

REIVINDICACIONES

- 1) Un método para aumentar el rendimiento en plantas de *Cannabis* seleccionadas de un grupo que consiste en *C. sativa*, *C. indica*, y *C. ruderalis*, que comprende las etapas de;
- a) seleccionar un gen implicado en la rutas de floración de dicha especie *Cannabis*;
- b) sintetizar o diseñar un casete de expresión de ARNg que corresponde a un locus de escisión dirigido a lo largo del genoma de *Cannabis* o un complejo de ARNg y una proteína (complejo de proteína Ribonucleoproteína);
- c) transformar dichas células de planta de *Cannabis* para insertar dicho casete de expresión de ARNg o dicho complejo de proteína ribonucleoproteína en las mismas;
- d) cultivar dichas células de planta de *Cannabis*;
- e) seleccionar dichas células de *Cannabis* que expresan mutaciones deseadas en la región objetivo de edición, y
- f) regenerar una planta a partir de dicha célula vegetal, núcleo de célula vegetal, o tejido vegetal.
- 2) El método de la reivindicación 1, en el que el gen implicado en la rutas de floración de dicha especie *Cannabis* se selecciona de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:171, SEQ ID NO:390, SEQ ID NO:727, SEQ ID NO:937, SEQ ID NO:1016, SEQ ID NO:1107 o SEQ ID NO:1336 como se detalla en el archivo titulado "seq.listing 2272-C-01-PCT".
- 3) Los ARNg de la reivindicación 1 y sus correspondientes PAM se seleccionan de un grupo que consiste en las SEQ ID NOS:4 – 170, SEQ ID NOS:174 -389, SEQ ID NOS:393 -726, SEQ ID NOS: 730 -936, SEQ ID NOS: 940 -1015, SEQ ID NOS: 1019 -1106, SEQ ID NOS: 1110 -1335 y SEQ ID NOS: 1339 -1501, como se detalla en el archivo titulado "seq.listing 2272-C-01-PCT".
- 4) El método de la reivindicación 2, en el que la secuencia de dominio objetivo se selecciona del grupo que comprende: (1) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO:1, (2) una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:171, (3) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO:390, (4) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO:727, (5) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO:937, (6) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO:1016, (7) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO:1107, (8) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO:1336, (9) una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con al menos 200 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO:1, (10) una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con al menos 200 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO:171, (11) una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con al menos 200 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO:390, (12) una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con al menos 200 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO:727, (13) una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con al menos 200 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO:937, (14) una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con al menos 200 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO:1016, (15) una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con al menos 200 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO:1107, (16) una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con al menos 200 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO:1336.
- 5) El método de la reivindicación 1, en el que dicha transformación se ejecuta por medios seleccionados de un grupo que consiste en: el método de transformación mediado por *Agrobacterium*, bombardeo de partículas (biolística), inyección, transformación viral, en la transformación de la planta, electroporación, lipofección, sonicación, transferencia de genes mediada por fibra de carburo de silicio, transferencia de genes inducida por microhaz de láser (UV), cocultivo con tejido de explantes y cualquier combinación de los mismos.
- 6) El método de la reivindicación 5, en el que la transformación se lleva a cabo utilizando *Agrobacterium* para suministrar un casete de expresión compuesto por: (a) un marcador de selección; (b) una secuencia de nucleótidos que codifica una o más moléculas de ARNg que comprenden una secuencia de ADN que es complementaria con una secuencia de dominio objetivo seleccionada del grupo de genes que consisten en la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:171, SEQ ID NO:390, SEQ ID NO:727, SEQ ID NO:937, SEQ ID NO:1016, SEQ ID NO:1107 y SEQ ID NO:1336, y (c) una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula Cas de, pero no limitada a *Streptococcus pyogenes* o *Staphylococcus aureus*.
- 7) El método de la reivindicación 6, en el que dicho método comprende administrar una composición de ácido nucleico que comprende: (a) una primera secuencia de nucleótidos que codifica la molécula de ARNg; y (b) una segunda secuencia de nucleótidos que codifica la proteína Cas.
- 8) El método de la reivindicación 5, en el que el sistema CRISPR/Cas se suministra a la célula por un virus de planta.

- 9) El método de la reivindicación 7, en el que la proteína Cas se selecciona de un grupo que comprende pero no se limita a Cpf1, Cas9, Cas12, Cas13, Cas14, CasX o CasY.
- 5 10) El método de la reivindicación 1, en el que aumentar el rendimiento de *Cannabis* comprende las etapas de
 (a) introducir en una planta de *Cannabis* o una célula de la misma (i) al menos una endonucleasa guiada por ARN
 que comprende al menos una señal de localización nuclear o ácido nucleico que codifica al menos una
 endonucleasa guiada por ARN que comprende al menos una señal de localización nuclear, (ii) al menos un ARN o
 10 ADN guía que codifica al menos un ARN guía, y, opcionalmente, (iii) al menos un polinucleótido donante; y
 (b) cultivar la planta de *Cannabis* o una célula de la misma de tal manera que cada ARN guía dirija una
 endonucleasa guiada por ARN hacia un sitio dirigido en la secuencia cromosómica donde la endonucleasa guiada
 por ARN introduce una ruptura de doble hebra en el sitio dirigido, y la ruptura de doble hebra se repara por un
 proceso de reparación de ADN de tal manera que se modifica la secuencia cromosómica, en la que el sitio dirigido
 se ubica en genes seleccionados de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:171, SEQ ID NO:390, SEQ ID NO:727, SEQ ID
 15 NO:937, SEQ ID NO:1016, SEQ ID NO:1107 y SEQ ID NO:1336 y la modificación cromosómica interrumpe o
 interfiere con la transcripción y/o traducción de los genes seleccionados de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:171, SEQ
 ID NO:390, SEQ ID NO:727, SEQ ID NO:937, SEQ ID NO:1016, SEQ ID NO:1107 y SEQ ID NO:1336.
- 11) El método de la reivindicación 10, en el que la endonucleasa guiada por ARN se deriva a partir de un sistema
 20 de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente intercaladas (CRISPR)/CRISPR asociado (Cas).
- 12) El método de la reivindicación 10, en el que la introducción de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:171, SEQ ID
 NO:390, SEQ ID NO:727, SEQ ID NO:937, SEQ ID NO:1016, SEQ ID NO:1107 y SEQ ID NO:1336 no inserta material
 genético exógeno ni produce una planta de *Cannabis* de origen no natural o una célula de la misma.
- 25 13) El método de la reivindicación 1, en el que aumentar el rendimiento de *Cannabis* comprende;
 (a) identificar al menos un locus dentro de una secuencia de ADN en una planta de *Cannabis* o una célula de la
 misma para la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:171, SEQ ID NO:390, SEQ ID NO:727, SEQ ID NO:937, SEQ ID
 NO:1016, SEQ ID NO:1107 y SEQ ID NO:1336;
 30 (b) identificar al menos una secuencia de reconocimiento de endonucleasas personalizada dentro de al menos un
 locus de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:171, SEQ ID NO:390, SEQ ID NO:727, SEQ ID NO:937, SEQ ID NO:1016,
 SEQ ID NO:1107 y SEQ ID NO:1336;
 (c) introducir en la planta de *Cannabis* o una célula de la misma al menos una primera endonucleasa
 personalizada, en la que la planta de *Cannabis* o una célula de la misma comprende la secuencia de
 35 reconocimiento para la endonucleasa personalizada en o próximo a los loci de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:171,
 SEQ ID NO:390, SEQ ID NO:727, SEQ ID NO:937, SEQ ID NO:1016, SEQ ID NO:1107 y SEQ ID NO:1336, y la
 endonucleasa personalizada se expresa de forma transitoria o estable;
 (d) ensayar la planta de *Cannabis* o una célula de la misma para una modificación mediada por endonucleasa
 personalizada en el ADN que constituye o flanquea los loci de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:171, SEQ ID NO:390,
 40 SEQ ID NO:727, SEQ ID NO:937, SEQ ID NO:1016, SEQ ID NO:1107 y SEQ ID NO:1336, (e) identificar la planta
 de *Cannabis*, una célula de la misma, o una progenie de la misma que comprende una modificación en los loci de
 la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:171, SEQ ID NO:390, SEQ ID NO:727, SEQ ID NO:937, SEQ ID NO:1016, SEQ ID
 NO:1107 y SEQ ID NO:1336.
- 45 14) El método de la reivindicación 13, en el que aumentar dicho rendimiento de *Cannabis* se selecciona de un
 grupo que consiste en: aumentar el número de flores, aumentar el tamaño de las flores, aumentar el peso de las flores,
 aumentar el número de brotes, aumentar el tamaño de los brotes, aumentar el peso de los brotes y cualquier
 combinación de los mismos.
- 50 15) Un método para aumentar el rendimiento en plantas de *Cannabis* seleccionadas de un grupo que consiste en
C. sativa, *C. indica*, y *C. ruderalis*, que comprende las etapas de;
 a) seleccionar un gen implicado en la rutas de floración de dicha especie *Cannabis*;
 b) obtener células de dichas plantas de *Cannabis*;
 c) editar dichos genes implicados en la rutas de floración de dichas células;
 55 d) cultivar dichas células;
 e) seleccionar dichas células que expresan mutaciones deseadas en la región objetivo de edición, y
 f) regenerar una planta de *Cannabis* de dicha célula, núcleo de célula vegetal, o tejido vegetal.
- 16) El método de la reivindicación 15, en el que dicha edición se ejecuta por medios seleccionados de un grupo
 que consiste en: CRISPR/Cas, escindir el genoma de dicha célula utilizando nucleasas de dedos de zinc, escindir el
 60 genoma de dicha célula utilizando meganucleasas (endonucleasas autodirigidas), escindir el genoma de dicha célula
 utilizando nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN), y cualquier combinación de los mismos.
- 17) El método de la reivindicación 15, en el que aumentar dicho rendimiento de *Cannabis* se selecciona de un
 grupo que consiste en: aumentar el número de flores, aumentar el tamaño de las flores, aumentar el peso de las flores,
- 65

aumentar el número de brotes, aumentar el tamaño de los brotes, aumentar el peso de los brotes y cualquier combinación de los mismos.

5

- 18) Una planta de *Cannabis* producida de acuerdo con una de cualquiera las reivindicaciones 1 y 15.
- 19) Una semilla de la planta de *Cannabis* de la reivindicación 18.