

REIVINDICACIONES

1. Una célula vegetal caracterizada porque comprende un sistema de edición de bases que comprende:
 - (a) una proteína efectora asociada a CRISPR;
 - (b) una citidina desaminasa o adenosina desaminasa; y
 - (c) un ácido nucleico guía (ARNg) que tiene una secuencia espaciadora con complementariedad a un gen objetivo endógeno que codifica un factor de transcripción de caja MADS clado AG.
2. La célula vegetal de la reivindicación 1, caracterizada porque el factor de transcripción de caja MADS clado AG es AGAMOUS (AG), SHATTERPROOF 1 (SHP1), SHATTERPROOF 2 (SHP2), y/o SEEDSTICK (STK).
3. La célula vegetal de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizada porque el gen endógeno que codifica un factor de transcripción de caja MADS clado AG es un gen endógeno SEEDSTICK (STK).
4. La célula vegetal de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, caracterizada porque el gen objetivo endógeno (a) codifica un factor de transcripción de caja MADS clado AG que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 13, 29, 53, 66, 78, 97, 128, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164 o 166–171** o comprende una región que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 177–183, 187, 188, o 189**, o (b) es codificado por una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 153, 155, 157, 159, 161, 163, o 165** o es codificado por una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 172–174**.

5. La célula vegetal de cualquiera de las reivindicaciones 1–4, caracterizada porque el ARNg comprende una secuencia espaciadora que tiene por lo menos 80% de identidad con cualquiera de **SEQ ID NOs: 175, 176, 184, 185, o 186**.

6. Un método para editar un sitio específico en el genoma de una célula vegetal, caracterizado porque el método comprende: escindir, de una manera específica de sitio, un sitio objetivo dentro de un gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG endógeno en una célula vegetal, donde el gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG endógeno es un gen SEEDSTICK (STK) (a) que comprende por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 153, 155, 157, 159, 161, 163, o 165**, o una región que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 172–174**; o (b) que codifica un factor de transcripción de caja MADS clado AG que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 13, 29, 53, 66, 78, 97, 128, 150, 152, 154, 156, 158, 159, 160, 162, 164 o 166–171** o comprende una región que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 177–183, 187, 188, o 189**, de modo de generar una edición en el gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG endógeno de la célula vegetal.

7. El método de la reivindicación 6, caracterizado porque además comprende regenerar una planta a partir de la célula vegetal que comprende una edición en el gen STK endógeno a fin de producir una planta que comprende la edición en su gen STK endógeno.

8. El método de la reivindicación 7, caracterizado porque la edición produce una mutación no natural.

9. El método de la reivindicación 7 o reivindicación 8, caracterizado porque la planta que comprende la edición en su gen STK endógeno exhibe desarrollo de fruto alterado.
10. El método de la reivindicación 9, caracterizado porque el desarrollo de fruto alterado es un fenotipo sin semillas y/o de reducida simiente.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8-10, caracterizado porque la mutación es un alelo dominante–negativo, alelo semidominante, alelo de pérdida de función débil, o una mutación hipomórfica.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8–11, caracterizado porque la mutación es una delección.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8–12, caracterizado porque la mutación es una delección de por lo menos 4 pares de bases consecutivos a alrededor de 150 pares de bases consecutivos, desde el extremo 3' del gen STK.
15. El método de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, caracterizado porque la delección produce un truncamiento C–terminal que comprende un truncamiento de por lo menos 1 residuo de aminoácido a alrededor de 50 residuos de aminoácidos consecutivos.
15. Un método para producir una planta caracterizado porque comprende:
- (a) poner en contacto una población de células vegetales que comprenden una secuencia de ADN que codifica un gen SEEDSTICK (STK) endógeno de tipo salvaje con una nucleasa unida a un dominio de unión de ácido nucleico (por ejemplo, sistema de edición) que se une a una secuencia: (a) que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 153, 155, 157, 159, 161, 163, o 165**, o que comprende una región que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las

secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 172–174**; o (b) que codifica un factor de transcripción SEEDSTICK (STK) (i) que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos **SEQ ID NOs: 13, 29, 53, 66, 78, 97, 128, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164**, o **166–171** o (ii) que comprende una región que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 177–183, 187, 188**, o **189**;

(b) seleccionar una célula vegetal de dicha población en donde por lo menos una secuencia de ADN que codifica el factor de transcripción STK se ha mutado, en donde la mutación comprende una sustitución de por lo menos un nucleótido en la por lo menos una secuencia de ADN; y

(c) cultivar la célula vegetal seleccionada hasta una planta.

16. Un método para producir una planta o parte de la misma que comprende por lo menos una célula en la que un gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG endógeno está mutado, caracterizado porque el método comprende

poner en contacto un sitio objetivo en el gen del factor de transcripción de caja MADS clado AG en la planta o parte de planta con una nucleasa unida a un dominio de unión de ácido nucleico (por ejemplo, sistema de edición) que se une al sitio objetivo, en donde el gen del factor de transcripción de caja MADS clado AG es un gen SEEDSTICK (STK) (a) que comprende una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 153, 155, 157, 159, 161, 163**, o **165** o comprende una región que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 172–174**, o (b) que codifica un factor de transcripción SEEDSTICK (STK) que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 13, 29, 53, 66, 78, 97, 128, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164**, o **166–171**, o que comprende una región que tiene por lo menos 80% de identidad con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 177–183, 187, 188**, o **189**, de modo de producir una planta o parte de la misma que comprende por lo menos una célula

que tiene una mutación en el gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG endógeno.

17. Un método para producir una planta que tiene un fenotipo de desarrollo de fruto alterado, caracterizado porque comprende

(a) poner en contacto una célula vegetal que comprende un gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG endógeno de tipo salvaje con una nucleasa que se dirige al gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG endógeno de tipo salvaje, en donde la nucleasa se une a un dominio de unión de ADN que se une a un sitio objetivo en el gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG endógeno de tipo salvaje,

en donde el gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG endógeno de tipo salvaje es un gen SEEDSTICK (STK) que

(i) comprende una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 153, 155, 157, 159, 161, 163, o 165** o comprende una región que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 172–174** y/o (ii) codifica una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 13, 29, 53, 66, 78, 97, 128, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, o 166–171**, o una secuencia que comprende una región que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 177–183, 187, 188, o 189**; y

(b) cultivar la célula vegetal hasta una planta, de manera de producir una planta que tiene un fenotipo de fruto alterado.

18. Un método para producir una planta o parte de la misma que comprende por lo menos una célula que tiene un gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG endógeno mutado, caracterizado porque el método comprende

poner en contacto un sitio objetivo en un gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG endógeno en la planta o parte de planta con una nucleasa que comprende un dominio de escisión y un dominio de unión de ADN, en donde el dominio de unión de ADN se une a un sitio objetivo en el gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG endógeno,

en donde el gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG endógeno es un gen SEEDSTICK (STK) que (a) codifica (i) una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 13, 29, 53, 66, 78, 97, 128, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, o 166–171** o (ii) una secuencia que comprende una región que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 177–183, 187, 188, o 189**; y/o (b) comprende una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de **SEQ ID NOs: 153, 155, 157, 159, 161, 163, o 165** o una región que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 172–174**, de modo de producir la planta o parte de la misma que comprende por lo menos una célula que tiene un gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG endógeno mutado.

19. Un método de producción de una planta o parte de la misma que comprende un gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG endógeno mutado y que tiene desarrollo de fruto alterado, caracterizado porque el método comprende

poner en contacto un sitio objetivo en un gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG endógeno con una nucleasa que comprende un dominio de escisión y un dominio de unión de ADN (por ejemplo, sistema de edición) que comprende un dominio de unión de ácido nucleico que se une al sitio objetivo en el gen del factor de transcripción de caja MADS clado AG, en donde el gen del factor de transcripción de caja MADS clado AG es un gen SEEDSTICK (STK) (a) que comprende una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 153, 155, 157, 159, 161, 163, o 165** o comprende una región que tiene por lo menos 80% de

identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 172–174**, o (b) que codifica un factor de transcripción SEEDSTICK (STK) que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 13, 29, 53, 66, 78, 97, 128, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, o 166–171**, o que comprende una región que tiene por lo menos 80% de identidad con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 177–183, 187, 188, o 189**, de modo de producir una planta o parte de la misma que comprende un gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG endógeno mutado y que tiene desarrollo de fruto alterado.

20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 15-19, caracterizado porque la nucleasa escinde el gen STK endógeno, y se introduce una mutación en el gen STK endógeno.

21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 15-20, caracterizado porque la mutación es una mutación no natural.

22. El método de la reivindicación 20 o reivindicación 21, caracterizado porque la mutación es un alelo dominante–negativo, alelo semidominante, alelo de pérdida de función débil, o una mutación hipomórfica.

23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 20-22, caracterizado porque la mutación es una sustitución, una inserción y/o una delección.

24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 20–23, caracterizado porque la mutación es una delección.

25. El método de la reivindicación 24, caracterizado porque la delección es una delección en marco o una delección fuera de marco.

26. El método de la reivindicación 24 o reivindicación 25, caracterizado porque la delección es un truncamiento C-terminal que comprende un truncamiento de por lo menos 1 residuo de aminoácido a alrededor de 50 residuos de aminoácidos consecutivos desde el extremo C-terminal de un polipéptido codificado por el gen STK.
27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 24-26, caracterizado porque la mutación es una delección de por lo menos 4 pares de bases consecutivos a alrededor de 150 pares de bases consecutivos desde el extremo 3' del gen STK.
28. El método de cualquiera de las reivindicaciones 66-73, caracterizado porque la mutación produce un fenotipo de desarrollo de fruto alterado.
29. El método de la reivindicación 28, caracterizado porque el desarrollo de fruto alterado produce la falta de semillas o la reducida simiente.
30. El método de cualquiera de las reivindicaciones 15-29, caracterizado porque la nucleasa es una nucleasa de dedo de zinc, una nucleasa efectora de tipo activador de transcripción (TALEN), una endonucleasa (por ejemplo, Fok1) o una proteína efectora CRISPR-Cas.
31. El método de cualquiera de las reivindicaciones 15-30, caracterizado porque el dominio de unión de ADN es un dedo de zinc, un dominio de unión de ADN de tipo activador de la transcripción (TAL), una argonauta o un dominio de unión de ADN efector CRISPR-Cas.
32. Un ácido nucleico guía (por ejemplo, ARNg, ADNg, ARNcr, ADNcr) que se une a un sitio objetivo en un gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG, caracterizado porque el gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG endógeno es un gen SEEDSTICK (STK)

(a) que comprende una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 153, 155, 157, 159, 161, 163, o 165** o comprende una región que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 172–174, o**

(b) que codifica un factor de transcripción SEEDSTICK (STK) que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 13, 29, 53, 66, 78, 97, 128, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, o 166–171, o** una región que tiene por lo menos 80% de identidad con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 177–183, 187, 188, o 189.**

33. El ácido nucleico guía de la reivindicación 32, caracterizado porque el ácido nucleico guía comprende un espaciador que tiene la secuencia de nucleótidos de cualquiera de **SEQ ID NOs: 175, 176, 184, 184, o 186.**

34. Un sistema caracterizado porque comprende el ácido nucleico guía de la reivindicación 32 o la reivindicación 33 y una proteína efectora CRISPR–Cas que se asocia con el ácido nucleico guía.

35. El sistema de la reivindicación 34, caracterizado porque además comprende un ácido nucleico tracr que se asocia con el ácido nucleico guía y una proteína efectora CRISPR–Cas, opcionalmente en donde el ácido nucleico tracr y el ácido nucleico guía están unidos covalentemente.

36. Un sistema de edición génica caracterizado porque comprende una proteína efectora CRISPR–Cas asociada con un ácido nucleico guía, en donde el ácido nucleico guía comprende una secuencia espaciadora que se une a un gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG.

37. El sistema de edición génica de la reivindicación 36, caracterizado porque el gen del factor de transcripción de caja MADS clado AG es un gen SEEDSTICK (STK) (a) que comprende por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de **SEQ ID NOs: 153, 155, 157, 159, 161, 163, o 165** o comprende una región que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 172–174**, y/o

(b) que codifica (i) una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 13, 29, 53, 66, 78, 97, 128, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, o 166–171**, o (ii) una secuencia que comprende una región que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 177–183, 187, 188, o 189**.

38. El sistema de edición génica de la reivindicación 36 o la reivindicación 37, caracterizado porque el ácido nucleico guía comprende una secuencia espaciadora que tiene la secuencia de nucleótidos de cualquiera de **SEQ ID NOs: 175, 176, 184, 185, o 186**.

39. El sistema de edición génica de cualquiera de las reivindicaciones 36–38, caracterizado porque además comprende un ácido nucleico tracr que se asocia con el ácido nucleico guía y una proteína efectora CRISPR–Cas, opcionalmente en donde el ácido nucleico tracr y el ácido nucleico guía están unidos covalentemente.

40. Un complejo caracterizado porque comprende una proteína efectora CRISPR–Cas que comprende un dominio de escisión y un ácido nucleico guía, en donde el ácido nucleico guía se une a un sitio objetivo en un gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG, en donde el gen del factor de transcripción de caja MADS clado AG es un gen SEEDSTICK (STK)

(a) que comprende por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de **SEQ ID NOs: 153, 155, 157, 159, 161,**

163, o **165** o comprende una región que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 172–174**, y/o

(b) que codifica (i) una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 13, 29, 53, 66, 78, 97, 128 o 150**, o (ii) una secuencia que comprende una región que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 13, 29, 53, 66, 78, 97, 128, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, o 166–171**, o una región que tiene por lo menos 80% de identidad con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 177–183, 187, 188, o 189**, en donde el dominio de escisión escinde una hebra objetivo en el gen del factor de transcripción de caja MADS clado AG.

41. Un casete de expresión caracterizado porque comprende (a) un polinucleótido que codifica proteína efectora CRISPR–Cas que comprende un dominio de escisión y (b) un ácido nucleico guía que se une a un sitio objetivo en un gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG, en donde el gen de factor de transcripción de caja MADS clado AG es un gen SEEDSTICK, y el ácido nucleico guía comprende una secuencia espaciadora que es complementaria y se une a una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con por lo menos una porción de una secuencia que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de **SEQ ID NOs: 153, 155, 157, 159, 161, 163, o 165** o una porción de una secuencia que comprende una región que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 172–174**; o una secuencia que codifica (i) un polipéptido que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 13, 29, 53, 66, 78, 97, 128, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, o 166–171**, o (ii) un polipéptido que comprende una región que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 177–183, 187, 188**,

o **189**, opcionalmente, en donde una porción es de alrededor de 2 a alrededor de 22 nucleótidos consecutivos de longitud.

42. Un ácido nucleico caracterizado porque codifica un alelo dominante–negativo, alelo semidominante, alelo de pérdida de función débil, o una mutación hipomórfica de un factor de transcripción de caja MADS clado AG.

43. El ácido nucleico de la reivindicación 42, caracterizado porque el factor de transcripción de caja MADS clado AG es AGAMOUS (AG), SHATTERPROOF 1 (SHP1), SHATTERPROOF 2 (SHP2), y/o SEEDSTICK (STK).

44. El ácido nucleico de la reivindicación 42 o la reivindicación 43, caracterizado porque el gen endógeno que codifica un factor de transcripción de caja MADS clado AG es un gen endógeno SEEDSTICK (STK).