

**PLANTAS DE FRAMBUESA NEGRA DE FLORACIÓN TEMPRANA**  
**CON CARACTERÍSTICAS MEJORADAS**

**DECLARACIÓN SOBRE LA PRESENTACIÓN ELECTRÓNICA DE UN**  
**LISTADO DE SECUENCIAS**

Un listado de secuencias en formato XML, titulado 1499–141\_ST26.xml, de 215.627 bytes de tamaño, generado el 10 de septiembre de 2024 y presentado junto con la presente solicitud, se incorpora por referencia a la memoria descriptiva para sus divulgaciones.

**DECLARACIÓN DE PRIORIDAD**

Esta solicitud reivindica el beneficio, en virtud del Título 35 U. S. C. § 119 (e), de la Solicitud Provisional de EE. UU. Nro. 63/584.339, presentada el 21 de septiembre de 2023, cuyo contenido completo se incorpora por referencia en la presente solicitud.

**CAMPO DE LA INVENCION**

Esta invención se refiere a composiciones y métodos para modificar genes *TFL1* en plantas de frambuesa negra, a fin de eliminar o reducir la dependencia de desencadenantes ambientales para la floración, producir opcionalmente plantas que tienen características mejoradas para la mejora y la producción, lo que opcionalmente incluye un tiempo reducido para el inicio de la floración, una duración más prolongada de la floración y/o características de rendimiento mejoradas. La invención se refiere además a plantas de frambuesa negra producidas usando los métodos y las composiciones de la invención.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La ganancia genética a través de la mejora en plantas está limitada por los controles ambientales que se requieren para desencadenar la floración y una fase juvenil larga, a menudo, de varios años de duración. Las variantes naturales en los genes del tiempo de floración han reducido la dependencia ambiental para la floración, así como también han alterado la arquitectura de la planta y mejorado el hábito de crecimiento determinado para generar variantes que son más propicias para la producción de plantas. Sin embargo, dicha variación natural es relativamente poco frecuente, y ha ocurrido solo en algunas especies de plantas.

La presente invención supera estas deficiencias para las plantas de frambuesa negra, al proporcionar métodos para modificar el tiempo de floración en las plantas de frambuesa negra.

5

## SÍNTESIS DE LA INVENCION

Un aspecto de la invención proporciona una planta de frambuesa negra o parte de ella que comprende por lo menos una (por ejemplo, una o más) mutación en un gen endógeno *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* (por ejemplo, uno o más genes *TFL1*) que codifica un polipéptido TFL1, opcionalmente, donde la por lo menos una mutación puede ser una mutación no natural.

10

Un segundo aspecto de la invención proporciona una célula vegetal de frambuesa negra, que comprende un sistema de edición que comprende: (a) una proteína efectora CRISPR–Cas; y (b) un ácido nucleico guía (p. ej., ARNg, ADNg, ARNcr, ADNcr, ARNsg, ADNsg) que tiene una secuencia espaciadora con complementariedad a (una porción de) un gen objetivo endógeno que codifica una proteína TFL1 en la célula vegetal de frambuesa negra.

15

Un tercer aspecto de la invención proporciona una célula vegetal de frambuesa negra que comprende por lo menos una mutación dentro de un gen *TFL1* endógeno, donde la por lo menos una mutación es una sustitución de base, inserción de base o una delección de base que se introduce usando un sistema de edición que comprende un dominio de unión de ácido nucleico que se une a un sitio objetivo en el gen *TFL1* endógeno, de manera opcional, donde la por lo menos una mutación puede ser una mutación no natural.

20

Un cuarto aspecto de la invención proporciona un método para producir/mejorar una planta de frambuesa negra editada libre de transgenes, que comprende: cruzar la planta de frambuesa negra de la invención con una planta de frambuesa negra libre de transgenes, de modo de introducir así la por lo menos mutación en la planta de frambuesa negra que está libre de transgenes; y seleccionar una planta de frambuesa negra de progenie que comprende la por lo menos una mutación y está libre de transgenes, a fin de producir así una planta de frambuesa negra editada libre de transgenes.

25

En un quinto aspecto, se proporciona un método para proporcionar una pluralidad de plantas de frambuesa negra que tiene un tiempo reducido hasta la floración (menos tiempo para el inicio de la floración), una mayor duración de la floración, y/o una o más características de rendimiento mejoradas, donde el método comprende plantar dos o más plantas de frambuesa negra de la invención en un área de cultivo, a fin de proporcionar una

30

pluralidad de plantas de frambuesa negra que tiene tiempo reducido hasta la floración (menos tiempo para el inicio de la floración), mayor duración de la floración, y/o una o más características de rendimiento mejoradas en comparación con una pluralidad de plantas de frambuesa negra de control que no comprenden la mutación.

5           Un sexto aspecto de la invención proporciona un método para producir una planta de frambuesa negra, que comprende: (a) poner en contacto una población de células vegetales de frambuesa negra que comprenden por lo menos un gen *TFL1* endógeno con una nucleasa unida a un dominio de unión de ácido nucleico (p. ej., un sistema de edición) que se une a un sitio objetivo en el por lo menos un gen *TFL1* endógeno, donde el por lo menos un gen *TFL1*  
10           endógeno: (i) comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, y/o SEQ ID NO: 80**; (ii) comprende una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 72–74 y/o SEQ ID NOs: 83–95**, (iii) codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80 % de  
15           identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NOs: 71**, y/o (iv) codifica una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 75**; (b) seleccionar una célula vegetal de frambuesa negra de dicha población, que comprende una mutación en el por lo menos un gen *TFL1* endógeno, de manera opcional, donde la mutación puede ser una mutación no natural; y (c) cultivar la  
20           célula vegetal de frambuesa negra seleccionada hasta una planta de frambuesa negra.

          Un séptimo aspecto de la invención proporciona un método para reducir el tiempo hasta la floración en una planta de frambuesa negra o parte de ella, que comprende (a) poner en contacto una célula vegetal de frambuesa negra que comprende un gen *TFL1* endógeno, con una nucleasa que se dirige al gen *TFL1* endógeno, donde la nucleasa está unida a un  
25           dominio de unión de ácido nucleico que se une a un sitio objetivo en el gen *TFL1* endógeno, donde el gen *TFL1* endógeno: (i) comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, y/o SEQ ID NO: 80**, (ii) comprende una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 72–74 y/o SEQ ID NOs: 83–95**, (iii) codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos  
30           80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 71**, y/o (iv) codifica una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 75**; y (b) cultivar la célula vegetal de frambuesa negra hasta una planta de frambuesa negra que comprende una mutación en el gen *TFL1* endógeno, de

manera opcional, donde la mutación puede ser una mutación no natural, a fin de reducir así el tiempo hasta la floración en una planta de frambuesa negra o parte de ella.

Un octavo aspecto proporciona un método para producir una planta de frambuesa negra o parte de ella que comprende por lo menos una célula que tiene un gen *TFL1*

- 5 endógeno mutado, donde el método comprende poner en contacto un sitio objetivo en un gen *TFL1* endógeno en la planta de frambuesa negra o parte de ella, con una nucleasa que comprende un dominio de escisión y un dominio de unión de ADN, donde el dominio de unión de ácido nucleico se une a un sitio objetivo en el gen *TFL1* endógeno, donde el gen *TFL1* endógeno (a) comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80 % de  
10 identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, y/o SEQ ID NO: 80**, (b) comprende una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 72–74 y/o SEQ ID NOs: 83–95**, (c) codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 71**, y/o (d) codifica una región que tiene  
15 por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 75**, a fin de producir así la planta de frambuesa negra o parte de ella que comprende por lo menos una célula que tiene un gen *TFL1* endógeno con una mutación.

Un noveno aspecto proporciona un método para producir una planta de frambuesa negra o parte de ella que comprende un gen *TFL1* endógeno mutado y exhibe tiempo

- 20 reducido hasta la floración, una mayor duración de la floración, una o más características de rendimiento mejoradas y/o un patrón de crecimiento de planta más determinado, donde el método comprende poner en contacto un sitio objetivo en un gen *TFL1* endógeno en la planta de frambuesa negra o parte de ella con una nucleasa que comprende un dominio de escisión y un dominio de unión de ADN, donde el dominio de unión de ácido nucleico se une a un sitio  
25 objetivo en el gen *TFL1* endógeno, donde el gen *TFL1* endógeno: (a) comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de **SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, y/o SEQ ID NO: 80**, (b) comprende una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 72–74 y/o SEQ ID NOs: 83–95**, (c) codifica  
30 una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 71**, y/o (d) codifica una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NO: 75**, a fin de producir así la planta de frambuesa negra o parte de ella que comprende un gen *TFL1* endógeno que tiene una mutación y tiempo reducido hasta la floración, mayor duración de la

floración, una o más características de rendimiento mejoradas y/o un patrón de crecimiento de planta más determinado.

Un décimo aspecto proporciona un ácido nucleico guía que se une a un sitio objetivo en un gen *TFL1*, donde el sitio objetivo es en una región del gen *TFL1* que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de **SEQ ID NOs: 72–74** y/o **SEQ ID NOs: 83–95**.

Un décimo primer aspecto de la invención proporciona un gen *TFL1* endógeno mutado, donde el gen *TFL1* endógeno mutado comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de **SEQ ID NO: 77**, **SEQ ID NO: 78** y/o **SEQ ID NOs: 96–99**, y/o codifica un polipéptido *TFL1* mutado que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 79** y/o **SEQ ID NO: 100**, de manera opcional, donde el gen *TFL1* endógeno mutado comprende una mutación no natural, de manera opcional, donde el gen *TFL1* endógeno mutado comprende una mutación no natural.

En un décimo segundo aspecto, se proporciona una proteína *TFL1* mutada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 79** y/o **SEQ ID NO: 100**, de manera opcional, donde la proteína *TFL1* mutada comprende una mutación no natural.

Además se proporciona una planta de frambuesa negra o parte de ella que comprende un gen *TFL1* endógeno mutado como se describe en este documento y/o un polipéptido *TFL1* mutado como se describe en este documento.

Asimismo, se proporcionan plantas de frambuesa negra que comprenden en su genoma uno o más genes *TFL1* mutados y exhiben un tiempo reducido hasta la floración, una mayor duración de la floración, una o más características de rendimiento mejoradas y/o un patrón de crecimiento de planta más determinado, donde dichas plantas de frambuesa negra son producidas por los métodos que se describen en el presente documento, así como polipéptidos, polinucleótidos, construcciones de ácido nucleico, casetes de expresión y vectores para producir una planta de frambuesa negra de esta invención.

Estos y otros aspectos de la invención se exponen en más detalle en la descripción de la invención a continuación.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NOs: 1–17 son secuencias de aminoácidos Cas12a ejemplares útiles con esta invención.

SEQ ID NOs: 18–20 son secuencias de nucleótidos Cas12a ejemplares útiles con esta invención.

SEQ ID NOs: 21–22 son secuencias reguladoras ejemplares que codifican un promotor y un intrón.

5 SEQ ID NOs: 23–29 son secuencias ejemplares de citosina desaminasa útiles con esta invención.

SEQ ID NOs: 30–40 son secuencias de aminoácidos de adenina desaminasa ejemplares útiles con esta invención.

10 SEQ ID NO: 41 es una secuencia de inhibidor de uracilo–ADN glicosilasa (UGI) ejemplar útil con esta invención.

SEQ ID NOs: 42–44 proporcionan etiquetas peptídicas ejemplares y polipéptidos de afinidad útiles con esta invención.

Las SEQ ID NO: 45–55 proporcionan motivos de reclutamiento de ARN de ejemplo y polipéptidos de afinidad correspondientes útiles con esta invención.

15 Las SEQ ID NO: 56–57 son secuencias de polipéptidos Cas9 de ejemplo útiles con esta invención.

Las SEQ ID NO: 58–68 son secuencias de polinucleótidos Cas9 ejemplares útiles con esta invención.

20 Las SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 80 son secuencias genómicas de *TFL1* de frambuesa negra ejemplares útiles con esta invención.

La SEQ ID NO: 70 es un ADNc de *TFL1* ejemplar útil con esta invención.

La SEQ ID NO: 71 es una secuencia de polipéptido TFL1 ejemplar útil con esta invención.

25 Las SEQ ID NO: 72–74 y las SEQ ID NO: 83–95 son porciones o regiones ejemplares de la secuencia genómica de *TFL1* de las SEQ ID NO: 69 y SEQ ID NO: 80 útiles con esta invención.

SEQ ID NO: 75 es una porción o región ejemplar de la SEQ ID NO: 71 de polipéptido TFL1 útil con esta invención.

30 SEQ ID NOs: 76, 81 y 82 son secuencias espaciadoras ejemplares para guías CRISPR–Cas (Cas12) útiles con esta invención.

SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NOs: 96–99 son genes *TFL1* mutados ejemplares.

SEQ ID NO: 78 es la secuencia codificante para el gen *TFL1* mutado de SEQ ID NO: 77.

SEQ ID NO: 79 es la secuencia de proteína TFL1 mutada codificada por SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NOs: 96–98.

SEQ ID NO: 100 es la secuencia de proteína TFL1 mutada codificada por SEQ ID NO: 99.

5 SEQ ID NO: 101 es la porción de 11 nucleótidos consecutivos delecionados de SEQ ID NO: 80 para generar la secuencia de ácido nucleico mutada SEQ ID NO: 99.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

10 La presente invención se describirá ahora a continuación con referencia a los dibujos y ejemplos adjuntos, en los que se muestran formas de realización de la invención. Esta descripción no pretende ser un catálogo detallado de todas las diferentes formas en que se puede implementar la invención, ni de todas las características que se pueden agregar a la presente invención. Por ejemplo, las características ilustradas con respecto a una forma de realización pueden incorporarse a otras formas de realización, y las características ilustradas  
15 con respecto a una forma de realización particular pueden eliminarse de esa forma de realización. Por lo tanto, la invención contempla que en algunas formas de realización de la invención, cualquier característica o combinación de características establecidas en el presente documento puede excluirse u omitirse. Además, a la luz de la presente divulgación, resultarán evidentes para los expertos en la técnica numerosas variaciones y adiciones a las  
20 diversas formas de realización sugeridas en el presente documento, que no se apartan de la presente invención. En consecuencia, las siguientes descripciones pretenden ilustrar algunas formas de realización particulares de la invención, y no especificar exhaustivamente todas las permutaciones, combinaciones y variaciones de las mismas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos  
25 utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. La terminología utilizada en la descripción de la invención en el presente documento tiene el propósito de describir formas de realización particulares únicamente y no pretende ser limitante de la invención.

Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias citadas en  
30 el presente documento se incorporan como referencia en su totalidad para las enseñanzas pertinentes a la oración y/o el párrafo en el que se presenta la referencia.

A menos que el contexto indique lo contrario, se pretende específicamente que las diversas características de la invención descriptas en el presente documento puedan usarse en cualquier combinación. Además, la presente invención también contempla que en algunas

formas de realización de la invención, cualquier característica o combinación de características establecidas en el presente documento puede excluirse u omitirse. Para ilustrar, si la memoria descriptiva establece que una composición comprende los componentes A, B y C, se pretende específicamente que cualquiera de A, B o C, o una combinación de los mismos, pueda omitirse y descartarse individualmente o en cualquier combinación.

Tal como se utilizan en la descripción de la invención y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" pretenden incluir también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

También como se utiliza en este documento, "y/o" se refiere y abarca todas y cada una de las combinaciones posibles de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como la falta de combinaciones, cuando se interpreta en la forma alternativa ("o").

El término "alrededor de", tal como se utiliza en el presente documento cuando se hace referencia a un valor medible tal como una cantidad o concentración y similares, pretende abarcar variaciones de  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 1\%$ ,  $\pm 0,5\%$ , o incluso  $\pm 0,1\%$  del valor especificado, así como el valor especificado. Por ejemplo, "alrededor de X", donde X es el valor medible, pretende incluir X así como variaciones de  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 1\%$ ,  $\pm 0,5\%$  o incluso  $\pm 0,1\%$  de X. Un rango proporcionado en este documento para un valor medible puede incluir cualquier otro rango y/o valor individual dentro del mismo.

Tal como se usan en este documento, frases como "entre X e Y" y "entre alrededor de X e Y" deben interpretarse para incluir X e Y. Como se usan en este documento, frases como "entre alrededor de X e Y" significan "entre alrededor de X y alrededor de Y", y frases tales como "de alrededor de X a Y" significan "de alrededor de X a alrededor de Y".

La enumeración de rangos de valores en este documento simplemente pretende servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del rango, a menos que se indique lo contrario en este documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se enumerara individualmente en este documento. Por ejemplo, si se divulga el rango de 10 a 15, entonces también se divulgan 11, 12, 13 y 14.

Los términos "comprende" y "que comprende", como se usan en el presente documento, especifican la presencia de las características, números enteros, pasos, operaciones, elementos y/o componentes indicados, pero no excluyen la presencia o adición de una o más otras características, números enteros, pasos, operaciones, elementos, componentes y/o grupos de los mismos.

Tal como se utiliza en este documento, la frase transitoria "que consiste esencialmente en" significa que el alcance de una reivindicación debe interpretarse para abarcar los materiales o pasos especificados enumerados en la reivindicación y aquellos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la invención reivindicada. Por lo tanto, no se pretende que el término "que consiste esencialmente en" cuando se utiliza en una reivindicación de esta invención sea interpretado como equivalente de "que comprende".

Como se usan en el presente documento, los términos "aumento", "aumentar", "aumentado", "mejorar", "mejorado", "mejora" y "mayor" (y variaciones gramaticales de los mismos) describen una elevación de por lo menos alrededor de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más en comparación con un control.

Como se usan en el presente documento, los términos "reducir", "reducido", "reducción", "menor", "disminuir" y "disminuido" (y variaciones gramaticales de los mismos), describen, por ejemplo, una disminución de por lo menos alrededor del 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 35 %, 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, o 100 % en comparación con un control. En formas de realización particulares, la reducción puede dar como resultado ninguna o esencialmente ninguna (es decir, una cantidad insignificante, por ejemplo, menos de alrededor del 10 % o incluso el 5 %) de actividad o cantidad detectable. Por ejemplo, "tiempo reducido hasta la floración," o "reducido tiempo hasta la iniciación de la floración" significa una reducción en el tiempo hasta el inicio de la floración (p. ej., en una planta de frambuesa negra) de alrededor de 5 % hasta alrededor de 95 %, (p. ej., alrededor de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, o 95 %; p. ej., alrededor de 5 % hasta alrededor de 75 %, alrededor de 5 % hasta alrededor de 80 %, alrededor de 5 % hasta alrededor de 85 %, alrededor de 5 % hasta alrededor de 90 %, alrededor de 5 % hasta alrededor de 95 %, alrededor de 15 % hasta alrededor de 80 %, alrededor de 15 % hasta alrededor de 85 %, alrededor de 25 % hasta alrededor de 75 %, alrededor de 25 % hasta alrededor de 80 %, alrededor de 25 % hasta alrededor de 85 %, alrededor de 25 % hasta alrededor de 90 %, alrededor de 25 % hasta alrededor de 95 %, alrededor de 50 % hasta alrededor de 80 %, alrededor de 50 % hasta alrededor de 85 %, alrededor de 75 % hasta alrededor de 80 %, alrededor de 75 % hasta alrededor de 85 %, alrededor de 75 % hasta alrededor de 90 %, alrededor de 75 % hasta

alrededor de 95 %, alrededor de 80 % hasta alrededor de 85 %, alrededor de 80 % hasta alrededor de 95 %), o cualquier rango o valor entre ellos, en comparación con una planta de control que no comprende la misma mutación. Una planta de control es típicamente la misma planta que la planta editada, pero la planta de control no ha sido editada de manera similar, y por lo tanto, está libre de la mutación. Una planta de control puede ser una planta isogénica y/o una planta de tipo silvestre. Por lo tanto, una planta de control puede ser la misma línea de mejora, variedad o cultivar que la planta objeto en la que se introgressa una mutación como la descrita en el presente documento, pero la línea de mejora, variedad o cultivar de control está libre de la mutación. En algunas formas de realización, se realiza una comparación entre una planta de la invención y una planta de control en las mismas condiciones de crecimiento, p. ej., las mismas condiciones ambientales (suelo, hidratación, luz, calor, nutrientes, etc.).

Como se usan en el presente documento, los términos "expresar", "expresa", "expresado" o "expresión" y similares, con respecto a una molécula de ácido nucleico y/o una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, ARN o ADN) indican que se transcribe y, opcionalmente, se traduce la molécula de ácido y/o una secuencia de nucleótidos. Así, una molécula de ácido nucleico y/o una secuencia de nucleótidos pueden expresar un polipéptido de interés o, por ejemplo, un ARN funcional no traducido.

Una secuencia de nucleótidos "heteróloga" o "recombinante" es una secuencia de nucleótidos que no está asociada de forma natural con una célula huésped en la que se introduce, incluidas copias múltiples de origen no natural de una secuencia de nucleótidos de origen natural. Un nucleótido/polipéptido "heterólogo" puede originarse de una especie extraña o, si proviene de la misma especie, está sustancialmente modificado a partir de su forma nativa en términos de composición y/o locus genómico, mediante intervención humana deliberada.

Un ácido nucleico, secuencia de nucleótidos, polipéptido o secuencia de aminoácidos "nativo" o "de tipo salvaje" se refiere a un ácido nucleico, secuencia de nucleótidos, polipéptido o secuencia de aminoácidos natural o endógeno. En algunos contextos, un ácido nucleico de "tipo salvaje" es un ácido nucleico que no se edita como se describe en este documento, y puede diferir de un gen "endógeno" que se puede editar como se describe en este documento (por ejemplo, un gen endógeno mutado). En algunos contextos, un ácido nucleico de "tipo salvaje" (por ejemplo, sin editar) puede ser heterólogo al organismo en el que se encuentra el ácido nucleico de tipo salvaje (por ejemplo, un organismo transgénico). Como ejemplo, un "gen *TFL1* endógeno de tipo salvaje" es un gen *TFL1* que se produce naturalmente en el organismo de referencia o es endógeno al organismo de referencia, por

ejemplo, una planta, en la familia de la frambuesa negra, y puede estar sujeto a modificación como se describe en este documento, después de lo cual, dicho gen endógeno modificado ya no es de tipo salvaje.

5 Como se usa en el presente documento, el término "heterocigoto" se refiere a un estado genético en el que diferentes alelos residen en los loci correspondientes en los cromosomas homólogos.

Como se usa en el presente documento, el término "homocigoto" se refiere a un estado genético en el que residen alelos idénticos en los loci correspondientes en los cromosomas homólogos.

10 Como se usa en el presente documento, el término "alelo" se refiere a uno de dos o más nucleótidos o secuencias de nucleótidos diferentes que se producen en un locus específico.

15 Un "alelo nulo" es un alelo no funcional causado por una mutación genética que da como resultado una falta total de producción de la proteína correspondiente, o produce una proteína que no es funcional.

Una "mutación recesiva" es una mutación en un gen que produce un fenotipo cuando es homocigoto, pero el fenotipo no es observable cuando el locus es heterocigoto.

20 Una "mutación dominante" es una mutación en un gen que produce un fenotipo mutante en presencia de una copia no mutada del gen. Una mutación dominante puede ser una mutación de pérdida o de ganancia de función, una mutación hipomórfica, una mutación hipermórfica o una pérdida de función débil o una ganancia de función débil.

25 Una "mutación negativa dominante" es una mutación que produce un producto génico alterado (p. ej., que tiene una función aberrante en relación con el tipo salvaje), cuyo producto génico afecta negativamente la función del producto génico o alelo de tipo salvaje. Por ejemplo, una "mutación negativa dominante" puede bloquear una función del producto génico de tipo salvaje. Una mutación negativa dominante también puede denominarse "mutación antimórfica".

30 Una "mutación semidominante" se refiere a una mutación en la que la penetración del fenotipo en un organismo heterocigoto es menor que la observada en un organismo homocigoto.

Una "mutación de pérdida de función débil" es una mutación que da como resultado un producto génico que tiene una función parcial o una función reducida (parcialmente inactivada) en comparación con el producto génico de tipo salvaje.

Una "mutación hipomórfica" es una mutación que resulta en una pérdida parcial de la función del gen, que puede ocurrir a través de una expresión reducida (p. ej., proteína reducida y/o ARN reducido) o rendimiento funcional reducido (p. ej., actividad reducida), pero no una completa pérdida de función/actividad. Un alelo "hipomórfico" es un alelo semifuncional causado por una mutación genética que da como resultado la producción de la proteína correspondiente que funciona entre el 1 % y el 99 % de la eficiencia normal.

Una "mutación hipermórfica" es una mutación que da como resultado una mayor expresión del producto génico y/o una mayor actividad del producto génico.

Como se utiliza en el presente documento, una "mutación no natural" se refiere a una mutación que se genera mediante intervención humana y difiere de las mutaciones encontradas en el mismo gen que han ocurrido en la naturaleza (por ejemplo, ocurrieron de forma natural y no como resultado de una modificación realizada por un humano).

Los términos "determinado" o "indeterminado" se utilizan en este documento con referencia al hábito de crecimiento de un brote de una planta. Un meristemo de brote "indeterminado" se refiere a un meristemo de brote que continúa creciendo (sin estado final definido). Un meristemo de brote "determinado" se refiere a un meristemo de brote que crece hasta una longitud fija o durante un período de tiempo fijo. El término "crecimiento vegetal determinado" se refiere al crecimiento de una planta en el que el tallo principal termina en una inflorescencia u otra estructura reproductiva (por ejemplo, un brote) y deja de alargarse indefinidamente, donde solo las ramas del tallo principal han restringido el crecimiento de manera adicional y similar, por ejemplo, crecimiento caracterizado por una floración secuencial desde la yema central o superior hasta las yemas laterales o basales. El término "crecimiento vegetal/de planta indeterminado" se refiere al crecimiento de una planta en el que el tallo principal continúa alargándose indefinidamente, sin estar limitado por una inflorescencia terminal u otra estructura reproductiva, p. ej., crecimiento caracterizado por una floración secuencial desde las yemas laterales o basales hasta las yemas centrales o superiores; p. ej., el crecimiento del eje de la planta no está limitado por una estructura reproductiva.

Un "patrón de crecimiento vegetal/de planta más determinado" se refiere a una planta que tiene más meristemos de brotes que crecen hasta una longitud fija o durante un período de tiempo fijo, en comparación con una planta de control desprovista de la mutación en el gen *TFL1* endógeno. En algunas formas de realización, el número de meristemos de brotes que crecen hasta una longitud fija o durante un período de tiempo fijo se incrementa en 50 % a 100 % (alrededor de 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68,

69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 %) en comparación con una planta de control desprovista de la mutación en el gen *TFL1* endógeno. En algunas formas de realización, una planta de esta invención que tiene una mutación como se describe en este documento y un patrón de crecimiento más determinado puede tener tallos (alrededor del 50 % a alrededor del 100 % de los tallos) que son alrededor del 30 % a alrededor del 85 % o más, más cortos que una planta de control. Por lo tanto, una planta de esta invención que tiene una mutación como se describe en este documento y un patrón de crecimiento más determinado puede tener un hábito de crecimiento más tupido, y puede ser alrededor del 30 % a alrededor del 85 % más corta que una planta de control (por ejemplo, que tiene tallos alrededor de 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, u 85 % más cortos).

Un "locus" es una posición en un cromosoma donde se encuentra un gen, marcador o alelo. En algunas formas de realización, un locus puede abarcar uno o más nucleótidos.

Como se usan en este documento, los términos "alelo deseado", "alelo diana/objetivo" y/o "alelo de interés" se usan indistintamente para referirse a un alelo asociado con un rasgo deseado. En algunas formas de realización, un alelo deseado puede estar asociado con un aumento o una disminución (en relación con un control) de un rasgo determinado, o en un rasgo determinado, de acuerdo con la naturaleza del fenotipo deseado.

Un marcador está "asociado con" un rasgo cuando dicho rasgo está unido a este, y cuando la presencia del marcador es un indicador de si, y/o en qué medida, el rasgo deseado o la forma del rasgo ocurrirá en una planta/germoplasma que comprende el marcador. De manera similar, un marcador está "asociado con" un alelo o un intervalo cromosómico cuando está unido a este, y cuando la presencia del marcador es un indicador de si el alelo o el intervalo cromosómico está presente en una planta/germoplasma que comprende el marcador.

Como se usan en este documento, los términos "retrocruzamiento" y "retrocruzar" se refieren al proceso mediante el cual una planta de progenie se cruza con uno de sus progenitores una o más veces (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, etc.). En un esquema de retrocruzamiento, el progenitor "donante" se refiere a la planta parental con el gen o locus deseado para ser introgresado. El progenitor "receptor" (usado una o más veces) o el progenitor "recurrente" (usado dos o más veces) se refiere a la planta progenitora en la que se introgressa el gen o locus. Por ejemplo, ver Ragot, M. et al. *Marker-assisted Backcrossing: A*

*Practical Example, in* TECHNIQUES ET UTILISATIONS DES MARQUEURS MOLECULAIRES LES COLLOQUES, Vol. 72, pp. 45–56 (1995); y Openshaw et al., *Marker-assisted Selection in Backcross Breeding, en* PROCEEDINGS OF THE SYMPOSIUM "ANALYSIS OF MOLECULAR MARKER DATA," pp. 41–43 (1994). El cruce inicial da lugar a la generación F1. El término

5 "BC1" se refiere al segundo uso del progenitor recurrente, "BC2" se refiere al tercer uso del progenitor recurrente, y así sucesivamente.

Como se usan en el presente documento, los términos "cruzar" o "cruzado/a" se refieren a la fusión de gametos a través de la polinización para producir progenie (p. ej., células, semillas o plantas). El término abarca tanto los cruces sexuales (la polinización de  
10 una planta por otra) como la autofecundación (autopolinización, por ejemplo, cuando el polen y el óvulo son de la misma planta). El término "cruce" se refiere al acto de fusionar gametos a través de la polinización para producir progenie.

Como se usan en este documento, los términos "introgresión", "introgresar" e "introgresado/a" se refieren tanto a la transmisión natural como artificial de un alelo deseado  
15 o de una combinación de alelos deseados de un locus genético o de loci genéticos de un fondo genético a otro. Por ejemplo, un alelo deseado en un locus especificado puede transmitirse a por lo menos una progenie a través de un cruce sexual entre dos progenitores de la misma especie, donde por lo menos uno de los progenitores tiene el alelo deseado en su genoma. Alternativamente, por ejemplo, la transmisión de un alelo puede ocurrir por  
20 recombinación entre dos genomas donantes, por ejemplo, en un protoplasto fusionado, donde por lo menos uno de los protoplastos donantes tiene el alelo deseado en su genoma. El alelo deseado puede ser un alelo seleccionado de un marcador, un QTL, un transgén o similar. La descendencia que comprende el alelo deseado se puede retrocruzar una o más veces (p. ej., 1, 2, 3, 4 o más veces) con una línea que tenga un fondo genético deseado, seleccionando el  
25 alelo deseado, con el resultado de que el alelo deseado se fija en el fondo genético deseado. Por ejemplo, un marcador asociado con un aumento del rendimiento en condiciones de estrés sin agua puede ser introgresado de un donante a un progenitor recurrente que no comprende el marcador y no muestra un aumento del rendimiento en condiciones de estrés sin agua. La descendencia resultante podría luego retrocruzarse una o más veces y seleccionarse hasta que  
30 la progenie posea los marcadores genéticos asociados con un mayor rendimiento en condiciones de estrés sin agua en el fondo del progenitor recurrente.

Un "mapa genético" es una descripción de las relaciones de unión genética entre loci en uno o más cromosomas dentro de una especie determinada, generalmente, representado en forma de diagrama o tabular. Para cada mapa genético, las distancias entre loci se miden por

las frecuencias de recombinación entre ellos. La recombinación entre loci se puede detectar usando una diversidad de marcadores. Un mapa genético es un producto de la población de mapeo, los tipos de marcadores utilizados y el potencial polimórfico de cada marcador entre diferentes poblaciones. El orden y las distancias genéticas entre los loci pueden diferir de un mapa genético a otro.

Como se usa aquí, el término "genotipo" se refiere a la constitución genética de un individuo (o grupo de individuos) en uno o más loci genéticos, en contraste con el rasgo observable y/o detectable y/o manifestado (el fenotipo). El genotipo se define por el(los) alelo(s) de uno o más loci conocidos que el individuo ha heredado de sus progenitores. El término genotipo se puede usar para referirse a la constitución genética de un individuo en un solo locus, en múltiples loci o, de manera más general, el término genotipo se puede usar para referirse a la composición genética de un individuo para todos los genes en su genoma. Los genotipos pueden caracterizarse indirectamente, p. ej., utilizando marcadores, y/o caracterizarse directamente mediante secuenciación de ácidos nucleicos.

Como se usa aquí, el término "germoplasma" se refiere al material genético de un individuo (p. ej., una planta), un grupo de individuos (p. ej., una línea, variedad o familia de plantas) o un clon derivado de una línea, variedad, especie o cultivo. El germoplasma puede ser parte de un organismo o de una célula, o puede estar separado del organismo o de la célula. En general, el germoplasma proporciona material genético con una composición genética específica que proporciona la base para algunas o todas las cualidades hereditarias de un organismo o cultivo celular. Como se usa en este documento, el germoplasma incluye células, semillas o tejidos a partir de los cuales se pueden cultivar nuevas plantas, así como partes de plantas que se pueden cultivar hasta una planta completa (por ejemplo, hojas, tallos, brotes, raíces, polen, células, etc.).

Como se usa en el presente documento, los términos "cultivar" y "variedad" se refieren a un grupo de plantas similares que por características estructurales o genéticas y/o rendimiento pueden distinguirse de otras variedades dentro de la misma especie.

Como se usan en el presente documento, los términos "exótico", "línea exótica" y "germoplasma exótico" se refieren a cualquier planta, línea o germoplasma que no es de élite. En general, las plantas o germoplasmas exóticos no se derivan de ninguna planta o germoplasma de élite conocido, sino que se seleccionan para introducir uno o más elementos genéticos deseados en un programa de mejoramiento (por ejemplo, para introducir alelos nuevos en un programa de mejoramiento).

Tal como se usa en el presente documento, el término "híbrido" en el contexto del fitomejoramiento se refiere a una planta que es descendiente de progenitores genéticamente diferentes producida mediante el cruce de plantas de diferentes líneas, crías o especies, incluido, entre otros, el cruce entre dos líneas endogámicas.

5            Como se usa en el presente documento, el término "endogámico" se refiere a una planta o variedad sustancialmente homocigota. El término puede referirse a una planta o variedad de planta que es sustancialmente homocigota en todo el genoma o que es sustancialmente homocigota con respecto a una porción del genoma que es de particular interés.

10           Un "haplotipo" es el genotipo de un individuo en una pluralidad de loci genéticos, es decir, una combinación de alelos. Por lo general, los loci genéticos que definen un haplotipo están física y genéticamente ligados, es decir, en el mismo segmento cromosómico. El término "haplotipo" puede referirse a polimorfismos en un locus particular, tal como un locus marcador único, o polimorfismos en múltiples loci a lo largo de un segmento cromosómico.

15           Tal como se utiliza en el presente documento, el término "heterólogo" se refiere a un nucleótido/polipéptido que se origina a partir de una especie extraña o, si es de la misma especie, se modifica sustancialmente a partir de su forma nativa en términos de composición y/o locus genómico, mediante intervención humana deliberada.

             Los términos "tiempo reducido hasta la floración", "tiempo reducido hasta la  
20    iniciación de la floración" o "período reducido de juventud" (y variaciones gramaticales de los mismos) se utilizarán indistintamente en el presente documento y significarán un tiempo más corto hasta la floración (por ejemplo, para comenzar o iniciar el proceso de floración, o para comenzar la etapa de crecimiento de la floración). El tiempo que transcurre antes de que una planta inicie el proceso de floración puede variar entre especies, e incluso entre diferentes  
25    variedades y cultivares. Por ejemplo, en general, una planta de frambuesa negra con flores de floricaña florece y produce frutos en un plazo de alrededor de 15 a 20 meses (por ejemplo, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5 o 20 meses) desde la aparición de la caña, y una planta de frambuesa negra con flores de primocaña florece y produce frutos después de  
30    alrededor de 3 a 5 meses (por ejemplo, alrededor de 3, 3,25, 3,5, 3,75, 4, 4,25, 4,5, 4,75 o 5 meses y cualquier rango o valor entre ellos, por ejemplo, alrededor de 12 semanas a alrededor de 15 semanas y cualquier rango o valor entre ellos, por ejemplo, alrededor de 12, 13, 14 o 15 semanas y cualquier rango o valor entre ellos), del crecimiento de la caña. Por el contrario, las plantas de frambuesa negra de la presente invención pueden proporcionar una reducción en el tiempo de floración de alrededor de 15–20 meses a alrededor de 6–9 meses y cualquier



alrededor de 80 % a alrededor de 85 %, alrededor de 80 % a alrededor de 95 %), o cualquier rango o valor entre ellos, en comparación con una planta de control que no comprende la misma mutación. En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un tiempo reducido hasta la floración en una planta de frambuesa negra de alrededor de 5 %–50 % (p. ej., alrededor de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30,, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 % o cualquier rango o valor entre ellos, de manera opcional, alrededor de 5 %– 25 %) en comparación con una planta de frambuesa negra de tipo salvaje (p. ej., una planta de frambuesa negra que no comprende una mutación en un gen *TFL1* endógeno como se describe en el presente documento). Por lo tanto, en algunas formas de realización, una planta de frambuesa negra de la presente invención florecerá y/o producirá frutos en un plazo de 2 a 9 meses (por ejemplo, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5 o 9 meses) desde la emergencia de las cañas. Como ejemplo, los métodos de la presente invención pueden proporcionar plantas de frambuesa negra que dan fruto en madera nueva. Es decir, una planta de frambuesa negra de la invención puede florecer y producir frutos en cañas producidas el mismo año en que se produce la caña en lugar del segundo año (por ejemplo, alrededor de 18 meses o más después de la aparición de las cañas); es decir, una planta de frambuesa negra de la invención puede florecer en madera nueva en lugar de madera vieja, de modo de reducir así el tiempo de floración en la planta de frambuesa negra. De manera similar, otras plantas de frambuesa negra que tienen una mutación como la descrita en el presente documento también pueden presentar un tiempo de floración reducido. En algunas formas de realización, una planta de frambuesa negra de la invención puede exhibir además un fenotipo de una mayor duración de la floración, una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más) características de rendimiento mejoradas (por ejemplo, mayor producción de frutos) y/o un patrón de crecimiento de la planta más determinado.

El término "mayor duración de la floración" se refiere al período desde el inicio de la floración hasta el final de la floración (por ejemplo, la última flor producida) es más largo en comparación con una planta de frambuesa negra que no comprende por lo menos una mutación en un gen *TFL1* endógeno como se describe en este documento. Por ejemplo, una planta de frambuesa negra que comprende una o más mutaciones en uno o más genes *TFL1* endógenos como se describe en este documento puede tener una duración de la floración que es por lo menos de un día a por lo menos 5 semanas (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días a alrededor de 1, 2, 3, 4, o 5 semanas; p. ej., alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 días a alrededor de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 31, 32, 33, 34, 35

días; p. ej., alrededor de 1, 2, 3, 4, o 5 semanas) mayor que una planta de frambuesa negra que no comprende una o más mutaciones *TFL1*. Por ejemplo, una planta de frambuesa negra típicamente florece durante un período de 3 semanas (p. ej., alrededor de 21 días). En consecuencia, en algunas formas de realización, una planta de frambuesa negra de esta

5 invención florecerá durante más de 3 semanas, uno o más días más, en comparación con una planta de frambuesa negra que no comprende por lo menos una mutación en un gen *TFL1* endógeno como se describe en el presente documento. En algunas formas de realización, una planta de frambuesa negra de esta invención florecerá durante más de 3 semanas, por lo menos 5 días a alrededor de 5 semanas más, en comparación con planta de frambuesa negra  
10 que no comprende por lo menos una mutación en un gen *TFL1* endógeno como se describe en el presente documento.

Tal como se utiliza en el presente documento, una "planta de control" significa una planta que no contiene uno o más genes *TFL1* editados como se describe en el presente documento, que imparten un rasgo mejorado/realzado (por ejemplo, rasgo de rendimiento) o  
15 un fenotipo alterado. Una planta de control se utiliza para identificar y seleccionar una planta editada como se describe en el presente documento, y que tiene un rasgo mejorado o un fenotipo alterado en comparación con la planta de control. Una planta de control adecuada puede ser una planta de la línea parental utilizada para generar una planta que comprende uno o más genes *TFL1* mutados, por ejemplo, una planta de frambuesa negra desprovista de una  
20 edición en un gen *TFL1* endógeno como se describe en el presente documento. Una planta de control adecuada también puede ser una planta que contiene ácidos nucleicos recombinantes que imparten otros rasgos, por ejemplo, una planta transgénica que tiene una tolerancia mejorada a los herbicidas. Una planta de control adecuada puede ser, en algunos casos, una progenie de una línea de planta transgénica heterocigota o hemicigota que carece del gen  
25 *TFL1* mutado como se describe en el presente documento, conocida como segregante negativo o línea isogénica negativa.

Un rasgo mejorado (por ejemplo, rasgo de rendimiento mejorado) puede incluir, por ejemplo, disminución de los días desde la plantación hasta la madurez, aumento del tamaño del tallo, aumento del número de hojas, aumento de la tasa de crecimiento de la altura de la  
30 planta en la etapa vegetativa, aumento del tamaño de la mazorca, aumento del peso seco de la mazorca por planta, aumento del número de granos por mazorca, aumento del peso por grano, aumento del número de granos por planta, disminución de vacíos de la mazorca, período de llenado de grano extendido, reducción de la altura de la planta, aumento del número de ramas de la raíz, aumento de la longitud total de la raíz, aumento del rendimiento, aumento de la

eficiencia del uso del nitrógeno y aumento de la eficiencia del uso de agua, en comparación con una planta de control. Un fenotipo alterado puede ser, por ejemplo, altura de la planta, biomasa, área del dosel, contenido de antocianina, contenido de clorofila, agua aplicada, contenido de agua y eficiencia del uso del agua.

5           En algunas formas de realización, una planta de esta invención puede comprender uno o más rasgos de rendimiento mejorados que incluyen, entre otros, mayor rendimiento (bu/acre), mayor biomasa, mayor altura de la planta, mayor diámetro del tallo, mayor área de las hojas y/o mayor número de flores, en comparación con una planta de control desprovista de la por lo menos una mutación. En algunas formas de realización, un rasgo o característica  
10 de rendimiento mejorado puede ser, por ejemplo, mayor producción de frutos, por planta o por hectárea.

          Como se usa en el presente documento, un "rasgo" es una característica fisiológica, morfológica, bioquímica o física de una planta o de una célula o un material vegetal particular. En algunos casos, esta característica es visible para el ojo humano y puede medirse  
15 mecánicamente, tal como el tamaño, el peso, la forma, la conformación, la longitud, la altura, la tasa de crecimiento y la etapa de desarrollo de la semilla o la planta, o puede medirse mediante técnicas bioquímicas, tales como como la detección del contenido de proteína, almidón, ciertos metabolitos o aceite de semillas u hojas, o mediante la observación de un proceso metabólico o fisiológico, por ejemplo, midiendo la tolerancia a la privación de agua o  
20 concentraciones particulares de sal o azúcar, o mediante la medición de la nivel de expresión de uno o más genes, por ejemplo, mediante el empleo de análisis Northern, RT-PCR, ensayos de expresión génica de micromatrices o sistemas de expresión de genes reporteros, o mediante observaciones agrícolas tales como rendimiento o la tolerancia al estrés hiperosmótico. Sin embargo, se puede usar cualquier técnica para medir la cantidad, el nivel  
25 comparativo o la diferencia en cualquier compuesto químico o macromolécula seleccionado en las plantas transgénicas.

          Como se usan en el presente documento, los términos "ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico", "secuencia de nucleótidos" y "polinucleótido" se refieren a ARN o ADN que es lineal o ramificado, monocatenario o bicatenario, o un híbrido de los mismos. El término  
30 también abarca híbridos de ARN/ADN. Cuando el ARNs se produce sintéticamente, las bases menos comunes, tales como la inosina, la 5-metilcitosina, la 6-metiladenina, la hipoxantina y otras también se pueden usar para el emparejamiento antisentido, de ARNs y ribozima. Por ejemplo, se ha demostrado que los polinucleótidos que contienen análogos de propino C-5 de uridina y citidina se unen al ARN con alta afinidad y son potentes inhibidores

antisentido de la expresión génica. También se pueden realizar otras modificaciones, tales como la modificación del espinazo de fosfodiéster o el 2'-hidroxi en el grupo azúcar ribosa del ARN.

5 Como se usa en el presente documento, el término "secuencia de nucleótidos" se refiere a un heteropolímero de nucleótidos o la secuencia de estos nucleótidos desde el extremo 5' al 3' de una molécula de ácido nucleico, e incluye moléculas de ADN o ARN, incluido ADNc, un fragmento o una porción de ADN, ADN genómico, ADN sintético (p. ej., sintetizado químicamente), ADN plásmido, ARNm y ARN antisentido, cualquiera de los cuales puede ser monocatenario o bicatenario. Los términos "secuencia de nucleótidos",  
10 "ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico", "construcción de ácido nucleico", "oligonucleótido" y "polinucleótido" también se usan indistintamente aquí para referirse a un heteropolímero de nucleótidos. Las moléculas de ácido nucleico y/o las secuencias de nucleótidos que se proporcionan en el presente documento se presentan en la dirección 5' a 3', de izquierda a derecha y se representan utilizando el código estándar para representar los  
15 caracteres de nucleótidos tal como se establece en las reglas de secuencias de EE. UU., 37 CFR § §1.821 – 1.825 y la Norma ST.25 de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI). Una "región 5'" tal como se usa aquí puede significar la región de un polinucleótido que está más cerca del extremo 5' del polinucleótido. Así, por ejemplo, un elemento en la región 5' de un polinucleótido puede ubicarse en cualquier lugar desde el  
20 primer nucleótido ubicado en el extremo 5' del polinucleótido hasta el nucleótido ubicado en la mitad del polinucleótido. Una "región 3'" tal como se usa aquí puede significar la región de un polinucleótido que está más cerca del extremo 3' del polinucleótido. Así, por ejemplo, un elemento en la región 3' de un polinucleótido puede ubicarse en cualquier lugar desde el  
25 primer nucleótido ubicado en el extremo 3' del polinucleótido hasta el nucleótido ubicado en la mitad del polinucleótido.

Tal como se utiliza en el presente documento con respecto a ácidos nucleicos, el término "fragmento" o "porción" se refiere a un ácido nucleico que tiene reducida longitud en relación con (p. ej., reducida en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,  
30 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 o más nucleótidos, o cualquier rango o valor entre ellos) un ácido nucleico de referencia y que comprende, consiste esencialmente en y/o consiste en una secuencia de nucleótidos de nucleótidos contiguos idénticos o casi idénticos (p. ej., 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83

%, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idénticos) a una porción correspondiente del ácido nucleico de referencia. Dicho fragmento de ácido nucleico puede, cuando sea apropiado, incluirse en un polinucleótido más grande del cual es un constituyente. A modo de ejemplo, una secuencia de repetición de ácido nucleico guía de esta invención puede comprender una porción de una secuencia de repetición de tipo salvaje CRISPR–Cas (por ej., una repetición de tipo salvaje CRISPR–Cas; por ej., una repetición del sistema CRISPR Cas de, por ejemplo, una Cas9, Cas12a (Cpf1), Cas12b, Cas12c (C2c3), Cas12d (CasY), Cas12e (CasX), Cas12g, Cas12h, Cas12i, C2c4, C2c5, C2c8, C2c9, C2c10, Cas14a, Cas14b, y/o una Cas14c, y similares).

En algunas formas de realización, un fragmento de ácido nucleico puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en alrededor de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, o 900 o más nucleótidos consecutivos o cualquier rango o valor entre ellos de un ácido nucleico que codifica una proteína TFL1, de manera opcional; un fragmento de *TFL1* puede ser de alrededor de 50 nucleótidos a alrededor de 300 nucleótidos de longitud, alrededor de 50 nucleótidos a alrededor de 350 nucleótidos de longitud, alrededor de 50 nucleótidos a alrededor de 400 nucleótidos de longitud, alrededor de 50 nucleótidos a alrededor de 450 nucleótidos de longitud, alrededor de 50 nucleótidos a alrededor de 500 nucleótidos de longitud, alrededor de 50 nucleótidos a alrededor de 600 nucleótidos de longitud, alrededor de 50 nucleótidos a alrededor de 800 nucleótidos de longitud, alrededor de 50 nucleótidos a alrededor de 900 nucleótidos de longitud, alrededor de 50 nucleótidos a alrededor de 950 nucleótidos de longitud, alrededor de 100 nucleótidos a alrededor de 300 nucleótidos de longitud, alrededor de 100 nucleótidos a alrededor de 350 nucleótidos de longitud, alrededor de 100 nucleótidos a alrededor de 400 nucleótidos de longitud, alrededor de 100 nucleótidos a alrededor de 450 nucleótidos de longitud, alrededor de 100 nucleótidos a alrededor de 500 nucleótidos de longitud, alrededor de 100 nucleótidos a alrededor de 600 nucleótidos de longitud, alrededor de 100 nucleótidos a alrededor de 800 nucleótidos de longitud, alrededor de 100 nucleótidos a alrededor de 900 nucleótidos de longitud, o alrededor de 100 nucleótidos a alrededor de 950 nucleótidos de longitud, o cualquier rango o valor entre ellos (p. ej., un fragmento o una porción de **SEQ ID NO: 69**, **SEQ ID NO: 70**, y/o **SEQ ID NO: 80** (p. ej., **SEQ ID NOs: 72–74** y/o **SEQ ID NOs: 83–95**).

En algunas formas de realización, una "porción", con referencia a un ácido nucleico, significa por lo menos 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23,

24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 120, 130, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 150, 160, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 190, 200, 210, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, o 300 o más nucleótidos consecutivos de un gen (p. ej., nucleótidos consecutivos de un gen *TFL1*) (p. ej., un fragmento o una porción de **SEQ ID NO: 69**, **SEQ ID NO: 70**, y/o **SEQ ID NO: 80** (p. ej., **SEQ ID NOs: 72–74** y/o **SEQ ID NOs: 83–95**).

En algunas formas de realización, un fragmento de ácido nucleico de un gen *TFL1* puede ser el resultado de una delección de nucleótidos desde el extremo 3', el extremo 5', y/o desde dentro de cualquier región (p. ej., dentro de un exón, una región codificante) de un gen que codifica una proteína TFL1. En algunas formas de realización, una delección de una porción de un gen que codifica una proteína TFL1 puede comprender una delección de una porción de nucleótidos consecutivos desde el extremo 5', el extremo 3', o desde dentro de cualquier región de un gen, por ejemplo, una delección de una porción de nucleótidos consecutivos desde el extremo 5', el extremo 3', o desde dentro de cualquier región de la secuencia de nucleótidos de **SEQ ID NO: 69**, **SEQ ID NO: 70**, y/o **SEQ ID NO: 80**. En algunas formas de realización, una delección de una porción de un gen *TFL1* puede comprender una delección de una porción de nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de **SEQ ID NO: 69**, **SEQ ID NO: 70**, y/o **SEQ ID NO: 80**.

En algunas formas de realización, una delección de una porción de un gen *TFL1* puede comprender una delección de una porción de nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de **SEQ ID NO: 69** y/o **SEQ ID NO: 80** de alrededor de 3 nucleótidos consecutivos a alrededor de 2600 nucleótidos consecutivos o más (p. ej., alrededor de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500 o 2600 o más nucleótidos consecutivos, o cualquier rango o valor entre ellos).

En algunas formas de realización, una delección en un gen *TFL1* puede comprender una delección de alrededor de 3 a alrededor de 515 o más nucleótidos de **SEQ ID NO: 70** (p. ej., alrededor de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 nucleótidos consecutivos a alrededor de 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 420, 425, 430, 435, 440, 445, 350, 455, 460, 465, 470, 475, 480, 485, 490, 495, 500, 505, 510, 515, 516, 517, 518, 519, 520 o más nucleótidos consecutivos o cualquier rango o valor entre ellos, de manera opcional, alrededor de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 a alrededor de 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 nucleótidos consecutivos).

En algunas formas de realización, una delección en un gen *TFL1* produce un polipéptido codificado que está truncado.

En algunas formas de realización, una inserción en un gen *TFL1* puede comprender una inserción de por lo menos un par de bases, opcionalmente, un par de bases hasta alrededor de 100 pares de bases. En algunas formas de realización, una inserción en un gen *TFL1* puede comprender una inserción de un par de bases. En algunas formas de realización, una inserción de un par de bases en un gen *TFL1* puede dar como resultado una mutación fuera de marco, opcionalmente, donde la mutación fuera de marco produce un codón de terminación prematuro y un polipéptido truncado.

En algunas formas de realización, una delección en un gen *TFL1* como se describe en el presente documento puede ser un alelo nulo, que cuando está comprendido en una planta, puede hacer que la planta exhiba un fenotipo de tiempo reducido hasta la floración en la planta, una duración más prolongada de la floración, una o más características de rendimiento mejoradas y/o un patrón de crecimiento de la planta más determinado. En algunas formas de realización, dicha delección puede ser un alelo dominante negativo, un alelo semidominante, un alelo de pérdida de función débil, un alelo nulo o una mutación hipomórfica, que cuando

está comprendida en una planta, puede hacer que la planta exhiba un fenotipo de tiempo reducido hasta la floración en la planta, una mayor duración de la floración, una o más características de rendimiento mejoradas (por ejemplo, mayor producción de frutos) y/o un patrón de crecimiento de la planta más determinado.

5           En algunas formas de realización, un "dominio de unión de ácido nucleico específico de secuencia" (p. ej., dominio de unión de ADN específico de secuencia) puede unirse a un gen *TFL1* (p. ej., **SEQ ID NO: 69** y/o **SEQ ID NO: 80**) y/o a uno o más fragmentos, porciones o regiones de un ácido nucleico *TFL1* (p. ej., **SEQ ID NOs: 72–74** y/o **SEQ ID NOs: 83–95**).

10           Como se usa en este documento con respecto a polipéptidos, el término "fragmento" o "porción" puede referirse a un polipéptido que tiene reducida longitud en relación con un polipéptido de referencia, y que comprende, consiste esencialmente en, y/o consiste en una secuencia de aminoácidos, de aminoácidos contiguos, idénticos o casi idénticos (p. ej., 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idénticos) a una porción  
15 correspondiente del polipéptido de referencia. Dicho fragmento de polipéptido, cuando corresponda, puede estar incluido en un polipéptido más grande del cual es un constituyente. En algunas formas de realización, el fragmento de polipéptido comprende, consiste esencialmente en, o consiste en por lo menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175,  
20 200, 225, 250, 300, 350, 400 o más aminoácidos consecutivos de un polipéptido de referencia. En algunas formas de realización, un fragmento de polipéptido puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63,  
25 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, o 172 o más residuos de aminoácidos consecutivos (o cualquier rango o valor entre  
30 ellos) de un polipéptido *TFL1* (p. ej., un fragmento o una porción de **SEQ ID NO: 71** (p. ej., **SEQ ID NO: 75**)).

En algunas formas de realización, una "porción" puede relacionarse con el número de aminoácidos que son delecionados de un polipéptido. Así, por ejemplo, una "porción" delecionada de un polipéptido *TFL1* puede comprender por lo menos un residuo de

aminoácido (p. ej., por lo menos 1, o por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, o 172, o más residuos de aminoácidos consecutivos) delecionados de **SEQ ID NO: 71**, de manera opcional, donde la porción delecionada puede ser de alrededor de 1, 5, 10, 15, 20, 25 o 30 a alrededor de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, o 70 residuos del extremo C-terminal de, por ejemplo, **SEQ ID NO: 71**. En algunas formas de realización, los residuos truncados son del residuo 107 al residuo 172. En algunas formas de realización, los residuos 100 a 106 de un polipéptido TFL1 mutado están modificados en comparación con **SEQ ID NO: 71**.

En algunas formas de realización, una deleción de una porción de una proteína TFL1 puede comprender una deleción de una porción de residuos de aminoácidos consecutivos del extremo N- o C-terminal de la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 71**, o dentro de ella. Así, en algunas formas de realización, una deleción de una porción de un polipéptido TFL1 puede comprender una deleción de una porción de residuos de aminoácidos consecutivos del extremo C-terminal o el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos **SEQ ID NO: 71**, de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos consecutivos a alrededor de 50, alrededor de 75, alrededor de 100, alrededor de 120, alrededor de 125, alrededor de 126, alrededor de 127, alrededor de 128, alrededor de 129, alrededor de 130, alrededor de 150, alrededor de 151, alrededor de 152, alrededor de 153, alrededor de 154, alrededor de 155, alrededor de 160, o alrededor de 172 aminoácidos consecutivos, o alrededor de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 aminoácidos consecutivos a alrededor de 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, o 170 o más aminoácidos consecutivos (o cualquier rango o valor entre ellos). Por lo tanto, en algunas formas de

realización, un fragmento o una porción de un polipéptido TFL1 que está delecionado puede estar dentro de un polipéptido TFL1 del residuo de aminoácido 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 71, 72, 73, o 74 al residuo de aminoácido 115, 116, 117, 118, 119, o 120 con referencia a la numeración de posición de aminoácidos de **SEQ ID NO: 71**. En algunas

5 formas de realización, un fragmento o una porción de un polipéptido TFL1 que está delecionado puede comprender los residuos de aminoácidos 100, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110 a 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, o 172 con referencia a la numeración de posición de aminoácidos de **SEQ ID NO: 71**. En algunas formas de realización, una delección de una  
10 porción de un polipéptido TFL1 puede ser el resultado de una inserción, tal como una inserción fuera de marco (p. ej., **SEQ ID NO: 79** y/o **SEQ ID NO: 100**).

En algunas formas de realización, dicha delección o inserción puede ser un alelo nulo, que cuando está comprendido en una planta de frambuesa negra, puede dar como resultado un fenotipo de tiempo reducido hasta la floración, una duración más prolongada de la  
15 floración, un patrón de crecimiento de la planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas (por ejemplo, mayor producción de frutos) en comparación con una planta de frambuesa negra desprovista de la delección. En algunas formas de realización, dicha delección puede ser un alelo dominante negativo, un alelo semidominante, un alelo de pérdida débil de función, un alelo nulo, o una mutación  
20 hipomórfica, que cuando está comprendido en una planta de frambuesa negra, puede hacer que la planta tenga un tiempo reducido hasta la floración, una duración más prolongada de la floración, un patrón de crecimiento de la planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas en comparación con una planta de frambuesa negra de control desprovista de la mutación.

25 Como se usa en este documento con respecto a los ácidos nucleicos, el término "fragmento funcional" se refiere al ácido nucleico que codifica un fragmento funcional de un polipéptido. Un "fragmento funcional" con respecto a un polipéptido es un fragmento de un polipéptido que retiene una o más de las actividades del polipéptido de referencia nativo.

El término "gen", como se usa en este documento, se refiere a una molécula de ácido  
30 nucleico capaz de usarse para producir ARNm, ARN antisentido, ARNm<sub>i</sub>, oligodesoxirribonucleótido antisentido (AMO) anti-microARN y similares. Los genes pueden o no usarse para producir una proteína funcional o un producto génico. Los genes pueden incluir tanto regiones codificantes como no codificantes (p. ej., intrones, elementos reguladores, promotores, mejoradores, secuencias de terminación y/o regiones no traducidas

5' y 3'). Un gen se puede "aislar", lo que significa un ácido nucleico que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente se encuentran en asociación con el ácido nucleico en su estado natural. Dichos componentes incluyen otro material celular, medio de cultivo de la producción recombinante y/o diversos productos químicos utilizados en la síntesis química del ácido nucleico.

El término "mutación" se refiere a mutaciones puntuales (por ejemplo, sentido erróneo o sin sentido, o inserciones o eliminaciones de pares de bases individuales que dan como resultado cambios de marco), inserciones, deleciones, inversiones y/o truncamientos. Cuando la mutación es una sustitución de un residuo dentro de una secuencia de aminoácidos con otro residuo, o una deleción o inserción de uno o más residuos dentro de una secuencia, las mutaciones se describen típicamente mediante la identificación del residuo original seguido de la posición del residuo dentro de la secuencia, y por la identidad del residuo recién sustituido. Un truncamiento puede incluir un truncamiento en el extremo C-terminal de un polipéptido o en el extremo N-terminal de un polipéptido. Un truncamiento de un polipéptido puede ser el resultado de una deleción del extremo 5' o del extremo 3' correspondiente del gen que codifica el polipéptido. Una mutación por desplazamiento de marco puede producirse cuando se introducen deleciones o inserciones de uno o más pares de bases en un gen, lo que opcionalmente da como resultado una mutación fuera de marco o una mutación dentro del marco. Las mutaciones por desplazamiento del marco en un gen pueden dar como resultado la producción de un polipéptido que es más largo, más corto o de la misma longitud que el polipéptido de tipo salvaje, de acuerdo con cuándo se produce el primer codón de detención después de la región mutada del gen. A modo de ejemplo, una mutación fuera de marco que produce un codón de detención prematuro puede producir un polipéptido que es más corto que el polipéptido de tipo salvaje o, en algunas formas de realización, el polipéptido puede estar ausente o ser indetectable. En algunas formas de realización, una mutación puede ser una inversión de ADN, opcionalmente, una inversión de ADN que tiene una longitud de alrededor de 10 a alrededor de 2000 pares de bases consecutivos.

Los términos "complementario" o "complementariedad", tal como se usan en el presente documento, se refieren a la unión natural de polinucleótidos en condiciones salinas y de temperatura permisivas mediante apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "A-G-T" (5' a 3') se une a la secuencia complementaria "T-C-A" (3' a 5'). La complementariedad entre dos moléculas monocatenarias puede ser "parcial", en la que sólo se unen algunos de los nucleótidos, o puede ser completa, cuando existe una complementariedad total entre las moléculas monocatenarias. El grado de complementariedad entre las hebras de ácido nucleico

tiene efectos significativos sobre la eficacia y la fuerza de la hibridación entre las hebras de ácidos nucleicos.

"Complemento", como se usa en el presente documento, puede significar 100 % de complementariedad con la secuencia de nucleótidos de comparación, o puede significar menos de 100 % de complementariedad (por ej., alrededor de 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, y similares, de complementariedad) con la secuencia de nucleótidos de comparación.

Los diferentes ácidos nucleicos o proteínas que tienen homología se denominan aquí "homólogos". El término homólogo incluye secuencias homólogas de la misma y de otras especies, y secuencias ortólogas de la misma y de otras especies. "Homología" se refiere al nivel de similitud entre dos o más secuencias de ácidos nucleicos y/o aminoácidos en términos de porcentaje de identidad posicional (es decir, similitud o identidad de secuencia). La homología también se refiere al concepto de propiedades funcionales similares entre diferentes ácidos nucleicos o proteínas. Por lo tanto, las composiciones y los métodos de la invención comprenden además homólogos de las secuencias de nucleótidos y las secuencias de polipéptidos de esta invención. "Ortólogo", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de nucleótidos y/o secuencias de aminoácidos homólogas en diferentes especies que surgieron de un gen ancestral común durante la especiación. Un homólogo de una secuencia de nucleótidos de esta invención tiene una identidad de secuencia sustancial (por ej., por lo menos alrededor de 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 %) con respecto a dicha secuencia de nucleótidos de la invención.

Como se usa en el presente documento, "identidad de secuencia " se refiere al alcance al cual dos secuencias de polinucleótido o polipéptido óptimamente alineadas son invariantes a través de una ventana de alineación de componentes, por ej., nucleótidos o aminoácidos. La "identidad" se puede calcular fácilmente por métodos conocidos que incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: *Computational Molecular Biology* (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, New York (1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (Smith, D. W., ed.) Academic Press, New York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Part I* (Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds.) Humana Press, New Jersey (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology* (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987); y

*Sequence Analysis Primer* (Gribskov, M. y Devereux, J., eds.) Stockton Press, New York (1991).

Como se usa en el presente documento, el término "porcentaje de identidad de secuencia" o "porcentaje de identidad" se refiere al porcentaje de nucleótidos idénticos en una secuencia de polinucleótidos lineal de una molécula de polinucleótido de referencia ("consulta") (o su hebra complementaria), en comparación con una molécula de polinucleótido de prueba ("sujeto") (o su hebra complementaria), cuando las dos secuencias están alineadas de manera óptima. En algunas formas de realización, "porcentaje de identidad" puede referirse al porcentaje de aminoácidos idénticos en una secuencia de aminoácidos en comparación con un polipéptido de referencia.

Como se usa en el presente documento, la frase "sustancialmente idéntica" o "identidad sustancial" en el contexto de dos moléculas de ácido nucleico, secuencias de nucleótidos o secuencias de polipéptidos se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen por lo menos alrededor de 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % de identidad de residuos de aminoácidos o nucleótidos, cuando se comparan y alinean para obtener la máxima correspondencia, medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias, o mediante inspección visual. En algunas formas de realización de la invención, la identidad sustancial existe en una región de nucleótidos consecutivos de una secuencia de nucleótidos de la invención que es alrededor de 10 nucleótidos a alrededor de 20 nucleótidos, alrededor de 10 nucleótidos a alrededor de 25 nucleótidos, alrededor de 10 nucleótidos a alrededor de 30 nucleótidos, alrededor de 15 nucleótidos a alrededor de 25 nucleótidos, alrededor de 30 nucleótidos a alrededor de 40 nucleótidos, alrededor de 50 nucleótidos a alrededor de 60 nucleótidos, alrededor de 70 nucleótidos a alrededor de 80 nucleótidos, alrededor de 90 nucleótidos a alrededor de 100 nucleótidos, alrededor de 100 nucleótidos a alrededor de 200 nucleótidos, alrededor de 100 nucleótidos a alrededor de 300 nucleótidos, alrededor de 100 nucleótidos a alrededor de 400 nucleótidos, alrededor de 100 nucleótidos a alrededor de 500 nucleótidos, alrededor de 100 nucleótidos a alrededor de 600 nucleótidos, alrededor de 100 nucleótidos a alrededor de 800 nucleótidos, alrededor de 100 nucleótidos a alrededor de 900 nucleótidos, o más de longitud, o cualquier rango entre ellos, hasta la longitud entera de la secuencia. En algunas formas de realización, las secuencias de nucleótidos pueden ser sustancialmente idénticas sobre por lo menos alrededor de 20

nucleótidos (p. ej., alrededor de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 60, 70 u 80 nucleótidos o más).

En algunas formas de realización de la invención, la identidad sustancial existe sobre una región de residuos de aminoácidos consecutivos de un polipéptido de la invención que es

5 de alrededor de 3 residuos de aminoácidos a alrededor de 20 residuos de aminoácidos, alrededor de 5 residuos de aminoácidos a alrededor de 25 residuos de aminoácidos, alrededor de 7 residuos de aminoácidos a alrededor de 30 residuos de aminoácidos, alrededor de 10 residuos de aminoácidos a alrededor de 25 residuos de aminoácidos, alrededor de 15 residuos de aminoácidos a alrededor de 30 residuos de aminoácidos, alrededor de 20 residuos de

10 aminoácidos a alrededor de 40 residuos de aminoácidos, alrededor de 25 residuos de aminoácidos a alrededor de 40 residuos de aminoácidos, alrededor de 25 residuos de aminoácidos a alrededor de 50 residuos de aminoácidos, alrededor de 30 residuos de aminoácidos a alrededor de 50 residuos de aminoácidos, alrededor de 40 residuos de aminoácidos a alrededor de 50 residuos de aminoácidos, alrededor de 40 residuos de

15 aminoácidos a alrededor de 70 residuos de aminoácidos, alrededor de 50 residuos de aminoácidos a alrededor de 70 residuos de aminoácidos, alrededor de 60 residuos de aminoácidos a alrededor de 80 residuos de aminoácidos, alrededor de 70 residuos de aminoácidos a alrededor de 80 residuos de aminoácidos, alrededor de 90 residuos de aminoácidos a alrededor de 100 residuos de aminoácidos, o más residuos de aminoácidos de

20 longitud, y cualquier rango entre ellos, hasta la longitud entera de la secuencia. En algunas formas de realización, las secuencias de polipéptido pueden ser sustancialmente idénticas entre sí sobre por lo menos alrededor de 8 residuos de aminoácidos consecutivos (p. ej., alrededor de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54,

25 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 350 o más aminoácidos de longitud, o más residuos de aminoácidos consecutivos). En algunas formas de realización, dos o más polipéptidos

30 TFL1 pueden ser idénticos o sustancialmente idénticos (p. ej., por lo menos 70 % a 99,9 % idénticos, p. ej., alrededor de 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % idénticos o cualquier rango o valor entre ellos) entre sí sobre por lo menos alrededor de 44 residuos de aminoácidos consecutivos (p.

ej., **SEQ ID NO: 75**). En algunas formas de realización, dos o más proteínas TFL1 pueden ser sustancialmente idénticas a través de residuos de aminoácidos consecutivos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 a alrededor de 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 171, 172 o más de las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NO: 71**.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en una computadora, las coordenadas de la subsecuencia se designan si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de prueba en relación con la secuencia de referencia, en función de los parámetros del programa designados.

El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación es bien conocido por los expertos en la técnica, y se puede realizar mediante herramientas tales como el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, y opcionalmente, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos, tales como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA, disponibles como parte del paquete GCG® Wisconsin Package® (Accelrys Inc., San Diego, CA). Una "fracción de identidad" para segmentos alineados de una secuencia de prueba y una secuencia de referencia es el número de componentes idénticos que comparten las dos secuencias alineadas dividido por el número total de componentes en el segmento de la secuencia de referencia, por ejemplo, la secuencia de referencia completa o una parte definida más pequeña de la secuencia de referencia. El porcentaje de identidad de secuencia se representa como la fracción de identidad multiplicada por 100. La comparación de una o más secuencias de polinucleótidos puede ser con una secuencia de polinucleótidos de longitud completa o una parte de la misma, o con una secuencia de polinucleótidos más larga. Para los fines de esta invención, el "porcentaje de identidad" también puede determinarse usando BLASTX versión 2.0 para secuencias de nucleótidos traducidas, y BLASTN versión 2.0, para secuencias de polinucleótidos.

Dos secuencias de nucleótidos también pueden considerarse sustancialmente complementarias cuando las dos secuencias se hibridan entre sí en condiciones rigurosas. En algunas formas de realización, dos secuencias de nucleótidos que se consideran sustancialmente complementarias se hibridan entre sí en condiciones altamente rigurosas.

5 Las "condiciones de hibridación rigurosas" y las "condiciones de lavado de hibridación rigurosas" en el contexto de los experimentos de hibridación de ácidos nucleicos tales como las hibridaciones Southern y Northern dependen de la secuencia, y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. En Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Acid Probes*, parte I, capítulo 2, 10 "Descripción general de los principios de hibridación y la estrategia de los ensayos de sonda de ácido nucleico", Elsevier, Nueva York (1993), se encuentra una guía completa sobre la hibridación de ácidos nucleicos. En general, las condiciones de hibridación y lavado altamente rigurosas se seleccionan para que sean alrededor de 5°C más bajas que el punto de fusión térmica ( $T_m$ ) para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos.

15 La  $T_m$  es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50 % de la secuencia diana se hibrida en una sonda perfectamente coincidente. Se seleccionan condiciones muy rigurosas para que sean iguales a la  $T_m$  para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de secuencias de nucleótidos complementarias que tienen más de 100 residuos complementarios en un filtro en 20 un Southern o Northern blot es formamida al 50 % con 1 mg de heparina a 42°C, donde la hibridación se lleva a cabo durante la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado muy rigurosas es NaCl 0,15 M a 72°C durante alrededor de 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado de SSC 0,2x a 65°C durante 15 minutos (ver Sambrook, más abajo, para obtener una descripción del tampón SSC). A menudo, un lavado 25 de alta rigurosidad está precedido por un lavado de baja rigurosidad, para eliminar la señal de la sonda de fondo. Un ejemplo de un lavado de rigurosidad media para una dupla de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es SSC 1x a 45°C durante 15 minutos. Un ejemplo de un lavado de baja rigurosidad para una dupla de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es SSC 4–6x a 40°C durante 15 minutos. Para sondas cortas (p. ej., alrededor de 10 a 50 nucleótidos), 30 las condiciones rigurosas típicamente implican concentraciones de sal de menos de alrededor de 1,0 M de iones de Na, típicamente alrededor de 0,01 a 1,0 M de concentración de iones de Na (u otras sales) a un pH de 7,0 a 8,3, y la temperatura es típicamente de por lo menos alrededor de 30°C. También se pueden lograr condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizadores, tales como la formamida. En general, una relación señal a ruido de 2x (o

superior) a la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica la detección de una hibridación específica. Las secuencias de nucleótidos que no se hibridan entre sí en condiciones rigurosas siguen siendo sustancialmente idénticas si las proteínas que codifican son sustancialmente idénticas. Esto puede ocurrir, por ejemplo, cuando se crea una copia de una secuencia de nucleótidos utilizando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético.

Una construcción de polinucleótidos y/o ácidos nucleicos recombinantes de esta invención (p. ej., casetes de expresión y/o vectores) puede optimizarse por codones para la expresión. En algunas formas de realización, los polinucleótidos, las construcciones de ácido nucleico, los casetes de expresión y/o vectores de los sistemas de edición de la invención (p. ej., que comprenden o codifican un dominio de unión de ADN específico de secuencia (p. ej., un dominio de unión de ADN específico de secuencia de una endonucleasa guiada por polinucleótidos, una nucleasa con dedos de zinc, una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN, conforme a sus siglas en inglés), una proteína Argonaute y/o una endonucleasa CRISPR–Cas (p. ej., proteína efectora CRISPR–Cas) (por ejemplo, una proteína efectora CRISPR–Cas Tipo I, una proteína efectora CRISPR–Cas Tipo II, una proteína efectora CRISPR–Cas Tipo III, una proteína efectora CRISPR–Cas Tipo IV, una proteína efectora CRISPR–Cas Tipo V o una proteína efectora CRISPR–Cas de tipo VI)), una nucleasa (p. ej., una endonucleasa (p. ej., Fok1), una endonucleasa guiada por polinucleótidos, una endonucleasa CRISPR–Cas (p. ej., proteína efectora CRISPR–Cas), una nucleasa con dedos de zinc y/o una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN)), dominios/proteínas de desaminasas (p. ej., adenina desaminasa, citosina desaminasa), un polinucleótido que codifica una proteína o un dominio de transcriptasa inversa, un polinucleótido que codifica un polipéptido de exonucleasa 5'–3' y/o polipéptidos de afinidad, etiquetas peptídicas, etc.) pueden optimizarse por codones para la expresión en una planta. En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos, polinucleótidos, casetes de expresión y/o vectores de optimizados por codones de la invención tienen alrededor de 70 % a alrededor de 99,9 % (por ej., 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % o 100 %) de identidad o más con respecto a los ácidos nucleicos, polinucleótidos, casetes de expresión, y/o vectores de referencia, que no se han optimizado por codones.

Una construcción de polinucleótido o ácido nucleico de la invención se puede asociar operativamente con una diversidad de promotores y/u otros elementos reguladores para la

expresión en una planta y/o una célula de una planta. Por lo tanto, en algunas formas de realización, una construcción de polinucleótido o ácido nucleico de esta invención puede comprender además uno o más promotores, intrones, mejoradores y/o terminadores unidos operativamente a una o más secuencias de nucleótidos. En algunas formas de realización, un promotor puede asociarse operativamente con un intrón (p. ej., promotor e intrón Ubi1). En algunas formas de realización, un promotor asociado con un intrón puede denominarse "región promotora/de promotor" (p. ej., promotor e intrón Ubi1).

Por "unido operativamente" o "asociado operativamente" como se usa en el presente documento con referencia a los polinucleótidos, se entiende que los elementos indicados están funcionalmente relacionados entre sí y también están generalmente relacionados físicamente. Por lo tanto, el término "unido operativamente" o "asociado operativamente", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de nucleótidos en una sola molécula de ácido nucleico que están funcionalmente asociadas. Por lo tanto, una primera secuencia de nucleótidos que está unida operativamente a una segunda secuencia de nucleótidos significa una situación en la que la primera secuencia de nucleótidos se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, un promotor está asociado operativamente con una secuencia de nucleótidos si el promotor efectúa la transcripción o expresión de dicha secuencia de nucleótidos. Los expertos en la técnica apreciarán que las secuencias de control (por ejemplo, el promotor) no necesitan ser contiguas con la secuencia de nucleótidos a la que está asociadas operativamente, siempre que las secuencias de control funcionen para dirigir su expresión. Así, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias de ácido nucleico intermedias no traducidas, aunque transcritas, entre un promotor y la secuencia de nucleótidos, y el promotor aún puede considerarse "unido operativamente" a la secuencia de nucleótidos.

Como se usa en el presente documento, el término "unido", con referencia a los polipéptidos, se refiere a la unión de un polipéptido a otro. Un polipéptido puede unirse a otro polipéptido (en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal) directamente (p. ej., a través de un enlace peptídico) o a través de un enlazador (p. ej., un enlazador peptídico). La fusión directa de dos polipéptidos (p. ej., una unión directa) se refiere a la unión covalente de un residuo de aminoácido de un primer polipéptido de los dos polipéptidos, a un residuo de aminoácido de un segundo polipéptido de los dos polipéptidos, sin un elemento intermedio entre los dos residuos de aminoácidos. Por ejemplo, el primer y el segundo polipéptidos pueden estar unidos directamente a través de un enlace peptídico entre el primer y el segundo polipéptidos sin un elemento intermedio (p. ej., un enlazador) entre el primer y el segundo

polipéptidos. Dos polipéptidos que se fusionan directamente (por ejemplo, una unión indirecta) se refieren a un elemento intermedio (por ejemplo, un enlazador, tal como un enlazador peptídico) que está presente entre los dos polipéptidos y está unido covalentemente a cada uno; opcionalmente el elemento intermedio puede unir un extremo de un primer polipéptido de los dos polipéptidos, a un extremo del segundo polipéptido de los dos polipéptidos.

Una “proteína de fusión” como se utiliza en el presente documento se refiere a dos o más polipéptidos que están unidos covalentemente (por ejemplo, directa o indirectamente) de modo que se transcriben y traducen como una sola unidad y, por lo tanto, producen un solo polipéptido que comprende los dos o más polipéptidos. En algunas formas de realización, los dos o más polipéptidos pueden estar codificados de forma natural por genes separados, si bien, en forma de una proteína de fusión, están codificados por un solo gen.

El término "enlazador" se reconoce en la técnica, y se refiere a un grupo químico, o una molécula que une dos moléculas o restos, por ejemplo, dos dominios de una proteína de fusión, tal como, por ejemplo, un polipéptido o dominio de unión de ADN y una etiqueta peptídica y/o una transcriptasa inversa y un polipéptido de afinidad que se une a la etiqueta peptídica; o un polipéptido o dominio de endonucleasa de ADN y una etiqueta peptídica y/o una transcriptasa inversa y un polipéptido de afinidad que se une a la etiqueta peptídica. Un enlazador puede estar compuesto por una sola molécula de unión, o puede comprender más de una molécula de unión. En algunas formas de realización, el enlazador puede ser una molécula orgánica, un grupo, un polímero o un resto químico tal como un resto orgánico bivalente. En algunas formas de realización, el enlazador puede ser un aminoácido, o puede ser un péptido. En algunas formas de realización, el enlazador es un péptido.

En algunas formas de realización, un enlazador peptídico útil con esta invención puede ser de alrededor de 2 a alrededor de 100 o más aminoácidos de longitud, por ejemplo, alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o más aminoácidos de longitud (p. ej., alrededor de 2 a alrededor de 40, alrededor de 2 a alrededor de 50, alrededor de 2 a alrededor de 60, alrededor de 4 a alrededor de 40, alrededor de 4 a alrededor de 50, alrededor de 4 a alrededor de 60, alrededor de 5 a alrededor de 40, alrededor de 5 a alrededor de 50, alrededor de 5 a alrededor de 60, alrededor de 9 a alrededor de 40, alrededor de 9 a alrededor de 50, alrededor de 9 a alrededor de 60, alrededor de 10 a

alrededor de 40, alrededor de 10 a alrededor de 50, alrededor de 10 a alrededor de 60, o alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 aminoácidos a alrededor de 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o más aminoácidos de longitud (p. ej., alrededor de 105, 110, 115, 120, 130, 140 150 o más aminoácidos de longitud). En algunas formas de realización, un enlazador peptídico puede ser un enlazador GS.

Como se usa en el presente documento, el término "unido", con referencia a polinucleótidos, se refiere a la unión de un polinucleótido a otro. En algunas formas de realización, dos o más moléculas de polinucleótidos pueden unirse mediante un enlazador que puede ser una molécula orgánica, un grupo, un polímero o un resto químico tal como un resto orgánico bivalente. Un polinucleótido puede unirse o fusionarse con otro polinucleótido (en el extremo 5' o en el extremo 3') a través de un enlace o una unión covalente o no covalente, incluido, por ejemplo, el emparejamiento de bases de Watson–Crick, o a través de uno o más nucleótidos de unión. En algunas formas de realización, se puede insertar un motivo polinucleotídico de una determinada estructura dentro de otra secuencia de polinucleótido (p. ej., extensión de la estructura de horquilla en el ARN guía). En algunas formas de realización, los nucleótidos de unión pueden ser nucleótidos naturales. En algunas formas de realización, los nucleótidos de unión pueden ser nucleótidos no naturales. Dos polinucleótidos que se fusionan directamente (por ejemplo, una unión directa) se refiere a la unión covalente de un nucleótido de un primer polinucleótido de los dos polinucleótidos a un nucleótido de un segundo polinucleótido de los dos polinucleótidos, sin un elemento intermedio entre los dos polinucleótidos. Por ejemplo, el primer y el segundo polinucleótidos pueden estar unidos directamente a través de un enlace de fosfodiéster entre el primer y el segundo polinucleótidos sin un elemento intermedio (por ejemplo, un enlazador) entre el primer y el segundo polinucleótidos. Dos polinucleótidos que se fusionan directamente (por ejemplo, una unión indirecta) se refiere a un elemento intermedio (por ejemplo, un enlazador tal como un enlazador de polinucleótido) que está presente entre los dos polinucleótidos y está unido covalentemente a cada uno; opcionalmente, el elemento intermedio une un extremo de un primer polinucleótido de los dos polinucleótidos a un extremo del segundo polinucleótido de los dos polinucleótidos.

Un "promotor" es una secuencia de nucleótidos que controla o regula la transcripción de una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, una secuencia de codificación) que está

operativamente asociada con el promotor. La secuencia codificante controlada o regulada por un promotor puede codificar un polipéptido y/o un ARN funcional. Normalmente, un "promotor" se refiere a una secuencia de nucleótidos que contiene un sitio de unión para la ARN polimerasa II y dirige la iniciación de la transcripción. En general, los promotores se encuentran 5', o corriente ascendente, con respecto al inicio de la región codificante de la secuencia codificante correspondiente. Un promotor puede comprender otros elementos que actúen como reguladores de la expresión génica; por ejemplo, una región de promotor. Estos incluyen una secuencia de consenso de caja TATA y, a menudo, una secuencia de consenso de caja CAAT (Breathnach y Chambon, (1981), *Annu. Rev. Biochem.* 50: 349). En plantas, la caja CAAT puede ser sustituida por la caja AGGA (Messing et al., (1983), en *Genetic Engineering of Plants*, T. Kosuge, C. Meredith and A. Hollaender (eds.), Plenum Press, pp. 211 –227).

Los promotores útiles con esta invención pueden incluir, por ejemplo, promotores constitutivos, inducibles, regulados temporalmente, regulados por el desarrollo, regulados químicamente, preferidos de tejido y/o específicos de tejido para el uso en la preparación de moléculas de ácido nucleico recombinante, p. ej., "construcciones de ácido nucleico sintético" o "complejo de proteína–ARN". Estos diversos tipos de promotores son conocidos en la técnica.

La elección del promotor puede variar en función de los requisitos temporales y espaciales para la expresión, y también puede variar en función de la célula huésped que se va a transformar. Los promotores de muchos organismos diferentes son bien conocidos en la técnica. Sobre la base del amplio conocimiento presente en la técnica, se puede seleccionar el promotor apropiado para el organismo huésped particular de interés. Así, por ejemplo, se sabe mucho acerca de los promotores corriente ascendente de los genes expresados de forma altamente constitutiva en organismos modelo, y se puede acceder fácilmente a dicho conocimiento e implementarlo en otros sistemas según corresponda.

En algunas formas de realización, se puede usar un promotor funcional en una planta con las construcciones de esta invención. Los ejemplos no limitativos de un promotor útil para conducir la expresión en una planta incluyen el promotor del gen de la subunidad pequeña de RubisCo 1 (PrbcS1), el promotor del gen de la actina (Pactin), el promotor del gen de la nitrato reductasa (Pnr) y el promotor del gen de la anhidrasa carbónica duplicado 1 (Pdca1) (ver Walker et al. *Plant Cell Rep.* 23: 727–735 (2005); Li et al. *Gene* 403: 132–142 (2007); Li et al. *Mol Biol Rep.*, 37: 1143–1154 (2010)). PrbcS1 y Pactin son promotores constitutivos, y Pnr y Pdca1 son promotores inducibles. Pnr es inducido por nitrato y

reprimido por amonio (Li et al., *Gene*, 403: 132–142 (2007)), y Pdca1 es inducido por sal (Li et al. *Mol Biol. Rep.* 37: 1143–1154 (2010)). En algunas formas de realización, un promotor útil con esta invención es el promotor de ARN polimerasa II (Pol II). En algunas formas de realización, un promotor U6 o un promotor 7SL de *Zea mays* pueden ser útiles con

5 construcciones de esta invención. En algunas formas de realización, el promotor U6c y/o el promotor 7SL de *Zea mays* pueden ser útiles para conducir la expresión de un ácido nucleico guía. En algunas formas de realización, un promotor U6c, un promotor U6i y/o un promotor 7SL de *Glycine max* pueden ser útiles con construcciones de esta invención. En algunas formas de realización, el promotor U6c, el promotor U6i y/o el promotor 7SL de *Glycine max*  
10 pueden ser útiles para conducir la expresión de un ácido nucleico guía.

Ejemplos de promotores constitutivos útiles para plantas incluyen, sin limitación, el promotor del virus Cestrum (cmp) (Patente de los Estados Unidos Nro. 7.166.770), el promotor de actina 1 del arroz (Wang et al. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12:3399–3406; así como Patente de los Estados Unidos Nro. 5.64.876), promotor de CaMV 35S (Odell et al. (1985)  
15 *Nature* 313: 810–812), promotor de CaMV 19S (Lawton et al. (1987) *Plant Mol. Biol.* 9:315–324), promotor nos (Ebert et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84:5745–5749), promotor Adh (Walker et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6624–6629), promotor de sacarosa sintasa (Yang & Russell (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4144–4148), y el promotor de ubiquitina. El promotor constitutivo derivado de la ubiquitina se acumula en muchos tipos de  
20 células. Se han clonado promotores de ubiquitina de varias especies de plantas para su uso en plantas transgénicas, por ejemplo, girasol (Binet et al., 1991. *Plant Science* 79: 87–94), maíz (Christensen et al., 1989. *Plant Molec. Biol.* 12: 619–632), y *Arabidopsis* (Norris et al. 1993. *Plant Molec. Biol.* 21: 895–906). El promotor de ubiquitina de maíz (UbiP) se ha desarrollado en sistemas transgénicos de monocotiledóneas, y su secuencia y sus vectores  
25 contruidos para la transformación de monocotiledóneas se describen en la Publicación de Patente EP 0 342 926. El promotor de ubiquitina es adecuado para la expresión de las secuencias de nucleótidos de la invención en plantas transgénicas, especialmente monocotiledóneas. Además, los casetes de expresión de promotores descritos por McElroy et al. (*Mol. Gen. Genet.* 231: 150–160 (1991)) pueden modificarse fácilmente para la  
30 expresión de las secuencias de nucleótidos de la invención y son particularmente adecuados para su uso en huéspedes monocotiledóneas.

En algunas formas de realización, se pueden usar promotores específicos de tejido/preferidos de tejido para la expresión de un polinucleótido heterólogo en una célula vegetal. Los patrones de expresión preferidos o específicos de tejido incluyen, entre otros,

específicos o preferidos tejido verde, específicos o preferidos de raíz, específicos o preferidos de tallo, específicos o preferidos de flor, o específicos o preferidos de polen. Los promotores adecuados para la expresión en tejido verde incluyen muchos que regulan genes implicados en la fotosíntesis, y muchos de estos se han clonado a partir de monocotiledóneas y

5 dicotiledóneas. En una forma de realización, un promotor útil con la invención es el promotor PEPC de maíz del gen de la fosfoenol carboxilasa (Hudspeth & Grula, *Plant Molec. Biol.* 12: 579–589 (1989)). Los ejemplos no limitativos de promotores específicos de tejido incluyen aquellos asociados con genes que codifican las proteínas de almacenamiento de semillas (tales como  $\beta$ -conglucina, cruciferina, napina y faseolina), zeína o proteínas de cuerpo  
10 oleoso (tales como oleosina), o proteínas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos (incluida la proteína portadora de acilo, estearoil-ACP desaturasa y ácido graso desaturasa (fad 2–1)), y otros ácidos nucleicos expresados durante el desarrollo del embrión (tales como Bce4; ver, por ejemplo, Kridl et al. (1991) *Seed Sci. Res.* 1: 209–219, así como la Patente EP Nro. 255378). Los promotores específicos de tejido o preferenciales de tejido útiles para la  
15 expresión de las secuencias de nucleótidos de la invención en plantas, particularmente maíz, incluyen pero no se limitan a aquellos que dirigen la expresión en raíz, médula, hoja o polen. Dichos promotores se describen, por ejemplo, en el documento WO 93/07278, incorporado aquí como referencia en su totalidad. Otros ejemplos no limitativos de promotores específicos de tejido o preferidos de tejido útiles con la invención son el promotor rubisco de algodón  
20 descrito en la Patente de EE.UU. 6.040.504; el promotor de sacarosa sintasa de arroz descrito en la Patente de EE.UU. 5.604.121; el promotor específico de raíz descrito por de Framond (FEBS 290:103–106 (1991); EP 0 452 269 de Ciba–Geigy); el promotor específico de tallo descrito en la Patente de EE.UU. 5.625.136 (de Ciba–Geigy) y que dirige la expresión del gen *trpA* del maíz; el promotor del virus del enrollamiento de la hoja amarilla  
25 *cestrum* descrito en el documento WO 01/73087; y promotores preferidos o específicos de polen que incluyen, entre otros, ProOsLPS10 y ProOsLPS11 de arroz (Nguyen et al. *Plant Biotechnol. Reports* 9(5):297–306 (2015)), ZmSTK2\_USP de maíz (Wang et al. *Genome* 60 (6): 485–495 (2017)), LAT52 y LAT59 de tomate (Twell et al. *Development* 109 (3): 705–713 (1990)), Zm13 (Patente de EE. UU. Nro. 10.421.972), promotor PLA<sub>2</sub>- $\delta$  de *Arabidopsis*  
30 (Patente de EE. UU. Nro. 7.141.424), y/o el promotor ZmC5 de maíz (Publicación Internacional PCT Nro. WO1999/042587).

Ejemplos adicionales de promotores preferidos de tejido o específicos de tejido vegetal incluyen, entre otros, los elementos *cis* específicos de pelo de raíz (RHEs) (Kim et al. *The Plant Cell* 18: 2958–2970 (2006)), los promotores específicos de raíz RCc3 (Jeong et al.

*Plant Physiol.* 153: 185–197 (2010)) y RB7 (Patente de los Estados Unidos Nro. 5459252), el promotor de lectina (Lindstrom et al. (1990) *Der. Genet.* 11:160–167; y Vodkin (1983) *Prog. Clin. Biol. Res.* 138:87–98), el promotor de alcohol deshidrogenasa 1 de maíz (Dennis et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:3983–4000), S-adenosil-L-metionina sintetasa (SAMS) (Vander Mijnsbrugge et al. (1996) *Plant and Cell Physiology*, 37(8): 1108–1115), promotor del complejo de luz del maíz (Bansal et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3654–3658), el promotor de proteína de choque de calor del maíz (O'Dell et al. (1985) *EMBO J.* 5:451–458; y Rochester et al. (1986) *EMBO J.* 5:451–458), el promotor de RuBP carboxilasa de subunidad pequeña de la arveja (Cashmore, "Genes nucleares que codifican la subunidad pequeña de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa" pp. 29–39, en: *Genetic Engineering of Plants* (Hollaender ed., Plenum Press 1983; y Poulsen et al. (1986) *Mol. Gen. Genet.* 205:193–200), el promotor de manopina sintasa de plásmido Ti (Langridge et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3219–3223), promotor de nopalina sintasa de plásmido Ti (Langridge et al. (1989), supra), el promotor de calcona isomerasa de la petunia (van Tunen et al. (1988) *EMBO J.* 7: 1257–1263), promotor de proteína 1 rica en glicina del poroto (Keller et al. (1989) *Genes Dev.* 3: 1639–1646), promotor CaMV 35S truncado (O'Dell et al. (1985) *Nature* 313: 810–812), promotor de patatina de la papa (Wenzler et al. (1989) *Plant Mol. Biol.* 13: 347–354), promotor de células de raíz (Yamamoto et al. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18: 7449), promotor de zeína de maíz (Kriz et al. (1987) *Mol. Gen. Genet.* 207: 90–98; Langridge et al. (1983) *Cell* 34: 1015–1022; Reina et al. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18: 6425; Reina et al (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:7449 y Wandelt et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 2354), promotor de globulina-1 (Belanger et al. (1991) *Genetics* 129: 863–872), promotor cab de  $\alpha$ -tubulina (Sullivan et al. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 215: 431–440), promotor PEPCasa (Hudspeth & Grula (1989) *Plant Mol. Biol.* 12: 579–589), promotores asociados al complejo del gen R (Chandler et al. (1989) *Plant Cell* 1: 1175–1183), y promotores de calcona sintasa (Franken et al. (1991) *EMBO J.* 10: 2605–2612).

Útil para la expresión específica de semillas es el promotor de vicilina de la arveja (Czako et al. (1992) *Mol. Gen. Genet.* 235: 33–40; así como los promotores específicos de semillas descritos en la Patente de EE.UU. Nro. 5.625.136. Promotores útiles para la expresión en hojas maduras son aquellos que se cambian al comienzo de la senescencia, tales como el promotor SAG de *Arabidopsis* (Gan et al. (1995) *Science* 270: 1986–1988).

Además, pueden usarse promotores funcionales en cloroplastos. Los ejemplos no limitantes de tales promotores incluyen el gen 9 5' UTR del bacteriófago T3 y otros promotores descritos en la Patente de EE.UU. Nro. 7.579.516. Otros promotores útiles con

la invención incluyen, sin limitación, el promotor de carboxilasa de RuBP de la subunidad pequeña S-E9 y el promotor del gen inhibidor de la tripsina de Kunitz (Kti3).

Los elementos reguladores adicionales útiles con esta invención incluyen, entre otros, intrones, mejoradores, secuencias de terminación y/o regiones no traducidas en 5' y 3'.

5 Un intrón útil con esta invención puede ser un intrón identificado y aislado de una planta y luego insertado en un casete de expresión para usar en la transformación de una planta. Como entenderán los expertos en la técnica, los intrones pueden comprender las secuencias requeridas para la autoescisión y se incorporan en las construcciones de ácidos nucleicos/casetes de expresión en marco. Se puede usar un intrón como espaciador para  
10 separar múltiples secuencias que codifican proteínas en una construcción de ácido nucleico, o se puede usar un intrón dentro de una secuencia que codifica proteína para, por ejemplo, estabilizar el ARNm. Si se usan dentro de una secuencia de codificación de proteína, se insertan "en marco" con los sitios de escisión incluidos. Los intrones también se pueden asociar con promotores para mejorar o modificar la expresión. A modo de ejemplo, una  
15 combinación de promotor/intrón útil con esta invención incluye, sin limitación, aquella del promotor e intrón Ubi1 de maíz (ver, por ejemplo, **SEQ ID NO: 21** y **SEQ ID NO: 22**).

Los ejemplos no limitantes de intrones útiles con la presente invención incluyen intrones del gen ADHI (por ejemplo, los intrones 1, 2 y 6 de Adh1-S), el gen de la ubiquitina (Ubi1), el gen de la subunidad pequeña RuBisCO (rbcS), el gen de la subunidad grande de  
20 RuBisCO (rbcL), el gen de la actina (p. ej., intrón de actina-1), el gen de la piruvato deshidrogenasa quinasa (pdk), el gen de la nitrato reductasa (nr), el gen de la anhidrasa carbónica duplicada 1 (Tdca1), el gen *psbA*, el gen *atpA*, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas formas de realización, un polinucleótido y/o una construcción de ácido  
25 nucleico de la invención puede ser un "casete de expresión" o puede estar comprendido dentro de un casete de expresión. Como se usa aquí, "casete de expresión" significa una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende, por ejemplo, uno o más polinucleótidos de la invención (por ejemplo, un polinucleótido que codifica un dominio de unión de ADN específico de secuencia, un polinucleótido que codifica un dominio o una  
30 proteína desaminasa, un polinucleótido que codifica una proteína o dominio de transcriptasa inversa, un polinucleótido que codifica un polipéptido o dominio de exonucleasa 5'-3', un ácido nucleico guía y/o un patrón de transcriptasa inversa (RT), donde los polinucleótidos están asociados operativamente con una o más secuencias de control (p. ej., un promotor, un terminador y similares). Por lo tanto, en algunas formas de realización, se pueden

proporcionar uno o más casetes de expresión, que están diseñados para expresar, por ejemplo, una construcción de ácido nucleico de la invención (p. ej., un polinucleótido que codifica un dominio de unión de ADN específico de secuencia), un polinucleótido que codifica un polipéptido/dominio de nucleasa, un polinucleótido que codifica una proteína/dominio de desaminasa, un polinucleótido que codifica una proteína/dominio de transcriptasa inversa, un polinucleótido que codifica un polipéptido/dominio de exonucleasa 5'-3', un polinucleótido que codifica una etiqueta peptídica y/o un polinucleótido que codifica un polipéptido de afinidad y similares, o que comprende un ácido nucleico guía, un ácido nucleico guía extendido y/o un patrón de RT, y similares). Cuando un casete de expresión de la presente invención comprende más de un polinucleótido, los polinucleótidos se pueden unir operativamente a un solo promotor que dirige la expresión de todos los polinucleótidos, o los polinucleótidos se pueden unir operativamente a uno o más promotores separados (por ejemplo, tres polinucleótidos pueden ser conducidos por uno, dos o tres promotores en cualquier combinación). Cuando se usan dos o más promotores separados, los promotores pueden ser el mismo promotor o pueden ser promotores diferentes. Por lo tanto, un polinucleótido que codifica un dominio de unión de ADN específico de secuencia, un polinucleótido que codifica una proteína/dominio de nucleasa, un polinucleótido que codifica una proteína/dominio efector CRISPR-Cas, un polinucleótido que codifica una proteína/dominio de desaminasa, un polinucleótido que codifica un polipéptido/dominio de transcriptasa inversa (por ejemplo, ADN polimerasa dependiente de ARN) y/o un polinucleótido que codifica un polipéptido/dominio de exonucleasa 5'-3', un ácido nucleico guía, un ácido nucleico guía extendido y/o un patrón de RT, cuando se incluyen en un solo casete de expresión, pueden estar cada uno unidos operativamente a un solo promotor, o a promotores separados en cualquier combinación.

Un casete de expresión que comprende una construcción de ácido nucleico de la invención puede ser quimérico, lo que significa que por lo menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a por lo menos uno de sus otros componentes (p. ej., un promotor del organismo huésped unido operativamente a un polinucleótido de interés para ser expresado en el organismo huésped, donde el polinucleótido de interés es de un organismo diferente al huésped o no se encuentra normalmente en asociación con ese promotor). Un casete de expresión también puede ser uno que se produzca de forma natural pero que se haya obtenido en una forma recombinante útil para la expresión heteróloga.

Un casete de expresión puede incluir opcionalmente una región de terminación de transcripción y/o traducción (es decir, una región de terminación) y/o una región de

mejorador que es funcional en la célula huésped seleccionada. Se conocen en la técnica una diversidad de terminadores y mejoradores de la transcripción, que están disponibles para su uso en casetes de expresión. Los terminadores de la transcripción son responsables de la terminación de la transcripción y la correcta poliadenilación del ARNm. Una región de terminación y/o la región de mejorador pueden ser nativas de la región de inicio de la transcripción, pueden ser nativas, por ejemplo, de un gen que codifica una proteína de unión de ADN específica de secuencia, un gen que codifica una nucleasa, un gen que codifica una transcriptasa inversa, un gen que codifica una desaminasa, y similares, o pueden ser nativas de una célula huésped, o pueden ser nativas de otra fuente (por ejemplo, extraña o heteróloga, por ejemplo, a un promotor, a un gen que codifica una proteína de unión a ADN específica de secuencia, un gen que codifica una nucleasa, un gen que codifica una transcriptasa inversa, un gen que codifica una desaminasa y similares, o a la célula huésped, o cualquier combinación de los mismos).

Un casete de expresión de la invención también puede incluir un polinucleótido que codifica un marcador seleccionable, que puede usarse para seleccionar una célula huésped transformada. Como se usa en el presente documento, "marcador seleccionable" significa una secuencia de polinucleótidos que, cuando se expresa, imparte un fenotipo distinto a la célula huésped que expresa el marcador y, por lo tanto, permite que dichas células transformadas se distingan de aquellas que no tienen el marcador. Dicha secuencia de polinucleótidos puede codificar un marcador seleccionable o rastreable, según si el marcador confiere un rasgo que puede seleccionarse por medios químicos, tal como mediante el uso de un agente selectivo (p. ej., un antibiótico y similares), o si el marcador es simplemente un rasgo que se puede identificar a través de la observación o la prueba, tal como, por ejemplo, mediante el cribado (por ejemplo, fluorescencia). Muchos ejemplos de marcadores seleccionables adecuados se conocen en la técnica y se pueden usar en los casetes de expresión descritos en el presente documento.

Además de los casetes de expresión, las moléculas/construcciones de ácido nucleico y las secuencias de polinucleótidos descritas en el presente documento se pueden usar en relación con los vectores. El término "vector" se refiere a una composición para transferir, suministrar o introducir un ácido nucleico (o ácidos nucleicos) en una célula. Un vector comprende una construcción de ácido nucleico (p. ej., casete(s) de expresión) que comprende la(s) secuencia(s) de nucleótidos por transferir, suministrar o introducir. Los vectores para uso en la transformación de organismos huéspedes son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de clases generales de vectores incluyen vectores virales, vectores de

plásmidos, vectores de fagos, vectores de fagémidos, vectores de cósmidos, vectores de fósidos, bacteriófagos, cromosomas artificiales, minicírculos o vectores binarios de *Agrobacterium* en forma lineal o circular de cadena doble o sencilla que pueden o pueden no ser autotransmisibles o movilizables. En algunas formas de realización, un vector viral puede

5 incluir, entre otros, un vector viral retroviral, lentiviral, adenoviral, adenoasociado o de herpes simplex. Un vector como se define en el presente documento puede transformar un huésped procariota o eucariota mediante integración en el genoma celular, o puede existir extracromosómicamente (p. ej., plásmido de replicación autónoma con un origen de replicación). Además, se incluyen vectores lanzadera, por los que se entiende un vehículo de

10 ADN capaz, de forma natural o por diseño, de replicarse en dos organismos huéspedes diferentes, que pueden seleccionarse de actinomicetos y especies relacionadas, bacterias y eucariotas (p. ej., células de plantas superiores, mamíferos, levaduras o fúngicas). En algunas formas de realización, el ácido nucleico en el vector está bajo el control de un promotor apropiado u otros elementos reguladores para la transcripción en una célula huésped y está

15 operativamente unido a ellos. El vector puede ser un vector de expresión bifuncional que funcione en múltiples huéspedes. En el caso del ADN genómico, este puede contener su propio promotor y/u otros elementos reguladores, y en el caso del ADNc, este puede estar bajo el control de un promotor apropiado y/u otros elementos reguladores para la expresión en la célula huésped. Por consiguiente, un ácido nucleico o polinucleótido de esta invención

20 y/o los casetes de expresión que comprenden los mismos pueden estar incluidos en vectores como se describe en el presente documento y como se conoce en la técnica.

Como se usan aquí, "contacto", "contactar", "contactado" y variaciones gramaticales de los mismos, se refieren a colocar los componentes de una reacción deseada juntos en condiciones adecuadas para llevar a cabo la reacción deseada (por ejemplo, transformación,

25 control transcripcional, edición del genoma, mellado y/o escisión). Como ejemplo, un ácido nucleico diana puede ponerse en contacto con una proteína de unión de ácido nucleico específica de secuencia (p. ej., endonucleasa guiada por polinucleótido, una endonucleasa CRISPR–Cas (p. ej., proteína efectora CRISPR–Cas), una nucleasa de dedos de zinc, una endonucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN) y/o una proteína

30 Argonaute)) y una desaminasa o una construcción de ácido nucleico que codifica la misma, en condiciones en las que se expresan la proteína de unión a ADN específica de secuencia, la transcriptasa inversa y/o la desaminasa, y la proteína de unión de ADN específica de secuencia se une al ácido nucleico diana, y la transcriptasa inversa y/o la desaminasa pueden fusionarse o bien con la proteína de unión de ADN específica de secuencia, o puede

reclutarse para la proteína de unión de ADN específica de secuencia (a través de, por ejemplo, una etiqueta de péptido fusionada con la proteína de unión de ADN específica de secuencia y una etiqueta de afinidad fusionada con la transcriptasa inversa y/o desaminasa) y, por lo tanto, la desaminasa y/o la transcriptasa inversa se coloca en los alrededores del ácido nucleico diana, para modificar así el ácido nucleico diana. Pueden usarse otros métodos para reclutar transcriptasa inversa y/o desaminasa que aprovechen otras interacciones proteína–proteína, y también pueden usarse interacciones ARN–proteína e interacciones químicas para el reclutamiento de proteína–proteína y proteína–ácido nucleico.

Tal como se usa en el presente documento, "modificar" o "modificación" con referencia a un ácido nucleico diana incluye la edición (p. ej., mutación), modificación covalente, intercambio/sustitución de ácidos nucleicos/bases de nucleótidos, delección, escisión, mellado y/o alteración del control de la transcripción de un ácido nucleico diana. En algunas formas de realización, una modificación puede incluir uno o más cambios de una sola base (SNP) de cualquier tipo.

"Introducir", "introducción", "introducido/a" (y sus variaciones gramaticales) en el contexto de un polinucleótido de interés significa presentar una secuencia de nucleótidos de interés (p. ej., polinucleótido, patrón de RT, una construcción de ácido nucleico y/o un ácido nucleico guía) a una planta, parte de la planta de la misma, o célula de la misma, de tal manera que la secuencia de nucleótidos obtenga acceso al interior de una célula.

Los términos "transformación" o "transfección" pueden usarse indistintamente y, tal como se usan aquí, se refieren a la introducción de un ácido nucleico heterólogo en una célula. La transformación de una célula puede ser estable o transitoria. Por lo tanto, en algunas formas de realización, una célula huésped u organismo huésped (p. ej., una planta) puede transformarse de forma estable con una molécula de polinucleótido/ácido nucleico de la invención. En algunas formas de realización, una célula huésped u organismo huésped puede transformarse transitoriamente con una molécula de polinucleótido/ácido nucleico de la invención.

"Transformación transitoria" en el contexto de un polinucleótido significa que un polinucleótido se introduce en la célula y no se integra en el genoma de la célula.

Por "introducir de forma estable" o "introducido de forma estable" en el contexto de un polinucleótido introducido en una célula se pretende que el polinucleótido introducido se incorpora de forma estable en el genoma de la célula y, por tanto, la célula se transforma de forma estable con el polinucleótido.

"Transformación estable" o "transformado/a de forma estable", como se usa en el presente documento, significa que una molécula de ácido nucleico se introduce en una célula y se integra en el genoma de la célula. De este modo, la molécula de ácido nucleico integrada puede ser heredada por su progenie, más particularmente, por la progenie de múltiples  
5 generaciones sucesivas. "Genoma", como se usa en el presente documento, incluye el genoma nuclear y plástido y, por lo tanto, incluye la integración del ácido nucleico en, por ejemplo, el cloroplasto o el genoma mitocondrial. La transformación estable, como se usa en el presente documento, también puede referirse a un transgén que se mantiene extracromosómicamente, por ejemplo, como un minicromosoma o un plásmido.

10 La transformación transitoria puede detectarse, por ejemplo, mediante un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA, conforme a sus siglas en inglés) o transferencia Western, que puede detectar la presencia de un péptido o polipéptido codificado por uno o más transgenes introducidos en un organismo. La transformación estable de una célula puede detectarse, por ejemplo, mediante un ensayo de hibridación de transferencia Southern del  
15 ADN genómico de la célula con secuencias de ácido nucleico que se hibridan específicamente con una secuencia de nucleótidos de un transgén introducido en un organismo (por ejemplo, una planta). La transformación estable de una célula puede detectarse, por ejemplo, mediante un ensayo de hibridación de transferencia Northern del ARN de la célula con secuencias de ácido nucleico que se hibridan específicamente con una  
20 secuencia de nucleótidos de un transgén introducido en un organismo huésped. La transformación estable de una célula también puede detectarse, por ejemplo, mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otras reacciones de amplificación, como se conoce bien en la técnica, empleando secuencias de cebadores específicas que se hibridan con la(s) secuencia(s) diana de un transgén, lo que produce la amplificación de la secuencia  
25 transgénica, que puede detectarse de acuerdo con métodos estándares. La transformación también puede detectarse mediante secuenciación directa y/o protocolos de hibridación bien conocidos en la técnica.

Por consiguiente, en algunas formas de realización, las secuencias de nucleótidos, los polinucleótidos, las construcciones de ácidos nucleicos y/o los casetes de expresión de la  
30 invención pueden expresarse de forma transitoria y/o pueden incorporarse de forma estable en el genoma del organismo huésped. Por lo tanto, en algunas formas de realización, una construcción de ácido nucleico de la invención (p. ej., uno o más casetes de expresión que comprenden polinucleótidos para la edición como se describe en este documento) puede

introducirse de forma transitoria en una célula con un ácido nucleico guía y, de este modo, no se mantiene ADN en la célula.

Una construcción de ácido nucleico de la invención se puede introducir en una célula vegetal mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica. Los ejemplos no limitativos de métodos de transformación incluyen la transformación a través del suministro de ácidos nucleicos mediado por bacterias (p. ej., a través de *Agrobacterias*), el suministro de ácidos nucleicos mediado por virus, el suministro de ácidos nucleicos mediado por virutas de ácido nucleico o carburo de silicio, el suministro de ácidos nucleicos mediado por liposomas, la microinyección, el bombardeo de micropartículas, transformación mediada por fosfato de calcio, transformación mediada por ciclodextrina, electroporación, transformación mediada por nanopartículas, sonicación, infiltración, captación de ácido nucleico mediada por PEG, así como cualquier otro mecanismo eléctrico, químico, físico (mecánico) y/o biológico que logre la introducción de ácido nucleico en la célula vegetal, incluida cualquier combinación de los mismos. Los procedimientos para transformar organismos eucarióticos y procarióticos son bien conocidos y rutinarios en la técnica y se describen en toda la bibliografía (ver, por ejemplo, Jiang et al. 2013. *Nat. Biotechnol.* 31:233–239; Ran et al. *Nature Protocols* 8:2281–2308 (2013)). Las guías generales para diversos métodos de transformación de plantas conocidos en la técnica incluyen Miki et al. ("Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" in *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R., y Thompson, J. E., Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993), pp. 67–88) y Rakowoczy–Trojanowska (*Cell. Mol. Biol. Lett.* 7:849–858 (2002)).

En algunas formas de realización de la invención, la transformación de una célula puede comprender la transformación nuclear. En otras formas de realización, la transformación de una célula puede comprender la transformación de plástidos (p. ej., transformación de cloroplastos). En aún otras formas de realización, los ácidos nucleicos de la invención pueden introducirse en una célula a través de técnicas de mejoramiento convencionales. En algunas formas de realización, uno o más de los polinucleótidos, casetes de expresión y/o vectores pueden introducirse en una célula vegetal a través de la transformación con *Agrobacterium*.

Por lo tanto, un polinucleótido puede introducirse en una planta, una parte de una planta o una célula vegetal de varias maneras que son bien conocidas en la técnica. Los métodos de la invención no dependen de un método particular para introducir una o más secuencias de nucleótidos en una planta, sino que acceden al interior de la célula. Cuando se va a introducir más de un polinucleótido, se pueden ensamblar como parte de una sola

construcción de ácido nucleico, o como construcciones de ácido nucleico separadas, y se pueden ubicar en la misma o en diferentes construcciones de ácido nucleico. En consecuencia, el polinucleótido se puede introducir en la célula de interés en un solo evento de transformación, o en eventos de transformación separados o, alternativamente, se puede incorporar un polinucleótido en una planta como parte de un protocolo de mejoramiento.

La floración y la arquitectura de las plantas están mediadas por un pequeño grupo de factores reguladores con similitudes estructurales a las proteínas de unión de fosfatidil etanolamina (PEBP, por sus siglas en inglés). Una variante natural en *TFL1* en la frutilla silvestre, por ejemplo, reduce el tiempo de floración (Plant Journal 69, 116–12 (2012)).

Los miembros individuales de la familia de tipo *TFL1* se pueden agrupar en clados *TFL1*, *CEN* y *BFT*, según la identidad de secuencia y la sintenia. La función dominante de los miembros de *TFL1*, *CEN* y *BFT* es regular el tiempo de floración. Sin embargo, existen funciones secundarias distintas asociadas con miembros individuales que se pueden explotar para la mejora de los cultivos. Una función secundaria importante es el control de la determinación del meristemo. Por ejemplo, la modificación de *TFL1* es responsable del fenotipo de autopoda en el tomate, donde la planta cambia el hábito de crecimiento de indeterminado a determinado.

La capacidad de alterar el tiempo de floración y otras características relacionadas en una planta puede ser útil para el mejoramiento y la producción de cultivos agrícolas y hortícolas. La presente invención proporciona plantas, en particular, plantas de la familia de la frambuesa negra, que tienen un tiempo reducido hasta la floración (por ejemplo, tiempo reducido hasta la iniciación de la floración y la producción de frutos), una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de la planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas, para el uso en la producción y el cultivo, así como métodos y composiciones para producir dichas plantas.

Como se describe en el presente documento, las plantas de frambuesa negra que tienen un tiempo reducido hasta la floración (por ejemplo, tiempo reducido hasta la iniciación de la floración y la producción de frutos), una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de la planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas se generan utilizando tecnología de edición que se dirige a los genes *TFL1*. El tiempo hasta la floración en las plantas de frambuesa negra de esta invención se reduce en comparación con las plantas de frambuesa negra sin editar (por ejemplo, una planta de frambuesa negra que no comprende o que está desprovista de la edición). En algunos aspectos, una mutación será una mutación hipomórfica, que puede ser ventajosa si desea que

el tiempo de floración se produzca en una fecha determinada. En algunas formas de realización, las mutaciones útiles para producir dichos fenotipos pueden generarse mediante el truncamiento o la delección completa del polipéptido TFL1. Dicha mutación puede ser una mutación nula, que se espera que tenga el fenotipo de floración temprana más extremo. Otros tipos de mutaciones útiles para la producción de plantas de frambuesa negra que tienen un tiempo reducido hasta la floración, una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de la planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas (o cualquier combinación de las mismas) incluyen sustituciones, delecciones y/o inserciones.

En algunas formas de realización, se proporciona una planta de frambuesa negra o parte de planta de ella, donde la planta de frambuesa negra o parte de planta de ella comprende por lo menos una mutación (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, o más mutaciones) en por lo menos una copia de un gen endógeno que codifica un polipéptido TFL1 (p. ej., en 1, 2, 3, 4 o más copias). En algunas formas de realización, por lo menos una mutación en la planta de frambuesa negra o parte de planta puede ser un alelo nulo. *En algunas formas de realización*, por lo menos una mutación en la planta de frambuesa negra o parte de plante puede ser una mutación negativa dominante, mutación semidominante, mutación de pérdida de función débil, o una mutación hipomórfica. *En algunas formas de realización*, por lo menos una mutación en la planta de frambuesa negra o parte de planta puede ser una mutación no natural. En algunas formas de realización, la por lo menos una mutación produce un gen *TFL1* mutado que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de **SEQ ID NO: 77**, **SEQ ID NO: 78** y/o **SEQ ID NOs: 96–99**, y/o codifica un polipéptido TFL1 mutado que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 79** y/o **SEQ ID NO: 100**.

En algunas formas de realización, una mutación en un gen *TFL1* endógeno puede proporcionar plantas de frambuesa negra que tienen un hábito de crecimiento más determinado en comparación con una planta de tipo silvestre. Las plantas de frambuesa negra de tipo silvestre pueden mostrar un tipo de hábito de crecimiento trepador, en el que las cañas de la planta continúan creciendo durante todo el ciclo de vida de la planta. Una planta de esta invención mostraría, por ejemplo, un hábito de crecimiento más compacto y tupido.

En algunas formas de realización, se proporciona una célula vegetal de frambuesa negra, que comprende un sistema de edición que comprende: (a) una proteína efectora CRISPR–Cas; y (b) un ácido nucleico guía (ARNg, ADNg, ARNcr, ADNcr, ARNsg, ADNsg) que comprende una secuencia espaciadora con complementariedad a un gen objetivo

endógeno que codifica un polipéptido TFL1 en la célula vegetal de frambuesa negra. El sistema de edición puede usarse para generar una mutación en el gen objetivo endógeno que codifica un polipéptido TFL1. En algunas formas de realización, la mutación puede ser una mutación no natural. En algunas formas de realización, un ácido nucleico guía de un sistema de edición puede comprender la secuencia de nucleótidos (una secuencia espaciadora, p. ej., uno o más espaciadores) de **SEQ ID NOs: 76, 80 y/o 81**, de manera opcional, donde el espaciador es **SEQ ID NO: 76**.

En algunas formas de realización, se proporciona una célula vegetal de frambuesa negra que comprende por lo menos una (p. ej., una o más) mutación dentro de un gen *TFL1* endógeno, donde la por lo menos una mutación es una sustitución de base, inserción de base o una delección de base que se introduce usando un sistema de edición que comprende un dominio de unión de ácido nucleico que se une a un sitio objetivo en el gen *TFL1* endógeno, de manera opcional, donde el sitio objetivo está dentro de una región del gen *TFL1*, donde dicha región: comprende una secuencia que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 72–74 y/o SEQ ID NOs: 83–95** y/o codifica una secuencia que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 75**. En algunas formas de realización, donde el sistema de edición además comprende una nucleasa, y el dominio de unión de ácido nucleico se une a un sitio objetivo dentro de una secuencia que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de nucleótidos de **SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, y/o SEQ ID NO: 80** y/o una secuencia que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de la secuencia de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 72–74 y/o SEQ ID NOs: 83–95**, y la por lo menos una mutación se hace luego de la escisión por la nucleasa.

Una mutación en un gen *TFL1* de una planta de frambuesa negra, parte de ella o célula vegetal de frambuesa negra útil para esta invención puede ser cualquier tipo de mutación, que incluye una sustitución de base, una delección de base, y/o una inserción de base, de manera opcional, donde la mutación es una mutación puntual. En algunas formas de realización, una mutación puede ser una mutación no natural. En algunas formas de realización, una mutación puede comprender una sustitución de base a una A, una T, una G, o una C. En algunas formas de realización, una mutación puede ser una delección o inserción de por lo menos un par de bases (p. ej., 1 par de bases a alrededor de 100 pares de bases, o alrededor de 3 pares de bases a alrededor de 200 pares de bases y cualquier rango o valor entre ellos; p. ej., alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,

16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 120, 130, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 150, 160, 170, 180, 190, o 200, y cualquier rango o valor entre ellos), de manera opcional, una delección o inserción de alrededor de 5 a alrededor de 100 nucleótidos consecutivos, o una inserción de un nucleótido, de manera opcional, una inserción de una adenina (A), de manera opcional, una inserción de una A en la posición 3237 con referencia a la secuencia de nucleótidos de **SEQ ID NO: 69**.

En algunas formas de realización, una mutación en un gen *TFL1* endógeno de una planta de frambuesa negra o parte de ella puede ser una delección de por lo menos 3 pares de bases consecutivos de la región del gen *TFL1* que codifica un polipéptido TFL1, donde el gen *TFL1* comprende una secuencia que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NO: 69**, **SEQ ID NO: 70**, y/o **SEQ ID NO: 80**, de manera opcional, donde la delección es de alrededor de 3 pares de bases consecutivos a alrededor de 200 pares de bases consecutivos, de manera opcional, alrededor de 5 pares de bases consecutivos a alrededor de 100 pares de bases consecutivos de una secuencia que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NO: 69** y/o alrededor de 3 pares de bases consecutivos a alrededor de 100, 125, 150, o 200 pares de bases consecutivos (o cualquier valor o rango en el medio de estos) de una secuencia que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NO: 70**. En algunas formas de realización, la delección en un gen *TFL1* como se describe en el presente documento produce un truncamiento C-terminal de por lo menos 1 residuo de aminoácido del extremo C-terminal de una secuencia de polipéptido TFL1 que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de **SEQ ID NO: 71**, de manera opcional, una delección de alrededor de 1 residuo de aminoácido a alrededor de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170 o más residuos de aminoácidos consecutivos (o cualquier valor o rango en el medio de estos) de **SEQ ID NO: 71**.

Un gen *TFL1* endógeno útil con esta invención puede ser cualquier gen *TFL1* que codifica un polipéptido TFL1 involucrado en el proceso de floración de una planta de frambuesa negra. En algunas formas de realización, el gen *TFL1* endógeno puede ser un gen *TFL1* que codifica un polipéptido TFL1. En algunas formas de realización, el gen objetivo

endógeno (p. ej., gen *TFL1* endógeno) al cual una secuencia espaciadora del ácido nucleico guía es complementaria puede: (a) comprender una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia (p. ej., alrededor de 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 100 % de identidad de secuencia; de manera  
5 opcional, alrededor de 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 100 % de identidad de secuencia o alrededor de 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, o 100 % de identidad de secuencia) con respecto a cualquiera de **SEQ ID NO: 69**, **SEQ ID NO: 70**, y/o **SEQ ID NO: 80**, (b) comprender una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de **SEQ ID NOs: 72–74** y/o **SEQ ID NOs: 83–95**, (c) codificar una secuencia que  
10 tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 71**, y/o (d) codificar una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 75**. En algunas formas de realización, una secuencia espaciadora de un ácido nucleico guía de un sistema de edición de esta invención puede comprender una secuencia de nucleótidos de cualquiera de **SEQ ID NOs: 76, 80 y/o 81**.

15 En algunas formas de realización, una planta de frambuesa negra o parte de ella puede comprender uno o más genes *TFL1* endógenos, y uno o más alelos de los uno o más genes pueden comprender una mutación como se describe en el presente documento.

La mutación en un gen *TFL1* endógeno de una planta de frambuesa negra, parte de la planta o célula de la planta puede ser cualquier mutación como se describe en el presente  
20 documento, que incluye una delección de base, una sustitución de base o una inserción de base. En algunas formas de realización, la por lo menos una mutación puede ser una mutación dominante negativa, una mutación semidominante, una mutación de pérdida de función débil, una mutación nula o una mutación hipomórfica, opcionalmente, en donde la por lo menos una mutación da como resultado un alelo nulo. En algunas formas de  
25 realización, por lo menos una mutación puede ser una mutación no natural. En algunas formas de realización, la mutación en un gen *TFL1* puede ser una mutación hipomórfica y da como resultado una sustitución de aminoácido dentro del polipéptido *TFL1* codificado. En algunas formas de realización, la mutación puede ser una inserción o delección en el gen *TFL1* que da como resultado un polipéptido truncado, opcionalmente, una proteína *TFL1* no  
30 detectable (por ejemplo, una mutación nula, un alelo nulo o un noqueo por inactivación). Una mutación de un gen *TFL1* endógeno de una planta, parte de una planta o célula de una planta de frambuesa negra puede hacer que la planta o la planta regenerada a partir de la parte de la planta o célula vegetal tenga un tiempo reducido hasta la floración, una duración más prolongada de la floración, un patrón de crecimiento de la planta más determinado y/o una o

más características de rendimiento mejoradas en comparación con una planta de frambuesa negra que no comprenda la mutación en el gen *TFL1*. En algunas formas de realización, una mutación en un gen *TFL1* endógeno puede dar como resultado un gen *TFL1* mutado que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de **SEQ ID NO: 77**,  
5 **SEQ ID NO: 78** y/o **SEQ ID NOs: 96–99**, y/o que codifica un polipéptido TFL1 mutado que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 79** y/o **SEQ ID NO: 100**.

En algunas formas de realización, el dominio de unión de ácido nucleico de un sistema de edición útil con esta invención puede ser de una endonucleasa guiada por  
10 polinucleótido, una endonucleasa CRISPR–Cas (p. ej., proteína efectora CRISPR–Cas), una nucleasa de dedos de zinc, una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN) y/o una proteína Argonaute. En algunas formas de realización, una nucleasa útil con la invención es una nucleasa de dedos de zinc, una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN), una endonucleasa (p. ej., Fok1) o una proteína efectora CRISPR–  
15 Cas. En algunas formas de realización, una mutación de un gen *TFL1* endógeno se realiza mediante la escisión por un sistema de edición que comprende una nucleasa y un dominio de unión de ácido nucleico que se une a un sitio objetivo dentro de una secuencia que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia que codifica de **SEQ ID NO: 69**, **SEQ ID NO: 70**, y/o **SEQ ID NO: 80**, o que tiene por lo menos 80 % de  
20 identidad de secuencia con respecto a una secuencia que codifica **SEQ ID NO: 71**, y la por lo menos una mutación dentro de un gen *TFL1* se realiza mediante la escisión por la nucleasa, de manera opcional, donde la mutación puede ser una mutación no natural.

En algunas formas de realización, una parte de planta/célula vegetal editada como se describe en el presente documento puede ser regenerada hasta una planta de frambuesa negra,  
25 a fin de proporcionar una planta de frambuesa negra con una mutación en un gen *TFL1* que está implicado en el tiempo de floración, y que tiene tiempo reducido hasta la floración, una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas (p. ej., mayor producción de frutos) en comparación con una planta de frambuesa negra que no comprende la mutación en el gen  
30 *TFL1*. En algunas formas de realización, la planta de frambuesa negra puede comprender un gen *TFL1* mutado que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de **SEQ ID NO: 77**, **SEQ ID NO: 78** y/o **SEQ ID NOs: 96–99**, y/o que codifica un polipéptido TFL1 mutado que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 79** y/o **SEQ ID NO: 100**.

En algunas formas de realización, se proporciona un método para producir/mejorar una planta de frambuesa negra editada libre de transgenes, que comprende: cruzar una planta de frambuesa negra de la presente invención (p. ej., una planta de frambuesa negra que comprende una mutación en una proteína TFL1/gen y que exhibe un tiempo reducido hasta la floración, mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento más determinado y/o uno o más rasgos de rendimiento mejorados), con una planta de frambuesa negra libre de transgenes, de modo de introducir así la por lo menos una mutación en la planta de frambuesa negra que está libre de transgenes; y seleccionar una planta de frambuesa negra de progenie que comprende la por lo menos una mutación y que está libre de transgenes, a fin de producir así una planta de frambuesa negra editada libre de transgenes, de manera opcional, donde la por lo menos una mutación puede ser una mutación no natural.

Además se proporciona un método para proporcionar una pluralidad de plantas de frambuesa negra que tienen un tiempo reducido hasta la floración, una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas, donde el método comprende plantar dos o más plantas de frambuesa negra de la invención (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más plantas de frambuesa negra que comprenden una mutación en una proteína TFL1/gen (que incluye una delección de secuencia codificante) y que tienen un tiempo reducido hasta la floración, una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas) en un área de cultivo (p. ej., a un campo (p. ej., un campo cultivado, un campo agrícola), una cámara de crecimiento, un invernadero, un área recreativa, un césped, y/o el borde de un camino y similares), a fin de proporcionar una pluralidad de plantas de frambuesa negra que tienen un tiempo reducido hasta la floración, una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas en comparación con una pluralidad de plantas de frambuesa negra de control desprovistas de la mutación. En algunas formas de realización, un rasgo o característica de rendimiento mejorado puede ser, por ejemplo, mayor producción de frutos por planta o por hectárea.

En algunas formas de realización, una planta de frambuesa negra (o una pluralidad de plantas de frambuesa negra de esta invención) puede ser autofecundada y/o puede ser cruzada con otra planta de frambuesa negra.

En algunas formas de realización, un método para editar un sitio específico en el genoma de una célula vegetal de frambuesa negra, donde el método comprende: escindir, de manera específica de sitio, un sitio objetivo dentro de un gen *TFL1* endógeno en la célula

vegetal de frambuesa negra, donde el gen *TFL1* endógeno (a) comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 69**, **SEQ ID NO: 70**, y/o **SEQ ID NO: 80**, (b) comprende una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 72–74** y/o **SEQ ID NOs: 83–95**, (c) codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 71**, y/o (d) codifica una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 75**, a fin de generar así una edición en el gen *TFL1* endógeno de la célula vegetal de frambuesa negra y producir una célula vegetal que comprende la edición en el gen *TFL1* endógeno. En algunas formas de realización, la edición produce una mutación, que incluye, sin limitación, una delección, sustitución, o inserción. En algunas formas de realización, la edición puede ser una sustitución de nucleótido a una A, una T, una G, o una C. En algunas formas de realización, la edición produce una mutación no natural. En algunas formas de realización, la edición puede producir un alelo nulo, una mutación negativa dominante, una mutación semidominante, una mutación de pérdida de función débil, una mutación nula (noqueo por desactivación), o una mutación hipomórfica. En algunas formas de realización, la edición es una delección que produce un truncamiento del polipéptido TFL1, o polipéptido TFL1 no detectable, como se describe en el presente documento (p. ej., una mutación nula o noqueo por desactivación). En algunas formas de realización, una edición produce variación en el gel *TFL1* y/o polipéptido TFL1 como se describe en el presente documento. En algunas formas de realización, la edición puede producir un gen *TFL1* mutado que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de **SEQ ID NO: 77**, **SEQ ID NO: 78** y/o **SEQ ID NOs: 96–99**, y/o que codifica un polipéptido TFL1 mutado que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 79** y/o **SEQ ID NO: 100**.

En algunas formas de realización, el método para la edición puede comprender además regenerar una planta de frambuesa negra a partir de la célula vegetal de frambuesa negra que comprende la edición en el gen *TFL1* endógeno, a fin de producir así una planta de frambuesa negra que comprende la edición en el gen *TFL1* endógeno y que tiene un fenotipo de un tiempo reducido hasta la floración, una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas en comparación con una planta de control de frambuesa negra que está desprovista de la edición, de manera opcional, donde la planta de frambuesa negra comprende un gen *TFL1* mutado que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a

cualquiera de **SEQ ID NO: 77**, **SEQ ID NO: 78** y/o **SEQ ID NOs: 96–99**, y/o que codifica un polipéptido TFL1 mutado que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 79** y/o **SEQ ID NO: 100**.

En algunas formas de realización, se proporciona un método para producir una planta de frambuesa negra, donde el método comprende: (a) poner en contacto una población de células vegetales de frambuesa negra que comprenden por lo menos un gen *TFL1* endógeno, con una nucleasa unida a un dominio de unión de ácido nucleico (p. ej., un sistema de edición) que se une a un sitio objetivo en el por lo menos un gen *TFL1* endógeno, donde el por lo menos un gen *TFL1* endógeno: (i) comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 69**, **SEQ ID NO: 70**, y/o **SEQ ID NO: 80**, (ii) comprende una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 72–74** y/o **SEQ ID NOs: 83–95**, (iii) codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 71**, y/o (iv) codifica una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 75**; (b) seleccionar una célula vegetal de frambuesa negra de dicha población que comprende una mutación en el por lo menos un gen *TFL1* endógeno; y (c) cultivar la célula vegetal de frambuesa negra seleccionada hasta una planta de frambuesa negra, de manera opcional, donde la mutación en el por lo menos un gen *TFL1* endógeno produce un alelo nulo del gen *TFL1* endógeno. En algunas formas de realización, la mutación en el por lo menos un gen *TFL1* endógeno puede ser una mutación no natural.

En algunas formas de realización, se proporciona un método para reducir el tiempo hasta la floración en una planta de frambuesa negra o parte de ella, que comprende (a) poner en contacto una célula vegetal de frambuesa negra que comprende un gen *TFL1* endógeno con una nucleasa que se dirige al gen *TFL1* endógeno, donde la nucleasa está unida a un dominio de unión de ácido nucleico que se une a un sitio objetivo en el gen *TFL1* endógeno, donde el gen *TFL1* endógeno: (i) comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 69**, **SEQ ID NO: 70**, y/o **SEQ ID NO: 80**, (ii) comprende una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 72–74** y/o **SEQ ID NOs: 83–95**, (iii) codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 71**, y/o (iv) codifica una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 75**; y (b) cultivar la célula vegetal de frambuesa negra hasta

una planta de frambuesa negra que comprende una mutación en el gen *TFL1* endógeno, a fin de reducir así el tiempo hasta la floración en la planta de frambuesa negra o parte de ella. En algunas formas de realización, la mutación en el por lo menos un gen *TFL1* endógeno puede ser una mutación no natural.

5           En algunas formas de realización, se proporciona un método para alargar (aumentar) la duración de la floración en una planta de frambuesa negra o parte de ella, que comprende (a) poner en contacto una célula vegetal de frambuesa negra que comprende un gen *TFL1* endógeno con una nucleasa que se dirige al gen *TFL1* endógeno, donde la nucleasa está unida a un dominio de unión de ácido nucleico que se une a un sitio objetivo en el gen *TFL1*  
10           endógeno, donde el gen *TFL1* endógeno: (i) comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 69**, **SEQ ID NO: 70**, y/o **SEQ ID NO: 80**, (ii) comprende una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 72–74** y/o **SEQ ID NOs: 83–95**, (iii) codifica una secuencia de aminoácidos que tiene  
15           por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 71**, y/o (iv) codifica una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 75**; y (b) cultivar la célula vegetal de frambuesa negra hasta una planta de frambuesa negra que comprende una mutación en el gen *TFL1* endógeno, a fin de ese modo alargar (aumentar) la duración de la floración en la planta de  
20           frambuesa negra o parte de ella.

          En algunas formas de realización, se proporciona un método para proporcionar un patrón de crecimiento de planta más determinado en una planta de frambuesa negra o parte de ella, que comprende (a) poner en contacto una célula vegetal de frambuesa negra que comprende un gen *TFL1* endógeno con una nucleasa que se dirige al gen *TFL1* endógeno,  
25           donde la nucleasa está unida a un dominio de unión de ácido nucleico que se une a un sitio objetivo en el gen *TFL1* endógeno, donde el gen *TFL1* endógeno: (i) comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 69**, **SEQ ID NO: 70**, y/o **SEQ ID NO: 80**, (ii) comprende una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las  
30           secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 72–74** y/o **SEQ ID NOs: 83–95**, (iii) codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 71**, y/o (iv) codifica una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 75**; y (b) cultivar la célula vegetal de frambuesa negra hasta una planta de frambuesa negra que

comprende una mutación en el gen *TFL1* endógeno, a fin de proporcionar la planta de frambuesa negra o parte de ella que tiene un patrón de crecimiento más determinado.

En algunas formas de realización, se proporciona un método para proporcionar una planta de frambuesa negra o parte de ella que tiene una o más características de rendimiento mejoradas, que comprende (a) poner en contacto una célula vegetal de frambuesa negra que comprende un gen *TFL1* endógeno con una nucleasa que se dirige al gen *TFL1* endógeno, donde la nucleasa está unida a un dominio de unión de ácido nucleico que se une a un sitio objetivo en el gen *TFL1* endógeno, donde el gen *TFL1* endógeno: (i) comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, y/o SEQ ID NO: 80**, (ii) comprende una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 72–74 y/o SEQ ID NOs: 83–95**, (iii) codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 71**, y/o (iv) codifica una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 75**; y (b) cultivar la célula vegetal de frambuesa negra hasta una planta de frambuesa negra que comprende una mutación en el gen *TFL1* endógeno, a fin de proporcionar la planta de frambuesa negra o parte de ella que tiene una o más características de rendimiento mejoradas. En algunas formas de realización, un rasgo o una característica de rendimiento mejorado puede ser, por ejemplo, mayor producción de frutos por planta o por hectárea.

En algunas formas de realización, se proporciona una planta de frambuesa negra o parte de ella que exhibe un fenotipo de cualquier combinación de un tiempo reducido hasta la floración, una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas.

En algunas formas de realización, se proporciona un método para producir una planta de frambuesa negra o parte de ella que comprende por lo menos una célula que tiene un gen *TFL1* endógeno con una mutación, donde el método comprende poner en contacto un sitio objetivo en un gen *TFL1* endógeno en la planta de frambuesa negra o parte de esta, con una nucleasa que comprende un dominio de escisión y un dominio de unión de ADN, donde el dominio de unión de ácido nucleico se une a un sitio objetivo en el gen *TFL1* endógeno, donde el gen *TFL1* endógeno (a) comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de **SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, y/o SEQ ID NO: 80**, (b) comprende una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID**

**NOs: 72–74 y/o SEQ ID NOs: 83–95**, (c) codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 71**, y/o (d) codifica una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 75**, a fin de producir así la planta de frambuesa negra o parte de ella que comprende por lo menos una célula que tiene un gen *TFL1* endógeno con una mutación.

Además se proporciona en el presente documento un método para producir una planta de frambuesa negra o parte de ella que comprende un gen *TFL1* endógeno mutado y exhibe un fenotipo de tiempo reducido hasta la floración, una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas (en una combinación), donde el método comprende poner en contacto un sitio objetivo en un gen *TFL1* endógeno en la planta de frambuesa negra o parte de ella con una nucleasa que comprende un dominio de escisión y un dominio de unión de ADN, donde el dominio de unión de ácido nucleico se une a un sitio objetivo en el gen *TFL1* endógeno, donde el gen *TFL1* endógeno: (a) comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 69**, **SEQ ID NO: 70**, y/o **SEQ ID NO: 80**, (b) comprende una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 72–74 y/o SEQ ID NOs: 83–95**, (c) codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 71**, y/o (d) codifica una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 75**, a fin de producir así la planta de frambuesa negra o parte de ella que comprende un gen *TFL1* endógeno que tiene una mutación y exhibe un fenotipo de tiempo reducido hasta la floración, una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas.

En algunas formas de realización, una nucleasa puede escindir un gen *TFL1* endógeno, de modo de introducir así la mutación en el gen *TFL1* endógeno. Una nucleasa útil con la invención puede ser cualquier nucleasa que puede ser utilizada para editar/modificar un ácido nucleico objetivo. Dichas nucleasas incluyen, sin limitación, una nucleasa de dedos de zinc, nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN), endonucleasa (p. ej., Fok1) y/o una proteína efectora CRISPR–Cas. Asimismo, cualquier dominio de unión de ácido nucleico útil con la invención puede ser cualquier dominio de unión a ADN o dominio de unión a ARN que puede ser utilizado para editar/modificar un ácido nucleico diana.

Dichos dominios de unión de ácido nucleico incluyen, sin limitación, un dedo de zinc, un dominio de unión de ADN de tipo activador de la transcripción (TAL), un Argonaute y/o un dominio de unión de ADN efector CRISPR–Cas.

En algunas formas de realización, un dominio de unión de ácido nucleico (p. ej., dominio de unión de ADN) está comprendido en un polipéptido de unión de ácido nucleico. Una "proteína de unión de ácido nucleico" o un "polipéptido de unión de ácido nucleico" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que se une y/o es capaz de unirse a un ácido nucleico de una manera específica de sitio y/o de secuencia. En algunas formas de realización, un polipéptido de unión de ácido nucleico puede ser un polipéptido de unión de ácido nucleico específico de secuencia (p. ej., un dominio de unión de ADN específico de secuencia) tal como, sin limitación, un polipéptido de unión específico de secuencia y/o dominio de, por ejemplo, una endonucleasa guiada por polinucleótido, una proteína efectora CRISPR–Cas (p. ej., una endonucleasa CRISPR–Cas), una nucleasa de dedos de zinc, una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN) y/o una proteína Argonaute. En algunas formas de realización, un polipéptido de unión de ácido nucleico comprende un polipéptido de escisión (p. ej., un polipéptido de nucleasa y/o dominio) tal como, sin limitación, una endonucleasa (p. ej., Fok1), una endonucleasa guiada por polinucleótido, una endonucleasa CRISPR–Cas, una nucleasa de dedos de zinc, y/o una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN). En algunas formas de realización, el polipéptido de unión de ácido nucleico se asocia con (p. ej., forma un complejo con) una o más moléculas de ácido nucleico, y/o es capaz de asociarse con estas (p. ej., forma un complejo con un ácido nucleico guía como se describe en el presente documento), las que pueden dirigir o guiar el polipéptido de unión de ácido nucleico a una secuencia de nucleótidos objetivo específica (p. ej., un locus génico de un genoma) que es complementaria a las una o más moléculas de ácido nucleico (o una porción o región de las mismas), de modo de provocar así la unión del polipéptido de unión de ácido nucleico a la secuencia de nucleótidos en el sitio objetivo específico. En algunas formas de realización, el polipéptido de unión de ácido nucleico es una proteína efectora CRISPR–Cas como se describe en el presente documento. En algunas formas de realización, se hace referencia específicamente a una proteína efectora CRISPR–Cas por razones de simplicidad, pero se puede utilizar un polipéptido de unión de ácido nucleico como se describe en el presente documento. En algunas formas de realización, una construcción de polinucleótido y/o un ácido nucleico de la invención puede ser un “casete de expresión” o puede estar comprendido dentro de un casete de expresión.

En algunas formas de realización, se proporciona un método de edición de un gen *TFL1* endógeno en una planta o parte de planta, donde el método comprende poner en contacto un sitio objetivo en el gen *TFL1* en la planta o parte de planta, con un sistema de edición de bases de citosina que comprende una citosina desaminasa y un dominio de unión de ácido nucleico que se une a un sitio objetivo en el gen *TFL1*, donde el gen *TFL1* (a) comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, y/o SEQ ID NO: 80**, (b) comprende una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 72–74 y/o SEQ ID NOs: 83–95**, (c) codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 71**, y/o (d) codifica una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 75**, a fin de editar de este modo el gen *TFL1* endógeno en la planta o parte de ella y producir una planta o parte de ella que comprende por lo menos una célula que tiene una mutación en el gen *TFL1* endógeno.

En algunas formas de realización, se proporciona un método de edición de un gen *TFL1* endógeno en una planta o parte de planta, donde el método comprende poner en contacto un sitio objetivo en el gen *TFL1* en la planta o parte de planta con un sistema de edición de bases de adenosina que comprende una adenosina desaminasa y un dominio de unión de ácido nucleico que se une a un sitio objetivo en el gen *TFL1*, donde el gen *TFL1* (a) comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, y/o SEQ ID NO: 80**, (b) comprende una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 72–74 y/o SEQ ID NOs: 83–95**, (c) codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 71**, y/o (d) codifica una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 75**, a fin de editar así el gen *TFL1* endógeno en la planta o parte de ella y producir una planta o parte de ella que comprende por lo menos una célula que tiene una mutación en el gen *TFL1* endógeno.

Una mutación proporcionada por los métodos de la invención puede ser una sustitución, una inserción y/o una delección, de manera opcional, donde la inserción o delección es una mutación en marco, p. ej., una inserción en marco o delección en marco. En algunas formas de realización, la mutación puede ser una delección de alrededor de 1 par de bases, de

manera opcional, alrededor de 3 pares de bases consecutivos a alrededor de 519 pares de bases consecutivos o alrededor de 3 pares de bases consecutivos a alrededor de 2600 pares de bases consecutivos, o cualquier valor o rango entre ellos. En algunas formas de realización, la mutación puede ser una mutación no natural.

5           En otro aspecto, se proporcionan plantas de frambuesa negra o partes de plantas producidas por los métodos de la invención, que comprenden en su genoma uno o más genes endógenos mutados *TFL1* como se describe en el presente documento. En algunas formas de realización, los métodos de la invención producen plantas de frambuesa negra o partes de ellas que tienen un gen endógeno mutado *TLF* que tiene por lo menos 90 % de identidad de  
10           secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 y/o SEQ ID NOs: 96–99**, y/o que codifica un polipéptido TFL1 mutado que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 79 y/o SEQ ID NO: 100**.

          Otro aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico que comprende un gen mutado *TFL1*, donde el gen mutado *TFL1*, cuando se expresa, produce un polipéptido  
15           truncado TFL1 y/o polipéptido TFL1 no detectable. Un aspecto adicional proporciona un ácido nucleico mutado que codifica un polipéptido TFL1, de manera opcional, donde la mutación está comprendida en la región codificante del gen *TFL1*, donde la mutación produce un polipéptido TFL1 truncado o polipéptido TFL1 no detectable.

          En algunas formas de realización, una mutación en un gen endógeno *TLF* puede  
20           producir una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de **SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 y/o SEQ ID NOs: 96–99**, y/o un gen endógeno *TLF* que codifica un polipéptido TFL1 mutado que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 79 y/o SEQ ID NO: 100**. En algunas formas de realización, el gen *TFL1* endógeno mutado comprende una mutación  
25           no natural.

          Además se proporcionan plantas de frambuesa negra que tienen en su genoma uno o más genes *TFL1* que tienen una mutación producida por los métodos de la invención, de manera opcional, donde la plantas de frambuesa negra exhiben un fenotipo de tiempo reducido hasta la floración, una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de  
30           planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas, o cualquiera de sus combinaciones, en comparación con una planta de frambuesa negra que no comprenden la mutación. En algunas formas de realización, la mutación puede ser una mutación no natural. En algunas formas de realización, la mutación en un gen endógeno *TLF* puede producir una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 90 % de identidad de

secuencia con respecto a cualquiera de **SEQ ID NO: 77**, **SEQ ID NO: 78** y/o **SEQ ID NOs: 96–99**, y/o que codifica un polipéptido TFL1 mutado que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 79** y/o **SEQ ID NO: 100**. En algunas formas de realización, el gen *TFL1* endógeno mutado comprende una mutación no natural.

5           En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un método de producción de una planta de frambuesa negra que comprende una mutación en un gen *TFL1* endógeno y por lo menos un polinucleótido de interés, donde el método comprende cruzar una planta de frambuesa negra de la invención que comprende por lo menos una mutación en un gen *TFL1* endógeno (una primera planta de frambuesa negra) con una segunda planta de  
10   frambuesa negra que comprende la por lo menos un polinucleótido de interés, a fin de producir plantas de progenie; y seleccionar plantas de progenie que comprenden por lo menos una mutación en el gen *TFL1* y el por lo menos un polinucleótido de interés, a fin de producir así la planta de frambuesa negra que comprende una mutación en un gen *TFL1* endógeno y por lo menos un polinucleótido de interés.

15           La presente invención además proporciona un método de producción de una planta de frambuesa negra que comprende una mutación en un gen *TFL1* endógeno y por lo menos un polinucleótido de interés, donde el método comprende introducir por lo menos un polinucleótido de interés en una planta de frambuesa negra de la presente invención que comprende por lo menos una mutación en un gen *TFL1*, a fin de producir así la planta de  
20   frambuesa negra que comprende por lo menos una mutación en un gen *TFL1* y por lo menos un polinucleótido de interés.

          En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un método de producción de una planta de frambuesa negra que comprende una mutación en un gen *TFL1* endógeno y por lo menos un polinucleótido de interés, donde el método comprende introducir  
25   por lo menos un polinucleótido de interés en una planta de frambuesa negra de la invención que comprende por lo menos una mutación en un gen *TFL1* endógeno, a fin de producir así la planta de frambuesa negra que comprende por lo menos una mutación en un gen *TFL1* y por lo menos un polinucleótido de interés.

          En algunas formas de realización, además se proporciona un método de producción de  
30   una planta de frambuesa negra que comprende una mutación en un gen *TFL1* endógeno y exhibe un fenotipo de mejorada arquitectura de la planta y/o mejorados rasgos de defensa, donde el método comprende cruzar una primera planta de frambuesa negra, que es una planta de frambuesa negra de la presente invención que comprende por lo menos una mutación en un gen *TFL1*, con una segunda planta de frambuesa negra que exhibe un fenotipo de

mejorada arquitectura de la planta y/o mejorados rasgos de defensa; y seleccionar plantas de progenie que comprenden la mutación en el gen *TFL1* y un fenotipo de mejorada arquitectura de la planta y/o mejorados rasgos de defensa, a fin de producir así la planta de frambuesa negra que comprende una mutación en un gen *TFL1* endógeno y exhibe un fenotipo de mejorada arquitectura de la planta y/o mejorados rasgos de defensa en comparación con una planta de frambuesa negra de control.

Además, se proporciona un método para controlar malezas en un recipiente (por ejemplo, una maceta, una bandeja de semillas y similares), en una cámara de crecimiento, un invernadero, un campo, un área recreativa, un césped o el borde de un camino, donde el método comprende la aplicación de un herbicida a una o más (una pluralidad) plantas de frambuesa negra de la invención que crecen en un recipiente, una cámara de crecimiento, un invernadero, un campo, un área recreativa, un césped o en el borde de un camino, a fin de controlar así las malezas en el recipiente, la cámara de crecimiento, el invernadero, el campo, el área recreativa, el césped o el borde de un camino donde crecen las una o más plantas de frambuesa negra.

En algunas formas de realización, se proporciona un método para reducir la depredación de insectos en una planta, donde el método comprende la aplicación de un insecticida a una o más plantas de frambuesa negra de la invención, opcionalmente, donde las una o más plantas de frambuesa negra crecen en un recipiente, una cámara de crecimiento, un invernadero, un campo, un área recreativa, un césped o en el borde de un camino, de modo de reducir así la depredación de insectos en las una o más plantas de frambuesa negra.

En algunas formas de realización, se proporciona un método para reducir la enfermedad fúngica en una planta, donde el método comprende la aplicación de un fungicida a una o más plantas de frambuesa negra de la invención, opcionalmente, donde las una o más plantas de frambuesa negra crecen en un recipiente, una cámara de crecimiento, un invernadero, un campo, un área recreativa, un césped o en el borde de un camino, de modo de reducir así la enfermedad fúngica en las una o más plantas de frambuesa negra.

Un polinucleótido de interés puede ser cualquier polinucleótido que pueda conferir un fenotipo deseable o modificar de otro modo el fenotipo o genotipo de una planta. En algunas formas de realización, un polinucleótido de interés puede ser un polinucleótido que confiere tolerancia a herbicidas, resistencia a insectos, resistencia a nematodos, resistencia a enfermedades, mayor rendimiento, mayor eficiencia en el uso de nutrientes o resistencia al estrés abiótico.

Por lo tanto, las plantas o los cultivares de plantas que deben tratarse con preferencia de acuerdo con la invención incluyen todas las plantas que, mediante modificación genética, recibieron material genético que imparte propiedades útiles ventajosas ("rasgos") particulares, a estas plantas. Ejemplos de dichas propiedades son un mejor crecimiento de las plantas, vigor, tolerancia al estrés, estabilidad erguida, resistencia al acame, absorción de nutrientes, nutrición de las plantas y/o rendimiento, en particular, crecimiento mejorado, mayor tolerancia a temperaturas altas o bajas, mayor tolerancia a la sequía o a niveles de salinidad del agua o del suelo, mayor rendimiento de la floración, cosecha más fácil, maduración acelerada, mayores rendimientos, mayor calidad y/o mayor valor nutricional de los productos cosechados, mejor vida útil de almacenamiento y/o procesabilidad de los productos cosechados.

Otros ejemplos de tales propiedades son una mayor resistencia contra plagas animales y microbianas, tales como insectos, arácnidos, nematodos, ácaros, babosas y caracoles debido, por ejemplo, a las toxinas formadas en las plantas. Entre las secuencias de ADN que codifican proteínas que confieren propiedades de tolerancia a dichas plagas animales y microbianas, en particular insectos, se hará especial mención al material genético de *Bacillus thuringiensis* que codifica las proteínas Bt ampliamente descritas en la literatura y bien conocidas por los expertos en la técnica. También se hará mención de proteínas extraídas de bacterias tales como *Photorhabdus* (WO97/17432 y WO98/08932). En particular, se hará mención a las proteínas Bt Cry o VIP que incluyen las proteínas CryIA, CryIAb, CryIAC, CryIIA, CryIIIA, CryIIIB2, Cry9c Cry2Ab, Cry3Bb y CryIF o fragmentos tóxicos de las mismas, y también híbridos o combinaciones de las mismas, especialmente la proteína CryIF o híbridos derivados de una proteína CryIF (p. ej., proteínas híbridas CryIA–CryIF o fragmentos tóxicos de las mismas), las proteínas de tipo CryIA o fragmentos tóxicos de las mismas, preferentemente la proteína Cry1Ac o híbridos derivados de la proteína Cry1Ac (p. ej., proteínas híbridas Cry1AbCry1Ac) o la proteína Cry1Ab o Bt2 o fragmentos tóxicos de las mismas, las proteínas Cry2Ae, Cry2Af o Cry2Ag o fragmentos tóxicos de las mismas, proteína CryIA.105 o un fragmento tóxico de la misma, proteína VIP3Aa19, proteína VIP3Aa20, proteínas VIP3A producidas en los eventos de algodón COT202 o COT203, la proteína VIP3Aa o un fragmento tóxico de la misma como se describe en Estruch et al. (1996), Proc Natl Acad Sci USA. 28; 93(11):5389–94, las proteínas Cry como se describe en WO2001/47952, las proteínas insecticidas de *Xenorhabdus* (como se describe en WO98/50427), *Serratia* (particularmente de *S. entomophila*) o cepas de especies de *Photorhabdus*, tales como proteínas Tc de *Photorhabdus* como se describe en el documento

WO98/08932. También se incluye en el presente documento cualquier variante o mutante de cualquiera de estas proteínas que difiera en algunos aminoácidos (1–10, preferentemente 1–5) de cualquiera de las secuencias mencionadas anteriormente, en particular la secuencia de su fragmento tóxico, o que se fusionen con un péptido de tránsito, tal como un péptido de tránsito de plástidos, u otra proteína o péptido.

Otro ejemplo particularmente destacado de tales propiedades es la tolerancia conferida a uno o más herbicidas, por ejemplo, imidazolinonas, sulfonilureas, glifosato o fosfinotricina. Entre las secuencias de ADN que codifican proteínas (es decir, polinucleótidos de interés) que confieren propiedades de tolerancia a determinados herbicidas a las plantas y células vegetales transformadas, se hará especial mención al gen *bar* o PAT, o al gen de *Streptomyces coelicolor* descrito en el documento WO2009/152359 que confiere tolerancia a los herbicidas de glufosinato, un gen que codifica una EPSPS (5–enolpiruvilshikimat–3–fosfat–sintasa) adecuado que confiere tolerancia a los herbicidas que tienen como diana el EPSPS, especialmente, herbicidas tales como el glifosato y sus sales, un gen que codifica glifosato–n–acetiltransferasa, o un gen que codifica la glifosato oxidorreductasa. Otros rasgos de tolerancia a herbicidas adecuados incluyen por lo menos un inhibidor de ALS (acetolactato sintasa) (p. ej., WO2007/024782), un gen de ALS/AHAS de *Arabidopsis* mutado (p. ej., Patente de EE. UU. 6.855.533), genes que codifican 2,4–D–monooxigenasas que confieren tolerancia a 2,4–D (ácido 2,4–diclorofenoxiacético) y genes que codifican monooxigenasas de Dicamba que confieren tolerancia a dicamba (ácido 3,6–dicloro–2–metoxibenzoico).

Otros ejemplos de tales propiedades son una mayor resistencia contra hongos, bacterias y/o virus fitopatógenos debido, por ejemplo, a la resistencia sistémica adquirida (SAR, conforme a sus siglas en inglés), sistemina, fitoalexinas, elicitores y también genes de resistencia y proteínas y toxinas correspondientemente expresadas.

Eventos transgénicos particularmente útiles en plantas transgénicas o cultivares de plantas que se pueden tratar con preferencia de acuerdo con la invención incluyen Evento 531/ PV–GHBK04 (algodón, control de insectos, descrito en el documento WO2002/040677), Evento 1143–14A (algodón, control de insectos, no depositado, descrito en el documento WO2006/128569); Evento 1143–51B (algodón, control de insectos, no depositado, descrito en el documento WO2006/128570); Evento 1445 (algodón, tolerancia a herbicidas, no depositado, descrito en el documento US–A 2002–120964 o WO2002/034946); Evento 17053 (arroz, tolerancia a herbicidas, depositado como PTA–9843, descrito en el documento WO2010/117737); Evento 17314 (arroz, tolerancia a

herbicidas, depositado como PTA-9844, descrito en el documento WO2010/117735);  
 Evento 281-24-236 (algodón, control de insectos – tolerancia a herbicidas, depositado como  
 PTA-6233, descrito en el documento WO2005/103266 o US-A 2005-216969); Evento  
 3006-210-23 (algodón, control de insectos – tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-  
 5 6233, descrito en el documento US-A 2007-143876 o WO2005/103266); Evento 3272  
 (maíz, rasgo de calidad, depositado como PTA-9972, descrito en el documento  
 WO2006/098952 o US-A 2006-230473); Evento 33391 (trigo, tolerancia a herbicidas,  
 depositado como PTA-2347, descrito en el documento WO2002/027004), Evento 40416  
 (maíz, control de insectos – tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-11508,  
 10 descrito en el documento WO 11/075593); Evento 43A47 (maíz, control de insectos –  
 tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-11509, descrito en el documento  
 WO2011/075595); Evento 5307 (maíz, control de insectos, depositado como ATCC PTA-  
 9561, descrito en el documento WO2010/077816); Evento ASR-368 (pasto doblado,  
 tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-4816, descrito en el documento US-  
 15 A 2006-162007 o WO2004/053062); Evento B16 (maíz, tolerancia a herbicidas, no  
 depositado, descrito en el documento US-A 2003-126634); Evento BPS-CV127- 9 (soja,  
 tolerancia a herbicidas, depositado como NCIMB No. 41603, descrito en el documento  
 WO2010/080829); Evento BLRl (colza oleaginosa, restauración de la esterilidad masculina,  
 depositado como NCIMB 41193, descrito en el documento WO2005/074671), Evento  
 20 CE43-67B (algodón, control de insectos, depositado como DSM ACC2724, descrito en el  
 documento US-A 2009-217423 o WO2006/128573); Evento CE44-69D (algodón, control  
 de insectos, no depositado, descrito en el documento US-A 2010- 0024077); Evento CE44-  
 69D (algodón, control de insectos, no depositado, descrito en el documento  
 WO2006/128571); Evento CE46-02A (algodón, control de insectos, no depositado, descrito  
 25 en el documento WO2006/128572); Evento COT102 (algodón, control de insectos, no  
 depositado, descrito en el documento US-A 2006-130175 o WO2004/039986); Evento  
 COT202 (algodón, control de insectos, no depositado, descrito en el documento US-A  
 2007-067868 o WO2005/054479); Evento COT203 (algodón, control de insectos, no  
 depositado, descrito en el documento WO2005/054480); ); Evento DAS21606-3 / 1606  
 30 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-11028, descrito en el documento  
 WO2012/033794), Evento DAS40278 (maíz, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC  
 PTA-10244, descrito en el documento WO2011/022469); Evento DAS-44406-6 /  
 pDAB8264.44.06.l (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-11336, descrito en  
 el documento WO2012/075426), Evento DAS-14536-7 / pDAB8291.45.36.2 (soja, tolerancia

a herbicidas, depositado como PTA-11335, descrito en el documento WO2012/075429),  
 Evento DAS-59122-7 (maíz, control de insectos – tolerancia a herbicidas, depositado como  
 ATCC PTA 11384, descrito en el documento US-A 2006-070139); Evento DAS-59132  
 (maíz, control de insectos – tolerancia a herbicidas, no depositado, descrito en el documento  
 5 WO2009/100188); Evento DAS68416 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC  
 PTA-10442, descrito en el documento WO2011/066384 o WO2011/066360); Evento DP-  
 098140-6 (maíz, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-8296, descrito en el  
 documento US-A 2009- 137395 o WO 08/112019); Evento DP-305423-1 (soja, rasgo de  
 calidad, no depositado, descrito en el documento US-A 2008-312082 o WO2008/054747);  
 10 Evento DP-32138-1 (maíz, sistema de hibridación, depositado como ATCC PTA-9158,  
 descrito en el documento US-A 2009-0210970 o WO2009/103049); Evento DP-356043-5  
 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-8287, descrito en el documento  
 US-A 2010-0184079 o WO2008/002872); Evento EE-I (berenjena, control de insectos, no  
 depositado, descrito en el documento WO 07/091277); Evento Fil 17 (maíz, tolerancia a  
 15 herbicidas, depositado como ATCC 209031, descrito en el documento US-A 2006-059581  
 o WO 98/044140); Evento FG72 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-11041,  
 descrito en el documento WO2011/063413), Evento GA21 (maíz, tolerancia a herbicidas,  
 depositado como ATCC 209033, descrito en el documento US-A 2005-086719 o WO  
 98/044140); Evento GG25 (maíz, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC 209032,  
 20 descrito en el documento US-A 2005-188434 o WO98/044140); Evento GHB119 (algodón,  
 control de insectos – tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-8398, descrito  
 en el documento WO2008/151780); Evento GHB614 (algodón, tolerancia a herbicidas,  
 depositado como ATCC PTA-6878, descrito en el documento US-A 2010-050282 o  
 W02007/017186); Evento GJ11 (maíz, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC  
 25 209030, descrito en el documento US-A 2005-188434 o WO98/044140); Evento GM RZ13  
 (remolacha azucarera, resistencia a virus, depositado como NCIMB-41601, descrito en el  
 documento WO2010/076212); Evento H7-l (remolacha azucarera, tolerancia a herbicidas,  
 depositado como NCIMB 41158 o NCIMB 41159, descrito en el documento US-A 2004-  
 172669 o WO 2004/074492); Evento JOPLINl (trigo, tolerancia a enfermedades, no  
 30 depositado, descrito en el documento US-A 2008-064032); Evento LL27 (soja, tolerancia a  
 herbicidas, depositado como NCIMB41658, descrito en el documento WO2006/108674 o  
 US-A 2008-320616); Evento LL55 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como NCIMB  
 41660, descrito en el documento WO 2006/108675 o US-A 2008-196127); Evento  
 LLcotton25 (algodón, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-3343, descrito

en el documento WO2003/013224 o US- A 2003-097687); Evento LLRICE06 (arroz, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC 203353, descrito en el documento US 6,468,747 o WO2000/026345); Evento LLRice62 ( arroz, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC 203352, descrito en el documento WO2000/026345), Evento LLRICE601  
 5 (arroz, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-2600, descrito en el documento US-A 2008-2289060 o WO2000/026356); Evento LY038 (maíz, rasgo de calidad, depositado como ATCC PTA-5623, descrito en el documento US-A 2007-028322 o WO2005/061720); Evento MIR162 (maíz, control de insectos, depositado como PTA-8166, descrito en el documento US-A 2009-300784 o WO2007/142840); Evento MIR604  
 10 (maíz, control de insectos, no depositado, descrito en el documento US-A 2008-167456 o WO2005/103301); Evento MON15985 (algodón, control de insectos, depositado como ATCC PTA-2516, descrito en el documento US-A 2004-250317 o WO2002/100163); Evento MON810 (maíz, control de insectos, no depositado, descrito en el documento US-A 2002-102582); Evento MON863 (maíz, control de insectos, depositado como ATCC PTA-2605, descrito en el documento WO2004/011601 o US-A 2006-095986); Evento  
 15 MON87427 (maíz, control de la polinización, depositado como ATCC PTA-7899, descrito en el documento WO2011/062904); Evento MON87460 (maíz, tolerancia al estrés, depositado como ATCC PTA-8910, descrito en el documento WO2009/111263 o US-A 2011-0138504); Evento MON87701 (soja, control de insectos, depositado como ATCC PTA-8194, descrito en el documento US-A 2009-130071 o WO2009/064652); Evento  
 20 MON87705 (soja, rasgo de calidad – tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-9241, descrito en el documento US-A 2010-0080887 o WO2010/037016); Evento MON87708 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-9670, descrito en el documento WO2011/034704); Evento MON87712 (soja, rendimiento, depositado como PTA-10296, descrito en el documento WO2012/051199), Evento MON87754 (soja, rasgo de calidad, depositado como ATCC PTA-9385, descrito en el documento  
 25 WO2010/024976); Evento MON87769 (soja, rasgo de calidad, depositado como ATCC PTA-8911, descrito en el documento US-A 2011-0067141 o WO2009/102873); Evento MON88017 (maíz, control de insectos – tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-5582, descrito en el documento US-A 2008-028482 o WO2005/059103); Evento  
 30 MON88913 (algodón, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-4854, descrito en el documento WO2004/072235 o US-A 2006-059590); Evento MON88302 (colza oleaginosa, tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-10955, descrito en el documento WO2011/153186), Evento MON88701 (algodón, tolerancia a herbicidas, depositado como

PTA-11754, descrito en el documento WO2012/134808), Evento MON89034 (maíz, control de insectos, depositado como ATCC PTA-7455, descrito en el documento WO 07/140256 o US-A 2008-260932); Evento MON89788 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-6708, descrito en el documento US-A 2006-282915 o

5 WO2006/130436); Evento MSI 1 (colza oleaginosa, control de la polinización – tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-850 o PTA-2485, descrito en el documento WO2001/031042); Evento MS8 (colza oleaginosa, control de la polinización – tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-730, descrito en el documento WO2001/041558 o US-A 2003-188347); Evento NK603 (maíz, tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC

10 PTA-2478, descrito en el documento US-A 2007-292854); Evento PE-7 (arroz, control de insectos, no depositado, descrito en el documento WO2008/114282); Evento RF3 (colza oleaginosa, control de la polinización – tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-730, descrito en el documento WO2001/041558 o US-A 2003-188347); Evento RT73 (colza oleaginosa, tolerancia a herbicidas, no depositado, descrito en el documento

15 WO2002/036831 o US-A 2008-070260); Evento SYHT0H2 / SYN-000H2-5 (soja, tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-11226, descrito en el documento WO2012/082548), Evento T227-1 (remolacha azucarera, tolerancia a herbicidas, no depositado, descrito en el documento WO2002/44407 o US-A 2009-265817); Evento T25 (maíz, tolerancia a herbicidas, no depositado, descrito en el documento US-A 2001-029014

20 o WO2001/051654); Evento T304-40 (algodón, control de insectos – tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-8171, descrito en el documento US-A 2010-077501 o WO2008/122406); Evento T342-142 (algodón, control de insectos, no depositado, descrito en el documento WO2006/128568); Evento TC1507 (maíz, control de insectos – tolerancia a herbicidas, no depositado, descrito en el documento US-A 2005-039226 o

25 WO2004/099447); Evento VIP1034 (maíz, control de insectos – tolerancia a herbicidas, depositado como ATCC PTA-3925, descrito en el documento WO2003/052073), Evento 32316 (maíz, control de insectos–tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-11507, descrito en el documento WO2011/084632), Evento 4114 (maíz, control de insectos–tolerancia a herbicidas, depositado como PTA-11506, descrito en el documento

30 WO2011/084621), Evento EE-GM3 / FG72 (soja, tolerancia a herbicidas, ATCC Acceso Nro. PTA-11041) opcionalmente apilado con el Evento EE-GM1/LL27 o Evento EE-GM2/LL55 (WO2011/063413A2), Evento DAS-68416-4 (soja, tolerancia a herbicidas, ATCC Acceso Nro. PTA-10442, WO2011/066360A1), Evento DAS-68416-4 (soja, tolerancia a herbicidas, ATCC Acceso Nro. PTA-10442, WO2011/066384A1), Evento DP-

040416-8 (maíz, control de insectos, ATCC Acceso Nro. PTA-11508, WO2011/075593A1),  
 Evento DP-043A47-3 (maíz, control de insectos, ATCC Acceso Nro. PTA-11509,  
 WO2011/075595A1), Evento DP- 004114-3 (maíz, control de insectos, ATCC Acceso Nro.  
 PTA-11506, WO2011/084621A1), Evento DP-032316-8 (maíz, control de insectos, ATCC  
 5 Acceso Nro. PTA-11507, WO2011/084632A1), Evento MON-88302-9 (colza oleaginosa,  
 tolerancia a herbicidas, ATCC Acceso Nro. PTA-10955, WO2011/153186A1), Evento DAS-  
 21606-3 (soja, tolerancia a herbicidas, ATCC Acceso Nro. PTA-11028,  
 WO2012/033794A2), Evento MON-87712-4 (soja, rasgo de calidad, ATCC Acceso Nro..  
 PTA-10296, WO2012/051199A2), Evento DAS-44406-6 (soja, tolerancia a herbicidas  
 10 apilada, ATCC Acceso Nro.. PTA-11336, WO2012/075426A1), Evento DAS-14536-7 (soja,  
 tolerancia a herbicidas apilada, ATCC Acceso Nro.. PTA-11335, WO2012/075429A1),  
 Evento SYN-000H2-5 (soja, tolerancia a herbicidas, ATCC Acceso Nro.. PTA-11226,  
 WO2012/082548A2), Evento DP-061061-7 (colza oleaginosa, tolerancia a herbicidas, sin  
 Nro. de depósito disponible, WO2012071039A1), Evento DP-073496-4 (colza oleaginosa,  
 15 tolerancia a herbicidas, sin Nro. de depósito disponible, US2012131692), Evento  
 8264.44.06.1 (soja, tolerancia a herbicidas apilada, Acceso Nro. PTA-11336,  
 WO2012075426A2), Evento 8291.45.36.2 (soja, tolerancia a herbicidas apilada, Acceso  
 Nro.. PTA-11335, WO2012075429A2), Evento SYHT0H2 (soja, ATCC Acceso Nro.. PTA-  
 11226, WO2012/082548A2), Evento MON88701 (algodón, ATCC Acceso Nro. PTA-11754,  
 20 WO2012/134808A1), Evento KK179-2 (alfalfa, ATCC Acceso Nro. PTA-11833,  
 WO2013/003558A1), Evento pDAB8264.42.32.1 (soja, tolerancia a herbicidas apilada,  
 ATCC Acceso Nro. PTA-11993, WO2013/010094A1), Evento MZDT09Y (maíz, ATCC  
 Acceso Nro. PTA-13025, WO2013/012775A1).

Los genes o eventos (p. ej., polinucleótidos de interés) que imparten las características  
 25 deseadas en cuestión también pueden estar presentes en combinación entre sí en las plantas  
 transgénicas. Ejemplos de plantas transgénicas que pueden mencionarse son las plantas de  
 cultivo importantes, tales como cereales (trigo, arroz, triticale, cebada, centeno, avena), maíz,  
 soja, papas, remolacha azucarera, caña de azúcar, tomates, arvejas y otros tipos de vegetales,  
 algodón, tabaco, colza y también plantas frutales (con los frutos manzanas, peras, cítricos y  
 30 uvas), con especial énfasis en el maíz, la soja, el trigo, el arroz, las papas, el algodón, la caña  
 de azúcar, el tabaco y colza. Los rasgos que se destacan particularmente son la mayor  
 resistencia de las plantas a insectos, arácnidos, nematodos y babosas y caracoles, así como la  
 mayor resistencia de las plantas a uno o más herbicidas.

Los ejemplos comercialmente disponibles de tales plantas, partes de plantas o semillas de plantas que pueden tratarse con preferencia de acuerdo con la invención incluyen productos comerciales, tales como semillas de plantas, comercializados o distribuidos bajo las denominaciones comerciales GENUITY®, DROUGHTGARD®, SMARTSTAX®, RIB  
5 COMPLETE®, ROUNDUP READY®, VT DOUBLE PRO®, VT TRIPLE PRO®, BOLLGARD II®, ROUNDUP READY 2 YIELD®, YIELDGARD®, ROUNDUP READY® 2 XTEND™, INTACTA RR2 PRO®, VISTIVE GOLD®, y/o XTENDFLEX™.

Un gen *TFL1* útil con esta invención incluye cualquier gen *TFL1* implicado en el proceso de floración, que puede conferir un reducido o acortado tiempo hasta la floración,  
10 una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas (p. ej., mayor producción de frutos) en una planta de frambuesa negra o parte de ella (p. ej., una proteína/gen *TFL1*). En algunas formas de realización, el gen *TFL1* (a) comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia (p. ej., 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91,  
15 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 %, de manera opcional, alrededor de 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 % o alrededor de 95, 96, 97, 98, 99, o 100 % de identidad de secuencia) con respecto a **SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, y/o SEQ ID NO: 80**, (b) comprende una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia (p. ej., 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 %, de manera  
20 opcional, alrededor de 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 % o alrededor de 95, 96, 97, 98, 99, o 100 % de identidad de secuencia) con respecto a cualquiera de **SEQ ID NOs: 72–74 y/o SEQ ID NOs: 83–95**, (c) codifica una secuencia que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia (p. ej., 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 %, de manera opcional, alrededor de 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o  
25 100 % o alrededor de 95, 96, 97, 98, 99, o 100 % de identidad de secuencia) con respecto a **SEQ ID NO: 71**, y/o (d) codifica una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia (p. ej., 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 %, de manera opcional, alrededor de 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 % o  
30 alrededor de 95, 96, 97, 98, 99, o 100 % de identidad de secuencia) con respecto a **SEQ ID NO: 75**.

Cualquier mutación en un gen *TFL1* que produzca un polipéptido TFL1 no funcional puede utilizarse para producir plantas de frambuesa negra o partes de las mismas de esta invención que tengan un tiempo reducido hasta la floración, una duración más prolongada de la floración, un patrón de crecimiento de la planta más determinado y/o una o más

características de rendimiento mejoradas. En algunas formas de realización, la mutación en el gen *TFL1* puede producir una proteína TFL1 que tenga una funcionalidad reducida (por ejemplo, una capacidad atenuada para funcionar en su rol en el proceso de floración), y también puede utilizarse para producir plantas de frambuesa negra o partes de las mismas de esta invención que tengan un tiempo reducido hasta la floración, una duración más prolongada de la floración, un patrón de crecimiento de la planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas.

En algunas formas de realización, la por lo menos una mutación en un gen *TFL1* endógeno es un alelo nulo (p. ej., produce una proteína no funcional o ninguna proteína). En algunas formas de realización, la por lo menos una mutación en un gen *TFL1* endógeno es una mutación negativa dominante (p. ej., produce una proteína que tiene una función aberrante que interfiere con la función del producto génico de tipo salvaje). En algunas formas de realización, la por lo menos una mutación en un gen *TFL1* endógeno en una planta de frambuesa negra puede ser una sustitución, una delección y/o una inserción. En algunas formas de realización, la por lo menos una mutación en un gen *TFL1* endógeno en una planta de frambuesa negra puede ser una sustitución, una delección y/o una inserción que da como resultado un alelo nulo, un alelo semidominante, un alelo de pérdida de función débil, un alelo nulo o una mutación hipomórfica, y una planta de frambuesa negra que exhibe un fenotipo de tiempo reducido hasta la floración, una duración más prolongada de la floración, un patrón de crecimiento de la planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas. En algunas formas de realización, la por lo menos una mutación en un gen *TFL1* endógeno en una planta de frambuesa negra puede ser una sustitución, una delección y/o una inserción que da como resultado una mutación negativa dominante, una mutación semidominante, una mutación de pérdida de función débil, una mutación nula o una mutación hipomórfica, y una planta de frambuesa negra que exhibe un fenotipo de tiempo reducido hasta la floración, una duración más prolongada de la floración, un patrón de crecimiento de la planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas. Por ejemplo, la mutación puede ser una sustitución, una delección y/o una inserción de uno o más residuos de aminoácidos (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más residuos de aminoácidos consecutivos, o más aminoácidos del factor de transcripción), o la mutación puede ser una sustitución, una delección y/o una inserción de por lo menos 5 nucleótidos consecutivos (p. ej., alrededor de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46,

47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90 o más nucleótidos consecutivos (por ejemplo, hasta la longitud completa de la secuencia genómica de *TFL1*), o cualquier rango o valor entre ellos) (por ejemplo, una sustitución, delección y/o inserción de bases) del gen que codifica el factor de transcripción. En algunas formas de realización, la

En algunas formas de realización, una mutación en una proteína/gen *TFL1* producida por métodos de esta invención puede ser una delección. En algunas formas de realización, una delección puede dar como resultado un truncamiento de la proteína TFL1 o una delección de una porción o de la totalidad del polipéptido TFL1. En algunas formas de realización, la mutación puede ser un truncamiento N-terminal o un truncamiento C-terminal. En algunas formas de realización, la delección puede ser dentro del polipéptido o puede abarcar todo el polipéptido. Cuando la mutación da como resultado un truncamiento C-terminal en la proteína TFL1, el truncamiento C-terminal puede comprender un truncamiento de por lo

menos 1 residuo de aminoácido (p. ej., alrededor de 1, alrededor de 5, alrededor de 10, alrededor de 15, alrededor de 20, alrededor de 30, alrededor de 40 o alrededor de 50 residuos de aminoácidos a alrededor de 60, alrededor de 70, alrededor de 80, alrededor de 90, alrededor de 100, alrededor de 110, alrededor de 120, alrededor de 130, alrededor de 140, alrededor de 150, alrededor de 160, alrededor de 170, o alrededor de 172 residuos de aminoácidos consecutivos o more) (p. ej., alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 171, 172 residuos de aminoácidos consecutivos, o más, o cualquier rango o valor entre ellos) del extremo C- o N-terminal de la proteína TFL1 (p. ej., **SEQ ID NO: 71**).

En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica un polipéptido *TFL1* truncado puede comprender una delección de por lo menos 3 pares de bases consecutivos (p. ej., alrededor de 3, 4, 5, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 40, 50, 100 pares de bases consecutivos a alrededor de 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 510, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 525, 550, 600, 700, 800, 900, o más pares de bases consecutivos; p. ej., alrededor de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71,

72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 505, 510, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 525, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, o 950 o más pares de bases consecutivos, o cualquier rango o valor entre ellos) de un gen endógeno que codifica el polipéptido TFL1 (p. ej., **SEQ ID NOs: 69 o 70**). En algunas formas de realización, una mutación en un gen endógeno *TFL* puede producir una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de **SEQ ID NO: 77**, **SEQ ID NO: 78** y/o **SEQ ID NOs: 96–99**, y/o un gen endógeno *TFL* que codifica un polipéptido TFL1 mutado que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 79** y/o **SEQ ID NO: 100**. En algunas formas de realización, un gen *TFL1* endógeno mutado puede ser una mutación no natural.

Una mutación en un gen endógeno que codifica una proteína TFL1 que proporciona plantas de frambuesa negra con un fenotipo de tiempo reducido hasta la floración, una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas puede ser un alelo nulo. En algunas formas de realización, una mutación en un gen endógeno que codifica una proteína TFL1 que proporciona plantas de frambuesa negra que tienen un fenotipo de tiempo reducido hasta la floración, una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas puede ser una mutación dominante negativa, una mutación semidominante, mutación de pérdida de función débil, una mutación nula, o una mutación hipomórfica, de manera opcional, donde la mutación puede ser una mutación no natural.

En algunas formas de realización, una mutación en un gen *TFL1* endógeno puede realizarse mediante la escisión por un sistema de edición que comprende una nucleasa y un dominio de unión de ADN que se une a un sitio objetivo dentro de un ácido nucleico objetivo que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de nucleótidos de **SEQ ID NO: 69**, **SEQ ID NO: 70**, y/o **SEQ ID NO: 80**, o que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de **SEQ ID NO: 71**. En algunas formas de realización, la nucleasa escinde el gen *TFL1* endógeno, y se introduce una mutación en el gen *TFL1* endógeno.

Además, se proporcionan en el presente documento ácidos nucleico guías (p. ej., ARNg, ADNg, ARNcr, ADNcr) que se unen a un sitio objetivo en un gen *TFL1*, donde el gen *TFL1* endógeno: (a) comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 80 % de

identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, y/o SEQ ID NO: 80**, (b) comprende una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 72–74 y/o SEQ ID NOs: 83–95**, (c) codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 71**, y/o (d) codifica una región que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO: 75**.

Adicionalmente, se proporcionan ácidos nucleico guías que se unen a un sitio objetivo en un gen *TFL1*, donde el sitio objetivo es en una región del gen *TFL1* que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de **SEQ ID NOs: 72–74 y/o SEQ ID NOs: 83–95**. En algunas formas de realización, un ácido nucleico guía comprende un espaciador que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de nucleótidos de cualquiera o más de **SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 81 y/o SEQ ID NO: 82**, de manera opcional, donde el ácido nucleico guía comprende un espaciador que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de nucleótidos de **SEQ ID NO: 76**, y el sitio objetivo es en una región del gen *TFL1* que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de **SEQ ID NOs: 72–74**. En algunas formas de realización, un ácido nucleico guía comprende un espaciador que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de nucleótidos de **SEQ ID NO: 81 y/o SEQ ID NO: 82**, y el sitio objetivo es en una región del gen *TFL1* que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de **SEQ ID NOs: 83–95**.

En algunas formas de realización, se proporciona un sistema que comprende un ácido nucleico guía que comprende una secuencia espaciadora que tiene la secuencia de nucleótidos de cualquiera de **SEQ ID NOs: 76, 80 y/o 81**, y una proteína efectora CRISPR–Cas que se asocia con el ácido nucleico guía. En algunas formas de realización, el sistema puede comprender además un ácido nucleico tracr que se asocia con el ácido nucleico guía y una proteína efectora CRISPR–Cas, de manera opcional, donde el ácido nucleico tracr y el ácido nucleico guía están unidos covalentemente.

Como se usa en el presente documento, "una proteína efectora CRISPR–Cas en asociación con un ácido nucleico guía" se refiere al complejo que se forma entre una proteína efectora CRISPR–Cas y un ácido nucleico guía a fin de dirigir la proteína efectora CRISPR–Cas a un sitio objetivo en un gen.

Además se proporciona en el presente documento un gen *TFL1* endógeno que tiene una mutación, donde el gen *TFL1* endógeno que tiene la mutación comprende una secuencia

de ácido nucleico que tiene una mutación como se describe en el presente documento, de manera opcional, una mutación que produce un polipéptido TFL1 truncado o polipéptido TFL1 no detectable. En algunas formas de realización, una mutación en un gen *TFL1* puede ser una delección, una inserción o una sustitución. En algunas formas de realización, una mutación en un gen *TFL1* puede ser una mutación no natural. Se proporciona asimismo un ácido nucleico que codifica un alelo nulo de un gen *TFL1*, donde el alelo nulo, cuando está presente en una planta de frambuesa negra, produce un tiempo reducido hasta la floración, una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas en la planta de frambuesa negra. Se proporcionan adicionalmente ácidos nucleicos que codifican una mutación negativa dominante de un gen *TFL1*, que cuando está presente en una planta de frambuesa negra, produce un tiempo reducido hasta la floración, una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas en la planta de frambuesa negra. Asimismo, se proporcionan en este documento ácidos nucleicos que codifican una mutación semidominante, una mutación de pérdida de función débil, una mutación nula, o una mutación hipomórfica, donde la mutación semidominante, mutación de pérdida de función débil, mutación nula, o mutación hipomórfica de un gen *TFL1* como se describe en el presente documento, cuando está presente en una planta de frambuesa negra, produce un tiempo reducido hasta la floración en la planta de frambuesa negra, y/o una planta de frambuesa negra que tiene una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas en comparación con una planta de frambuesa negra de control. En algunas formas de realización, una mutación en un gen endógeno *TLF* puede producir una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de **SEQ ID NO: 77**, **SEQ ID NO: 78** y/o **SEQ ID NOs: 96–99**, y/o un polipéptido TFL1 mutado que tiene por lo menos 90 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 79** y/o **SEQ ID NO: 100**. En algunas formas de realización, el gen *TFL1* endógeno mutado comprende una mutación no natural.

Las construcciones de ácidos nucleicos de la invención (por ejemplo, una construcción que comprende un dominio de unión de ADN específico de secuencia, un dominio efector CRISPR–Cas, un dominio de desaminasa, transcriptasa inversa (RT), patrón de RT y/o un ácido nucleico guía, etc.) y casetes de expresión/vectores que comprenden los mismos se pueden utilizar como un sistema de edición de esta invención para modificar

ácidos nucleicos objetivo (por ejemplo, genes *TFL1* endógenos de plantas de frambuesa negra) y/o su expresión.

Cualquier planta de frambuesa negra que comprenda un gen *TFL1* endógeno que esté implicado en la regulación del tiempo de floración en una planta de frambuesa negra puede modificarse (por ejemplo, mutarse, por ejemplo, editarse en bases, escindirse, mellarse, etc.) como se describe en el presente documento (por ejemplo, utilizando los polipéptidos, polinucleótidos, RNP, construcciones de ácidos nucleicos, casetes de expresión y/o vectores de la invención) para reducir o acortar el tiempo hasta la floración, lograr una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de la planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas en la planta en comparación con la planta de frambuesa negra no modificada. Por ejemplo, la invención puede proporcionar una planta de frambuesa negra que tiene un tiempo reducido hasta la floración (floración más temprana), de alrededor de 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, o 10 % a alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % (p. ej., alrededor de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 % o cualquier rango o valor entre ellos), en comparación con una planta de frambuesa negra que está desprovista del gen *TFL1* endógeno mutado.

En algunas formas de realización, se proporciona una planta de frambuesa negra que tiene mayor duración de la floración (mayor tiempo de floración), de alrededor de 30 % a alrededor de 170 %, (p. ej., alrededor de 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, o 170 % o cualquier rango o valor entre ellos) en comparación con una planta de frambuesa negra que está desprovista del gen *TFL1* endógeno mutado.

En algunas formas de realización, una planta de frambuesa negra producida como se describe en el presente documento comienza a florecer más temprano, y continúa floreciendo hasta que muere (p. ej., cuando es destruida por una helada o congelamiento), p. ej., florecimiento continuo. En consecuencia, la planta de frambuesa negra exhibe un tiempo reducido hasta la floración y una mayor duración de la floración en comparación con una planta de frambuesa negra desprovista de la mutación.

En algunas formas de realización, la invención puede proporcionar una planta de frambuesa negra que tiene un patrón de crecimiento de planta más determinado (p. ej., que tiene tallos que son alrededor de 30 % a alrededor de 85 % más cortos que los de una planta de control (p. ej., que tiene tallos alrededor de 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, o 85 % más cortos), en comparación con una planta de frambuesa negra que está desprovista del gen *TFL1* endógeno mutado.

En algunas formas de realización, la invención puede proporcionar una planta de frambuesa negra que tiene una o más características de rendimiento mejoradas (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) en comparación con una planta de frambuesa negra que está desprovista del gen *TFL1* endógeno mutado. En algunas formas de realización, una característica de rendimiento mejorada puede ser un aumento en el rendimiento de frutos comercializables, de manera opcional, un aumento de alrededor de 50 % a alrededor de 750 % de rendimiento de frutos comercializables (p. ej., alrededor de 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, o 750 % de aumento en el pes de frutos comercializables), en comparación con una planta de control (p. ej., desprovista de la modificación en un gen *TFL1* como se describe en el presente documento. "Fruto comercializable" incluye frutos que tienen una apariencia madura, y que están generalmente libres de enfermedad o putrefacción. En el caso de las bayas, "fruto comercializable" generalmente incluye bayas que tienen un rango de peso de 6 g a 10 g por baya. En algunas formas de realización, la invención puede proporcionar una planta de frambuesa negra que tiene cualquier combinación de un tiempo reducido hasta la floración, una mayor duración de la floración, un patrón de crecimiento de planta más determinado y/o una o más características de rendimiento mejoradas.

Una planta de frambuesa negra y/o parte de planta que puede ser modificada como se describe en el presente documento puede ser cualquier género, especies, variedad y/o cultivar de frambuesa negra.

El término "parte de planta", como se usa en este documento, incluye, sin limitación, tejidos reproductivos (p. ej., pétalos, sépalos, estambres, pistilos, receptáculos, anteras, polen, flores, frutos, botones florales, óvulos, semillas y embriones); tejidos vegetativos (p. ej.,

pecíolos, tallos, raíces, pelos de raíces, puntas de raíces, médula, coleóptilos, tallos, brotes, ramas, corteza, meristema apical, yema axilar, cotiledón, hipocótilos y hojas); tejidos vasculares (por ejemplo, floema y xilema); células especializadas tales como células epidérmicas, células de parénquima, células de colénquima, células de esclerénquima, estomas, células protectoras, cutícula, células de mesófilo; tejido calloso; y esquejes. El término "parte de planta" también incluye células vegetales, incluidas células vegetales que están intactas en plantas y/o partes de plantas, protoplastos vegetales, tejidos vegetales, órganos vegetales, cultivos de tejidos de células vegetales, callos vegetales, grupos de plantas y similares. Como se usa aquí, "brote" se refiere a las partes aéreas que incluyen las hojas y los tallos. Como se usa en el presente documento, el término "cultivo de tejidos" abarca cultivos de tejidos, células, protoplastos y callos. El término "tallo" como se utiliza en este documento se refiere al eje estructural de la planta sobre el suelo que consiste tanto en nodos (por ejemplo, hojas y flores) como en entrenudos (por ejemplo, material de conexión entre nudos).

Como se usa en el presente documento, "célula vegetal" se refiere a una unidad estructural y fisiológica de la planta, que típicamente comprende una pared celular pero también incluye protoplastos. Una célula vegetal de la presente invención puede estar en forma de una sola célula aislada, o puede ser una célula cultivada o puede ser parte de una unidad de organización superior tal como, por ejemplo, un tejido vegetal (incluido el callo) o un órgano de planta. Un "protoplasto" es una célula vegetal aislada sin pared celular o con solo partes de la pared celular. Por lo tanto, en algunas formas de realización de la invención, una célula transgénica que comprende una molécula de ácido nucleico y/o una secuencia de nucleótidos de la invención es una célula de cualquier planta o parte de una planta que incluye, sin limitación, una célula de raíz, una célula de hoja, una célula de cultivo de tejido, una célula de semilla, una célula de flor, una célula de fruto, una célula de polen y similares. En algunos aspectos de la invención, la parte de la planta puede ser un germoplasma vegetal. En algunos aspectos, una célula vegetal puede ser una célula vegetal que no se propaga y que no se regenera en una planta.

"Cultivo de células vegetales" significa cultivos de unidades vegetales tales como, por ejemplo, protoplastos, células de cultivo celular, células en tejidos vegetales, polen, tubos polínicos, óvulos, sacos embrionarios, cigotos y embriones en diversas etapas de desarrollo.

Como se usa en el presente documento, un "órgano de la planta" es una parte distinta y visiblemente estructurada y diferenciada de una planta tal como una raíz, tallo, hoja, botón floral o embrión.

“Tejido vegetal”, tal como se usa aquí, significa un grupo de células vegetales organizadas en una unidad estructural y funcional. Se incluye cualquier tejido de una planta *in planta* o en cultivo. Este término incluye, sin limitación, plantas enteras, órganos de plantas, semillas de plantas, cultivo de tejidos y cualquier grupo de células vegetales

5 organizadas en unidades estructurales y/o funcionales. El uso de este término junto con, o en ausencia de cualquier tipo específico de tejido vegetal como se indica anteriormente o de otro modo abarcado por esta definición no pretende ser exclusivo de ningún otro tipo de tejido vegetal.

En algunas formas de realización de la invención, se proporciona un cultivo de tejido transgénico o un cultivo de células de plantas transgénicas, donde el cultivo de células o tejidos transgénicos comprende una molécula de ácido nucleico/secuencia de nucleótidos de la invención. En algunas formas de realización, los transgenes pueden eliminarse de una planta desarrollada a partir del tejido o la célula transgénicos, mediante la mejora de la planta transgénica con una planta no transgénica, y la selección entre la progenie, de las plantas que

10 comprenden la edición de gen deseado, y no los transgenes utilizados en la producción de la edición.

Un sistema de edición útil con esta invención puede ser cualquier sistema de edición del genoma específico del sitio (específico de secuencia) ahora conocido o desarrollado posteriormente, cuyo sistema puede introducir mutaciones de una manera específica del

20 objetivo. Por ejemplo, un sistema de edición (p. ej., un sistema de edición específico de sitio o de secuencia) puede incluir, sine limitación, un sistema de edición CRISPR–Cas, un sistema de edición de meganucleasas, un sistema de edición de nucleasas de dedos de zinc (ZFN), un sistema de edición de nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN), un sistema de edición de bases y/o un sistema de edición de cebador, cada uno de

25 los cuales puede comprender uno o más polipéptidos y/o uno o más polinucleótidos que, cuando se expresan como un sistema en una célula, pueden modificar (mutar) un ácido nucleico diana de una manera específica de secuencia. En algunas formas de realización, un sistema de edición (por ejemplo, un sistema de edición específico de sitio o secuencia) puede comprender uno o más polinucleótidos y/o uno o más polipéptidos, incluidos, entre otros, un

30 dominio de unión de ácido nucleico (dominio de unión de ADN), un nucleasa y/u otro polipéptido y/o un polinucleótido.

En algunas formas de realización, un sistema de edición puede comprender uno o más dominios de unión de ácido nucleico específicos de secuencia (dominios de unión de ADN) que pueden ser, por ejemplo, de una endonucleasa guiada por polinucleótido, una

endonucleasa CRISPR–Cas (por ejemplo, proteína efectora CRISPR–Cas), una nucleasa de dedos de zinc, una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN) y/o una proteína Argonaute. En algunas formas de realización, un sistema de edición puede comprender uno o más dominios de escisión (p. ej., nucleasas) que incluyen, entre otros, una endonucleasa (p. ej., Fok1), una endonucleasa guiada por polinucleótido, una endonucleasa CRISPR–Cas (p. ej., proteína efectora CRISPR–Cas), una nucleasa de dedos de zinc y/o una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción (TALEN). En algunas formas de realización, un sistema de edición puede comprender uno o más polipéptidos que incluyen, entre otros, una desaminasa (por ejemplo, una citosina desaminasa, una adenina desaminasa), una transcriptasa inversa, un polipéptido Dna2 y/o una 5' endonucleasa de colgajo (FEN). En algunas formas de realización, un sistema de edición puede comprender uno o más polinucleótidos, incluidos, entre otros, un ácido nucleico de matriz CRISPR (guía CRISPR), un ácido nucleico guía extendido y/o un patrón de transcriptasa inversa.

En algunas formas de realización, un método para modificar o editar el gen *TFL1* puede comprender el contacto con un ácido nucleico diana (p. ej., un ácido nucleico que codifica una proteína TFL1) con una proteína de fusión de edición de bases (p. ej., una proteína de unión a ADN específica de secuencia (p. ej., una proteína o dominio efector CRISPR–Cas) fusionada a un dominio de desaminasa (p. ej., una adenina desaminasa y/ o una citosina desaminasa) y un ácido nucleico guía, en donde el ácido nucleico guía es capaz de guiar/dirigir la proteína de fusión de edición de bases, al ácido nucleico diana, de modo de editar así un locus dentro del ácido nucleico diana. En algunas formas de realización, una proteína de fusión de edición de bases y el ácido nucleico guía pueden estar comprendidos en uno o más casetes de expresión. En algunas formas de realización, el ácido nucleico diana puede ponerse en contacto con una proteína de fusión de edición de bases y un casete de expresión que comprende un ácido nucleico guía. En algunas formas de realización, las proteínas de fusión de unión de ácido nucleico específicas de secuencia y guías pueden proporcionarse como ribonucleoproteínas (RNP). En algunas formas de realización, una célula puede ponerse en contacto con más de una proteína de fusión de edición de bases y/o uno o más ácidos nucleicos guía que pueden dirigirse a uno o más ácidos nucleicos diana en la célula.

En algunas formas de realización, un método para modificar o editar un gen *TFL1* puede comprender poner en contacto un ácido nucleico diana (por ej., un ácido nucleico que codifica una proteína TFL1) con una proteína de fusión de unión de ácido nucleico específica de secuencia (por ej., una proteína de unión a ADN específica de secuencia (p. ej., una

proteína o dominio efector CRISPR–Cas) fusionada con una etiqueta peptídica, una proteína de fusión de desaminasa que comprende un dominio de desaminasa (p. ej., una adenina desaminasa y/o una citosina desaminasa) fusionada a un polipéptido de afinidad que es capaz de unirse a la etiqueta peptídica, y un ácido nucleico guía, donde el ácido nucleico guía es capaz de guiar/dirigir la proteína de fusión de unión de ácido nucleico específica de secuencia al ácido nucleico diana, y la proteína de fusión de unión de ácido nucleico específica de secuencia es capaz de reclutar la proteína de fusión desaminasa al ácido nucleico diana a través de la interacción del polipéptido de afinidad con la etiqueta peptídica, de modo de editar así un locus dentro del ácido nucleico diana. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de unión de ácido nucleico específica de secuencia puede fusionarse con el polipéptido de afinidad que se une a la etiqueta peptídica, y la desaminasa puede fusionarse con la etiqueta peptídica, de modo de reclutar así la desaminasa a la proteína de fusión de unión de ácido nucleico específica de secuencia y al ácido nucleico diana. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de unión específica de secuencia, la proteína de fusión de desaminasa y el ácido nucleico guía pueden estar comprendidos en uno o más casetes de expresión. En algunas formas de realización, el ácido nucleico diana puede ponerse en contacto con una proteína de fusión de unión específica de secuencia, una proteína de fusión de desaminasa y un casete de expresión que comprende un ácido nucleico guía. En algunas formas de realización, las proteínas de fusión de unión a ácido nucleico específicas de secuencia, las proteínas de fusión de desaminasa y las guías pueden proporcionarse como ribonucleoproteínas (RNP).

En algunas formas de realización, se pueden usar métodos tales como la edición de cebadores para generar una mutación en un gen *TFL1* endógeno. En la edición de cebadores, la ADN polimerasa dependiente de ARN (transcriptasa inversa, RT) y los patrones de transcriptasa inversa (patrón RT) se utilizan en combinación con dominios de unión de ácido nucleico específicos de secuencia que confieren la capacidad de reconocer y unirse al objetivo de una manera específica de secuencia, y que también puede causar una mella en la hebra que contiene PAM dentro del objetivo. El dominio de unión del ácido nucleico puede ser una proteína efectora CRISPR–Cas y, en este caso, la matriz CRISPR o el ARN guía puede ser una guía extendida que comprende una porción extendida que comprende un sitio de unión de cebador (PSB, conforme a sus siglas en inglés) y la edición que se incorporará en el genoma (el patrón). De manera similar a la edición de bases, la edición de cebadores puede aprovechar los diversos métodos de reclutamiento de proteínas para el uso en la edición del sitio objetivo, donde dichos métodos incluyen interacciones no covalentes y covalentes entre

las proteínas y los ácidos nucleicos utilizados en el proceso seleccionado de edición del genoma.

Como se usa en el presente documento, una "proteína efectora CRISPR-Cas" es una proteína o un polipéptido o su dominio que escinde o corta un ácido nucleico, se une a un ácido nucleico (p. ej., un ácido nucleico diana y/o un ácido nucleico guía) y/ o que identifica, reconoce o se une a un ácido nucleico guía como se define en el presente documento. En algunas formas de realización, una proteína efectora CRISPR-Cas puede ser una enzima (p. ej., una nucleasa, endonucleasa, nickasa, etc.) o una porción de la misma, y/o puede funcionar como una enzima. En algunas formas de realización, una proteína efectora CRISPR-Cas se refiere a un polipéptido de nucleasa CRISPR-Cas o un dominio del mismo que comprende actividad nucleasa, o en el que la actividad de nucleasa se ha reducido o eliminado, y/o comprende actividad de nickasa o en el que la nickasa se ha eliminado o reducido, y/o comprende actividad de escisión de ADN monocatenario (actividad de ss ADNasa) o en el que la actividad de ss ADNasa se ha reducido o eliminado, y/o comprende actividad de autoprocesamiento de ARNasa o en el que la actividad de autoprocesamiento de ARNasa ha sido reducido o eliminado. Una proteína efectora CRISPR-Cas puede unirse a un ácido nucleico diana.

En algunas formas de realización, un dominio de unión de ADN específico de secuencia puede ser una proteína efectora CRISPR-Cas. En algunas formas de realización, una proteína efectora CRISPR-Cas puede ser de un sistema CRISPR-Cas de tipo I, un sistema CRISPR-Cas de tipo II, un sistema CRISPR-Cas de tipo III, un sistema CRISPR-Cas de tipo IV, un sistema CRISPR-Cas de tipo V o un sistema CRISPR-Cas de tipo VI. En algunas formas de realización, una proteína efectora CRISPR-Cas de la invención puede ser de un sistema CRISPR-Cas de tipo II o de un sistema CRISPR-Cas de tipo V. En algunas formas de realización, una proteína efectora CRISPR-Cas puede ser una proteína efectora CRISPR-Cas de tipo II, por ejemplo, una proteína efectora Cas9. En algunas formas de realización, una proteína efectora CRISPR-Cas puede ser una proteína efectora CRISPR-Cas de tipo V, por ejemplo, una proteína efectora Cas12.

En algunas formas de realización, una proteína efectora CRISPR-Cas puede incluir, sin limitación, una nucleasa Cas9, C2c1, C2c3, Cas12a (también referida como Cpf1), Cas12b, Cas12c, Cas12d, Cas12e, Cas13a, Cas13b, Cas13c, Cas13d, Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas3', Cas3'', Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (también conocida como Csn1 y Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Cse1, Cse2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10,

Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 (dinG), y/o Csf5, opcionalmente, donde la proteína efectora CRISPR–Cas puede ser una proteína efectora Cas9, Cas12a (Cpf1), Cas12b, Cas12c (C2c3), Cas12d (CasY), Cas12e (CasX), Cas12g, Cas12h, Cas12i, C2c4, C2c5, C2c8, C2c9, C2c10, Cas14a, Cas14b, y/o Cas14c.

5           En algunas formas de realización, una proteína efectora CRISPR–Cas útil con la invención puede comprender una mutación en su sitio activo de nucleasa (por ejemplo, RuvC, HNH, por ejemplo, sitio RuvC de un dominio de nucleasa Cas12a; por ejemplo, sitio RuvC y/o sitio HNH de un dominio de nucleasa Cas9). Una proteína efectora CRISPR–Cas que tiene una mutación en su sitio activo de nucleasa y, por lo tanto, que ya no comprende  
10 actividad de nucleasa, se denomina comúnmente "muerta", por ejemplo, dCas. En algunas formas de realización, un polipéptido o dominio de proteína efectora CRISPR–Cas que tiene una mutación en su sitio activo de nucleasa puede tener una actividad alterada o una actividad reducida en comparación con la misma proteína efectora CRISPR–Cas sin la mutación, por ejemplo, una nickasa, por ejemplo, nickasa Cas9, nickasa Cas12a.

15           Una proteína efectora CRISPR Cas9 o un dominio efector CRISPR Cas9 útil con esta invención puede ser cualquier nucleasa Cas9 conocida o identificada posteriormente. En algunas formas de realización, un polipéptido CRISPR Cas9 puede ser un polipéptido Cas9 de, por ejemplo, género *Streptococcus* (por ej., *S. pyogenes*, *S. thermophilus*), género *Lactobacillus*, género *Bifidobacterium*, género *Kandleria*, género *Leuconostoc*, género  
20 *Oenococcus*, género *Pediococcus*, género *Weissella*, y/o género *Olsenella*. Ejemplos de secuencias Cas9 incluyen, sin limitación, las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOS 56** y **SEQ ID NOS 57** o las secuencias de nucleótidos de **SEQ ID NOS: 58–68**.

          En algunas formas de realización, la proteína efectora CRISPR–CAS puede ser un polipéptido Cas9 derivado de *Streptococcus pyogenes*, y reconoce el motivo de secuencia  
25 PAM NGG, NAG, NGA (Mali et al, Science 2013; 339(6121): 823–826). En algunas formas de realización, la proteína efectora CRISPR–CAS puede ser un polipéptido Cas9 derivado de *Streptococcus thermophiles* y reconoce el motivo de secuencia PAM NGGNG y/o NNAGAAW (W = A o T) (ver, por ej., Horvath et al, Science, 2010; 327(5962): 167–170, y Deveau et al, J Bacteriol 2008; 190(4): 1390–1400). En algunas formas de realización, la  
30 proteína efectora CRISPR–CAS puede ser un polipéptido Cas9 derivado de *Streptococcus mutans* y reconoce el motivo de secuencia PAM NGG y/o NAAR (R = A o G) (ver, por ej., Deveau et al, J BACTERIOL 2008; 190(4): 1390–1400). En algunas formas de realización, la proteína efectora CRISPR–CAS puede ser un polipéptido Cas9 derivado de *Streptococcus aureus* y reconoce el motivo de secuencia PAM NNGRR (R = A o G). En algunas formas de

realización, la proteína efectora CRISPR–CAS puede ser una proteína Cas9 derivada de *S. aureus*, que reconoce el motivo de secuencia PAM N GRRT (R = A o G). En algunas formas de realización, la proteína efectora CRISPR–CAS puede ser un polipéptido Cas9 derivado de *S. aureus*, que reconoce el motivo de secuencia PAM N GRRV (R = A o G). En algunas formas de realización, la proteína efectora CRISPR–CAS puede ser un polipéptido Cas9 que es derivado de *Neisseria meningitidis* y reconoce el motivo de secuencia PAM N GATT o N GCTT (R = A o G, V = A, G o C) (ver, por ej., Hou et al, PNAS 2013, 1–6). En las formas de realización anteriormente mencionadas, N puede ser cualquier residuo de nucleótido, por ej., cualquiera de A, G, C o T. En algunas formas de realización, la proteína efectora CRISPR–CAS puede ser una proteína Cas13a derivada de *Leptotrichia shahii*, que reconoce un motivo de secuencia de secuencia flanqueante de protoespaciador (PFS) (o ARN PAM (rPAM)) de un solo 3' A, U, o C, que puede ubicarse dentro del ácido nucleico diana.

En algunas formas de realización, la proteína efectora CRISPR–CAS puede ser derivada de Cas12a, que es una nucleasa Cas de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR) de tipo V; ver, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NO: 1–17**, secuencias de ácido nucleico de **SEQ ID NO: 18–20**. Cas12a difiere en varios aspectos de la nucleasa CRISPR Cas9 tipo II más conocida. Por ejemplo, Cas9 reconoce un motivo adyacente al protoespaciador rico en G (PAM) que está 3' con respecto a su sitio de unión de ARN guía (ARNg, ARNsg, ARNcr, ADNcr, matriz CRISPR) (protoespaciador, ácido nucleico diana, ADN diana) (3'–NGG), mientras que Cas12a reconoce un PAM rico en T que se encuentra en 5' del ácido nucleico diana (5'–TTN, 5'–TTTN). De hecho, las orientaciones en las que Cas9 y Cas12a se unen a sus ARN guía son muy cercanamente invertidas en relación con sus extremos N– y C–terminales. Además, las enzimas Cas12a utilizan un solo ARN guía (ARNg, matriz CRISPR, ARNcr) en lugar de ARN guía dual (ARNsg (p. ej., ARNcr y ARNtracr)) que se encuentra en los sistemas Cas9 naturales, y Cas12a procesa sus propios ARNg. Además, la actividad de la nucleasa Cas12a produce roturas escalonadas de doble hebra de ADN en lugar de extremos romos producidos por la actividad de la nucleasa Cas9, y Cas12a se sustenta en un solo dominio RuvC para escindir ambas hebras de ADN, mientras que Cas9 utiliza un dominio HNH y un dominio RuvC para la escisión.

Un dominio/proteína efectora CRISPR Cas12a útil con esta invención puede ser cualquier polipéptido Cas12a conocido o identificado posteriormente (anteriormente conocido como Cpf1) (ver, por ejemplo, la Patente de EE. UU. 9.790.490, que se incorpora por referencia por sus divulgaciones de secuencias Cpf1 (Cas12a)). El término "Cas12a",

"polipéptido Cas12a" o "dominio Cas12a" se refiere a una nucleasa guiada por ARN que comprende un polipéptido Cas12a, o un fragmento del mismo, que comprende el dominio de unión al ácido nucleico guía de Cas12a y/o un dominio de escisión de ADN activo, inactivo, o parcialmente activo de Cas12a. En algunas formas de realización, un Cas12a útil con la invención puede comprender una mutación en el sitio activo de la nucleasa (por ejemplo, el sitio RuvC del dominio Cas12a). Un dominio Cas12a o polipéptido Cas12a que tiene una mutación en su sitio activo de nucleasa y, por lo tanto, ya no comprende actividad de nucleasa, se denomina comúnmente Cas12a muerto (p. ej., dCas12a). En algunas formas de realización, un dominio Cas12a o un polipéptido Cas12a que tiene una mutación en su sitio activo de nucleasa puede tener actividad alterada, por ejemplo, puede tener actividad de nickasa.

Cualquier dominio/polipéptido de desaminasa útil para la edición de bases puede usarse con esta invención. En algunas formas de realización, el dominio de desaminasa puede ser un dominio de citosina desaminasa o un dominio de adenina desaminasa. Una citosina desaminasa (o citidina desaminasa) útil con esta invención puede ser cualquier citosina desaminasa conocida o identificada posteriormente de cualquier organismo (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. Nro. 10.167.457 y Thuronyi et al. *Nat. Biotechnol.* 37:1070–1079 (2019), cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia por su descripción de citosina desaminasas). Las citosina desaminasas pueden catalizar la desaminación hidrolítica de citidina o desoxicitidina a uridina o desoxiuridina, respectivamente. Por lo tanto, en algunas formas de realización, una desaminasa o un dominio de desaminasa útil con esta invención puede ser un dominio de citidina desaminasa, que cataliza la desaminación hidrolítica de citosina a uracilo. En algunas formas de realización, una citosina desaminasa puede ser una variante de una citosina desaminasa natural, que incluye, entre otros, un primate (p. ej., un humano, mono, chimpancé, gorila), un perro, una vaca, una rata o un ratón. Por lo tanto, en algunas formas de realización, una citosina desaminasa útil con la invención puede ser alrededor de 70 % a alrededor de 100 % idéntica a una citosina desaminasa de tipo salvaje (por ej., alrededor de 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica, y cualquier rango o valor entre ellos, a una citosina desaminasa natural).

En algunas formas de realización, una citosina desaminasa útil con la invención puede ser una desaminasa de la familia del complejo de edición de ARNm de apolipoproteína B (APOBEC, conforme a sus siglas en inglés). En algunas formas de realización, la citosina

desaminasa puede ser una APOBEC1 desaminasa, una APOBEC2 desaminasa, una APOBEC3A desaminasa, una APOBEC3B desaminasa, una APOBEC3C desaminasa, una APOBEC3D desaminasa, una APOBEC3F desaminasa, una APOBEC3G desaminasa, una APOBEC3H desaminasa, una APOBEC4 desaminasa, una desaminasa inducida por la activación humana (hAID), una rAPOBEC1, FERNY, y/o una CDA1, opcionalmente, una pmCDA1, una atCDA1 (por ej., At2g19570), y versiones evolucionadas de las mismas (por ej., **SEQ ID NOS 27, SEQ ID NOS 28 o SEQ ID NOS 29**). En algunas formas de realización, la citosina desaminasa puede ser una APOBEC1 desaminasa que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NOS 23**. En algunas formas de realización, la citosina desaminasa puede ser una APOBEC3A desaminasa que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NOS 24**. En algunas formas de realización, la citosina desaminasa puede ser una CDA1 desaminasa, opcionalmente una CDA1 que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NOS 25**. En algunas formas de realización, la citosina desaminasa puede ser una FERNY desaminasa, opcionalmente una FERNY que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NOS 26**. En algunas formas de realización, una citosina desaminasa útil con la invención puede ser alrededor de 70 % a alrededor de 100 % idéntica (por ej., 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % idéntica) a la secuencia de aminoácidos de una citosina desaminasa natural (por ej., una desaminasa evolucionada). En algunas formas de realización, una citosina desaminasa útil con la invención puede ser alrededor de 70 % a alrededor de 99,5 % idénticos (por ej., alrededor de 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 99,5 % idéntica) a la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NOS 23, SEQ ID NOS 24, SEQ ID NOS 25 o SEQ ID NOS 26** (por ej., por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 92 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 %, o por lo menos 99,5 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NOS 23, SEQ ID NOS 24, SEQ ID NOS 25, SEQ ID NOS 26, SEQ ID NOS 27, SEQ ID NOS 28 o SEQ ID NOS 29**). En algunas formas de realización, un polinucleótido que codifica una citosina desaminasa puede ser optimizado por codones para la expresión en una planta, y el polipéptido optimizado por codones puede ser de alrededor de 70 % a 99,5 % idéntico al polinucleótido de referencia.

En algunas formas de realización, una construcción de ácido nucleico de esta invención puede codificar además un polipéptido/dominio inhibidor de uracilo glicosilasa

(UGI) (p. ej., inhibidor de uracilo-ADN glicosilasa). Por lo tanto, en algunas formas de realización, una construcción de ácido nucleico que codifica una proteína efectora CRISPR-Cas y un dominio de citosina desaminasa (p. ej., que codifica una proteína de fusión que comprende un dominio de proteína efectora CRISPR-Cas fusionado con un dominio de citosina desaminasa, y/o un dominio de proteína efectora CRISPR-Cas fusionado a una etiqueta peptídica o a un polipéptido de afinidad capaz de unirse a una etiqueta peptídica y/o un dominio de proteína desaminasa fusionado a una etiqueta peptídica o a un polipéptido de afinidad capaz de unirse a una etiqueta peptídica) puede codificar además un inhibidor de uracil-ADN glicosilasa (UGI), opcionalmente en donde el UGI puede tener codones optimizados para la expresión en una planta. En algunas formas de realización, la invención proporciona proteínas de fusión que comprenden un polipéptido efector CRISPR-Cas, un dominio desaminasa y un UGI y/o uno o más polinucleótidos que los codifican, opcionalmente donde los uno o más polinucleótidos pueden tener codones optimizados para la expresión en una planta. En algunas formas de realización, la invención proporciona proteínas de fusión, en las que un polipéptido efector CRISPR-Cas, un dominio desaminasa y un UGI pueden fusionarse con cualquier combinación de etiquetas peptídicas y polipéptidos de afinidad como se describe en el presente documento, para reclutar así el dominio desaminasa y el UGI al polipéptido efector CRISPR-Cas y un ácido nucleico diana. En algunas formas de realización, un ácido nucleico guía puede unirse a un motivo de ARN de reclutamiento y uno o más del dominio de desaminasa y/o UGI pueden fusionarse con un polipéptido de afinidad que es capaz de interactuar con el motivo de ARN de reclutamiento, de modo de reclutar así el dominio de desaminasa y UGI a un ácido nucleico diana.

Un "inhibidor de uracilo glicosilasa" útil con la invención puede ser cualquier proteína que sea capaz de inhibir una enzima reparadora de escisión de base de uracilo-ADN glicosilasa. En algunas formas de realización, un dominio de UGI comprende un UGI de tipo salvaje o un fragmento del mismo. En algunas formas de realización, un dominio UGI útil con la invención puede ser alrededor de 70 % a alrededor de 100 % idéntico (por ej., 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % idéntico y cualquier rango o valor entre ellos) a la secuencia de aminoácidos de un dominio UGI natural. En algunas formas de realización, un dominio UGI puede comprender la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NOS 41** o un polipéptido que tiene alrededor de 70 % a alrededor de 99,5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NOS 41** (por ej., por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo

menos 90 %, por lo menos 92 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 %, o por lo menos 99,5 % idénticos a la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NOS 41**). Por ejemplo, en algunas formas de realización, un dominio UGI puede comprender un fragmento de la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NOS 41** que es 100 % idéntica a una porción de nucleótidos consecutivos (por ej., 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 nucleótidos consecutivos; por ej., alrededor de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, a alrededor de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 nucleótidos consecutivos) de la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NOS 41**. En algunas formas de realización, un dominio UGI puede ser una variante de un UGI conocido (por ej., **SEQ ID NOS 41**) que tiene alrededor de 70 % a alrededor de 99,5 % de identidad de secuencia (por ej., 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % de identidad de secuencia, y cualquier rango o valor entre ellos) con respecto al UGI conocido. En algunas formas de realización, un polinucleótido que codifica un UGI puede ser optimizado por codones para la expresión en una planta (por ej., una planta), y el polipéptido optimizado por codones puede ser alrededor de 70 % a alrededor de 99,5 % idéntico al polinucleótido de referencia.

Una adenina desaminasa (o adenosina desaminasa) útil con esta invención puede ser cualquier adenina desaminasa conocida o identificada posteriormente de cualquier organismo (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. Nro. 10.113.163, que se incorpora por referencia en el presente documento por su divulgación de las adenina desaminasas). Una adenina desaminasa puede catalizar la desaminación hidrolítica de adenina o adenosina. En algunas formas de realización, la adenina desaminasa puede catalizar la desaminación hidrolítica de adenosina o desoxiadenosina a inosina o desoxiinosina, respectivamente. En algunas formas de realización, la adenosina desaminasa puede catalizar la desaminación hidrolítica de adenina o adenosina en el ADN. En algunas formas de realización, una adenina desaminasa codificada por una construcción de ácido nucleico de la invención puede generar una conversión A→G en la hebra sentido (p. ej., "+"; patrón) del ácido nucleico diana, o una conversión T→C en la hebra antisentido (p. ej., "-", complementaria) del ácido nucleico diana.

En algunas formas de realización, una adenosina desaminasa puede ser una variante de una adenina desaminasa natural. Por lo tanto, en algunas formas de realización, una adenosina desaminasa puede ser alrededor del 70 % al 100 % idéntica a una adenina desaminasa de tipo salvaje (por ej., alrededor de 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % de identidad de secuencia, y cualquier rango o valor entre ellos) con respecto a la adenina desaminasa de tipo salvaje.

77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica, y cualquier rango o valor entre ellos, a una adenina desaminasa natural). En algunas formas de realización, la desaminasa o desaminasa no se produce en la naturaleza, y puede ser referida como una

5 adenosina desaminada diseñada, mutada o evolucionada. Por lo tanto, por ejemplo, un polipéptido de adenina desaminasa o un dominio de adenina desaminasa diseñado, mutado o evolucionado puede ser de alrededor de 70 % a 99,9 % idéntico a un polipéptido o dominio de adenina desaminasa natural (por ej., alrededor de 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 % o 99,9 % idéntico, y cualquier rango o valor entre ellos, a un

10 polipéptido de adenina desaminasa o dominio de adenina desaminasa natural). En algunas formas de realización, la adenosina desaminasa puede ser de una bacteria (por ej., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Caulobacter crescentus*, y similares). En algunas formas de realización, un polinucleótido que codifica un polipéptido o dominio de adenina desaminasa puede ser optimizado por codones para la expresión en una planta.

En algunas formas de realización, un dominio de adenina desaminasa puede ser un dominio de adenosina desaminasa específico de ARNt de tipo salvaje, por ej., dominio de

20 adenosina desaminasa (TadA) específico de ARNt y/o un dominio de adenosina desaminasa mutado/evolucionado, por ej., dominio de adenosina desaminasa específico de ARNt mutado/evolucionado (TadA\*). En algunas formas de realización, un dominio de TadA puede ser de *E. coli*. En algunas formas de realización, el TadA puede ser modificado, por ej., truncado, al que le faltan uno o más aminoácidos N–terminales y/o C–terminales en relación

25 con un TadA de longitud completa (por ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 6, 17, 18, 19, o 20 residuos de aminoácidos N–terminales y/o C terminales pueden faltar en relación con un TadA de longitud completa). En algunas formas de realización, un polipéptido TadA o dominio TadA no comprende una metionina N–terminal. En algunas formas de realización, un TadA de *E. coli* de tipo salvaje comprende la secuencia de

30 aminoácidos de **SEQ ID NO: 30**. En algunas formas de realización, un TadA\* de *E. coli* mutado/evolucionado comprende la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 31–40** (por ej., **SEQ ID NOs: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40**). En algunas formas de realización, un polinucleótido que codifica un TadA/TadA\* puede ser optimizado por codones para la expresión en una planta.

Una citosina desaminasa cataliza la desaminación de citosina y da como resultado una timidina (a través de un intermediario de uracilo), lo que provoca una conversión de C a T o una conversión de G a en la hebra complementaria en el genoma. Por lo tanto, en algunas formas de realización, la citosina desaminasa codificada por el polinucleótido de la invención genera una conversión C→T en la hebra sentido (p. ej., "+"; patrón) del ácido nucleico diana, o una conversión G→A en la hebra antisentido (p. ej., "-", complementaria) del ácido nucleico diana.

En algunas formas de realización, la adenina desaminasa codificada por la construcción de ácido nucleico de la invención genera una conversión A→G en la hebra sentido (p. ej., "+"; patrón) del ácido nucleico diana, o una conversión T→C en la hebra antisentido (por ejemplo, "-", complementaria) del ácido nucleico diana.

Las construcciones de ácido nucleico de la invención que codifican un editor de bases que comprende una proteína de unión a ADN específica de secuencia y un polipéptido de citosina desaminasa, y las construcciones de ácido nucleico, casetes de expresión, vectores que los codifican pueden usarse en combinación con ácidos nucleicos guía para modificar ácido nucleico diana, lo que incluye, sin limitación, la generación de mutaciones C→T o G→A en un ácido nucleico diana, lo que incluye, sin limitación, una secuencia de plásmido; generación de mutaciones C→T o G→A en una secuencia codificante para alterar la identidad de un aminoácido; generación de mutaciones C→T o G→A en una secuencia codificante para generar un codón de detención; generación de mutaciones C→T o G→A en una secuencia codificante para alterar un codón de inicio; generación de mutaciones puntuales en el ADN genómico para alterar la unión del factor de transcripción; y/o generación de mutaciones puntuales en el ADN genómico para alterar las uniones de empalme.

Las construcciones de ácido nucleico de la invención que codifican un editor de bases que comprende una proteína de unión de ADN específica de secuencia y un polipéptido de adenina desaminasa, y los casetes de expresión y/o vectores que los codifican pueden usarse en combinación con ácidos nucleicos guía para modificar un ácido nucleico diana, lo que incluye, sin limitación, la generación de mutaciones A→G o T→C en un ácido nucleico diana que incluye, sin limitación, una secuencia de plásmido; generación de mutaciones A→G o T→C en una secuencia codificante para alterar la identidad de un aminoácido; generación de mutaciones A→G o T→C en una secuencia codificante para generar un codón de detención; generación de mutaciones A→G o T→C en una secuencia codificante para alterar un codón de inicio; generación de mutaciones puntuales en el ADN genómico para

alterar la unión del factor de transcripción; y/o generación de mutaciones puntuales en el ADN genómico para interrumpir las uniones de empalme.

Las construcciones de ácido nucleico de la invención que comprenden una proteína efectora CRISPR–Cas o una proteína de fusión de la misma pueden usarse en combinación con un ARN guía (ARNg, matriz CRISPR, ARN de CRISPR, ARNcr), diseñado para funcionar con la proteína o el dominio efector CRISPR–Cas codificado, para modificar un ácido nucleico diana. Un ácido nucleico guía útil con esta invención comprende por lo menos una secuencia espaciadora y por lo menos una secuencia de repetición. El ácido nucleico guía es capaz de formar un complejo con el dominio de nucleasa de CRISPR–Cas codificado y expresado por una construcción de ácido nucleico de la invención, y la secuencia espaciadora es capaz de hibridar con un ácido nucleico diana, para guiar así el complejo (por ejemplo, una proteína de fusión efectora CRISPR–Cas (p. ej., dominio efector CRISPR–Cas fusionado con un dominio de desaminasa, y/o dominio efector CRISPR–Cas fusionado con una etiqueta peptídica o un polipéptido de afinidad para reclutar un dominio de desaminasa y, opcionalmente, un UGI) al ácido nucleico diana, donde el ácido nucleico diana puede ser modificado (p. ej., escindido o editado) o modulado (p. ej., modulación de la transcripción) por el dominio de desaminasa.

A modo de ejemplo, una construcción de ácido nucleico que codifica un dominio Cas9 unido a un dominio de citosina desaminasa (p. ej., proteína de fusión) puede usarse en combinación con un ácido nucleico guía Cas9 para modificar un ácido nucleico diana, donde el dominio de citosina desaminasa de la proteína de fusión desamina una base citosina en el ácido nucleico diana, de manera de editar así el ácido nucleico diana. En otro ejemplo, una construcción de ácido nucleico que codifica un dominio Cas9 unido a un dominio de adenina desaminasa (p. ej., proteína de fusión) puede usarse en combinación con un ácido nucleico guía Cas9 para modificar un ácido nucleico diana, donde el dominio de adenina desaminasa de la proteína de fusión desamina una base de adenosina en el ácido nucleico diana, para editar así el ácido nucleico diana.

Asimismo, una construcción de ácido nucleico que codifica un dominio Cas12a (u otra nucleasa CRISPR–Cas seleccionada, por ejemplo, C2c1, C2c3, Cas12b, Cas12c, Cas12d, Cas12e, Cas13a, Cas13b, Cas13c, Cas13d, Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas3', Cas3'', Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (también conocida como Csn1 y Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Cse1, Cse2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 (dinG), y/o Csf5) unido a un dominio de citosina desaminasa o

dominio de adenina desaminasa (por ej., proteína de fusión) puede ser usada en combinación con un ácido nucleico guía Cas12 (o el ácido nucleico guía para la otra nucleasa CRISPR–Cas seleccionada) para modificar un ácido nucleico diana, donde el dominio de citosina desaminasa o dominio de adenina desaminasa de la proteína de fusión desamina una base de citosina en el ácido nucleico diana, a fin de editar así el ácido nucleico diana.

Un "ácido nucleico guía", "ARN guía", "ARNg", "ARN/ADN CRISPR", "ARNcr" o "ADNcr", como se usa en el presente documento, significa un ácido nucleico que comprende por lo menos una secuencia espaciadora, que es complementaria a (y se hibrida con) un ADN diana (p. ej., protoespaciador) y por lo menos una secuencia de repetición (p. ej., una repetición de un sistema CRISPR–Cas Cas12a Tipo V, o un fragmento o una porción del mismo; una repetición de un sistema CRISPR–Cas Cas9 Tipo II o un fragmento del mismo; una repetición de un sistema CRISPR Cas C2c1 Tipo V, o un fragmento del mismo; una repetición de un sistema CRISPR–Cas de, por ejemplo, C2c3, Cas12a (también referida como Cpf1), Cas12b, Cas12c, Cas12d, Cas12e, Cas13a, Cas13b, Cas13c, Cas13d, Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas3', Cas3", Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (también conocida como Csn1 y Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Cse1, Cse2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 (dinG), y/o Csf5, o un fragmento del mismo), donde la secuencia de repetición puede unirse al extremo 5' y/o el extremo 3' de la secuencia de espaciador. El diseño de un ARNg de esta invención puede ser sobre la base de un sistema CRISPR–Cas Tipo I, Tipo II, Tipo III, Tipo IV, Tipo V, o Tipo VI.

En algunas formas de realización, un ARNg de Cas12a puede comprender, de 5' a 3', una secuencia de repetición (longitud completa o una porción de la misma ("mango")); por ejemplo, estructura de tipo pseudonudo) y una secuencia espaciadora.

En algunas formas de realización, un ácido nucleico guía puede comprender más de una secuencia de repetición–secuencia espaciadora (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más secuencias de repetición–espaciadoras) (por ejemplo, secuencias de repetición–espaciadora–repetición), por ejemplo, repetición–espaciador–repetición–espaciador–repetición–espaciador–repetición–espaciador–repetición–espaciador, y similares). Los ácidos nucleicos guía de esta invención son sintéticos, fabricados por humanos, y no hallados en la naturaleza. Un ARNg puede ser muy largo, y puede usarse como un aptámero (como en la estrategia de reclutamiento de MS2) u otras estructuras de ARN que cuelgan del espaciador.

Una "secuencia de repetición" como se usa aquí, se refiere, por ejemplo, a cualquier secuencia de repetición de un locus CRISPR Cas de tipo salvaje (por ejemplo, un locus Cas9,

un locus Cas12a, un locus C2c1, etc.) o una secuencia de repetición de un ARNcr sintético que es funcional con la proteína efectora CRISPR–Cas codificada por las construcciones de ácido nucleico de la invención. Una secuencia de repetición útil con esta invención puede ser cualquier secuencia de repetición conocida o identificada posteriormente de un locus

5 CRISPR–Cas (por ejemplo, Tipo I, Tipo II, Tipo III, Tipo IV, Tipo V o Tipo VI), o puede ser una repetición sintética diseñado para funcionar en un sistema CRISPR–Cas Tipo I, II, III, IV, V o VI. Una secuencia de repetición puede comprender una estructura de horquilla y/o una estructura de bucle de tallo. En algunas formas de realización, una secuencia de repetición puede formar una estructura de tipo pseudonudo en su extremo 5' (es decir,  
10 "mango"). Por lo tanto, en algunas formas de realización, una secuencia de repetición puede ser idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia de repetición de loci de CRISPR–CAS de Tipo I de tipo salvaje, loci de CRISPR–Cas Tipo II, loci de CRISPR–Cas Tipo III, loci de CRISPR–Cas Tipo IV, loci de CRISPR–Cas Tipo V y/o loci de CRISPR–Cas Tipo VI. Se puede determinar una secuencia de repetición de un locus CRISPR–Cas de tipo salvaje  
15 a través de algoritmos establecidos, como el uso de CRISPRfinder ofrecido a través de CRISPRdb (ver, Grissa et al. *Nucleic Acids Res.* 35 (edición del servidor web): W52–7). En algunas formas de realización, una secuencia de repetición o una porción de la misma está unida en su extremo 3' al extremo 5' de una secuencia espaciadora, de modo de formar así una secuencia de repetición–espaciadora (p. ej., ácido nucleico guía, ARN guía/ADN,  
20 ARNcr, ADNcr).

En algunas formas de realización, una secuencia de repetición comprende, consiste esencialmente en, o consiste en por lo menos 10 nucleótidos de acuerdo con la repetición particular y si el ácido nucleico guía que comprende la repetición está procesado o sin procesar (por ej., alrededor de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26,  
25 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 a 100 o más nucleótidos, o cualquier rango o valor entre ellos). En algunas formas de realización, una secuencia de repetición comprende, consiste esencialmente en, o consiste en alrededor de 10 a alrededor de 20, alrededor de 10 a alrededor de 30, alrededor de 10 a alrededor de 45, alrededor de 10 a alrededor de 50, alrededor de 15 a alrededor de 30,  
30 alrededor de 15 a alrededor de 40, alrededor de 15 a alrededor de 45, alrededor de 15 a alrededor de 50, alrededor de 20 a alrededor de 30, alrededor de 20 a alrededor de 40, alrededor de 20 a alrededor de 50, alrededor de 30 a alrededor de 40, alrededor de 40 a alrededor de 80, alrededor de 50 a alrededor de 100 o más nucleótidos.

Una secuencia de repetición unida al extremo 5' de una secuencia espaciadora puede comprender una porción de una secuencia de repetición (por ej., 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o más nucleótidos contiguos de una secuencia de repetición de tipo salvaje). En algunas formas de realización, una porción de una secuencia de repetición unida al extremo 5' de una secuencia espaciadora puede ser de alrededor de cinco a alrededor de diez nucleótidos consecutivos de longitud (por ej., alrededor de 5, 6, 7, 8, 9, 10 nucleótidos) y tener por lo menos 90 % de identidad de secuencia (por ej., por lo menos alrededor de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más) (p. ej., 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, o 100 %)) con respecto a la misma región (por ej., extremo 5') de una secuencia de nucleótido de repetición CRISPR Cas de tipo salvaje. En algunas formas de realización, una porción de una secuencia de repetición puede comprender una estructura de tipo pseudonudo en su extremo 5' (por ej., "mango").

Una "secuencia espaciadora" como se usa en el presente documento es una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ácido nucleico objetivo (p. ej., ADN objetivo) (p. ej., protoespaciador) (p. ej., una porción de nucleótidos consecutivos de una secuencia (a) que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 69**, **SEQ ID NO: 70**, y/o **SEQ ID NO: 80**; y/o (b) que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80 % de identidad de secuencia con respecto a **SEQ ID NO: 71**). En algunas formas de realización, una secuencia espaciadora (p. ej., uno o más espaciadores) puede incluir, sin limitación, la secuencia de nucleótidos de **SEQ ID NOs: 76, 80** y/o **81**, o cualquiera de sus combinaciones. La secuencia espaciadora puede ser completamente complementaria o sustancialmente complementaria (p. ej., por lo menos alrededor de 70 % complementaria (p. ej., alrededor de 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más (p. ej., 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, o 100 %)) a un ácido nucleico objetivo. En consecuencia, en algunas formas de realización, la secuencia espaciadora puede tener uno, dos, tres, cuatro o cinco desajustes en comparación con el ácido nucleico objetivo, donde dichos desajustes pueden ser contiguos o no contiguos. En algunas formas de realización, la secuencia espaciadora puede tener 70 % de complementariedad a un ácido nucleico objetivo. En otras formas de realización, la secuencia de nucleótidos espaciadora puede tener 80 % de complementariedad a un ácido nucleico objetivo. En aún otras formas de realización, la secuencia de nucleótidos espaciadora puede tener 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de

complementariedad, y similares, a la secuencia de ácido nucleico (protoespaciador). En algunas formas de realización, la secuencia espaciadora es 100 % complementaria al ácido nucleico objetivo. Una secuencia espaciadora puede tener una longitud de alrededor de 15 nucleótidos a alrededor de 30 nucleótidos (p. ej., 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos, o cualquier rango o valor entre ellos). En consecuencia, en algunas formas de realización, una secuencia espaciadora puede tener complementariedad completa o complementariedad sustancial sobre una región de un ácido nucleico objetivo (p. ej., protoespaciador) que es por lo menos de alrededor de 15 nucleótidos a alrededor de 30 nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, el espaciador es de alrededor de 20 nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, el espaciador es de alrededor de 21, 22, o 23 nucleótidos de longitud.

En algunas formas de realización, la región 5' de una secuencia espaciadora de un ácido nucleico guía puede ser idéntica a un ADN objetivo, mientras que la región 3' del espaciador puede ser sustancialmente complementaria al ADN objetivo (por ejemplo, CRISPR–Cas tipo V), o la región 3' de una secuencia espaciadora de un ácido nucleico guía puede ser idéntica a un ADN objetivo, mientras que la región 5' del espaciador puede ser sustancialmente complementaria al ADN objetivo (por ejemplo, CRISPR–Cas tipo II), y por lo tanto, la complementariedad general de la secuencia espaciadora con el ADN objetivo puede ser inferior al 100 %. Así, por ejemplo, en una guía para un sistema CRISPR–Cas Tipo V, los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nucleótidos en la región 5' (es decir, región semilla) de, por ejemplo, una secuencia espaciadora de 20 nucleótidos pueden ser 100 % complementarios al ADN objetivo, mientras que los nucleótidos restantes en la región 3' de la secuencia espaciadora son sustancialmente complementarios (por ejemplo, por lo menos alrededor de 70 % complementarios) al ADN objetivo. En algunas formas de realización, los primeros 1 a 8 nucleótidos (por ejemplo, los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 nucleótidos y cualquier rango en los mismos) del extremo 5' de la secuencia espaciadora pueden ser 100 % complementarios al ADN objetivo, mientras que los nucleótidos restantes en la región 3' de la secuencia espaciadora son sustancialmente complementarios (por ejemplo, por lo menos alrededor de 50 % complementarios (por ejemplo, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más)) al ADN objetivo.

A modo de ejemplo adicional, en una guía para un sistema CRISPR–Cas tipo II, los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nucleótidos en la región 3' (es decir, la región semilla) de,

por ejemplo, una secuencia espaciadora de 20 nucleótidos puede ser 100 % complementaria al ADN objetivo, mientras que los restantes nucleótidos en la región 5' de la secuencia espaciadora son sustancialmente complementarios (p. ej., por lo menos alrededor de 70 % complementarios) al ADN objetivo. En algunas formas de realización, los primeros 1 a 10 nucleótidos (p. ej., los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nucleótidos, y cualquier rango entre ellos) del extremo 3' de la secuencia espaciadora pueden ser 100 % complementarios al ADN objetivo, mientras que los restantes nucleótidos en la región 5' de la secuencia espaciadora son sustancialmente complementarios (p. ej., por lo menos alrededor de 50 % complementarios (p. ej., por lo menos alrededor de 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más o cualquier rango o valor entre ellos)) al ADN objetivo.

En algunas formas de realización, una región de semilla de un espaciador puede ser alrededor de 8 a alrededor de 10 nucleótidos de longitud, alrededor de 5 a alrededor de 6 nucleótidos de longitud, o alrededor de 6 nucleótidos de longitud.

Como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico objetivo/diana", "ADN objetivo/diana", "secuencia de nucleótidos objetivo/diana", "región objetivo/diana" o una "región objetivo/diana en el genoma" se refiere a una región del genoma de una planta que es completamente complementaria (100 % complementaria) o sustancialmente complementaria (p. ej., por lo menos 70 % complementaria (p. ej., 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o más)) a una secuencia espaciadora en un ácido nucleico guía de esta invención. Una región objetivo útil para un sistema CRISPR–Cas puede estar ubicada inmediatamente 3' (p. ej., sistema CRISPR–Cas tipo V) o inmediatamente 5' (p. ej., sistema CRISPR–Cas tipo II) a una secuencia PAM en el genoma del organismo (p. ej., el genoma de una planta). Una región objetivo puede ser seleccionada de cualquier región de por lo menos 15 nucleótidos consecutivos (p. ej., 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos, y similares) ubicada inmediatamente adyacente a una secuencia PAM.

Una "secuencia protoespaciadora/de protoespaciador" se refiere al ADN objetivo de doble hebra, y específicamente a la porción del ADN objetivo (por ejemplo, o región objetivo en el genoma) que es completa o sustancialmente complementaria (e híbrida) a la secuencia espaciadora de las secuencias de repetición–espaciador de CRISPR (p. ej., ácidos nucleicos guía, matrices CRISPR, ARNcr).

En el caso de los sistemas CRISPR–Cas Tipo V (p. ej., Cas12a) y CRISPR–Cas Tipo II (Cas9), la secuencia de protoespaciador está flanqueada por (p. ej., inmediatamente adyacente a) un motivo adyacente a protoespaciador (PAM). Para los sistemas CRISPR–Cas Tipo IV, el PAM está ubicado en el extremo 5' de la hebra no objetivo y en el extremo 3' de la hebra objetivo (ver a continuación, como ejemplo).

```

5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3' ARN espaciador
    | | | | | | | | | | | | | |
3'AANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-5' Hebra objetivo
    | | | |
5'TTTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3' Hebra no objetivo

```

En el caso de los sistemas CRISPR–Cas Tipo II (p. ej., Cas9), el PAM se ubica inmediatamente 3' de la región objetivo. El PAM para los sistemas CRISPR–Cas Tipo I se encuentra 5' de la hebra objetivo. No hay PAM conocido para los sistemas CRISPR–Cas Tipo III. Makarov et al. describe la nomenclatura de todas las clases, tipos y subtipos de sistemas CRISPR (*Nature Reviews Microbiology* 13: 722–736 (2015)). Las estructuras guía y los PAM se describen en R. Barrangou (*Genome Biol.* 16: 247 (2015)).

Los PAM Cas12a canónicos son ricos en T. En algunas formas de realización, una secuencia PAM Cas12a canónica puede ser 5'–TTN, 5'–TTTN o 5'–TTTV. En algunas formas de realización, los PAM Cas9 canónicos (p. ej., *S. pyogenes*) pueden ser 5'–NGG–3'. En algunas formas de realización, se pueden usar PAM no canónicos, pero pueden ser menos eficientes.

Los expertos en la técnica pueden determinar secuencias de PAM adicionales a través de enfoques experimentales y computacionales establecidos. Por lo tanto, por ejemplo, los enfoques experimentales incluyen el direccionamiento de una secuencia flanqueada por todas las secuencias de nucleótidos posibles y la identificación de miembros de la secuencia que no se someten a direccionamiento, tal como a través de la transformación del ADN del plásmido objetivo (Esvelt et al. 2013. *Nat. Methods* 10:1116–1121; Jiang et al. 2013. *Nat. Biotechnol.* 31:233–239). En algunos aspectos, un enfoque computacional puede incluir realizar búsquedas BLAST de espaciadores naturales para identificar las secuencias de ADN objetivo originales en bacteriófagos o plásmidos y alinear estas secuencias para determinar secuencias conservadas adyacentes a la secuencia objetivo (Briner y Barrangou. 2014. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:994–1001; Mojica et al. 2009. *Microbiology* 155:733–740).

En algunas formas de realización, la presente invención proporciona casetes de expresión y/o vectores que comprenden las construcciones de ácido nucleico de la invención

(p. ej., uno o más componentes de un sistema de edición de la invención). En algunas formas de realización, pueden proporcionarse casetes de expresión y/o vectores que comprenden las construcciones de ácido nucleico de la invención y/o uno o más ácidos nucleicos guía. En algunas formas de realización, una construcción de ácido nucleico de la invención que

5 codifica un editor de bases (p. ej., una construcción que comprende una proteína efectora CRISPR–Cas y un dominio desaminasa (p. ej., una proteína de fusión)) o los componentes para la edición de bases (p. ej., una proteína efectora CRISPR–Cas fusionada con una etiqueta peptídica o un polipéptido de afinidad, un dominio de desaminasa fusionado con una etiqueta peptídica, o un polipéptido de afinidad y/o una UGI fusionado con una etiqueta

10 peptídica o un polipéptido de afinidad), puede estar comprendida en el mismo casete de expresión o vector, o en uno separado, respecto del que comprende uno o más ácidos nucleicos guía. Cuando la construcción de ácido nucleico que codifica un editor de bases o los componentes para la edición de bases están incluidos en casetes o vectores de expresión separados respecto del que comprende el ácido nucleico guía, se pueden poner en contacto un

15 ácido nucleico diana (p. ej., provisto con) con el(los) casete(s) de expresión o el(los) vector(es) que codifica(n) el editor de bases o los componentes para la edición de bases en cualquier orden entre sí, y se proporciona el ácido nucleico guía, por ejemplo, antes, al mismo tiempo o después del casete de expresión que comprende el ácido nucleico guía (p. ej., se pone en contacto con el ácido nucleico diana).

20 Las proteínas de fusión de la invención pueden comprender dominios de unión de ácidos nucleicos específicos de secuencia (p. ej., dominios de unión de ADN específicos de secuencia), polipéptidos CRISPR–Cas y/o dominios de desaminasa fusionados con etiquetas peptídicas o polipéptidos de afinidad que interactúan con las etiquetas peptídicas, como es conocido en la técnica, para el uso en el reclutamiento de la desaminasa al ácido nucleico

25 diana. Los métodos de reclutamiento también pueden comprender ácidos nucleicos guía unidos a motivos de reclutamiento de ARN y desaminasas fusionadas con polipéptidos de afinidad capaces de interactuar con motivos de reclutamiento de ARN, para reclutar así la desaminasa al ácido nucleico diana. Alternativamente, pueden usarse interacciones químicas para reclutar polipéptidos (p. ej., desaminasas) a un ácido nucleico diana.

30 Una etiqueta peptídica (p. ej., un epítipo) útil con esta invención puede incluir, sin limitación, una etiqueta peptídica GCN4 (p. ej., Sun–Tag), una etiqueta de afinidad c–Myc, una etiqueta de afinidad HA, una etiqueta de afinidad His, una etiqueta de afinidad S, una etiqueta de afinidad metionina–His, una etiqueta de afinidad RGD–His, un octapéptido FLAG, una etiqueta estrep o etiqueta estrep II, una etiqueta V5 y/o un epítipo VSV–G.

Cualquier epítopo que pueda ser unido a un polipéptido y para el cual hay un correspondiente polipéptido de afinidad que puede ser unido a otro polipéptido puede ser usado con esta invención como una etiqueta peptídica. En algunas formas de realización, una etiqueta peptídica puede comprender 1 o 2 o más copias de una etiqueta peptídica (p. ej., unidad de repetición, epítopo multimerizado (p. ej., repeticiones en tándem)) (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más unidades de repetición). En algunas formas de realización, un polipéptido de afinidad que interactúa con/se une a una etiqueta peptídica puede ser un anticuerpo. En algunas formas de realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo scFv. En algunas formas de realización, un polipéptido de afinidad que se une a una etiqueta peptídica puede ser sintético (p. ej., evolucionado para interacción por afinidad), que incluye, sin limitación, un aficuerpo, una anticalina, un monocuerpo y/o un DARPIn (ver, p. ej., Sha et al., *Protein Sci.* 26 (5): 910–924 (2017)); Gilbreth (*Curr Opin Struc Biol* 22 (4): 413–420 (2013)), Patente U. S. Nro. 9.982.053, cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad para las enseñanzas pertinentes a aficuerpos, anticalinas, monocuerpos y/o DARPIn. Ejemplos de secuencias de etiqueta peptídica y sus polipéptidos de afinidad incluyen, sin limitación, las secuencias de aminoácidos de **SEQ ID NOs: 42–44**.

En algunas formas de realización, un ácido nucleico guía se puede unir a un motivo de reclutamiento de ARN, y un polipéptido que se va a reclutar (p. ej., una desaminasa) se puede fusionar con un polipéptido de afinidad que se une al motivo de reclutamiento de ARN, donde la guía se une al el ácido nucleico diana y el motivo de reclutamiento de ARN se une al polipéptido de afinidad, para reclutar así el polipéptido a la guía y poner en contacto el ácido nucleico diana con el polipéptido (p. ej., desaminasa). En algunas formas de realización, se pueden reclutar dos o más polipéptidos para un ácido nucleico guía, para de ese modo poner en contacto el ácido nucleico diana con dos o más polipéptidos (p. ej., desaminasas). Ejemplos de motivos de reclutamiento de ARN y sus polipéptidos de afinidad incluyen, sin limitación, las secuencias de **SEQ ID NO: 45–55**.

En algunas formas de realización, un polipéptido fusionado con un polipéptido de afinidad puede ser una transcriptasa inversa, y el ácido nucleico guía puede ser un ácido nucleico guía extendido unido a un motivo de reclutamiento de ARN. En algunas formas de realización, un motivo de reclutamiento de ARN puede ubicarse en el extremo 3' de la porción extendida de un ácido nucleico guía extendido (p. ej., 5'–3', porción de repetición–espaciador–extendida (sitio de unión de cebador–patrón de RT)–motivo de reclutamiento de

ARN). En algunas formas de realización, un motivo de reclutamiento de ARN puede estar incrustado en la porción extendida.

En algunas formas de realización de la invención, un ARN guía extendido y/o un ARN guía puede estar unido a uno o dos o más motivos de reclutamiento de ARN (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más motivos; por ejemplo, por lo menos 10 a alrededor de 25 motivos), opcionalmente donde los dos o más motivos de reclutamiento de ARN pueden ser el mismo motivo de reclutamiento de ARN o diferentes motivos de reclutamiento de ARN. En algunas formas de realización, un motivo de reclutamiento de ARN y el polipéptido de afinidad correspondiente pueden incluir, entre otros, un motivo de unión de telomerasa Ku (p. ej., horquilla de unión de Ku) y el polipéptido de afinidad correspondiente Ku (p. ej., heterodímero Ku), un motivo de unión de telomerasa Sm7 y el polipéptido de afinidad correspondiente Sm7, un tallo–bucle de operador de fago MS2 y la correspondiente proteína de cubierta MS2 de polipéptido de afinidad (MCP), un tallo–bucle de operador de fago PP7 y la correspondiente proteína de cubierta de polipéptido de afinidad PP7 (PCP), un bucle–tallo de fago SfMu Com y la correspondiente proteína de unión de ARN Com de polipéptido de afinidad, un sitio de unión de PUF (PBS) y el polipéptido de afinidad Pumilio/factor de unión de ARNm fem–3 (PUF), y/o un aptámero de ARN sintético y el ligando de aptámero como el polipéptido de afinidad correspondiente. En algunas formas de realización, el motivo de reclutamiento de ARN y el polipéptido de afinidad correspondiente pueden ser un tallo–bucle de operador de fago MS2 y la proteína de cubierta MS2 del polipéptido de afinidad (MCP). En algunas formas de realización, el motivo de reclutamiento de ARN y el polipéptido de afinidad correspondiente pueden ser un sitio de unión de PUF (PBS), y el polipéptido de afinidad Pumilio/factor de unión de ARNm fem–3 (PUF).

En algunas formas de realización, los componentes para reclutar polipéptidos y ácidos nucleicos pueden ser aquellos que funcionan a través de interacciones químicas que pueden incluir, entre otras, dimerización inducible por rapamicina de FRB – FKBP; biotina–estreptavidina; etiqueta SNAP; etiqueta de halo; etiqueta CLIP; heterodímero DmrA–DmrC inducido por un compuesto; ligando bifuncional (p. ej., fusión de dos productos químicos de unión a proteínas, p. ej., dihidrofolato reductasa (DHFR).

En algunas formas de realización, las construcciones de ácido nucleico, los casetes de expresión o vectores de la invención que están optimizados para la expresión en una planta pueden ser alrededor de 70 % a 100 % idénticos (por ej., alrededor de 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100

%) a las construcciones de ácido nucleico, los casetes de expresión o vectores que comprenden los mismos polinucleótidos pero que no han sido optimizados con codones para la expresión en una planta (p. ej., una planta de frambuesa negra).

Además, en el presente documento se proporcionan células que comprenden uno o más polinucleótidos, ácidos nucleicos guía, construcciones de ácidos nucleicos, casetes de expresión o vectores de la invención.

Las construcciones de ácido nucleico de la invención (p. ej., una construcción que comprende un dominio de unión de ADN específico de secuencia, un dominio efector CRISPR–Cas, un dominio desaminasa, transcriptasa inversa (RT), patrón de RT y/o un ácido nucleico guía, etc.) y los casetes/vectores de expresión que las comprenden pueden usarse como un sistema de edición de esta invención para modificar los ácidos nucleicos diana y/o su expresión.

La invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos. Debe apreciarse que estos ejemplos no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones de la invención, sino más bien pretenden ser ejemplos de ciertas formas de realización. Se pretende que cualquier variación en los métodos ejemplificados que se le ocurran al experto en la técnica caiga dentro del alcance de la invención.

## EJEMPLOS

### **Ejemplo 1.** Estrategias de edición.

Se desarrolló una estrategia para generar ediciones de noqueo por desactivación o noqueo por disminución en el gen *TFL1* de frambuesa negra, para la línea de frambuesa negra patentada A14 (**SEQ ID NO: 80**), a fin de alterar el tiempo para el inicio de la floración. Para generar un rango de alelos, se diseñó un ácido nucleico guía CRISPR que comprendía por lo menos un espaciador (PWsp592: GGCACCACAGATGCTACATT (**SEQ ID NO: 76**), PWsp265: GTAGTTGGGGTGAAGGAATCAAG (**SEQ ID NO: 81**) y/o PWsp266: GTGGTGAAGTGCAGAAAGGTAAGAG (**SEQ ID NO: 82**)) que tenía complementariedad a objetivos dentro del gen *TFL1*, y se colocó en diversas construcciones de transformación.

Se usó la misma estrategia para generar ediciones de noqueo por desactivación o noqueo por disminución en el gen *TFL1* en una segunda línea de frambuesa negra patentada, B13. La secuencia genómica para el gen *TFL1* en la línea de frambuesa negra B13 es **SEQ ID NO: 69**, y es 99,77 % idéntica a la secuencia genómica para el gen *TFL1* en la línea de frambuesa negra A14 (**SEQ ID NO: 80**). Cuando se comparan las líneas A14 y B13, las secuencias codificantes y las secuencias de aminoácidos son idénticas.

Las líneas de frambuesa negra que portaban ediciones en el gen *TFL1* se cribaron, y aquellas que mostraron alrededor de 10 % de las lecturas de secuenciación que tienen ediciones en el gen direccionado se avanzaron a la siguiente generación.

## 5 Ejemplo 2: Alelos editados *TFL*.

Los alelos *TFL* editados de frambuesa negra se generaron como se describe en el Ejemplo 1, y se caracterizaron adicionalmente como se describe a continuación en la **Tabla 1**.

**Tabla 1. Alelos editados.**

| Alelo       | Descripción de edición                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Notas                                                                                                                               |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A14 Alelo A | Inserción de base única “T” después de la posición 3235 de <b>SEQ ID NO: 80</b> para lograr la secuencia de nucleótidos <b>SEQ ID NO: 96</b>                                                                                                                                                                                                  | Mutación fuera de marco que conduce a un codón de detención temprano y una proteína que tiene la secuencia de <b>SEQ ID NO: 79</b>  |
| A14 Alelo B | Inserción de base única “C” después de la posición 3235 de <b>SEQ ID NO: 80</b> para lograr la secuencia de nucleótidos <b>SEQ ID NO: 97</b>                                                                                                                                                                                                  | Mutación fuera de marco que conduce a un codón de detención temprano y una proteína que tiene la secuencia de <b>SEQ ID NO: 79</b>  |
| A14 Alelo C | Inserción de 11 pb “TCTTATCCATC” ( <b>SEQ ID NO: 101</b> ) después de la posición 2370 de <b>SEQ ID NO: 80</b> ; e inserción de 2 pb “CA” después de la posición 2377 de <b>SEQ ID NO: 80</b> ; y delección de 4 pb (CTTA) iniciando en la posición 2445 de <b>SEQ ID NO: 80</b> para lograr la secuencia de nucleótidos <b>SEQ ID NO: 99</b> | Mutación fuera de marco que conduce a un codón de detención temprano y una proteína que tiene la secuencia de <b>SEQ ID NO: 100</b> |
| B13 Alelo D | Inserción de una base única “A” después de la posición 3236 de <b>SEQ ID NO: 80</b> para lograr la secuencia de nucleótidos <b>SEQ ID NO: 98</b>                                                                                                                                                                                              | Mutación fuera de marco que conduce a un codón de detención temprano y una proteína que tiene la secuencia de <b>SEQ ID NO: 79</b>  |

10

**Ejemplo 3:** Descripción de recuperación de evento E0 y cribado de eventos editados *TFL1* E0.

Las plantas E0 recuperadas del proceso de transformación se cribaron mediante PCR y secuenciación NGS para detectar ediciones en el gen *TFL*. Se observó que los eventos E0 que no tenían copias de tipo salvaje del gen *TFL* (es decir, ambas copias del gen *TFL* fueron editadas, pero las dos copias editadas de *TFL* pueden no haber sido idénticas entre sí) tenían cambios en el hábito de crecimiento en comparación con las plantas no editadas que también se recuperaron del proceso de transformación. Las plantas E0 editadas en *TFL* descriptas anteriormente mostraron un brote de yemas laterales entre 6 y 8 semanas después de la plantación, y estas yemas laterales se desarrollaron hasta ramas cortas. En las plantas no editadas descriptas anteriormente, el brote primario mantuvo una fuerte dominancia apical, de modo que solo creció una sola caña sin yemas laterales que generaran ramas. Los eventos editados e *TFL1* descriptos anteriormente desarrollaron una yema floral terminal entre 10 y 12 semanas después del aislamiento y la plantación del brote editado, y las ramas laterales en los nudos subyacentes también comenzaron a florecer. Este hábito de crecimiento fue similar al comportamiento de fructificación de la primocaña en frambuesas y moras, donde las plantas pasan al desarrollo reproductivo sin requerir acumulación de frío. Los eventos no editados como los descriptos anteriormente no desarrollaron una flor terminal y continuaron mostrando dominancia apical y ramificación mínima durante este período de tiempo.

**Ejemplo 4:** Desempeño de la progenie E1 de plantas editadas en *TFL1* después de la autopolinización.

Una planta de frambuesa negra editada en *TFL1* se autopolinizó a fin de recuperar la progenie editada. Se recolectaron semillas, se germinaron, y se cribaron las plántulas para buscar ediciones. La progenie se segregó para los dos alelos *TFL1* (alelo A y alelo B) presentes en la planta madre, lo que indica que la planta madre se autopolinizó con éxito. Las plántulas se cultivaron en bandejas hasta que tuvieron de 6 a 8 nudos de longitud y luego se plantaron en macetas en un invernadero con clima controlado para comparar el desempeño de la población de hermanas.

Se monitoreó la población para determinar el momento de la primera floración, en relación con el momento de la plantación en el invernadero. Aproximadamente el 80 % de las líneas E1 editadas incluidas en el ensayo exhibieron floración durante un período de evaluación de cinco meses. Hubo variabilidad en el tiempo hasta la floración y la arquitectura general de las plantas hermanas, lo que sugiere que la segregación de la genética de fondo o la salud general de las hermanas también afectó el desempeño de una planta a otra. Esto no es

inesperado, ya que la generación E1 aún puede mostrar efectos del proceso de transformación.

La **Tabla 2** a continuación muestra el tiempo hasta la primera cosecha de bayas para las 13 líneas con el mejor hábito de crecimiento y desempeño de primocaña. No se incluyeron plantas de tipo silvestre o sin editar en esta plantación, ya que las plantas con una copia funcional del gen *TFL* no habrían florecido durante este período de tiempo de 5 meses. Las plantas de tipo silvestre o sin editar de frambuesa negra típicamente florecen en alrededor de 14 meses.

**Tabla 2. Evaluación de las hermanas E1 de frambuesa negra editadas en TFL.**

| Planta ID | Días hasta al primera cosecha | Genotipo TFL1                                                                    |
|-----------|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| CE198931  | 68                            | Alelo A heterocigoto & Alelo B heterocigoto (sin alelo de tipo salvaje presente) |
| CE198937  | 83                            | Alelo A heterocigoto & Alelo B heterocigoto (sin alelo de tipo salvaje presente) |
| CE198933  | 68                            | Alelo A homocigoto                                                               |
| CE198936  | 83                            | Alelo A heterocigoto & Alelo B heterocigoto (sin alelo de tipo salvaje presente) |
| CE198949  | 83                            | Alelo A heterocigoto & Alelo B heterocigoto (sin alelo de tipo salvaje presente) |
| CE198932  | 61                            | Alelo A heterocigoto & Alelo B heterocigoto (sin alelo de tipo salvaje presente) |
| CE198956  | 61                            | Alelo A homocigoto                                                               |
| CE198951  | 83                            | Alelo A heterocigoto & Alelo B heterocigoto (sin alelo de tipo salvaje presente) |
| CE198948  | 61                            | Alelo A heterocigoto & Alelo B heterocigoto (sin alelo de tipo salvaje presente) |
| CE198950  | 61                            | Alelo A homocigoto                                                               |
| CE198954  | 83                            | Alelo A heterocigoto & Alelo B heterocigoto (sin alelo de tipo salvaje presente) |
| CE198941  | 105                           | Alelo B homocigoto                                                               |
| CE198944  | 127                           | Alelo B homocigoto                                                               |

Lo anterior es ilustrativo de la presente invención y no debe interpretarse de modo limitante de la misma. La invención se define mediante las siguientes reivindicaciones, donde sus equivalentes se incluyen en las mismas.