAGTGGGAGGATCGATTCTATAAGGCTAACAG
 AGCACACACTTACTTGGGTAATCCTGCTAATGAGGAAGAGATC
 TTCCCTAATATGCTGAAATTTGCAGAGGCTTGTGGCGTACCTG
 CTGCAAGAGTGTACACAGGGATGATCTTAGAGCTGCCATTCA
 AAAGATGTTAGACACTCCTGGGCCATACTTGTGGATGTGATT
 GTACCTCATCAGGAGCATGTTCTACCGATGATTCCCAGTGGCG
 GTGCTTTCAAAGATGTGATTACGGAGGGTGATGGGAGACGTTT
 CTATTGACTTTGAGAAGCTACATAACTAGTTCAAGGCATTGTA

TTATCTAAAATAAACTTAATATTTATGTTTACTTAAAAGTTTT
TCATTGTGTGAAGGATTTTAGAATTTCTTGTTCTATTGGCAGC
ACCAATTAAGTATTTGGAGCTCTATTTAGTATGACTAAGATTA
ATTACAAGTGAAGTAGTTAAGTTCGATAAATCAGCTTTGTTAC
ATTCTATGTTATTTGGTGAACATGAATTCCATTTGGGAGAAGG
CTATGTCCAGCTTAAGGGCTCAAATTTTTCAGAGAGTGCTGAT
TCAAAGGTGAATGCCAAAATCAGATTAGCACAAAGTTTGCAGA
GTTATATTACGCCATCTTTCTGTTTTTCAGCTAATTGCTGTTGC
AAGGGCTCTACTGAAGAAGGCCTCTATTTTATTTCTTGATGAG
GTAATCTTTGACCCCTTTTGCTCCCCGTGTGTCCGTTGACTTT
TACCATGTATGCTCTGCGTTACAGTTCTGTGGGTGACCTTGGT
ATCTTCTTATTCACTGTAAATGTTGGTTTAAGCCTGAATTACC
TAGGGGATTCCCCAGGTCGTTTACACAGGGGTTTACATAAGAT
CAGCTCAGTTCTCCGGAGAAGTTCTAGCAATCTTGGAGAGCCT
ATTTTCATCTCTGCATGTGAATCTTAGGGCAGTTAATGCCAAGG
ATATCAGAGTGAAGATTATAGTGGATGACACCATTTTGCCTTC
ATCATTAGCAACAACACCTACAGAAGATGGAAAAGAGAACGGT
GCAGGAAATGGGAAAAGTTTCACAAATGGGGCAAGACGAAGAG
AATCCTTAAAGATGCTGGCAAATCTGTTGGTGGTGGCATAAAG
GAAGTGATGTCTGGGAAGTCATCAGGGAAATCTAAAGAGGAAG
TAGAATCATCAGAGACCGAAAGAATGAGCTCTGTGGAATCTGA
TATTTCTGATGCAGAGTCTCAACCTTCATCAGTTGATTCACCT
CCAGTTGTAGCGCCTTC

Fig. 2A

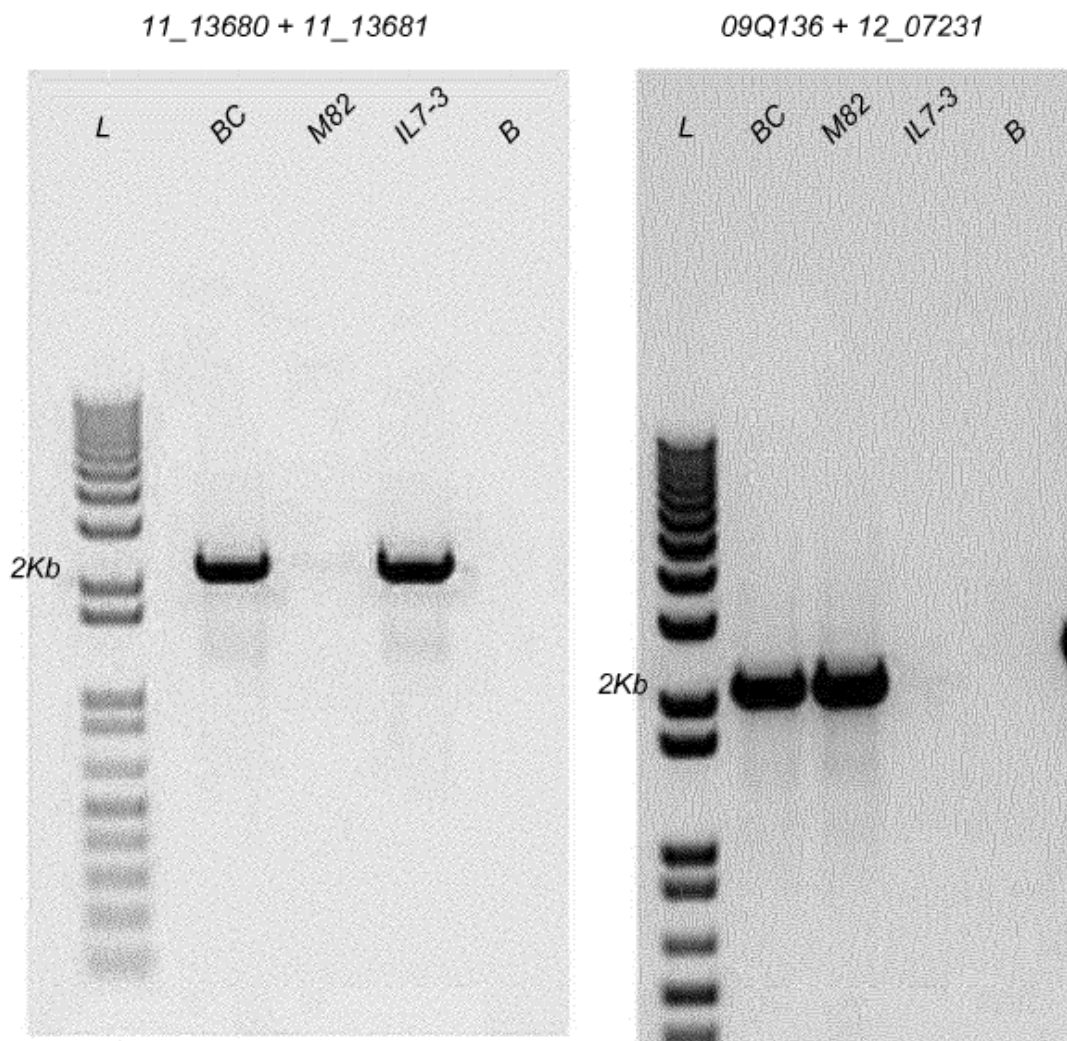


Fig. 3

ALS2 AATGTGCTGCCACGTCATGAACAGGGTGGTGTGTTGC

M82 (1) AATGTGCTGCCACGTCA---ACAGGGTGGTGTGTTGC

M82 (2) AATGTGCTGCCACGTCA----CAGGGTGGTGTGTTGC

M82 (3) AATGTGCTGCCACGTCAGAACAGGGTGGTGTGTTGC

M82 (4) AATGTGCTGCCACGTCATG---AGGGTGGTGTGTTGC

M82 (5) AATGTGCTGCCACGTC-----GGTGGTGTGTTGC

IL7-3 (1) AATGTGCTGCCACGTCA-----GGTGGTGTGTTGC

IL7-3 (2) AATGTGCTGCCACGTCAGAACAGGGTGGTGTGTTGC

Fig. 4

M82 ALS 2
 S-pennllii ALS 2

M82
 IL7-3

F1
 F1
 F1 x ZFN
 F1 x ZFN
 F1 x ZFN
 F1 x ZFN
 F1 x ZFN

Clon #1
 Clon #2

CATCAgGCTTTTGACACAGTTCaAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACAGTCAATGAACACAGGGTGGTG-446bps-TCaGAG
CATCAaGCTTTTGACACAGTTCgAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACAGTCAATGAACACAGGGTGGTG-446bps-TCgGAG

CATCAgGCTTTTGACACAGTTCaAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACAGTCAATGAACACAGGGTGGTG-446bps-TCaGAG
 CATCAaGCTTTTGACACAGTTCgAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACAGTCAATGAACACAGGGTGGTG-446bps-TCgGAG

CATCAgGCTTTTGACACAGTTCaAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACAGTCAATGAACACAGGGTGGTG-446bps-TCaGAG
 CATCAaGCTTTTGACACAGTTCgAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACAGTCAATGAACACAGGGTGGTG-446bps-TCgGAG

CATCAaGCTTTTGACACAGTTCgAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACAGTCA-----GGGTGGTG-446bps-TCaGAG
 CATCAaGCTTTTGACACAGTTCgAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACAGTCA-----GGTGGTG-446bps-TCaGAG
 CATCAaGCTTTTGACACAGTTCgAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACAGTCA-----GGGTGGTG-446bps-TCaGAG
 CATCAaGCTTTTGACACAGTTCgAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACAGTCA---ACAGGGTGGTG-446bps-TCaGAG
 CATCAaGCTTTTGACACAGTTCgAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACAGTCA---CAGGGTGGTG-446bps-TCaGAG

CATCAaGCTTTTGACACAGTTCgAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACAGTCA-----AGGGTGGTG-446bps-TCaGAG
 CATCAgGCTTTTGACACAGTTCaAAATATTAATTCGTAATGTGCTGCCACAGTCA---CAGGGTGGTG-446bps-TCgGAG

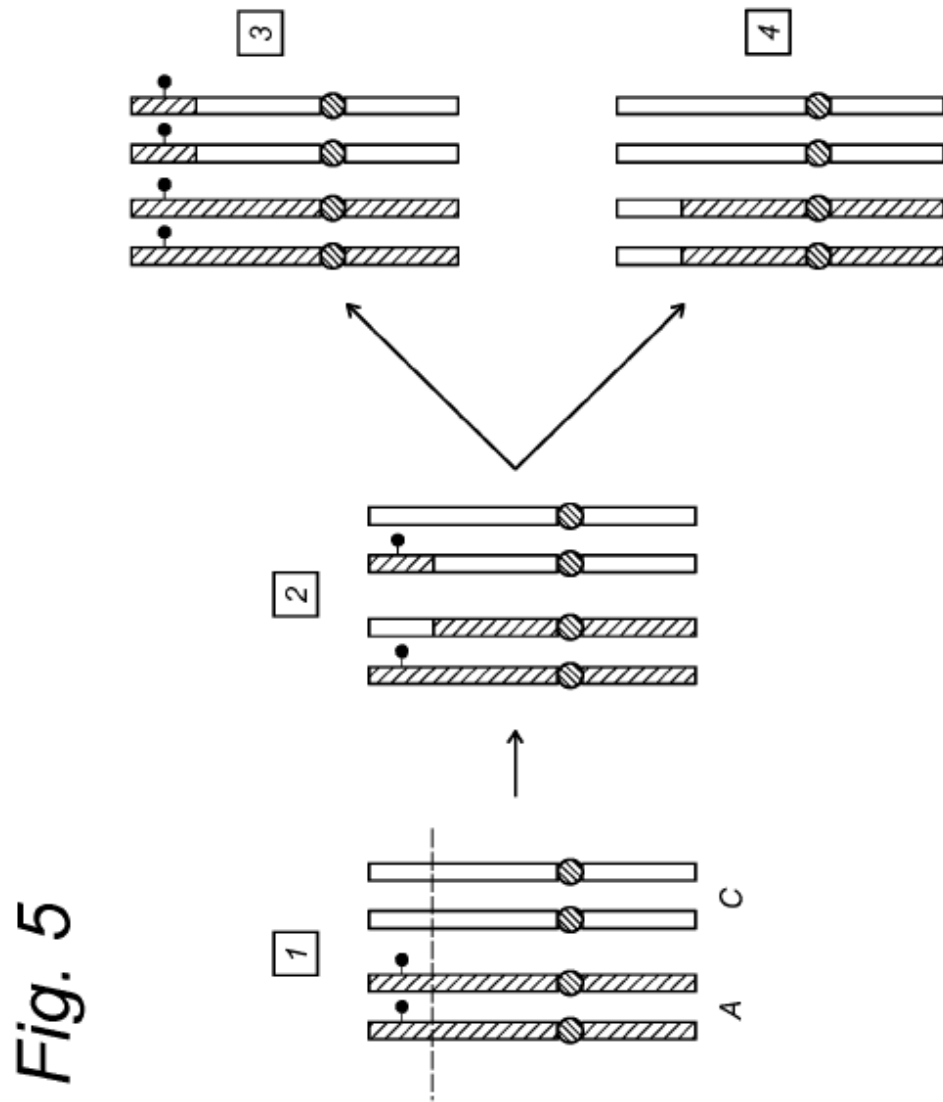


Fig. 5