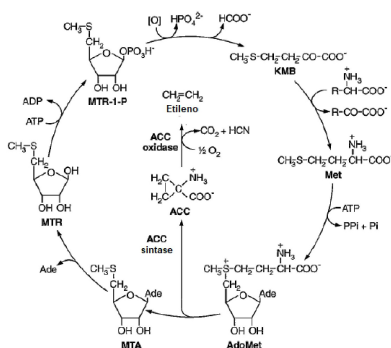




Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “**PLANTA DE BANANA E SUA PARTE, MÉTODO PARA PRODUÇÃO E AUMENTO DA MEIA-VIDA DE BANANA, FRUTO, CONSTRUTO DE ÁCIDO NUCLEICO, PLANTA OU MÉTODO OU PRODUTOS PROCESSADOS**”

CAMPO E ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção, em algumas modalidades da mesma, refere-se a composições e métodos para aumentar a meia-vida de banana.

[002] As bananas e bananas da terra cultivadas são plantas herbáceas gigantes dentro do gênero *Musa*. Ambas são estéreis e partenocárpicas, de modo que o fruto se desenvolve sem semente. Os híbridos e espécies cultivados são na sua maior parte triploides ($2n = 3x = 33$; alguns são diploides ou tetraploides) e a maior parte foi propagada a partir de mutantes encontrados no ambiente selvagem.

[003] As bananas são uma das dez principais culturas alimentícias mundiais. As bananas são comidas tanto cruas quando cozidas, dependendo do cultivar. Cerca de 60% das bananas são comidas cruas, como uma fruta de sobremesa, e as outras 40% são cozidas durante processos de vaporizar, ferver, assar e fritar. Mais de 120 milhões de toneladas de frutos de banana são produzidos a cada ano, com os três maiores produtores, Índia, Uganda e China, consumindo quase tudo que produzem domesticamente.

[004] A banana pertence a um fruto climatérico, após a colheita, a banana verde precisa passar por mudança climatérica através de seu processo de amadurecimento, incluindo a produção de etileno interno, hidrólise de amido e protopectina, e similares, até a carne do fruto ser amolecida, a doçura ser aumentada e fragrância ser produzida.

[005] Convencionalmente, a banana é colhida antecipadamente, e seu período de transporte e armazenamento é prolongado pelo progresso de amadurecimento. Entretanto, o fruto da banana pode frequentemente passar por amadurecimento devido à produção de etileno durante o processo de transporte. Além disso, o fruto pode ser excessivamente amadurecido e se tornar estragado, reduzindo o valor de mercado significativamente. Consequentemente, controle sobre a biossíntese de

etileno pode ser usado para fornecer um método para controlar o amadurecimento da banana.

[006] O etileno é um hormônio vegetal presente na forma gasosa, que pode afetar diversas reações bioquímicas e fisiológicas na planta. O etileno exerce um papel importante no crescimento, desenvolvimento e resposta ao estresse de planta, por exemplo, quando uma planta é submetida a inundação, lesão mecânica, infecção bacteriana, envelhecimento de folha e flor, amadurecimento do fruto, e similares, a mesma produzirá etileno. A via de biossíntese de etileno compreende a conversão de metionina em S-Adenosil-metionina (AdoMet) com o auxílio de AdoMet sintase, síntese de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) a partir de AdoMet com o auxílio de ACC sintase (ACS) e, então, oxidação de ACC em etileno com o auxílio de ACC oxidase (ACO) (consultar a Figura 1, adaptada a partir de Rudus et al. 2013, Volume 35, Edição 2, páginas 295 a 307). Sabe-se que ACO é a última enzima usada na via de biossíntese de etileno e, como resultado, a inibição em gene de ACO ou expressão de proteína do mesmo pode inibir/efetuar knock-down da biossíntese de etileno e, ainda, atingir o objetivo de retardar o pós-amadurecimento de um fruto.

[007] Diferente da maioria das outras grandes culturas alimentícias, as bananas são difíceis de aprimorar geneticamente. O desafio é que quase todos os cultivares de banana e variedades locais são triploides, com altos níveis de infertilidade masculina e feminina. Há diversos programas de melhoramento internacionais convencionais e muitos dos mesmos estão desenvolvendo novos cultivares. Entretanto, é virtualmente impossível realizar retrocruzamento em bananas, excluindo, assim, a possibilidade de introgridir novos traços em um cultivar atual.

[008] Assim, para atender o desafio de demanda global crescente por produção de alimentos, as abordagens típicas para aumentar a produtividade agrícola (por exemplo, resistência aumentada ou resistência aumentada a pragas) se baseavam em melhoramento por mutação ou introdução de genes novos nos genomas de espécies de cultura por transformação. Esses processos são inerentemente não específicos e relativamente ineficientes. Por exemplo, os métodos de transformação

de planta entregam DNA exógeno que se integra ao genoma em locais aleatórios. Assim, a fim de identificar e isolar linhagens transgênicas de plantas com atributos desejáveis, é necessário gerar centenas de eventos de integração aleatórios exclusivos por construto e subsequentemente triar os indivíduos desejados. Como resultado, a modificação genética de traço de planta convencional é uma tarefa trabalhosa, demorada e imprevisível. Além disso, a natureza aleatória dessas integrações torna difícil prever se os efeitos pleiotrópicos devido à ruptura de genoma indesejada ocorreram.

[009] A natureza aleatória dos processos de transformação atuais exige a geração de centenas de eventos para a identificação e seleção de candidatos de evento de transgene (a triagem de transformação e evento é limitante à taxa em relação aos candidatos de gene identificados a partir de estudos genômicos funcionais). Adicionalmente, dependendo do local de integração dentro do genoma, um cassete de expressão de gene pode ser expresso em diferentes níveis como resultado do efeito de posição genômica. Como resultado, a geração, isolamento e caracterização de linhagens de planta com genes ou traços geneticamente modificados têm sido um processo extremamente trabalhoso e dispendioso com uma baixa probabilidade de sucesso. Adicionalmente aos obstáculos associados à seleção de eventos transgênicos, surgem algumas das principais preocupações relacionadas ao confinamento de gene e ao grau de stringência necessário para liberação de uma planta transgênica no ambiente para aplicações comerciais.

[010] Os avanços recentes em técnicas de edição de genoma tornaram possível alterar sequências de DNA em células vivas. A edição de genoma é mais precisa que os métodos de melhoramento de cultura convencionais ou métodos de engenharia genética padrão (transgênica ou GM). Editando-se apenas alguns bilhões de nucleotídeos (os blocos de construção de genes) nas células de plantas, essas novas técnicas podem ser a forma mais eficaz de obter culturas que cresçam melhor em climas severos, resistam a pragas e melhorem a nutrição. Devido a técnicas mais precisas, menos do material genético é alterado, de modo a reduzir a incerteza sobre

outros efeitos em como a planta se comporta.

[011] O método mais estabelecido de engenharia genética de planta com o uso de técnicas de edição de genoma com CRISPR Cas9 exige a inserção de DNA novo no genoma do hospedeiro. Esse inserto, DNA de transferência (T-DNA), porta diversas unidades transcricionais a fim de atingir edições de genoma bem-sucedidas com CRISPR Cas9. As mesmas comumente consistem em gene de resistência a antibióticos para selecionar plantas transgênicas, o mecanismo de Cas9, e diversas unidades de sgRNA. Devido à integração de DNA estranho no genoma, as plantas geradas dessa forma são classificadas como transgênicas ou geneticamente modificadas (GM). Uma vez que uma edição de genoma tenha sido estabelecida no hospedeiro, essa cadeia principal de T-DNA pode ser removida através de propagação e o melhoramento sexuais, visto que o mecanismo de CRISPR Cas9 não é mais necessário para manter o fenótipo. Entretanto, conforme mencionado, espécies de banana são partenocárpicas (não produzem sementes viáveis), tornando a remoção de cadeia principal de T-DNA por reprodução sexual impossível.

[012] A técnica anterior adicional inclui:

Publicação de Pedido nº U.S. 20130097732

Pedido de Patente nº U.S. 20140075593;

Zhang, Y., et al., *Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA*. Nat Commun, 2016. **7**: página 12.617;

Woo, J.W., et al., *DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins*. Nat Biotechnol, 2015. **33**(11): páginas 1.162 a 1.164;

Svitashev, S., et al., *Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes*. Nat Commun, 2016. **7**: página 13274;

Luo, S., et al., *Non-transgenic Plant Genome Editing Using Purified Sequence-Specific Nucleases*. Mol Plant, 2015. **8**(9): página 1.425 a 1.427.

Hoffmann 2017 PlosOne 12(2):e0172630;

Chiang et al., 2016. SP1,2,3. Sci Rep. 15 de abril de 2016;6:24356.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[013] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecida uma planta de banana que compreende um genoma que compreende uma perda de mutação de função em uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um componente em uma via de biossíntese de etileno da banana.

[014] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um método para aumentar a meia-vida de banana, em que o método compreende:

(a) submeter uma célula vegetal de banana a um agente de edição de DNA direcionado a uma sequência de ácido nucleico que codifica um componente em uma via de biossíntese de etileno da banana para resultar em uma perda de mutação de função na sequência de ácido nucleico que codifica a via de biossíntese de etileno e

(b) regenerar uma planta da célula vegetal.

[015] De acordo com algumas modalidades da invenção, o método compreende ainda colher o fruto da planta.

[016] De acordo com algumas modalidades da invenção, a planta é desprovida de um transgene que codifica o agente de edição de DNA.

[017] De acordo com algumas modalidades da invenção, a mutação está em uma forma homozigota.

[018] De acordo com algumas modalidades da invenção, a planta ou o ancestral da mesma que foi tratado com um agente de edição de DNA direcionado à sequência genômica que codifica o componente na via de biossíntese de etileno.

[019] De acordo com algumas modalidades da invenção, a mutação é selecionada a partir do grupo que consiste em uma deleção, uma inserção, uma inserção/deleção (Indel) e uma substituição.

[020] De acordo com algumas modalidades da invenção, o componente na via de biossíntese de etileno ser selecionado a partir do grupo que consiste em 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase (ACS) e ACC oxidase (ACO)

[021] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um construto de ácido nucleico que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um agente de edição de DNA direcionado a uma sequência de ácido nucleico que codifica um componente em uma via de biossíntese de etileno de uma banana ligado de modo operacional a um promotor vegetal.

[022] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA é de um sistema de edição de DNA selecionado a partir do grupo que consiste em meganucleases, nucleases de dedo de zinco (ZFNs), nucleases efetoras do tipo ativador de transcrição (TALENs) e CRISPR-Cas.

[023] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA é de um sistema de edição de DNA compreendendo CRISPR-Cas.

[024] De acordo com algumas modalidades da invenção, o componente na via de biossíntese de etileno é selecionado a partir do grupo que consiste em Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9) e Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

[025] De acordo com algumas modalidades da invenção, o componente na via de biossíntese de etileno é selecionado a partir do grupo que consiste em Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9), Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8), Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20) e Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

[026] De acordo com algumas modalidades da invenção, o componente na via de biossíntese de etileno é selecionado a partir do grupo que consiste em Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9) e Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

[027] De acordo com algumas modalidades da invenção, o componente na via de biossíntese de etileno é selecionado a partir do grupo que consiste em Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8) e Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20).

[028] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA é direcionado a coordenadas de ácido nucleico que alvejam especificamente mais de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica o componente na via de biossíntese de etileno.

[029] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA compreende uma sequência de ácidos nucleicos pelo menos 99% idêntica a uma sequência de ácidos nucleicos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 47-54.

[030] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA compreende uma sequência de ácidos nucleicos pelo menos 99% idêntica a uma sequência de ácidos nucleicos estabelecida na SEQ ID NO: 47.

[031] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA compreende um ácido nucleico estabelecido na SEQ ID NO: 47.

[032] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA compreende uma pluralidade de sequências de ácidos nucleicos estabelecidas na SEQ ID NO: 47-54.

[033] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA compreende uma pluralidade de sequências de ácidos nucleicos estabelecidas na SEQ ID NO: 47, 49 ou 50.

[034] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA compreende uma pluralidade de sequências de ácidos nucleicos estabelecidas na SEQ ID NO: 51 e 53.

[035] De acordo com algumas modalidades da invenção, a planta de banana é não transgênica.

[036] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecida uma parte da planta da planta, como descrito no presente documento.

[037] De acordo com algumas modalidades da invenção, a parte de planta é um fruto.

[038] De acordo com algumas modalidades da invenção, o fruto é seco.

[039] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um método para produzir banana, em que o método compreende:

- (a) cultivar a planta como descrito no presente documento; e
- (b) colher o fruto da planta.

[040] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um produto de banana processado que compreende DNA de banana genômico que compreende uma perda de mutação de função em uma sequência de ácido nucleico que codifica um componente em uma via de biossíntese de etileno da banana.

[041] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecida uma planta de banana, ou parte da mesma, que compreende uma perda de mutação de função introduzida em uma sequência de ácidos nucleicos genômica que codifica uma proteína que é um componente em uma via de biossíntese de etileno da banana, em que a mutação resulta em um nível reduzido ou uma atividade reduzida da proteína em comparação com uma planta de banana que carece da perda de mutação de função.

[042] De acordo com algumas modalidades da invenção, a planta compreende uma ou mais perdas não naturais de mutações de função introduzidas em uma ou mais sequências de ácidos nucleicos genômica que codificam uma ou mais proteínas que são componentes em uma via de biossíntese de etileno da banana, em que a uma ou mais mutações resultam, cada uma, em níveis reduzidos ou atividades reduzidas da proteína em comparação com uma planta de banana que carece da perda de mutação de função.

[043] De acordo com algumas modalidades da invenção, a uma ou mais proteínas são selecionadas a partir do grupo que consiste em 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase (ACS) e ACC oxidase (ACO).

[044] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de ácidos nucleicos genômica de proteína ACS compreende uma sequência de ácidos nucleicos pelo menos 85% idêntica a, pelo menos 90% idêntica a, pelo menos 95% idêntica a ou é uma sequência de ácidos nucleicos selecionada a partir do grupo que consiste em Ma01_g07800.1 (SEQ ID NO: 1), Ma01_g12130.1 (SEQ ID NO: 2), Ma02_g10500.1 (SEQ ID NO: 3), Ma03_g12030.1 (SEQ ID NO: 4), Ma03_g27050.1 (SEQ ID NO: 5), Ma04_g01260.1 (SEQ ID NO: 6), Ma04_g24230.1 (SEQ ID NO: 7),

Ma04_g31490.1 (SEQ ID NO: 8), Ma04_g35640.1 (SEQ ID NO: 9), Ma04_g37400.1 (SEQ ID NO: 10), Ma05_g08580.1 (SEQ ID NO: 11), Ma05_g13700.1 (SEQ ID NO: 12), Ma09_g19150.1 (SEQ ID NO: 13) e Ma10_g27510.1 (SEQ ID NO: 14); e em que a sequência de ácidos nucleicos genômica de proteína ACO compreende uma sequência de ácidos nucleicos pelo menos 85% idêntica a, pelo menos 90% idêntica a, pelo menos 95% idêntica a ou é uma sequência de ácidos nucleicos selecionada selecionada a partir do grupo que consiste em Ma09_g04370.1 (SEQ ID NO: 15), Ma06_g17160.1 (SEQ ID NO: 16), Ma11_g05490.1 (SEQ ID NO: 17), Ma00_g04490.1 (SEQ ID NO: 18), Ma07_g15430.1 (SEQ ID NO: 19), Ma01_g11540.1 (SEQ ID NO: 20), Ma10_g16100.1 (SEQ ID NO: 21), Ma05_g08170.1 (SEQ ID NO: 22), Ma06_g14430.1 (SEQ ID NO: 23), Ma05_g09360.1 (SEQ ID NO: 24), Ma11_g22170.1 (SEQ ID NO: 25), Ma05_g31690.1 (SEQ ID NO: 26), Ma07_g19730.1 (SEQ ID NO: 27), Ma06_g02600.1 (SEQ ID NO: 28), Ma10_g05270.1 (SEQ ID NO: 29), Ma06_g14370.1 (SEQ ID NO: 30), Ma11_g05480.1 (SEQ ID NO: 31), Ma06_g14410.1 (SEQ ID NO: 32), Ma06_g14420.1 (SEQ ID NO: 33), Ma06_g34590.1 (SEQ ID NO: 34), Ma02_g21040.1 (SEQ ID NO: 35), Ma11_g04210.1 (SEQ ID NO: 36), Ma05_g12600.1 (SEQ ID NO: 37), Ma04_g23390.2 (SEQ ID NO: 38), Ma03_g06970.1 (SEQ ID NO: 39), Ma05_g09980.1 (SEQ ID NO: 40), Ma04_g36640.1 (SEQ ID NO: 41), Ma11_g04180.1 (SEQ ID NO: 42), Ma11_g02650.1 (SEQ ID NO: 43) e Ma00_g04770.1 (SEQ ID NO: 44).

[045] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de ácidos nucleicos genômica que codifica o componente de proteína na via de biossíntese de etileno compreende uma sequência de ácidos nucleicos pelo menos 85% idêntica a, pelo menos 90% idêntica a, pelo menos 95% idêntica a ou é uma sequência de ácidos nucleicos selecionada a partir do grupo que consiste em Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9), Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8), Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20) e Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

[046] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de ácidos nucleicos genômica que codifica o componente de proteína na via de biossíntese de

etileno compreende uma sequência de ácidos nucleicos pelo menos 85% idêntica a, pelo menos 90% idêntica a, pelo menos 95% idêntica a ou é uma sequência de ácidos nucleicos selecionada a partir do grupo que consiste em Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9) e Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

[047] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de ácidos nucleicos genômica que codifica o componente de proteína na via de biossíntese de etileno compreende uma sequência de ácidos nucleicos pelo menos 85% idêntica a, pelo menos 90% idêntica a, pelo menos 95% idêntica a ou é uma sequência de ácidos nucleicos selecionada a partir do grupo que consiste em Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8) e Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20).

[048] De acordo com algumas modalidades da invenção, a perda não natural de mutação de função foi introduzida com o uso de um agente de edição de DNA.

[049] De acordo com algumas modalidades da invenção, a planta não compreende um transgene que codifica o agente de edição de DNA, um transgene que codifica um marcador selecionável ou um repórter, ou não compreende um transgene que codifica qualquer agente de edição de DNA, o marcador selecionável ou o repórter.

[050] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA compreendeu um sistema de edição de DNA selecionado a partir do grupo que consiste em meganucleases, nucleases de dedo de zinco (ZFNs), nucleases efetoras do tipo ativador de transcrição (TALENs) e CRISPR-Cas.

[051] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA foi CRISPR-Cas.

[052] De acordo com algumas modalidades da invenção, a mutação é homozigota.

[053] De acordo com algumas modalidades da invenção, a mutação é selecionada a partir do grupo que consiste em uma deleção, uma inserção, uma inserção/deleção (Indel) e uma substituição.

[054] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção,

é fornecido um construto de ácido nucleico que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um agente de edição de DNA e um agente de alvejamento de DNA, em que o agente de alvejamento alveja o agente de edição a uma sequência de ácidos nucleicos genômica que codifica um componente de proteína em uma via de biossíntese de etileno de uma banana para introduzir uma perda de mutação de função na sequência de ácidos nucleicos genômica, em que os agentes de edição e alvejamento são ligados de modo operacional a um promotor de planta e em que a mutação resulta em um nível reduzido ou uma atividade reduzida da proteína em comparação com uma planta de banana que carece da perda de mutação de função.

[055] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA e o agente de alvejamento de DNA geram uma das mutações no genoma da planta de qualquer uma das reivindicações 1 a 13.

[056] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de alvejamento de DNA é projetado para alvejar ácidos nucleicos que são comuns a mais de uma sequência de ácidos nucleicos genômica que codifica um componente na via de biossíntese de etileno.

[057] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de alvejamento de DNA compreende uma sequência de ácidos nucleicos pelo menos 99% idêntica a uma sequência de ácidos nucleicos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 47-54.

[058] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA compreende uma sequência de ácidos nucleicos pelo menos 99% idêntica a uma sequência de ácidos nucleicos estabelecida na SEQ ID NO: 47.

[059] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA compreende um ácido nucleico estabelecido na SEQ ID NO: 47.

[060] De acordo com algumas modalidades da invenção, o construto de ácido nucleico compreende dois ou mais agentes de edição de DNA selecionados dentre as sequências de ácidos nucleicos estabelecidas na SEQ ID NO: 47-54.

[061] De acordo com algumas modalidades da invenção, o construto de ácido

nucleico compreende dois ou mais agentes de edição de DNA selecionados dentre as sequências de ácidos nucleicos estabelecidas na SEQ ID NO: 47, 49 ou 50.

[062] De acordo com algumas modalidades da invenção, o construto de ácido nucleico compreende pelo menos dois agentes de edição de DNA que compreendem as sequências de ácidos nucleicos estabelecidas na SEQ ID NO: 51 e 53.

[063] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um método para aumentar a meia-vida de banana, em que o método compreende:

(a) transformar uma ou mais células de uma planta de banana com o construto de ácido nucleico de qualquer uma das reivindicações 14 a 22;

(b) gerar a perda de mutação de função na sequência de ácidos nucleicos genômica que codifica o componente de proteína da via de biossíntese de etileno, em que a mutação resulta no nível reduzido ou na atividade reduzida da proteína; e

(c) regenerar uma planta da célula vegetal.

[064] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA é CRISPR-Cas e o agente de alvejamento de DNA é um sgRNA.

[065] De acordo com algumas modalidades da invenção, a sequência de ácidos nucleicos genômica que codifica um componente de proteína em uma via de biossíntese de etileno da banana é selecionada a partir do grupo que consiste em Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9), Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8), Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20) e Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

[066] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de alvejamento de sgRNA DNA é selecionado a partir do grupo que consiste em sg-183 (SEQ ID NO: 47), sg-184 (SEQ ID NO: 48), sg-188 (SEQ ID NO: 49), sg-189 (SEQ ID NO: 50), sg-190 (SEQ ID NO: 51), sg-191 (SEQ ID NO: 52), sg-194 (SEQ ID NO: 53) e sg-195 (SEQ ID NO: 54).

[067] De acordo com algumas modalidades da invenção, a perda de mutação de função é conforme descrito no presente documento.

[068] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção,

é fornecida uma planta de banana mutante que compreende bananas mutantes, em que a planta mutante compreende uma mutação em um gene que codifica uma proteína 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase (ACS), em que a atividade da proteína ACS na planta de banana mutante é reduzida em comparação com a atividade da proteína de uma planta de banana que carece da mutação e em que o fruto de banana mutante amadurece mais lentamente que bananas de uma planta de banana que carece da mutação.

[069] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecida uma planta de banana mutante que compreende bananas mutantes, em que a planta mutante compreende uma mutação no gene Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), em que o gene Ma09_g19150 codifica a proteína 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase (ACS), em que a atividade de proteína ACS na planta de banana mutante é reduzida em comparação com a atividade da proteína de uma planta de banana que carece da mutação e em que o fruto de banana mutante amadurece mais lentamente que as bananas de uma planta de banana que carece da mutação.

[070] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecida uma planta de banana mutante que compreende bananas mutantes, em que a planta mutante compreende uma mutação no gene Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9), em que o gene Ma04_g35640 codifica a proteína 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase (ACS), em que a atividade de proteína ACS na planta de banana mutante é reduzida em comparação com a atividade da proteína de uma planta de banana que carece da mutação e em que o fruto de banana mutante amadurece mais lentamente que as bananas de uma planta de banana que carece da mutação.

[071] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecida uma planta de banana mutante que compreende bananas mutantes, em que a planta mutante compreende uma mutação no gene Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8), em que o gene Ma04_g31490 codifica a proteína 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase (ACS), em que a atividade de proteína ACS na planta de banana mutante é reduzida em comparação com a atividade da proteína de uma planta de

banana que carece da mutação e em que o fruto de banana mutante amadurece mais lentamente que as bananas de uma planta de banana que carece da mutação.

[072] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecida uma planta de banana mutante que compreende bananas mutantes, em que a planta mutante compreende uma mutação em um gene que codifica uma proteína ACC oxidase (ACO), em que a atividade da proteína ACO na planta de banana mutante é reduzida em comparação com a atividade da proteína de uma planta de banana que carece da mutação e em que o fruto de banana mutante amadurece mais lentamente que bananas de uma planta de banana que carece da mutação.

[073] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecida uma planta de banana mutante que compreende bananas mutantes, em que a planta mutante compreende uma mutação no gene Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20), em que o gene Ma01_g11540 codifica a proteína ACC oxidase (ACO), em que a atividade de proteína ACO na planta de banana mutante é reduzida em comparação com a atividade da proteína de uma planta de banana que carece da mutação e em que o fruto de banana mutante amadurece mais lentamente que as bananas de uma planta de banana que carece da mutação.

[074] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecida uma planta de banana mutante que compreende bananas mutantes, em que a planta mutante compreende uma mutação no gene Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27), em que o gene Ma07_g19730 codifica a proteína ACC oxidase (ACO), em que a atividade de proteína ACO na planta de banana mutante é reduzida em comparação com a atividade da proteína de uma planta de banana que carece da mutação, em que as bananas mutantes amadurecem mais lentamente que as bananas de uma planta de banana que carece da mutação.

[075] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um método para produzir banana, em que o método compreende:

(a) cultivar a planta como descrito no presente documento; e

(b) colher o fruto da planta.

[076] De acordo com algumas modalidades da invenção, a planta, ou parte da mesma, é uma parte de planta.

[077] De acordo com algumas modalidades da invenção, a parte de planta é um fruto.

[078] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um produto de banana processado que compreende a parte de planta.

[079] A não ser que definido de outro modo, todos os termos científicos e/ou técnicos usados no presente documento têm o mesmo significado conforme comumente entendido por um versado na técnica ao qual a invenção pertence. Embora os métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser usados na prática ou nos testes das modalidades da invenção, os métodos e/ou materiais exemplificativos são descritos abaixo. No caso de conflito, o relatório descritivo de patente, incluindo as definições, terá preferência. Além disso, os materiais, métodos, e exemplos são apenas ilustrativos e não se destinam a ser necessariamente limitantes.

BREVE DESCRIÇÃO DAS VÁRIAS VISTAS DO DESENHO (OU DESENHOS)

[080] Algumas modalidades da invenção são descritas no presente documento, a título de exemplo apenas, em referência aos desenhos anexos. Com referência específica agora aos desenhos em detalhes, destaca-se que as particularidades mostradas são a título exemplificativo e para fins de discussão ilustrativa das modalidades da invenção. Nesse sentido, a descrição tomada com os desenhos torna evidente àqueles versados na técnica como as modalidades da invenção podem ser praticadas.

[081] Nos desenhos:

A Figura 1 é um esquema da via de biossíntese de etileno tomado de Bleecker e Kende. 2000. Annu. Rev. Cell. Dev 16: 1 a 18.

A Figura 2 é um fluxograma de uma modalidade do método para selecionar

células que compreende um evento de edição de genoma;

A Figura 3 mostra transfecção positiva de protoplastos de banana com plasmídeos de mCherry. 1×10^6 protoplastos de banana foram transfectados com o uso de PEG com plasmídeo pAC2010 que porta mCherry (marcador fluorescente). 3 dias após a transfecção, a eficiência da transfecção foi analisada sob um microscópio fluorescente. A figura mostra protoplastos de banana, campo brilhante de painel superior, fluorescência de painel inferior.

A Figura 4A mostra enriquecimento de FACS de banana positiva para mCherry. 1×10^6 protoplastos de banana foram transfectados com o uso de PEG com plasmídeo pAC2010 que porta marcador fluorescente mCherry. Três dias após a transfecção, os protoplastos foram analisados por FACS, todas as células positivas para mCherry foram classificadas e coletadas.

A Figura 4B mostra enriquecimento de FACS de protoplastos de banana positiva para mCherry. O enriquecimento de protoplastos de banana com mCherry foi confirmado por microscópio fluorescente. Os protoplastos transfectados não classificados (painéis superiores) e classificados (painéis inferiores) foram imageados com um microscópio fluorescente em 3 dias após a transfecção.

As Figuras 5A a C mostram a diminuição de protoplastos de banana positivos para mCherry ao longo do tempo, indicando eventos de transformação temporária. Os protoplastos de banana transfectados com um plasmídeo que porta o marcador fluorescente mCherry foram imageados em 3 (Figura 5A) e 10 (Figura 5B) dias após a transfecção. Figura 5C. Redução progressiva no número de protoplastos positivos para mCherry até 25 dias após a transfecção foi observada conforme medido por FACS. 100% representa a proporção de células que expressam cherry em 3 dias após a transfecção.

A Figura 6A mostra a diminuição de protoplastos de banana positivos para mCherry ao longo do tempo, indicando eventos de transformação temporários em protoplastos não classificados e imageados antes de FACS. Protoplastos de *Musa acuminata* foram transfectados com um plasmídeo que porta o marcador fluorescente

mCherry (pAC2010) ou sem DNA. Os protoplastos não classificados foram imageados em 3, 6 e 10 dias após a transfecção conforme indicado. Imagens de microscopia mostram a redução progressiva no número e intensidade de protoplastos positivos para mCherry ao longo do tempo. BF (Campo brilhante).

A Figura 6B mostra a diminuição de protoplastos positivos para mCherry ao longo do tempo, indicando eventos de transformação temporários em protoplastos classificados e imageados após **FACS**. Os protoplastos de *Musa acuminata* transfectados com um plasmídeo que porta o marcador fluorescente mCherry (2010) foram classificados e imageados em 3, 6 e 10 dias após a transfecção, conforme indicado. Imagens de microscopia mostram a redução progressiva no número e intensidade de protoplastos positivos para mCherry ao longo do tempo. BF (Campo brilhante).

As Figuras 7A e B é uma ilustração esquemática da biossíntese e regulação de etileno durante a transição do sistema 1 ao sistema 2 em *S. lycopersicum* e *M. acuminata*. O esquema simplificado da via bioquímica em duas etapas de etileno de S-adenosil-L-metionina (S-Ado-Met) em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) em etileno e os genes envolvidos na transição do sistema 1 ao sistema 2 durante o amadurecimento do fruto de tomate (Figura 7A) e banana (Figura 7B). A transição do sistema 1 ao sistema 2 depende da regulação de expressão gênica de diversos membros das famílias de gene de ACC sintase (ACS) e ACC oxidase (ACO). Os retângulos roxos indicam os genes de tomate que foram selecionados para análise adicional. O esquema de tomate foi adaptado a partir de Alexander e Grierson, 2002. Journal of Experimental Botany, Volume 53, nº 377, páginas 2.039 a 2.055; Cara e Giovannoni, 2008. Plant Science Volume 175, páginas 106 a 113; e Pech et al., 2012. Annual Plant Reviews, Volume 44, páginas 275 a 304. O esquema de banana foi baseado em constatações em tomate e Liu et al., 1999. Plant Physiology, Volume 121, páginas 1.257 a 1.265 e Rudus et al., 2013. Acta Physiol Plant. Volume 35, página 295 a 307.

A Figura 8 é uma ilustração esquemática das relações evolucionárias de

genes de ACC sintase (ACS). O histórico evolucionário foi inferido com o uso do método de união de vizinho. A porcentagem de árvores replicadas em que a taxa associada agrupada em conjunto no teste de bootstrap (1.000 réplicas) é mostrada como ramificações coloridas (vermelho < 20%; azul 50%; verde > 90%). Os retângulos roxos pontilhados indicam que os genes de tomate que mostraram estar envolvidos durante o amadurecimento do fruto do tomate e que foram usados como sequências de consulta para recuperar genes proximamente relacionados no genoma de *M. acuminata*. Os IDs de gene em laranja indicam genes candidatos de *M. acuminata* que são homólogos mais provavelmente próximos aos genes de tomate caracterizados envolvidos no amadurecimento do fruto.

A Figura 9 é uma ilustração esquemática das relações evolucionárias de genes de ACC oxidase (ACO). O histórico evolucionário foi inferido com o uso do método de união de vizinho. A porcentagem de árvores replicadas em que a taxa associada agrupada em conjunto no teste de bootstrap (1.000 réplicas) é mostrada como ramificações coloridas (vermelho < 20%; azul 50%; verde > 90%). Os IDs de gene em roxo e vermelho indicam os genes de Arabidopsis ou tomate, respectivamente, que foram caracterizados durante o amadurecimento do fruto e que foram usados como sequências de consulta para recuperar genes proximamente relacionados no genoma de *M. acuminata*. Os IDs de gene em laranja indicam genes candidatos de *M. acuminata* que são homólogos mais provavelmente próximos aos genes (a tomate e Arabidopsis) de tomate caracterizados envolvidos no amadurecimento do fruto.

A Figura 10 mostra um exemplo de seleção de sgRNAs. Após usar algoritmos publicamente disponíveis para encontrar e projetar sgRNAs na sequência de interesse, uma etapa de cura manual assegura a seleção de sgRNAs que se sobrepõem às regiões que foram mostradas empiricamente ou previstas como sendo importantes para função de proteína (retângulos vermelhos). Os retângulos azuis destacam as posições em que sgRNAs foram projetados. De acordo com modalidades da invenção, são selecionados sgRNAs que sobrepõem os retângulos azuis e

vermelhos.

A Figura 11 é um gráfico que mostra a expressão de genes de genes candidatos de ACS selecionados em frutos de *M. acuminata*. As condições experimentais são descritas em D'Hont et al. 2012 Nature. 9 de agosto de 2012;488(7410):213 a 217. Os frutos foram colhidos após florescimento (40, 60 e 90 dias) e mantidos a 20 °C por 5 dias não tratados (-) ou tratados (+) com acetileno para verificar alterações de transcriptoma no amadurecimento de frutos de banana. Os dados de RNAseq indicaram que o tratamento com acetileno induziu alterações na expressão de genes do gene candidato de ACS de banana *Ma04_g35640*.

A Figura 12 é um gráfico que mostra a expressão de genes de genes candidatos de ACO selecionados em frutos de *M. acuminata*. As condições experimentais são descritas em D'Hont et al. (2012), supra. Os frutos foram colhidos após florescimento (40, 60 e 90 dias) e mantidos a 20 °C por 5 dias não tratados (-) ou tratados (+) com acetileno para verificar alterações de transcriptoma no amadurecimento de frutos de banana. Os dados de RNAseq indicaram que o tratamento com acetileno induziu alterações na expressão de genes do gene candidato de ACO de banana *Ma07_g19730*.

As Figuras 13A a D mostram análise de sequenciamento e ensaio de T7 que revelam a presença de mutações no gene candidato *Ma09_19150*. (Figura 13A) O desenho que representa o locus *Ma09_19150* que indica as posições relativas em que os sgRNAs foram projetados e selecionados com base em regiões conservadas com outros genes de ACS. (Figura 13B) O locus *Ma09_19150* foi amplificado com iniciadores específicos fora da região de sgRNAs e clonado em pBLUNT (Invitrogen) para análise de sequências e ensaio de T7E1. (Figura 13C) Detecção de mutações medidas pelo ensaio de T7E1. "Ctr" indica o plasmídeo de controle sem sgRNAs e WT indica amostra não transfectada (sem DNA). 07 e 08 são a combinação do sgRNA usado. (Figura 13D) Sequências de DNA mutantes induzidas por expressão do mecanismo de edição de genoma por sgRNAs específicos são alinhadas à sequência do tipo selvagem (WT). O PAM é mostrado destacado em cinza e os sgRNAs em

letras vermelhas. Pequenas deleções foram encontradas em diversos clones analisados.

As Figuras 14A a C mostra resultados de ensaio de T7 que revelam a presença de mutações no gene candidato *Ma04_35640*. (Figura 14A) O desenho que representa o locus *Ma04_35640* que indica as posições relativas em que os sgRNAs foram projetados e selecionados com base em regiões conservadas com outros genes de ACS. (Figura 14B) O locus *Ma04_35640* foi amplificado com iniciadores específicos fora da região de sgRNAs para ensaio de T7E1. (Figura 14C) Detecção de mutações medidas pelo ensaio de T7E1. “Ctr” indica o plasmídeo de controle sem sgRNAs e WT indica amostra não transfectada (sem DNA). 07 e 08 são a combinação do sgRNA usado.

As Figuras 15A a D mostram análise de sequenciamento e ensaio de T7 que revelam a presença de mutações no gene candidato *Ma04_31490*. (Figura 15A) O desenho que representa o locus *Ma04_31490* que indica as posições relativas em que os sgRNAs foram projetados e selecionados com base em regiões conservadas com outros genes de ACS. (Figura 15B) O locus *Ma04_31490* foi amplificado com iniciadores específicos fora da região de sgRNAs e clonado em pBLUNT (Invitrogen) para análise de sequências e ensaio de T7E1. (Figura 15C) Detecção de mutações medidas pelo ensaio de T7E1. “Ctr” indica o plasmídeo de controle sem sgRNAs e WT indica amostra não transfectada (sem DNA). 07 e 08 são a combinação do sgRNA usado. (Figura 15D) Sequências de DNA mutantes induzidas por expressão do mecanismo de edição de genoma por sgRNAs específicos são alinhadas à sequência do tipo selvagem (WT). O PAM é mostrado destacado em cinza e os sgRNAs em letras vermelhas. WT e pequenas deleções foram encontrados em diversos clones analisados.

As Figuras 16A a C mostra resultados de ensaio de T7 que revelam a presença de mutações no gene candidato *Ma07_19730*. (Figura 16A) O desenho que representa o locus *Ma07_19730* que indica as posições relativas em que os sgRNAs foram projetados e selecionados com base em regiões conservadas com outros genes

de *ACO*. (Figura 16B) O locus *Ma07_19730* foi amplificado com iniciadores específicos fora da região de sgRNAs para ensaio de T7E1. (Figura 16C) Detecção de mutações medidas pelo ensaio de T7E1. “Ctr” indica o plasmídeo de controle sem sgRNAs e WT indica amostra não transfectada (sem DNA). 11 e 12 são a combinação dos sgRNAs usados.

As Figuras 17A a C mostra resultados de ensaio de T7 que revelam que o ensaio de T7 revelou a presença de mutações no gene candidato *Ma01_11540*. (Figura 17A) O desenho que representa o locus *Ma01_11540* que indica as posições relativas em que os sgRNAs foram projetados e selecionados com base em regiões conservadas com outros genes de *ACO*. (Figura 17B) O locus *Ma01_11540* foi amplificado com iniciadores específicos fora da região de sgRNAs para ensaio de T7E1. (Figura 17C) Detecção de mutações medidas pelo ensaio de T7E1. “Ctr” indica o plasmídeo de controle sem sgRNAs e WT indica amostra não transfectada (sem DNA). 11 e 12 são a combinação do sgRNA usado e 231 é gDNA do tipo selvagem.

A Figura 18 mostra análise de sequenciamento de mutações no gene *Ma01_11540*. Sequências de DNA mutantes induzidas por expressão do mecanismo de edição de genoma por sgRNAs específicos são alinhadas à sequência do tipo selvagem (WT). O PAM é mostrado destacado em cinza e os sgRNAs em letras vermelhas. WT e indels foram encontrados em diversos clones analisados.

A Figura 19 mostra análise de sequenciamento de mutações no gene candidato *Ma01_11540*. Sequências de DNA mutantes induzidas por expressão do mecanismo de edição de genoma por sgRNAs específicos são alinhadas à sequência do tipo selvagem (WT). O PAM é mostrado destacado em cinza, os sgRNAs em letras vermelhas, e inserções em letras verdes. WT e pequenos indels foram encontrados em diversos clones analisados.

As Figuras 20A e B mostram análise de sequenciamento de mutações no gene candidato *Ma01_11540* com vários sgRNAs. Sequências de DNA mutantes induzidas por expressão do mecanismo de edição de genoma por sgRNAs específicos são alinhadas à sequência do tipo selvagem (WT). O PAM é mostrado destacado em

cinza e os sgRNAs em letras vermelhas. Sequência WT, deleções pequenas e grandes foram encontradas em diversos clones analisados.

A Figura 21 mostra um resumo da evidência de eventos de edição de genoma nos genes de ACS alvejados. Os eventos de edição de genoma foram avaliados por (i) PCR, clonagem e sequenciamento; e (ii) ensaio de T7EI. Y= indels detectados; N= nenhum indel detectado; X= dados inconclusivos.

A Figura 22 mostra um resumo da evidência de eventos de edição de genoma nos genes de ACO alvejados. Os eventos de edição de genoma foram avaliados por (i) PCR, clonagem e sequenciamento; e (ii) ensaio de T7EI. Y= indels detectados; N= nenhum indel detectado; X= dados inconclusivos.

As Figuras 23A a E mostram a regeneração de protoplastos de banana transfetados. Figura 23A. Protoplastos recém-isolados, que foram submetidos à transfecção com plasmídeos pAC007, pAC2008, pAC2010, pAC2011 ou pAC2012. Figura 23B. As primeiras divisões celulares ocorrem 48 h após o isolamento e a transfecção dos protoplastos. Figura 23C. Microcalos de células embriogênicas desenvolvem-se após 1 a 2 meses. Figura 23D. Desenvolvimento de pró-embriões de células embriogênicas; Figura 23E. Embriões globulares;

As Figuras 24A mostram a regeneração de protoplastos de banana transfetados. Figura 24A. Embriões maduros derivados de protoplastos de banana transfetados em meio de germinação (GM) contendo sais de MS e vitaminas;

Figuras 24B e C Embriões começam a germinar 1 a 2 semanas após a transferência;

Figura 24D Embriões em germinação 3 a 4 semanas após a transferência para GM (meio de germinação), prontos para serem transferidos para o meio de proliferação para alongamento de broto.

As Figuras 25A a E mostram a regeneração de suspensão de células embriogênicas de banana bombardeadas (ECS) para estender a meia-vida. Figura 25A. ECS com 3 dias de vida após o bombardeio em meio de proliferação; Figura 25B. Proliferação de ECS bombardeadas uma semana após bombardeio; Figura 25C. Os

embriões desenvolvem-se a partir de ECS bombardeadas, um mês após o bombardeio em meio de desenvolvimento de embrião (EDM); Figura 25D. Embriões em meio de maturação; Figura 25E. Embriões globulares.

A Figura 26 mostra sequências de ACO e ACS assim como sgRNAs, sítios de ligação a sgRNA e iniciadores usados de acordo com algumas modalidades da invenção. O destaque em vermelho denota a posições dos sgRNAs ao longo das sequências alvejadas; Código em cor é fornecido na figura.

DESCRIÇÃO DE MODALIDADES ESPECÍFICAS DA INVENÇÃO

[082] A presente invenção, em algumas modalidades da mesma, refere-se a composições e métodos para aumentar a meia-vida de banana.

[083] Antes de explicar pelo menos uma modalidade da invenção em detalhes, deve-se entender que a invenção não é necessariamente limitada neste pedido aos detalhes apresentados na descrição a seguir ou exemplificados pelos Exemplos. A invenção pode ter outras modalidades ou pode ser praticada ou executada de várias formas.

[084] O etileno, o hidrocarboneto insaturado mais simples (dois carbonos com uma ligação dupla) é um hormônio vegetal gasoso que regula essencialmente todos os processos fisiológicos durante o ciclo de vida da planta. O mesmo é responsável por sinalizar alterações em: dormência e germinação de sementes, crescimento e nodulação de raiz, formação de broto e folha, desenvolvimento de flor e fruto, senescência e abscisão de diferentes órgãos, mecanismos de defesa da planta e diversas interações com outros hormônios vegetais. Embora o etileno seja indubitavelmente essencial para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência vegetal adequados, o mesmo pode ser também prejudicial às plantas em alguns casos. Foram relatados níveis de etileno aumentados em plantas expostas a vários tipos de estresse, incluindo frio, calor, deprivação de nutrientes, anaerobiose, ferimento e infecção por patógeno, com dano aumentado ao crescimento e saúde vegetal como resultado. Há, assim, um interesse comercial considerável em modificar geneticamente a quantidade de etileno produzida sob condições de amadurecimento,

senescência ou estresse e, criando, assim, plantas com traço mais robusto e/ou desejável.

[085] O método mais estabelecido de engenharia genética de planta com o uso de técnicas de edição de genoma com CRISPR-Cas exige a inserção de DNA novo no genoma do hospedeiro. Esse inserto, um DNA de transferência (T-DNA), porta diversas unidades transcricionais a fim de atingir edições de genoma bem-sucedidas mediadas por CRISPR-Cas. As mesmas comumente consistem em gene de resistência a antibióticos para selecionar plantas transgênicas, o mecanismo de Cas, e diversas unidades de sgRNA. Devido à integração de DNA estranho no genoma, as plantas geradas dessa forma são classificadas como transgênicas ou geneticamente modificadas (GM). Uma vez que uma edição de genoma tenha sido estabelecida no hospedeiro, o T-DNA pode ser removido através de propagação e o melhoramento sexuais, visto que o mecanismo de CRISPR Cas9 não é mais necessário para manter o fenótipo. Entretanto, para culturas partenocárpicas, tal como a banana, que não produzem sementes viáveis, a remoção de T-DNA por reprodução sexual é impossível.

[086] As modalidades da invenção referem-se à identificação de alvos para edição de genoma na via de biossíntese de etileno da banana.

[087] Assim, para reduzir os níveis de etileno em plantas de banana, o que pode resultar em meia-vida estendida de frutos de banana, foi tentado knockout de genes envolvido na biossíntese de etileno, incluindo ACS e ACO (Figura 7A, 7B). Entretanto, o genoma de banana contém múltiplas sequências que são homólogas a esses genes.

[088] A fim de identificar genes alvo superiores dentro do genoma de banana, que codificam sequências homólogas de ACS e ACO funcionais, sequências homólogas de vias caracterizadas em modelo ou espécies de cultura foram identificadas. O processo envolveu uma série de etapas sequenciais para análise comparativa de sequências de DNA e proteína que visam reconstruir o histórico evolucionário de genes através de análise filogenética, filtrar candidatos validando sua expressão em tecido geral e alvo e sequenciamento de genes candidatos para

assegurar o projeto de sgRNA adequado (para evitar pareamentos errados). Esse procedimento permitir a seleção de genes, a identificação de regiões alvo otimizadas para knockout (domínios conservados e potencialmente catalíticos) e o projeto de sgRNAs adequados.

[089] Após transfecção de protoplastos de banana com sgRNAs direcionados a uma pluralidade de genes na via de biossíntese de etileno, os presentes inventores puderam identificar edição de genoma robusta em genes chave, por exemplo, Ma07_g19730 e Ma04_g35640, assim como em outros genes das famílias para evitar compensação por redundância. Tais protoplastos foram também submetidos a protocolos de regeneração de modo a obter uma planta de banana que tem uma meia-vida longa (consultar as Figuras 8 a 25A a E).

[090] Assim, de acordo com um aspecto, é fornecido um método para aumentar a meia-vida de banana, em que o método compreende:

(a) submeter uma célula vegetal de banana a um agente de edição de DNA direcionado a uma sequência de ácido nucleico que codifica um componente em uma via de biossíntese de etileno da banana para resultar em uma perda de mutação de função na dita sequência de ácido nucleico que codifica a dita via de biossíntese de etileno e

(b) regenerar uma planta da dita célula vegetal.

[091] Conforme usado no presente documento, o termo “banana” refere-se a uma planta do gênero Musa, incluindo Plantains.

[092] De acordo com uma modalidade específica, a banana é triploide.

[093] Outros ploidies são também contemplados, incluindo, diploide e tetraploide.

[094] Conforme usado no presente documento, “planta” refere-se a planta (ou plantas) inteira, uma planta enxertada, ancestrais e progênie das plantas e partes de plantas, incluindo sementes, frutos, brotos, caules, raízes (incluindo tubérculos), porta-enxerto, enxerto e células vegetais, tecidos e órgãos.

[095] De acordo com uma modalidade específica, a parte da planta é um fruto.

[096] De acordo com uma modalidade específica, a parte da planta é uma

semente.

[097] “Semente” refere-se a uma unidade de reprodução da planta em florescimento que pode se desenvolver em outra de tal planta.

[098] De acordo com uma modalidade específica, a célula é uma célula germinativa.

[099] De acordo com uma modalidade específica, a célula é uma célula somática.

[0100] A planta pode estar em qualquer forma, incluindo culturas em suspensão, protoplastos, embriões, regiões meristemáticas, tecido caloso, folhas, gametófitos, esporófitos, pólen e micrósporos.

[0101] De acordo com uma modalidade específica, a parte da planta compreende DNA.

[0102] A seguir está uma lista não limitante de cultivares que podem ser usados de acordo com os presentes ensinamentos.

[0103] Grupo AA

[0104] *Musa acuminata* diploide, tanto plantas de banana selvagens quanto cultivares

[0105] Banana Chingan

[0106] Banana Lakatan

[0107] Banana dedo de moça (banana doce)

[0108] Pisang jari buaya (banana dedo de crocodilo)

[0109] Señorita banana (Monkoy, banana Arnibal, Cuarenta dias, Cariñosa, Pisang Empat Puluh Hari, Pisang Lampung)^[12]

[0110] Banana Sinwobogi

[0111] Grupo AAA

[0112] *Musa acuminata* triploide, tanto plantas de banana selvagens quanto cultivares

[0113] Subgrupo Cavendish

[0114] “Cavendish anã”

[0115] “Cavendish gigante” (“Williams”)

- [0116] “Grand Nain” (“Chiquita”)
- [0117] “Masak Hijau”
- [0118] “Robusta”
- [0119] “Red Dacca”
- [0120] Banana vermelha anã
- [0121] Banana Gros Michel
- [0122] Bananas das montanhas da África Oriental (subgrupo AAA-EA)
- [0123] Grupo AAAA
- [0124] *Musa acuminata* tetraploide, tanto bananas selvagens quanto cultivares
- [0125] Banana Bodles Altafort
- [0126] Banana Golden Beauty
- [0127] Grupo AAAB
- [0128] Cultivares tetraploides de *Musa × paradisiaca*
- [0129] Banana Atan
- [0130] Banana Goldfinger
- [0131] Grupo AAB
- [0132] Cultivares triploides de *Musa × paradisiaca*. Esse grupo contém o subgrupo Banana-da-terra, composto por bananas-da-terra "verdadeiras" ou bananas-da-terra africanas - cujo centro de diversidade é a África Central e África Ocidental, em que um grande número de cultivares foi domesticado após a introdução de bananas-da-terra ancestrais da Ásia, possivelmente 2.000 a 3.000 anos atrás.
- [0133] Os subgrupos Iholena e Maoli-Popo'ulu são denominados bananas-da-terra do Pacífico.
- [0134] Subgrupo Iholena - *subgrupo de bananas para cozimento domesticadas na região do Pacífico*
- [0135] Subgrupo Maoli-Popo'ulu - *subgrupo de bananas para cozimento domesticadas na região do Pacífico*
- [0136] Banana Maqueño
- [0137] Banana Popoulu

- [0138] Subgrupo Mysore - *bananas para cozimento e sobremesa*^[15]
- [0139] Banana Mysore
- [0140] Subgrupo Pisang Raja
- [0141] Banana Pisang Raja
- [0142] Subgrupo banana-da-terra
- [0143] Banana-da-terra francesa
- [0144] Banana-da-terra francesa verde
- [0145] Banana-da-terra Horn e banana Rhino Horn
- [0146] Banana Nendran
- [0147] Banana-da-terra francesa rosa
- [0148] Banana tigre
- [0149] Subgrupo Maçã
- [0150] Banana maçã
- [0151] Banana Prata-anã (Banana brasileira anã, Prata anã)
- [0152] Subgrupo Silk
- [0153] Banana Latundan (banana Silk, banana maçã)
- [0154] Outros
- [0155] Banana Pisang Seribu
- [0156] Banana plu
- [0157] Grupo AABB
- [0158] Cultivares tetraploides de *Musa × paradisiaca*
- [0159] Banana Kalamagol
- [0160] Pisang Awak (banana Ducasse)
- [0161] Grupo AB
- [0162] Cultivares diploides de *Musa × paradisiaca*
- [0163] Banana Ney Poovan
- [0164] Grupo ABB
- [0165] Cultivares triploides de *Musa × paradisiaca*
- [0166] Banana Blue Java (Banana Ice Cream, Ney mannan, banana-da-terra Ash,

Pata hina, Dukuru, Vata)

- [0167]** Subgrupo Bluggoe
- [0168]** Banana Bluggoe (também conhecida como orinoco e "burro")
- [0169]** Banana Silver Bluggoe
- [0170]** Banana Pelipita (Pelipia, Pilipia)
- [0171]** Subgrupo Saba
- [0172]** Banana Saba (Cardaba, Dippig)
- [0173]** Banana Cardaba
- [0174]** Banana Benedetta
- [0175]** Grupo ABBB
- [0176]** Cultivares tetraploides de *Musa* × *paradisiaca*
- [0177]** Banana Tiparot
- [0178]** Grupo BB
- [0179]** *Musa balbisiana* diploide, bananas selvagens
- [0180]** Grupo BBB
- [0181]** *Musa balbisiana* triploide, bananas selvagens e cultivares
- [0182]** Kluai Lep Chang Kut
- [0183]** De acordo com uma modalidade específica, a planta é uma célula vegetal, por exemplo, célula vegetal em uma suspensão de células embrionárias.
- [0184]** De acordo com uma modalidade específica, a célula vegetal é um protoplasto.
- [0185]** Os protoplastos são derivados de qualquer tecido vegetal, por exemplo, raízes, folhas, suspensão de células embrionárias, calos ou tecidos de mudas.
- [0186]** Conforme usado no presente documento, "componente na via de biossíntese de etileno" refere-se a um polipeptídeo que é essencial para a biossíntese de etileno em banana, por exemplo, uma enzima. Especificamente, a biossíntese de etileno começa a partir de S-adenosilmetionina (SAM) e inclui duas etapas chave (Figura 1) conforme analisado por Pech et al. (2010, Ethylene biosynthesis. Em: Plant hormones: biosynthesis, transduction, action, 3ª edição. Springer, Dordrecht, páginas

115 a 136).

[0187] A via de biossíntese de etileno compreende a conversão de metionina em S-Adenosil-metionina (AdoMet, SAM) com o auxílio de AdoMet sintase. 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase (ACS) [EC 4.4.1.14] catalisa a ciclização de SAM em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), que é frequentemente considerada a reação limitante de taxa na via. ACS também produz 5'-metiltioadenosina (MTA) que é reciclada para regenerar metionina. A etapa final, conversão dependente de oxigênio de ACC em etileno, é catalisada por ACC oxidase (ACO) [EC 1.14.17.4]. ACC é convertido em etileno por uma modificação de carbonos C-2 e C-3 de ACC, enquanto C-1 é convertido em cianeto e o grupo carboxila convertido em dióxido de carbono.

[0188] De acordo com uma modalidade específica, a AdoMet sintase é banana AdoMet.

[0189] Todos os números de acesso correspondem ao haploide duplicado de *M. acuminata* de genoma publicamente disponível do acesso à coleção de germoplasma nomeada montagem Pahang (2n=22) versão 2.

[0190] Todos os números de acesso correspondem ao haploide duplicado de *M. acuminata* de genoma publicamente disponível do acesso à coleção de germoplasma nomeada montagem Pahang (2n=22) versão 2.

[0191] De acordo com uma modalidade específica, a ACS é:

- >Ma01_g07800.1 (SEQ ID NO: 1
- >Ma01_g12130.1 (SEQ ID NO: 2);
- >Ma02_g10500.1 (SEQ ID NO: 3);
- >Ma03_g12030.1 (SEQ ID NO: 4);
- >Ma03_g27050.1 (SEQ ID NO: 5);
- >Ma04_g01260.1 (SEQ ID NO: 6);
- >Ma04_g24230.1 (SEQ ID NO: 7);
- >Ma04_g31490.1 (SEQ ID NO: 8);
- >Ma04_g35640.1 (SEQ ID NO: 9);

>Ma04_g37400.1 (SEQ ID NO: 10);
>Ma05_g08580.1 (SEQ ID NO: 11);
>Ma05_g13700.1 (SEQ ID NO: 12);
>Ma09_g19150.1 (SEQ ID NO: 13); ou
>Ma10_g27510.1 (SEQ ID NO: 14);

De acordo com uma modalidade específica, a ACO é:

>Ma09_g04370.1 (SEQ ID NO: 15);
>Ma06_g17160.1 (SEQ ID NO: 16);
>Ma11_g05490.1 (SEQ ID NO: 17);
>Ma00_g04490.1 (SEQ ID NO: 18);
>Ma07_g15430.1 (SEQ ID NO: 19);
>Ma01_g11540.1 (SEQ ID NO: 20);
>Ma10_g16100.1 (SEQ ID NO: 21);
>Ma05_g08170.1 (SEQ ID NO: 22);
>Ma06_g14430.1 (SEQ ID NO: 23);
>Ma05_g09360.1 (SEQ ID NO: 24);
>Ma11_g22170.1 (SEQ ID NO: 25);
>Ma05_g31690.1 (SEQ ID NO: 26);
>Ma07_g19730.1 (SEQ ID NO: 27);
>Ma06_g02600.1 (SEQ ID NO: 28);
>Ma10_g05270.1 (SEQ ID NO: 29);
>Ma06_g14370.1 (SEQ ID NO: 30);
>Ma11_g05480.1 (SEQ ID NO: 31);
>Ma06_g14410.1 (SEQ ID NO: 32);
>Ma06_g14420.1 (SEQ ID NO: 33);
>Ma06_g34590.1 (SEQ ID NO: 34);
>Ma02_g21040.1 (SEQ ID NO: 35);
>Ma11_g04210.1 (SEQ ID NO: 36);
>Ma05_g12600.1 (SEQ ID NO: 37);

>Ma04_g23390.2 (SEQ ID NO: 38);
 >Ma03_g06970.1 (SEQ ID NO: 39);
 >Ma05_g09980.1 (SEQ ID NO: 40);
 >Ma04_g36640.1 (SEQ ID NO: 41);
 >Ma11_g04180.1 (SEQ ID NO: 42);
 >Ma11_g02650.1 (SEQ ID NO: 43); ou
 >Ma00_g04770.1 (SEQ ID NO: 44);

De acordo com uma modalidade específica, a ACO é Ma01_g11540.1 (SEQ ID NO: 20) e/ou Ma07_g19730.1 (SEQ ID NO: 27):

De acordo com uma modalidade específica, a ACS é Ma09_g19150.1 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g35640.1 (SEQ ID NO: 9) e/ou Ma04_g31490.1 (SEQ ID NO: 8):

Também são contemplados os homólogos funcionais de ocorrência natural de cada um dos genes acima, por exemplo, exibindo pelo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade com os genes mencionados acima e que têm uma atividade de ACS ou ACO, conforme definido acima.

[0192] Conforme usado no presente documento, “identidade de sequência” ou “identidade” ou equivalentes gramaticais, conforme usado no presente documento no contexto de duas sequências de ácido nucleico ou polipeptídeo, incluem referência aos resíduos nas duas sequências que são iguais quando alinhadas. Quando a porcentagem de identidade de sequência é usada em referência às proteínas, é reconhecido que as posições de resíduo que não são idênticas frequentemente se diferem por substituições de aminoácidos conservativas, em que os resíduos de aminoácidos são substituídos por outros resíduos de aminoácidos com propriedades químicas similares (por exemplo, carga ou hidrofobicidade) e, portanto, não alteram as propriedades funcionais da molécula. Quando as sequências se diferem em substituição conservativas, a porcentagem de identidade de sequência pode ser ajustada para cima para corrigir a natureza conservativa da substituição. As sequências que diferem por essas substituições conservadoras são consideradas

como tendo “similaridade de sequência” ou “similaridade”. Os meios para fazer esse ajuste são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Tipicamente, isso envolve pontuar uma substituição conservativa como uma incompatibilidade parcial em vez de completa, aumentando, assim, a porcentagem de identidade de sequência. Assim, por exemplo, quando é dada a um aminoácido idêntico uma pontuação de 1 e é dada a uma substituição não conservativa uma pontuação de zero, é dada a uma substituição conservativa uma pontuação entre zero e 1. A pontuação das substituições conservadoras é calculada, por exemplo, de acordo com o algoritmo de Henikoff S e Henikoff JG. [Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 1992, 89(22): 10.915 a 10.919].

[0193] A identidade pode ser determinada com o uso de qualquer software de comparação de homologia, incluindo, por exemplo, o software BlastN do Centro Nacional de Informações de Biotecnologia (NCBI), tal como com o uso de parâmetros padrão.

[0194] De acordo com algumas modalidades da invenção, a identidade é uma identidade global, isto é, uma identidade sobre as sequências de ácidos nucleicos inteiras da invenção e não sobre suas porções.

[0195] Conforme usado no presente documento, “planta” refere-se a planta (ou plantas) inteira, uma planta enxertada, ancestrais e progênie das plantas e partes de plantas, incluindo sementes, frutos, brotos, caules, raízes (incluindo tubérculos), porta-enxerto, enxerto e células vegetais, tecidos e órgãos.

[0196] A planta pode estar em qualquer forma, incluindo culturas em suspensão, protoplastos, embriões, regiões meristemáticas, tecido caloso, folhas, gametófitos, esporófitos, pólen e micrósporos.

[0197] De acordo com uma modalidade específica, a parte da planta compreende DNA.

[0198] De acordo com uma modalidade específica, a planta de banana é de uma linhagem de melhoramento de banana, mais preferencialmente, uma linhagem de elite.

[0199] De acordo com uma modalidade específica, a planta de banana é de uma linhagem de elite.

[0200] De acordo com uma modalidade específica, a planta de banana é de uma linhagem pura por cruza.

[0201] De acordo com uma modalidade específica, a planta de banana é de uma variedade de banana ou germoplasma de melhoramento.

[0202] O termo “linhagem de melhoramento”, conforme usado no presente documento, refere-se a uma linhagem de banana cultivada que tem características comercialmente valiosas ou agronomicamente desejáveis, em oposição a variedades selvagens ou endêmicas. O termo inclui referência a uma linhagem de melhoramento de elite ou linhagem de elite, que representa uma linhagem essencialmente homozigota, usualmente endogâmica, de plantas usadas para produzir híbridos F₁ comerciais. Uma linhagem de melhoramento de elite é obtida por melhoramento e seleção para melhor desempenho agrônômico que compreende uma pluralidade de traços agronomicamente desejáveis. Uma planta de elite é qualquer planta de uma linhagem de elite. Desempenho agrônômico superior refere-se a uma combinação desejada de traços agronomicamente desejáveis, conforme definido no presente documento, em que é desejável que a maioria, de preferência, todos os traços agronomicamente desejáveis, sejam melhorados na linhagem de melhoramento de elite em comparação com uma linhagem de melhoramento não elite. As linhagens de melhoramento de elite são essencialmente homozigotas e são, de preferência, puras.

[0203] O termo “linhagem de elite”, conforme usado no presente documento, refere-se a qualquer linhagem que tenha resultado de melhoramento e seleção para desempenho agrônômico superior. Uma linhagem de elite é, de preferência, uma linhagem que tem múltiplas, de preferência, pelo menos 3, 4, 5, 6 ou mais (genes para) traços agrônômicos desejáveis, conforme definido no presente documento.

[0204] Os termos “cultivar” e “variedade” são usados no presente documento e são intercambiáveis e denotam que uma planta foi deliberadamente desenvolvida por melhoramento, por exemplo, cruzamento e seleção, com o objetivo de ser

comercializado, por exemplo, usado por agricultores e produtores, para produzir produtos agropecuários para consumo próprio ou para comercialização. O termo “germoplasma de melhoramento” indica uma planta com uma situação biológica diferente de “selvagem”, que “selvagem” indica o estado original não cultivado ou natural de uma planta ou adesão.

[0205] O termo “germoplasma de melhoramento” inclui, porém sem limitação, seminatural, semisselvagem, erva daninha, cultivar tradicional, endêmica, material de melhoramento, material de pesquisa, linhagem de criadores, população sintética, híbrida, estoque fundador/população-base, linhagem pura (progenitora do cultivar híbrida), população segregante, estoque mutante/genético, classe de mercado e cultivar avançada/aprimorada. Conforme usado no presente documento, os termos “puro por cruza”, “endocruzamento puro” ou “endocruzamento” são intercambiáveis e se referem a uma planta ou linhagem de planta substancialmente homozigota obtida por autorrepetição e/ou retrocruzamento repetidos.

[0206] Conforme usado no presente documento, “modificar um genoma” refere-se a introduzir pelo menos uma mutação em pelo menos um anelo que codifica um componente na via de biossíntese de etileno em banana. De acordo com algumas modalidades, modificar refere-se a introduzir uma mutação em cada alelo de um componente na via de biossíntese de etileno. De acordo com pelo menos some modalidades, a mutação nos dois alelos do componente na via de biossíntese de etileno está em uma forma homozigota.

[0207] De acordo com algumas modalidades, as mutações nos dois alelos que codificam o componente na via de biossíntese de etileno são não complementares.

[0208] De acordo com uma modalidade específica, o agente de edição de DNA modifica a sequência-alvo do componente na via de biossíntese de etileno e é desprovido de atividade “fora do alvo”, isto é, não modifica outras sequências no genoma de banana.

[0209] De acordo com uma modalidade específica, o agente de edição de DNA compreende uma “atividade fora do alvo” em um gene não essencial no genoma de

banana.

[0210] Não essencial refere-se a um gene que, quando modificado com o agente de edição de DNA, não afeta o fenótipo do genoma alvo de uma maneira agropecuária (por exemplo, valor nutricional, sabor, biomassa, rendimento, tolerância ao estresse biótico/abiótico e outros).

[0211] Os efeitos fora do alvo podem ser analisados com o uso de métodos que são bem conhecidos na técnica e são descritos no presente documento.

[0212] Conforme usado no presente documento, mutação de “perda de função” refere-se a uma aberração genômica que resulta em capacidade reduzida (isto é, função comprometida) ou incapacidade do componente da via de biossíntese de etileno de facilitar a síntese de etileno ou precursor do mesmo.

[0213] Conforme usado no presente documento, “capacidade reduzida” refere-se à atividade reduzida do componente na atividade da via de biossíntese de etileno (isto é, síntese de etileno) em comparação com aquela da enzima do tipo selvagem desprovida da perda de mutação de função. De acordo com uma modalidade específica, a atividade reduzida é de pelo menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou até mais em comparação com a de a enzima de tipo selvagem sob as mesmas condições de ensaio. A biossíntese de etileno pode ser medida em plântulas pequenas através de cromatografia gasosa (GC) ou ensaios baseados em laser (Cristescu SM, Mandon J, Arslanov D, De Pessemier J, Hermans C, Harren FJM. Current methods for detecting ethylene in plants. Ann Bot-London. 2013; 111(3):347 a 360).

[0214] De acordo com uma modalidade específica, a perda de mutação de função resulta em nenhuma expressão do componente do mRNA ou proteína da via de biossíntese de etileno mRNA ou proteína (dependendo do local da aberração no gene que codifica o componente da via de biossíntese de etileno).

[0215] De acordo com uma modalidade específica, a perda de mutação de função resulta em expressão do componente da via de biossíntese de etileno, mas que é incapaz ou ineficiente para sintetizar etileno ou um precursor do mesmo.

[0216] De acordo com uma modalidade específica, a perda de mutação da função é selecionada do grupo que consiste em deleção, inserção, inserção-deleção (Indel), inversão, substituição e uma combinação dos mesmos (por exemplo, deleção e substituição, por exemplo, deleções e SNPs).

[0217] De acordo com uma modalidade específica, a perda da mutação da função é menor que 1 Kb ou 0,1 Kb.

[0218] De acordo com uma modalidade específica, a mutação de “perda de função” ocorre no 5’ do gene que codifica o componente da via de biossíntese de etileno de modo a inibir a produção de qualquer produto de expressão de α (por exemplo, éxon 1).

[0219] De acordo com uma modalidade específica, a mutação de “perda de função” ocorre em qualquer parte no gene que permita a produção do produto de expressão, embora seja incapaz de facilitar (contribuir para) a síntese de etileno ou precursor do mesmo, isto é, proteína inativa. Também é fornecida no presente documento uma mutação nos elementos reguladores do gene, por exemplo, promotor.

[0220] Conforme mencionado, a planta de banana compreende a perda de mutação de função em pelo menos um alelo de um gene que codifica o componente da via de biossíntese de etileno.

[0221] De acordo com uma modalidade específica, a mutação é homozigota.

[0222] De acordo com um aspecto, é fornecido um método para aumentar a meia-vida de banana, em que o método compreende:

(a) submeter uma célula vegetal de banana a um agente de edição de DNA direcionado a uma sequência de ácido nucleico que codifica um componente em uma via de biossíntese de etileno da banana para resultar em uma perda de mutação de função na sequência de ácido nucleico que codifica a via de biossíntese de etileno e

(b) regenerar uma planta da célula vegetal.

[0223] De acordo com uma modalidade específica, o método compreende, ainda, colher frutos da planta.

[0224] De acordo com uma modalidade específica, o fruto é colhido ainda verde e

firme, 7 a 14 dias antes do amadurecimento. Cada planta adulta de banana produz um único cacho, que é formado por muitos frutos de banana ou “dedos” e agrupado em várias “mãos (FAO, 2014). Os cachos de banana são cortados por “mão” (usualmente envolvendo 2 a 3 pessoas) com o uso de uma faca curvada afiada ou uma machadinha.

[0225] Conforme usado no presente documento “aumentar a meia-vida” refere-se a pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% ou mesmo 95% de aumento de meia-vida de fruto de banana colhido que tem a perda de mutação de função no genoma (conforme descrito no presente documento) em comparação com aquela de uma planta de banana da mesma base genética que não compreende a perda de mutação de função e conforme manifestado pela meia-vida, conforme avaliado por métodos que são bem conhecidos na técnica (consultar a seção de Exemplos a seguir). A meia-vida é estimada acompanhando-se a cor e a consistência do fruto.

[0226] A seguir, é apresentada uma descrição de vários exemplos não limitativos de métodos e agentes de edição de DNA usados para introduzir alterações de ácidos nucleicos em um gene de interesse e agentes para implementá-los que podem ser usados de acordo com modalidades específicas da presente divulgação.

[0227] Edição de genoma usando endonucleases manipuladas - essa abordagem se refere a um método genético reverso usando nucleases manipuladas artificialmente para tipicamente cortar e criar quebras de fita dupla específicas em um local desejado (ou locais desejados) no genoma, que são então reparadas por processos endógenos celulares, como, recombinação homóloga (HR) ou união final não homóloga (NHEJ). A NHEJ une diretamente as extremidades do DNA em uma quebra de fita dupla, enquanto a HR utiliza uma sequência de doadores homólogos como modelo (isto é, a cromátide-irmã formada durante a fase S) para regenerar a sequência de DNA ausente no local da ruptura. A fim de introduzir modificações específicas de nucleotídeos no DNA genômico, um modelo de reparo de DNA doador contendo a sequência desejada deve estar presente durante a FC (DNA de fita simples ou de fita

dupla fornecida exogenamente).

[0228] A edição do genoma não pode ser realizada usando endonucleases de restrição tradicionais, já que a maioria das enzimas de restrição reconhece alguns pares de bases no DNA como alvo e essas sequências geralmente são encontradas em muitos locais do genoma, resultando em cortes múltiplos que não se limitam ao local desejado. Para superar esse desafio e criar quebras de cadeia simples ou dupla específicas do local, várias classes distintas de nucleases foram descobertas e bioengenharia até o momento. Isso inclui as meganucleases, nucleases de dedos de zinco (ZFNs), nucleases efetoras do tipo ativador de transcrição (TALENs) e sistema CRISPR/Cas.

[0229] *Meganucleases* – As meganucleases são geralmente agrupadas em quatro famílias: a família LAGLIDADG, a família GIY-YIG, a família de caixas His-Cys e a família HNH. Essas famílias são caracterizadas por motivos estruturais, que afetam a atividade catalítica e a sequência de reconhecimento. Por exemplo, os membros da família LAGLIDADG caracterizam-se por ter uma ou duas cópias do título conservado do LAGLIDADG. As quatro famílias de meganucleases são amplamente separadas uma da outra em relação aos elementos estruturais conservados e, conseqüentemente, à especificidade da sequência de reconhecimento de DNA e à atividade catalítica. As meganucleases são comumente encontradas em espécies microbianas e têm a propriedade exclusiva de ter sequências de reconhecimento muito longas (> 14 pb), tornando-as naturalmente muito específicas para o corte em um local desejado.

[0230] Isso pode ser explorado para fazer quebras de fita dupla específicas do site na edição do genoma. Um versado na técnica pode usar essas meganucleases de ocorrência natural, no entanto, o número dessas meganucleases de ocorrência natural é limitado. Para superar esse desafio, métodos de mutagênese e triagem de alta produtividade foram usados para criar variantes de meganucleases que reconhecem sequências únicas. Por exemplo, várias meganucleases foram fundidas para criar enzimas híbridas que reconhecem uma nova sequência.

[0231] Alternativamente, os aminoácidos que interagem com o DNA da meganuclease podem ser alterados para projetar meganucleases específicas da sequência (consultar, por exemplo, a Patente nº US 8.021.867). As meganucleases podem ser projetadas com o uso dos métodos descritos em, por exemplo, Certo, MT *et al.* Nature Methods (2012) 9:073 a 975; Patentes nºs US 8.304.222; 8.021.867; 8.119.381; 8.124.369; 8.129.134; 8.133.697; 8.143.015; 8.143.016; 8.148.098; ou 8.163.514, cujo conteúdo está incorporado ao presente documento a título de referência na sua totalidade. Alternativamente, as meganucleases com características de corte específicas do local podem ser obtidas usando tecnologias comercialmente disponíveis, por exemplo, a tecnologia de edição de genoma do Preceded Biosciences, Directed Nuclease Editor™ da Precision Biosciences.

[0232] *ZFNs* e *TALENs* - Duas classes distintas de nucleases manipuladas, nucleases de dedo de zinco (*ZFNs*) e nucleases efetoras do tipo ativador de transcrição (*TALENs*), provaram ser eficazes na produção de quebras de fita dupla direcionadas (Christian *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2011; Mahfouz *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2010).

[0233] Basicamente, a tecnologia de endonuclease de restrição de *ZFNs* e *TALENs* utiliza uma enzima de corte de DNA não específica que está ligada a um domínio de ligação de DNA específico (uma série de domínios de dedos de zinco ou repetições de *TALE*, respectivamente). Tipicamente, uma enzima de restrição cujo local de reconhecimento de DNA e local de clivagem são separados um do outro é selecionada. A porta de clivagem é separada e depois ligada a um domínio de ligação ao DNA, produzindo assim uma endonuclease com especificidade muito alta para uma sequência desejada. Uma enzima de restrição exemplificativa com essas propriedades é a FokI. Além disso, a FokI tem a vantagem de exigir que a moeda de dez centavos tenha atividade de nuclease e isso significa que a especificidade aumenta drasticamente à medida que cada parceiro de nuclease reconhece uma sequência de DNA única. Para aumentar esse efeito, as nucleases de FokI foram projetadas para funcionar apenas como heterodímeros e aumentar a atividade

catalítica. As nucleases de funcionamento do heterodímero evitam a possibilidade de atividade indesejável do homodímero e, assim, aumentam a especificidade da quebra de fita dupla.

[0234] Assim, por exemplo, para direcionar um local específico, ZFNs e TALENs são construídos como pares de nucleases, com cada membro do par projetado para ligar sequências adjacentes no local de destino. Mediante expressão transitória nas células, as nucleases se ligam aos seus locais-alvo e os domínios FokI se heterodimerizam para criar uma quebra de fita dupla. O reparo dessas quebras de fita dupla através da via de junção não homóloga (NHEJ) geralmente resulta em pequenas deleções ou pequenas inserções de sequência. Como cada reparo feito pelo NHEJ é único, o uso de um único par de nucleases pode produzir uma série alélica com uma variedade de deleções diferentes no local de destino.

[0235] Em geral, o NHEJ é relativamente preciso (cerca de 85% dos DSBs nas células humanas são reparados pela NHEJ dentro de cerca de 30 minutos após a detecção) na edição de genes. É considerado a NHEJ errônea. Quando o reparo é preciso, a nuclease continua cortando até que o produto de reparo seja mutagênico e o motivo de reconhecimento/local de corte/PAM desapareceu/sofreu mutação ou que a nuclease transientemente introduzida não está mais presente.

[0236] As deleções geralmente variam de alguns pares de bases a algumas centenas de pares de comprimento, mas deleções maiores foram geradas com sucesso na cultura de células usando dois pares de nucleases simultaneamente (Carlson *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2010). Além disso, quando um fragmento de DNA com homologia para a região-alvo é introduzido em conjunto com o par nuclease, a quebra de fita dupla pode ser reparada por meio de recombinação homóloga (HR) para gerar modificações específicas (Li *et al.*, 2011; Miller; *et al.*, 2010; Urnov *et al.*, 2005).

[0237] Embora as porções de nuclease de ZFNs e TALENs tenham propriedades semelhantes, a diferença entre essas nucleases manipuladas está em seu peptídeo de reconhecimento de DNA. Os ZFNs confiam nos dedos de zinco Cys2-His2 e os TALEN nos TALEs. Ambos os peptídeos de reconhecimento de DNA têm a

característica de serem encontrados naturalmente em combinações em suas proteínas. Os dedos de zinco Cys2-His2 são tipicamente encontrados em repetições com 3 pb de distância e são encontrados em diversas combinações em uma variedade de proteínas que interagem com nucleotídeos. Os TALEs, por outro lado, são encontrados em repetições com uma taxa de reconhecimento de um para um entre os aminoácidos e os pares de nucleotídeos reconhecidos. Devido ao fato de que os dedos de zinco e os TALEs ocorrem em padrões repetidos, é possível tentar diferentes combinações para criar uma ampla variedade de especificidades de sequência. As abordagens para a produção de endonucleases de dedo de zinco específicas para o local incluem, por exemplo, montagem modular (onde os dedos de zinco correlacionados com uma sequência tripla são anexados em uma linha para cobrir a sequência requerida), OPEN (seleção de rigor estrito dos domínios peptídicos vs. nucleotídeos tripletos seguidos por seleções rigorosas da combinação de peptídeos vs. o alvo final em sistemas bacterianos) e triagem bacteriana de um híbrido de bibliotecas de dedos de zinco, entre outras. Os ZFNs também podem ser projetados e obtidos comercialmente, por exemplo, junto à Sangamo Biosciences™ (Richmond, CA).

[0238] Os métodos para projetar e obter TALENs são descritos em, por exemplo, Reyon *et al.* Nature Biotechnology maio de 2012; 30 (5): 460 a 465; Miller *et al.* Nat Biotechnol. (2011) 29: 143 a 148; Cermak *et al.* Nucleic Acids Research (2011) 39 (12): e82 e Zhang *et al.* Nature Biotechnology (2011) 29 (2): 149-53. Um programa baseado na Web recentemente desenvolvido, chamado Mojo Hand, foi introduzido pela Mayo Clinic para projetar construções TAL e TALEN para aplicativos de edição de genoma (pode ser acessado através de [www\(ponto\)talendesign\(ponto\)org](http://www(ponto)talendesign(ponto)org)). O TALEN também pode ser projetado e obtido comercialmente, por exemplo, na Sangamo Biosciences™ (Richmond, CA).

[0239] Sistema T-GEE (mecanismo de edição de genoma da TargetGene) - Um complexo molecular de nucleoproteína programável que contém uma fração polipeptídica e um ácido nucleico que confere especificidade (SCNA) que se reúne in

vivo, em uma célula-alvo, e pode interagir com a sequência de ácidos nucleicos alvo predeterminada é fornecido. O complexo molecular programável da nucleoproteína pode modificar e/ou editar especificamente um sítio-alvo dentro da sequência de ácidos nucleicos alvo e/ou modificar a função da sequência de ácidos nucleicos alvo. A composição de nucleoproteínas compreende (a) molécula de polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo quimérico e compreende (i) um domínio funcional que pode modificar o sítio-alvo e (ii) um domínio de ligação que pode interagir com uma especificidade que confere ácido nucleico, e (b) especificidade que confere ácido nucleico (SCNA) que compreende (i) uma sequência de nucleotídeos complementar a uma região do ácido nucleico-alvo que flanqueia o sítio-alvo e (ii) uma região de reconhecimento que pode se ligar especificamente ao domínio de ligação do polipeptídeo. A composição permite modificar um alvo de sequência de ácidos nucleicos predeterminado com precisão, confiabilidade e custo-benefício com alta especificidade e capacidade de ligação do complexo molecular ao ácido nucleico-alvo através do pareamento de bases de ácidos nucleicos que conferem especificidade e de um ácido nucleico-alvo. A composição é menos genotóxica, modular em sua montagem, utiliza plataforma única sem customização, prática para uso independente fora de instalações especializadas, e possui um prazo de desenvolvimento mais curto e custos reduzidos.

[0240] *Sistema CRISPR-Cas* (também denominado no presente documento como “CRISPR”) - Muitas bactérias e arqueias contêm sistemas imunes adaptativos baseados em RNA endógenos que podem degradar ácidos nucleicos de fagos e plasmídeos invasores. Esses sistemas consistem em sequências de nucleotídeos de repetição curta palindrômica curta (CRISPR) regularmente espaçadas e agrupadas que produzem componentes de RNA e genes (Cas) associados a CRISPR que codificam componentes de proteína. Os RNAs CRISPR (crRNAs) contêm trechos curtos de homologia ao DNA de vírus e plasmídeos específicos e atuam como guias para direcionar as nucleases de Cas para degradar os ácidos nucleicos complementares do patógeno correspondente. Estudos do sistema CRISPR/Cas tipo

II de *Streptococcus pyogenes* mostraram que três componentes formam um complexo de RNA/proteína e, juntos, são suficientes para a atividade nuclease específica da sequência: a nuclease Cas9, um crRNA contendo 20 pares de bases de homologia com a sequência-alvo e um crRNA de ativação trans (tracrRNA) (Jinek *et al. Science* (2012) 337: 816 a 821.).

[0241] Foi ainda demonstrado que um RNA-guia quimérico sintético (gRNA) composto por uma fusão entre crRNA e tracrRNA poderia direcionar Cas9 para clivar alvos de DNA que são complementares ao crRNA *in vitro*. Também foi demonstrado que a expressão transitória de Cas9 em conjunto com os gRNAs sintéticos pode ser usada para produzir quebras de fita dupla direcionadas em uma variedade de espécies diferentes (Cho *et al.*, 2013; Cong *et al.*, 2013; DiCarlo *et al.*, 2013; Hwang *et al.*, 2013a, b; Jinek *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013).

[0242] O sistema CRISPR/Cas para edição de genoma contém dois componentes distintos: um gRNA e uma endonuclease, por exemplo, Cas9.

[0243] O gRNA é tipicamente uma sequência de 20 nucleotídeos que codifica uma combinação da sequência homóloga alvo (crRNA) e o RNA bacteriano endógeno que liga o crRNA à nuclease Cas9 (tracrRNA) em um único transcrito quimérico. O complexo gRNA/Cas9 é recrutado para a sequência-alvo pelo emparelhamento de bases entre a sequência de gRNA e o DNA genômico do complemento. Para uma ligação bem-sucedida de Cas9, a sequência de destino genômico também deve conter a sequência correta de Motospace Adjacent Motif (PAM), imediatamente após a sequência alvo. A ligação do complexo gRNA/Cas9 localiza o Cas9 na sequência genômica-alvo, para que o Cas9 possa cortar as duas fitas do DNA, causando uma quebra das fitas duplas. Assim como ZFNs e TALENs, as quebras de fita dupla produzidas por CRISPR/Cas podem ser reparadas por HR (recombinação homóloga) ou NHEJ (junção de extremidade não homóloga) e são suscetíveis à modificação de sequência específica durante o reparo do DNA.

[0244] A nuclease Cas9 possui dois domínios funcionais: RuvC e HNH, em que cada um corta uma cadeia de DNA diferente. Quando esses dois domínios estão

ativos, o Cas9 causa quebras de fita dupla no DNA genômico.

[0245] Uma vantagem significativa do CRISPR/Cas é a alta eficiência desse sistema, combinada com a capacidade de criar facilmente gRNAs sintéticos. Isso cria um sistema que pode ser facilmente modificado para alvejar modificações em diferentes sítios genômicos e/ou alvejar diferentes modificações no mesmo sítio. Além disso, foram estabelecidos protocolos que permitem o alvejamento simultâneo de múltiplos genes. A maioria das células que portam a mutação apresenta mutações bialélicas nos genes alvo.

[0246] No entanto, a flexibilidade aparente nas interações de pareamento de bases entre a sequência de gRNA e a sequência-alvo de DNA genômico permite que correspondências imperfeitas com a sequência-alvo sejam cortadas por Cas9.

[0247] Versões modificadas da enzima Cas9 contendo um único domínio catalítico inativo, RuvC- ou HNH-, são denominadas “nickases”. Com apenas um domínio de nuclease ativo, a nickase Cas9 corta apenas uma fita do DNA-alvo, criando uma quebra de fita simples ou “corte”. Uma quebra de fita simples, ou corte, é reparada principalmente pelo mecanismo de reparo de quebra de fita simples, envolvendo proteínas como, mas não apenas, o PARP (sensor) e o complexo XRCC1/LIG III (ligação). Se uma quebra de fita simples (SSB) for gerada por venenos da topoisomerase I ou por fármacos que prendem a PARP1 em SSBs naturais, isso pode persistir e quando a célula entrar na fase S e o garfo de replicação encontrar esses SSBs, eles se tornarão de extremidade única DSBs que só podem ser reparados pelo RH. No entanto, dois cortes de cadeia proximais e opostos introduzidos por uma nickase Cas9 são tratados como uma quebra de fita dupla, no que é frequentemente chamado de sistema CRISPR de “corte duplo”. Um corte duplo que é basicamente DSB não paralelo pode ser reparado como outros DSBs por HR ou NHEJ, dependendo do efeito desejado no alvo do gene e da presença de uma sequência de doadores e do estágio do ciclo celular (a FC é de abundância e só pode ocorrer nos estágios S e G2 do ciclo celular). Assim, se a especificidade e os efeitos fora do corte reduzidos são cruciais, o uso da nickase Cas9 para criar um apelido duplo, projetando

dois gRNAs com sequências alvo próximas e em filamentos opostos do DNA genômico, diminuiria o efeito fora do alvo, pois o gRNA só isso resultará em cortes que provavelmente não mudarão o DNA genômico, mesmo que esses eventos não sejam impossíveis.

[0248] Versões modificadas da enzima Cas9 contendo dois domínios catalíticos inativos (Cas9 morto ou dCas9) não possuem atividade de nuclease enquanto ainda podem se ligar ao DNA com base na especificidade do gRNA. O dCas9 pode ser utilizado como uma plataforma para reguladores de transcrição de DNA para ativar ou reprimir a expressão gênica, fundindo a enzima inativa a domínios reguladores conhecidos. Por exemplo, a ligação de dCas9 sozinha a uma sequência-alvo no DNA genômico pode interferir na transcrição de genes.

[0249] Existem várias ferramentas disponíveis publicamente para ajudar a escolher e/ou projetar sequências-alvo, bem como listas de gRNAs exclusivos determinados bioinformaticamente para genes diferentes em diferentes espécies, como o Target Finder do laboratório de Feng Zhang, o Target Finder do laboratório de Michael Boutros (E-CRISP), o RGEN Tools: Cas-OFFinder, o CasFinder: algoritmo flexível para identificar alvos Cas9 específicos em genomas e o CRISPR Optimal Target Finder.

[0250] Os exemplos não limitantes de um gRNA que podem ser usados na presente divulgação incluem aqueles descritos na seção Exemplo a seguir.

[0251] Para usar o sistema CRISPR, o gRNA e o Cas9 devem estar em uma célula-alvo ou entregues como um complexo de ribonucleoproteínas. O vetor de inserção pode conter ambos os cassetes em um único plasmídeo ou os cassetes são expressos a partir de dois plasmídeos separados. Os plasmídeos CRISPR estão disponíveis comercialmente, como o plasmídeo px330 da Addgene. O uso da tecnologia de RNA do guia (Cas) associado a repetições palindrômicas curtas e regularmente espaçadas (CRISPR) e uma facilidade endonuclease de Cas para modificar genomas vegetais também são pelo menos divulgados por Svitashv *et al.*, 2015, *Plant Physiology*, 169 (2): 931 a 945; Kumar e Jain, 2015, *J Exp Bot* 66: 47 a

57; e na Publicação de Pedido de Patente nº US 20150082478, que está especificamente incorporada ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0252] “Hit and run” ou “in-out” - envolve um procedimento de recombinação em duas etapas. Na primeira etapa, um vetor do tipo inserção contendo um cassete marcador positivo/negativo selecionável duplo é usado para introduzir a alteração de sequência desejada. O vetor de inserção contém uma única região contínua de homologia para o locus alvejado e é modificado para transportar a mutação de interesse. Esse construto de alvejamento é linearizado com uma enzima de restrição em um sítio dentro da região de homologia, introduzido nas células, e a seleção positiva é realizada para isolar eventos de recombinação homóloga. O DNA que porta a sequência homóloga pode ser fornecida como um plasmídeo, oligo de fita simples ou dupla. Esses recombinantes homólogos contêm uma duplicação local que é separada por sequência de vetor intermediária, incluindo o cassete de seleção. Na segunda etapa, os clones direcionados são submetidos à seleção negativa para identificar células que perderam o cassete de seleção por recombinação intracromossômica entre as sequências duplicadas. O evento de recombinação local remove a duplicação e, dependendo do local da recombinação, o alelo retém a mutação introduzida ou volta ao tipo selvagem. O resultado final é a introdução da modificação desejada sem a retenção de nenhuma sequência exógena.

[0253] A estratégia de “substituição dupla” ou “etiqueta e troca” - envolve um procedimento de seleção em duas etapas semelhante à abordagem hit and run, mas exige o uso de dois construtos de alvejamento diferentes. Na primeira etapa, um vetor de alvejamento padrão com braços de homologia de 3' e 5' é usado para inserir um cassete selecionável positivo/negativo duplo próximo ao local onde a mutação deve ser introduzida. Após a introdução dos componentes do sistema na célula e a seleção positiva aplicada, os eventos de RH podem ser identificados. Em seguida, um segundo vetor de alvejamento que contém uma região de homologia com a mutação desejada é introduzido nos clones direcionados, e a seleção negativa é aplicada para

remover o cassete de seleção e introduzir a mutação. O alelo final contém a mutação desejada enquanto elimina sequências exógenas indesejadas.

[0254] Recombinases específicas para sítio - A recombinase Cre derivada do bacteriófago P1 e a recombinase Flp derivada da levedura *Saccharomyces cerevisiae* são recombinases específicas para sítio do DNA, cada uma reconhecendo uma sequência única de DNA de 34 pares de bases (denominada “Lox” e “FRT”, respectivamente) e as sequências flanqueadas com os locais Lox ou FRT podem ser prontamente removidas por recombinação específica do local após a expressão da recombinase Cre ou Flp, respectivamente. Por exemplo, a sequência Lox é composta por uma região espaçadora assimétrica de oito pares de bases, flanqueada por 13 repetições invertidas de 13 pares de bases. Cre recombina a equação de DNA sox de 34 pares de bases, ligando-se às repetições invertidas de 13 pares de bases e catalisando a clivagem e religação de cadeias na região espaçadora. Os cortes de DNA escalonados feitos por Cre na região espaçadora são separados por 6 pares de bases para dar uma região de sobreposição que atua como um sensor de homologia para garantir que apenas os sítios de recombinação com a mesma região de sobreposição sejam recombinados.

[0255] Basicamente, o sistema de recombinase específico para sítio oferece meios para a remoção de cassetes de seleção após eventos de recombinação homóloga. Esse sistema também permite a geração de alelos alterados condicionais que podem ser inativados ou ativados de maneira temporal ou específica de tecido. Nota-se que as recombinases Cre e Flp deixam para trás uma “cicatriz” Lox ou FRT de 34 pares de bases. Os sítios Lox ou FRT que permanecem normalmente são deixados para trás em um íntron ou 3' UTR do locus modificado, e as evidências atuais sugerem que esses sítios geralmente não interferem significativamente na função do gene.

[0256] Assim, a recombinação Cre/Lox e Flp/FRT envolve a introdução de um vetor de alvejamento com braços de homologia 3' e 5' contendo a mutação de interesse, duas sequências Lox ou FRT e tipicamente um cassete selecionável

colocado entre as duas sequências Lox ou FRT. A seleção positiva é aplicada e os eventos de recombinação homóloga que contêm a mutação-alvo são identificados. A expressão temporária de Cre ou Flp em conjunto com a seleção negativa resulta na excisão da fita de seleção e seleciona as células em que a fita foi perdida. O alelo final alvo contém a cicatriz Lox ou FRT de sequências exógenas.

[0257] De acordo com uma modalidade específica, o agente de edição de DNA é CRISPR-Cas9.

[0258] Sequências de gRNA exemplificativas são fornecidas no presente documento.

>Ma04_g31490

GACTCTAAGATCAGGGTTAAAGG (SEQ ID NO: 45);

>Ma09_g19150/Ma04_g35640/Ma04_g31490

GCAGCTAACATCAGGGTTAAAGG (SEQ ID NO: 46).

[0259] De acordo com uma modalidade específica, o componente na dita via de biossíntese de etileno é selecionado a partir do grupo que consiste em Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9), Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8), Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20) e Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

[0260] De acordo com uma modalidade específica, o componente na dita via de biossíntese de etileno é selecionado a partir do grupo que consiste em Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9) e Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

[0261] De acordo com uma modalidade específica, o componente na dita via de biossíntese de etileno é selecionado a partir do grupo que consiste em Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8) e Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20).

[0262] De acordo com uma modalidade específica, o agente de edição de DNA é direcionado a coordenadas de ácido nucleico que alvejam especificamente mais de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica o dito componente na dita via de biossíntese de etileno.

[0263] De acordo com uma modalidade específica, o agente de edição de DNA compreende uma sequência de ácidos nucleicos pelo menos 99% idêntica a uma

sequência de ácidos nucleicos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 47-54 (sgRNAs: 183, 184, 188, 189, 190, 191, 194 e 195).

[0264] De acordo com uma modalidade específica, o agente de edição de DNA compreende uma sequência de ácidos nucleicos pelo menos 99 % idêntica a uma sequência de ácidos nucleicos estabelecida na SEQ ID NO: 47 (sgRNA: 183).

[0265] De acordo com uma modalidade específica, o agente de edição de DNA compreende um ácido nucleico estabelecido na SEQ ID NO: 47 (sgRNA: 183).

[0266] De acordo com uma modalidade específica, o agente de edição de DNA compreende uma pluralidade de sequências de ácidos nucleicos estabelecidas na SEQ ID NO: 47-54 (sgRNAs: 183, 184, 188, 189, 190, 191, 194 e 195)

[0267] De acordo com uma modalidade específica, o agente de edição de DNA compreende uma pluralidade de sequências de ácidos nucleicos estabelecidas na SEQ ID NO: 47, 49 e/ou 50 (sgRNAs: 183, 188, 189).

[0268] De acordo com uma modalidade específica, o agente de edição de DNA compreende uma pluralidade de sequências de ácidos nucleicos estabelecidas na SEQ ID NO: 51 e/ou 53 (sgRNAs: 190 e 194).

[0269] O agente de edição de DNA é tipicamente introduzido na célula vegetal com o uso de vetores de expressão.

[0270] Assim, de acordo com um aspecto da invenção, é fornecido um construto de ácido nucleico que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um agente de edição de DNA que pode se hibridizar a um gene que codifica um componente da biossíntese de etileno de uma banana e que facilita a edição do dito gene, em que a dita sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operacional a um elemento regulador de atuação cis para expressar o dito agente de edição de DNA em uma célula de uma banana.

[0271] As modalidades da invenção referem-se a qualquer agente de edição de DNA, conforme descrito acima.

[0272] De acordo com uma modalidade específica, o agente de edição do genoma compreende uma endonuclease, que pode compreender ou ter uma unidade auxiliar

de um módulo de alvejamento de DNA (por exemplo, sgRNA, ou também conforme denominado no presente documento “gRNA”).

[0273] De acordo com uma modalidade específica, o agente de edição de DNA é o sgRNA CRISPR/Cas9.

[0274] De acordo com uma modalidade específica, a construto de ácido nucleico compreende ainda uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma endonuclease de um agente de edição de DNA (por exemplo, Cas9 ou as endonucleases descritas acima).

[0275] De acordo com outra modalidade específica, a endonuclease e o sgRNA são codificados a partir de diferentes construtos, de modo que cada um esteja ligado de modo operacional a um elemento regulador de ação cis ativo em células vegetais (por exemplo, promotor).

[0276] Em uma modalidade particular de algumas modalidades da invenção, a sequência reguladora é um promotor expressável em plantas.

[0277] Os construtos úteis nos métodos de acordo com algumas modalidades podem ser construídos com o uso da tecnologia de DNA recombinante bem conhecida pelos versados na técnica. Tais construtos podem estar comercialmente disponíveis, ser adequados para a transformação em plantas e adequadas para a expressão do gene de interesse nas células transformadas.

[0278] Conforme usado no presente documento, o sintagma “expressável por plantas” refere-se a uma sequência promotora, incluindo quaisquer elementos reguladores adicionais adicionados à mesma ou contidos na mesma, por pelo menos induzir, conferir anel, ativar ou melhorar a expressão em uma célula, tecido ou órgão vegetal, de preferência, uma célula, tecido ou órgão monocotiledôneo ou dicotiledôneo. Os exemplos de promotores úteis para os métodos das modalidades da invenção incluem, porém sem limitação, Actina, CANV 35S, CaMV19S, GOS2. Os promotores que são ativos em vários tecidos ou estágios de desenvolvimento também podem ser usados.

[0279] As sequências de ácido nucleico dos polipeptídeos de algumas

modalidades da invenção podem ser otimizadas para a expressão da planta. Os exemplos de tais modificações de sequência incluem, entre outros, um conteúdo alterado de G/C para aproximar-se mais de perto do que normalmente é encontrado nas espécies de plantas de interesse e a remoção de códons encontrados atipicamente nas espécies de plantas comumente conhecidas como otimização de códons.

[0280] As células vegetais podem ser transformadas de maneira estável ou transitória com as construções de ácido nucleico de algumas modalidades da invenção. Na transformação estável, a molécula de ácido nucleico de algumas modalidades da invenção é integrada ao genoma da planta e, como tal, representa uma característica estável e herdada. Na transformação temporária, a molécula de ácido nucleico é expressa pela célula transformada, mas não é integrada ao genoma, como tal, representa um traço temporário.

[0281] De acordo com uma modalidade específica, a planta é transfectada temporariamente com um agente de edição de DNA.

[0282] De acordo com uma modalidade específica, os promotores no construto de ácido nucleico compreendem um promotor de Pol3. Os exemplos de promotores de Pol3 incluem, porém sem limitação, AtU6-29, AtU626, AtU3B, AtU3d, TaU6.

[0283] De acordo com uma modalidade específica, os promotores no construto de ácido nucleico compreendem um promotor de Pol2. Os exemplos de promotores Pol2 incluem, porém sem limitação, CaMV 35S, CaMV 19S, ubiquitina, CVMV.

[0284] De acordo com uma modalidade específica, os promotores no construto de ácido nucleico compreendem um promotor de 35S.

[0285] De acordo com uma modalidade específica, os promotores no construto de ácido nucleico compreendem um promotor de U6.

[0286] De acordo com uma modalidade específica, os promotores no construto de ácido nucleico compreendem um promotor de Pol3 (por exemplo, U6) ligado de modo operacional ao agente de ácido nucleico que codifica pelo menos um gRNA e/ou um promotor de Pol2 (por exemplo, CamV35S) ligado de modo operacional ao núcleo

sequência de ácido que codifica o agente de edição do genoma ou a sequência de ácidos nucleicos que codifica o repórter fluorescente (como descrito em uma modalidade específica abaixo).

[0287] De acordo com uma modalidade específica, a construto é útil para expressão temporária por transformação mediada por *Agrobacterium* (Helens et al., 2005, *Plant Methods* 1:13). Métodos de transformação temporária são ainda descritos no presente documento.

[0288] De acordo com uma modalidade específica, as sequências de ácidos nucleicos compreendidas no construto são desprovidas de sequências homólogas ao genoma da célula da planta diferente de quaisquer sequências-guia em sequências de sgRNA, de modo a evitar a integração ao genoma da planta.

[0289] Em certas modalidades, a construto de ácido nucleico é um construto não integrante, de preferência, em que a sequência de ácidos nucleicos que codifica o repórter fluorescente também é não integrante. Conforme usado no presente documento, “não integrante” refere-se a um construto ou sequência que não é afirmativamente projetada para facilitar a integração do construto ou sequência no genoma da planta de interesse. Por exemplo, um sistema funcional de vetor T-DNA para transformação genética mediada por *Agrobacterium* não é um sistema vetorial não integrador, pois o sistema é afirmativamente projetado para integrar-se ao genoma da planta. Da mesma forma, uma sequência de gene repórter fluorescente ou sequência marcadora selecionável que possui sequências de flanqueamento homólogas ao genoma da planta de interesse para facilitar a recombinação homóloga da sequência gênica repórter fluorescente ou sequência marcadora selecionável no genoma da planta de interesse não ser uma sequência de genes repórter fluorescente não integradora ou sequência marcadora selecionável.

[0290] Vários kits de clonagem podem ser usados de acordo com os ensinamentos de algumas modalidades da invenção.

[0291] De acordo com uma modalidade específica, o construto de ácido nucleico é um vetor binário. Os exemplos de vetores binários são pBIN19, pBI101, pBinAR,

pGPTV, pCAMBIA, pBIB-HYG, pBecks, pGreen ou pPZP (Hajukiewicz, P. et al., Plant Mol. Biol. 25, 989 (1994), e Hellens et al., Trends in Plant Science 5, 446 (2000)).

[0292] Os exemplos de outros vetores a serem utilizados em outros métodos de entrega de DNA (por exemplo, transfecção, eletroporação, bombardeamento, inoculação viral) são: pGE-sgRNA (Zhang et al. Nat. Comms. 2016 7:12697), pJIT163-Ubi-Cas9 (Wang et al. Nat. Biotechnol 2004 32, 947-951), pICH47742::2x35S-5'UTR-hCas9(STOP)-NOST (Belhan et al. Plant Methods 2013 11;9(1):39).

[0293] As modalidades descritas no presente documento também se referem a um método de seleção de células que compreende um evento de edição de genoma, em que o método compreende:

(a) transformar células de uma planta de banana com um construto de ácido nucleico que compreende o agente de edição do genoma (conforme descrito acima) e um repórter fluorescente;

(b) selecionar células transformadas que exibem fluorescência emitida pelo repórter fluorescente com o uso de citometria de fluxo ou imagem;

(c) cultivar as células transformadas que compreendem o evento de edição de genoma pelo agente de edição de DNA por um tempo suficiente para perder a expressão do agente de edição de DNA, de modo a obter células que compreendem um evento de edição de genoma gerado pelo agente de edição de DNA, mas sem codificação de DNA o agente de edição de DNA; e

[0294] De acordo com algumas modalidades, o método compreende ainda a validação nas células transformadas, perda de expressão do repórter fluorescente após a etapa (c).

[0295] De acordo com algumas modalidades, o método compreende ainda a validação na perda de células transformadas, da expressão do agente de edição de DNA após a etapa (c).

[0296] Uma modalidade não limitante do método é descrita no Fluxograma da Figura 1.

[0297] De acordo com uma modalidade específica, a planta é uma célula vegetal,

por exemplo, célula vegetal em uma suspensão de células embrionárias.

[0298] De acordo com uma modalidade específica, a célula vegetal é um protoplasto.

[0299] Os protoplastos são derivados de qualquer tecido vegetal, por exemplo, raízes, folhas, suspensão de células embrionárias, calos ou tecidos de mudas.

[0300] Existem vários métodos para introduzir DNA nas células vegetais, por exemplo, com o uso de protoplastos e o versado saberá qual selecionar.

[0301] A entrega de ácidos nucleicos pode ser introduzida em uma célula vegetal em modalidades da invenção por qualquer método conhecido dos versados na técnica, incluindo, por exemplo e sem limitação: por transformação de protoplastos (consultar, por exemplo, a Patente nº U.S. 5.508.184); por captação de DNA mediada por dessecação/inibição (consultar, por exemplo, Potrykus et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 199:183 a 188); por eletroporação (Consultar, por exemplo, a Patente nº U.S. 5.384.253); por agitação com fibras de carboneto de silício (Consultar, por exemplo, as Patentes nºs U.S. 5.302.523 e 5.464.765); por transformação mediada por *Agrobacterium* (Consultar, por exemplo, as Patentes nºs U.S. 5.563.055, 5.591.616, 5.693.512, 5.824.877, 5.981.840 e 6.384.301); por aceleração de partículas revestidas com DNA (Consultar, por exemplo, as Patentes nºs U.S. 5.015.580, 5.550.318, 5.538.880, 6.160.208, 6.399.861 e 6.403.865) e por nanopartículas, nanocarreadores e peptídeos de penetração celular (WO201126644A2; WO2009046384A1; WO2008148223A1) nos métodos para entregar DNA, RNA, peptídeos e/ou proteínas ou combinações de ácidos nucleicos e peptídeos em células vegetais.

[0302] Outros métodos de transfecção incluem o uso de reagentes de transfecção (por exemplo, Lipofectin, ThermoFisher), dendrímeros (Kukowska-Latallo, JF et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA93, 4.897 a 4.902), peptídeos de penetração celular (Mäe et al., 2005, Internalisation of cell-penetrating peptides into tobacco protoplasts, Biochimica et Biophysica Acta 1669(2):101 a 107) ou poliaminas (Zhang e Vinogradov, 2010, Short biodegradable polyamines for gene delivery and transfection of brain capillary endothelial cells, J Control Release, 143(3):359 a 366).

[0303] De acordo com uma modalidade específica, a introdução de DNA nas células vegetais (por exemplo, protoplastos) é efetuada por eletroporação.

[0304] De acordo com uma modalidade específica, a introdução de DNA nas células vegetais (por exemplo, protoplastos) é efetuada por bombardeio/biolística.

[0305] De acordo com uma modalidade específica, para a introdução de DNA em protoplastos, o método compreende a captação de DNA mediada por polietileno glicol (PEG). Para mais detalhes, consultar Karesch et al. (1991) Plant Cell Rep. 9: 575 a 578; Mathur et al. (1995) Plant Cell Rep. 14: 221 a 226; Negrutiu et al. (1987) Plant Cell Mol. Biol. 8:363 a 373. Os protoplastos são, então, cultivados sob condições que lhes permitem crescer paredes celulares, começar a se dividir para formar um calo, desenvolver brotos e raízes e regenerar plantas inteiras.

[0306] A transformação transitória também pode ser efetuada por infecção viral como o uso de vírus de plantas modificados.

[0307] Os vírus que demonstraram ser úteis para a transformação de hospedeiros vegetais incluem CaMV, TMV, TRV e BV. A transformação de plantas com o uso de vírus vegetais é descrita na Patente nº U.S. 4.855.237 (BGV), EP-A 67.553 (TMV), Pedido Publicado nº JP 63-14693 (TMV), EPA 194.809 (BV), EPA 278.667 (BV); e Gluzman, Y. et al., Communications in Molecular Biology: Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque, páginas 172 a 189 (1988). Partículas de pseudovírus para uso na expressão de DNA estranho em muitos hospedeiros, incluindo plantas, são descritas no documento nº WO 87/06261.

[0308] O construto de vírus de RNA de plantas para a introdução e expressão de sequências de ácidos nucleicos exógenos não virais em plantas é demonstrado pelas referências acima, bem como por Dawson, WO et al., Virology (1989) 172: 285 a 292; Takamatsu et al. EMBO J. (1987) 6: 307 a 311; French et al. Science (1986) 231: 1.294 a 1.297; e Takamatsu et al. FEBS Letters (1990) 269: 73 a 76.

[0309] Quando o vírus é um vírus de DNA, modificações adequadas podem ser feitas no próprio vírus. Alternativamente, o DNA do vírus pode primeiramente ser clonado em um plasmídeo bacteriano para facilitar o construto do vetor viral desejado

com o DNA estranho. O DNA do vírus pode, então, ser retirado do plasmídeo. Se o vírus for um vírus de DNA, uma origem bacteriana de replicação pode ser anexada ao DNA viral, que é, então, replicado pela bactéria. A transcrição e tradução desse DNA produzirá a proteína de revestimento que encapsidará o DNA viral. Se o vírus for um vírus de RNA, o mesmo geralmente é clonado como um cDNA e inserido em um plasmídeo. O plasmídeo é, então, usado para produzir todas as construções. O vírus do RNA é, então, produzido pela transcrição da sequência viral do plasmídeo e tradução dos genes virais para produzir a proteína (ou proteínas) de revestimento que encapsidam o RNA viral.

[0310] A construção de vírus de RNA de plantas para a introdução e expressão em plantas de sequências de ácidos nucleicos exógenos não virais, como as incluídas no construto de algumas modalidades da invenção, é demonstrada pelas referências acima, bem como na Patente nº US 5.316.931.

[0311] Em uma modalidade, é fornecido um ácido nucleico viral da planta, no qual a sequência de codificação da proteína de revestimento nativa foi excluída de um ácido nucleico viral, uma sequência de codificação da proteína de revestimento viral da planta não nativa e um promotor não nativo, de preferência o promotor subgenômico de foi inserida a sequência de codificação da proteína de revestimento não nativa, com capacidade de expressão no hospedeiro da planta, empacotamento do ácido nucleico viral da planta recombinante e garantir uma infecção sistêmica do hospedeiro pelo ácido nucleico viral da planta recombinante. Alternativamente, o gene da proteína de revestimento pode ser inativado pela inserção da sequência de ácidos nucleicos não nativa dentro dele, de modo que uma proteína seja produzida. O ácido nucleico viral da planta recombinante pode conter um ou mais promotores subgenômicos não nativos adicionais. Cada promotor subgenômico não nativo pode transcrever ou expressar genes adjacentes ou sequências de ácidos nucleicos no hospedeiro da planta e não tem capacidade de recombinação entre si e com promotores subgenômicos nativos. As sequências de ácidos nucleicos não nativos (estranhos) podem ser inseridas adjacentes ao promotor subgenômico viral da planta

nativa ou ao promotor subgenômico viral da planta nativa e não nativa se mais de uma sequência de ácidos nucleicos for incluída. As sequências de ácidos nucleicos não nativos são transcritas ou expressas na planta hospedeira sob controle do promotor subgenômico para produzir os produtos desejados.

[0312] Em uma segunda modalidade, um ácido nucleico viral de planta recombinante é fornecido como na primeira modalidade, exceto pelo fato de que a sequência de codificação da proteína de revestimento nativa é colocada adjacente a um dos promotores subgenômicos de proteína de revestimento não nativos, em vez de uma sequência de codificação da proteína de revestimento não nativa.

[0313] Em uma terceira modalidade, é fornecido um ácido nucleico viral da planta recombinante, no qual o gene da proteína de revestimento nativo é adjacente ao seu promotor subgenômico e um ou mais promotores subgenômicos não nativos foram inseridos no ácido nucleico viral. Os promotores subgenômicos não nativos inseridos têm capacidade de transcrever ou expressar genes adjacentes em um hospedeiro da planta e não têm capacidade de se recombinar entre si e com os promotores subgenômicos nativos. As sequências de ácidos nucleicos não nativos podem ser inseridas adjacentes aos promotores virais da planta subgenômica não nativa, de modo que as referidas sequências sejam transcritas ou expressas na planta hospedeira sob controle dos promotores subgenômicos para produzir o produto desejado.

[0314] Em uma quarta modalidade, um ácido nucleico viral de planta recombinante é fornecido como na terceira modalidade, exceto pelo fato de que a sequência de codificação da proteína de revestimento nativa é substituída por uma sequência de codificação da proteína de revestimento não nativa.

[0315] Os vetores virais são encapsidados pelas proteínas de revestimento codificadas pelo ácido nucleico viral da planta recombinante para produzir um vírus da planta recombinante. O ácido nucleico viral da planta recombinante ou o vírus da planta recombinante é usado para infectar as plantas hospedeiras apropriadas. O ácido nucleico viral da planta recombinante tem capacidade de replicação no

hospedeiro, disseminação sistêmica no hospedeiro e transcrição ou expressão de gene estranho (ou genes estranhos) (ácido nucleico isolado) no hospedeiro para produzir a proteína desejada.

[0316] Independentemente do método de transformação/infecção empregado, os presentes ensinamentos se referem ainda a qualquer célula, por exemplo, uma célula vegetal (por exemplo, protoplasto) ou uma célula bacteriana que compreende o construto (ou construtos) de ácido nucleico, conforme descrito no presente documento.

[0317] Após a transformação, as células são submetidas à citometria de fluxo para selecionar células transformadas exibindo fluorescência emitida pelo repórter fluorescente (isto é, “proteína fluorescente”).

[0318] Conforme usado no presente documento, “uma proteína fluorescente” refere-se a um polipeptídeo que emite fluorescência e é tipicamente detectável por citometria de fluxo ou imagem, portanto, pode ser usado como base para a seleção de células que expressam tal proteína.

[0319] Os exemplos de proteínas fluorescentes que podem ser usadas como repórteres são a proteína verde fluorescente (GFP), a proteína azul fluorescente (BFP) e a proteína fluorescente vermelha dsRed. Uma lista não limitante de repórteres fluorescentes ou outros inclui proteínas detectáveis por luminescência (por exemplo, luciferase) ou ensaio colorimétrico (por exemplo, GUS). De acordo com uma modalidade específica, o repórter fluorescente é DsRed ou GFP.

[0320] Essa análise é tipicamente realizada dentro de 24 a 72 horas, por exemplo, 48 a 72, 24 a 28 horas, após a transformação. Para garantir a expressão temporária, nenhuma seleção de antibióticos é empregada, por exemplo, antibióticos para um marcador de seleção. A cultura ainda pode incluir antibióticos, mas não para um marcador de seleção.

[0321] A citometria de fluxo de células vegetais é normalmente realizada por Classificação de Células Ativadas por Fluorescência (FACS). A classificação celular ativada por fluorescência (FACS) é um método bem conhecido para separar

partículas, incluindo células, com base nas propriedades fluorescentes das partículas (consultar, por exemplo, Kamarch, 1987, *Methods Enzymol*, 151: 150 a 165).

[0322] Por exemplo, FACS de células positivas para GFP faz uso da visualização dos espectros de emissão verde versus vermelho de protoplastos excitados por um laser de 488 nm. Os protoplastos positivos para GFP podem ser distinguidos pelo aumento da proporção de emissão verde para vermelha.

[0323] A seguir é apresentado um protocolo não vinculativo adaptado de Bastiaan et al. *J Vis Exp*. 2010; (36): 1673, que está incorporado presente documento a título de referência. Os aparelhos de FACS estão disponíveis comercialmente, por exemplo, FACSMelody (BD), FACS Aria (BD).

[0324] Uma corrente de fluxo é configurada com um bocal de 100 µm e uma pressão na bainha de 0,13 MPa (20 psi). A densidade celular e a velocidade de injeção da amostra podem ser ajustadas para o experimento específico com base em se é desejado o melhor rendimento possível ou a velocidade mais rápida possível, por exemplo, até 10.000.000 de células/ml. A amostra é agitada no FACS para evitar a sedimentação dos protoplastos. Se o entupimento do FACS for um problema, existem três etapas possíveis para a solução de problemas: 1. Executar uma retrolavagem da linha de amostra. 2. Diluir a suspensão de protoplastos para reduzir a densidade. 3. Limpar a solução de protoplastos repetindo a etapa de filtração após centrifugação e ressuspensão. O aparelho é preparado para medir dispersão direta (FSC), dispersão lateral (SSC) e emissão a 530/30 nm para GFP e 610/20 nm para autofluorescência no espectro vermelho (RSA) após excitação por um laser de 488 nm. Esses são essencialmente os únicos parâmetros usados para isolar protoplastos positivos para GFP. As configurações de tensão podem ser usadas: FSC – 60 V, SSC 250 V, GFP 350 V e RSA 335 V. Observa-se que as configurações ideais de tensão serão diferentes para cada FACS e precisarão ser ajustadas durante toda a vida útil do classificador de células.

[0325] O processo é iniciado através da criação de um gráfico de pontos para dispersão direta versus dispersão lateral. As configurações de tensão são aplicadas

para que os eventos medidos sejam centralizados no gráfico. Em seguida, um gráfico de pontos é criado com sinais de fluorescência verde versus vermelho. As configurações de tensão são aplicadas para que os eventos medidos produzam uma população diagonal centralizada na plotagem ao observar uma suspensão de protoplastos tipo selvagem (sem GFP). Uma suspensão de protoplastos derivada de uma linha de marcadores GFP produzirá uma população clara de eventos fluorescentes verdes nunca vistos em amostras de tipo selvagem. As restrições de compensação são definidas para ajustar a sobreposição espectral entre GFP e RSA. As configurações adequadas de restrição de compensação permitirão uma melhor separação dos protoplastos positivos para GFP dos protoplastos e detritos não GFP. As restrições usadas aqui são as seguintes: RSA, menos 17,91% de GFP. Um portão é configurado para identificar eventos positivos de GFP, um controle negativo de protoplastos não GFP deve ser usado para ajudar na definição dos limites do portão. Um corte de dispersão para frente é implementado para deixar pequenos detritos fora da análise. Os eventos positivos para GFP são visualizados no gráfico FSC vs. SSC para ajudar a determinar o posicionamento do ponto de corte. Por exemplo, o ponto de corte é definido em 5.000. Observa-se que o FACS contará detritos como eventos de classificação e uma amostra com altos níveis de detritos pode ter um percentual diferente de eventos positivos de GFP do que o esperado. Isso não é necessariamente um problema. No entanto, quanto mais detritos na amostra, mais longa será a classificação. Dependendo do experimento e da abundância do tipo de célula a ser analisada, o modo de precisão FACS é definido para obter o rendimento ideal ou a pureza ideal das células classificadas.

[0326] Após a classificação por FACS, são coletados conjuntos selecionados positivamente de células vegetais transformadas (por exemplo, protoplastos) que exibem o marcador fluorescente e uma alíquota pode ser usada para testar o evento de edição de DNA (etapa opcional, consultar a Figura 1). Alternativamente (ou sequência de validação opcional) os clones são cultivados na ausência de seleção (por exemplo, antibióticos para um marcador de seleção), até que se transformem em

colônias, ou seja, clones (pelo menos 28 dias) e microcalos. Após pelo menos 60 a 100 dias em cultura (por exemplo, pelo menos 70 dias, pelo menos 80 dias), uma porção das células dos calos é analisada (validada) para: o evento de edição do DNA e a presença da edição do DNA agente, nomeadamente perda de sequências de DNA que codificam para o agente de edição de DNA, apontando para a natureza transitória do método.

[0327] Assim, os clones são validados para a presença de um evento de edição de DNA também denominado no presente documento “mutação” ou “edição”, dependendo do tipo de edição procurada, por exemplo, inserção, deleção, deleção-inserção (Indel), inversão, substituição e combinações dos mesmos.

[0328] De acordo com uma modalidade específica, o evento de edição do genoma compreende uma deleção, uma substituição de um único par de bases ou uma inserção de material genético de uma segunda planta que poderia ser introduzida na planta de interesse pelo melhoramento tradicional.

[0329] De acordo com uma modalidade específica, o evento de edição do genoma não compreende uma introdução de DNA estranho em um genoma da planta de interesse que não pôde ser introduzido através do melhoramento tradicional.

[0330] Os métodos para detectar alteração de sequência são bem conhecidos na arte e incluem, porém sem limitação, sequenciamento de DNA (por exemplo, sequenciamento de próxima geração), eletroforese, um ensaio de detecção de incompatibilidade baseado em enzima e um ensaio de hibridação, como PCR, RT-PCR, Proteção de RNase, hibridização in situ, extensão de iniciador, Southern blot, análise de Northern Blot e dotblot. Vários métodos usados para a detecção de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) também podem ser utilizados, como endonuclease T7 baseada em PCR, sequenciamento Hetroduplex e Sanger.

[0331] Outro método para validar a presença de um evento de edição de DNA, por exemplo, Indels compreende um ensaio de clivagem de incompatibilidade que faz uso de uma enzima seletiva de estrutura (por exemplo, endonuclease) que reconhece e cliva DNA não correspondido.

[0332] O ensaio de clivagem de pareamento incorreto é um método simples e econômico para a detecção de indels e, portanto, é o procedimento típico para detectar mutações induzidas pela edição do genoma. O ensaio usa enzimas que clivam o DNA heteroduplex em pareamento incorretos e laços extra-hélicos formados por múltiplos nucleotídeos, produzindo dois ou mais fragmentos menores. Um produto de PCR de ~ 300 a 1.000 pb é gerado com o sítio de clivagem previsto para a nucleasse descentralizado, para que os fragmentos resultantes sejam de tamanho diferente e possam ser facilmente resolvidos por eletroforese em gel convencional ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os produtos de digestão com marcação final também podem ser analisados por gel automatizado ou eletroforese capilar. A frequência de indels no locus pode ser estimada medindo as intensidades integradas do amplicon de PCR e das bandas de DNA clivadas. A etapa de digestão leva de 15 a 60 minutos e, quando as etapas de preparação do DNA e PCR são adicionadas, os ensaios inteiros podem ser concluídos em < 3 h.

[0333] Duas enzimas alternativas são tipicamente usadas nesse ensaio. A T7 endonuclease 1 (T7E1) é uma resolvase que reconhece e cliva DNA imperfeitamente correspondente na primeira, segunda ou terceira ligação fosfodiéster a montante da incompatibilidade. A sensibilidade de um ensaio avaliado com base em T7E1-b é de 0,5% a 5%. Em contrapartida, a nuclease Surveyor™ (Transgenomic Inc., Omaha, NE, EUA) é um membro da família CEL de nucleases específicas de pareamento incorreto derivadas do aipo. A mesma reconhece e cliva os pareamentos incorretos devido à presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) ou pequenos indels, clivando ambas as cadeias de DNA da própria corrente do pareamento incorreto. A mesma pode detectar indels de até 12 nt e é sensível a mutações presentes em frequências tão baixas quanto ~ 3%, isto é, 1 em 32 cópias.

[0334] Ainda outro método de validar a presença de uma edição inclui até a análise de fusão de alta resolução.

[0335] A análise de fusão de alta resolução (HRMA) envolve a amplificação de uma sequência de DNA que mede o alvo genômico (90 a 200 pb) por PCR em tempo

real com a incorporação de um corante fluorescente, seguido pela análise da curva de fusão dos amplicons. O HRMA é baseado na perda de fluorescência quando corantes intercalantes são liberados do DNA de fita dupla durante a desnaturação térmica. Ele registra o perfil de desnaturação dependente da temperatura dos amplicons e detecta se o processo de fusão envolve uma ou mais espécies moleculares.

[0336] Ainda outro método é o ensaio de mobilidade heteroduplex. As mutações também podem ser detectadas através da análise de fragmentos de PCR re-hibridados diretamente pela eletroforese em gel de poliacrilamida nativa (PAGE). Esse método aproveita a migração diferencial do DNA heteroduplex e homoduplex em géis de poliacrilamida. O ângulo entre as fitas de DNA com pareamento correto e incorreto causadas por um indel significa que o DNA heteroduplex migra em uma taxa significativamente mais lenta que o DNA homoduplex em condições nativas, e eles podem ser facilmente distinguidos com base em sua mobilidade. Os fragmentos de 140 a 170 pb podem ser separados num gel de poliacrilamida a 15%. A sensibilidade de tais ensaios pode se aproximar de 0,5% sob condições ideais, o que é semelhante a T7E1. Após reanelar os produtos PCR, o componente de eletroforese do ensaio leva aproximadamente 2 h.

[0337] Outros métodos de validação da presença de eventos de edição são descritos em detalhes em Zischewski 2017 *Biotechnol. Advances* 1(1):95 a 104.

[0338] Será percebido que os clones positivos podem ser homozigotos ou heterozigotos para o evento de edição de DNA. O versado na técnica selecionará o clone para cultura/regeneração adicional de acordo com o uso pretendido.

[0339] Os clones que exibem a presença de um evento de edição de DNA, conforme desejado, são ainda analisados quanto à presença do agente de edição de DNA. A saber, perda de sequências de DNA que codificam o agente de edição de DNA, apontando para a natureza temporária do método.

[0340] Isso pode ser realizado analisando-se a expressão do agente de edição de DNA (por exemplo, no mRNA, na proteína), por exemplo, pela detecção fluorescente

de GFP ou q-PCR.

[0341] Alternativa ou adicionalmente, as células são analisadas quanto à presença do construto de ácido nucleico como descrito no presente documento ou porções das mesmas, por exemplo, sequência de ácidos nucleicos que codifica o polipeptídeo repórter ou o agente de edição de DNA.

[0342] Os clones que não mostram DNA que codifica o repórter fluorescente ou o agente de edição de DNA (por exemplo, como afirmado por microscopia fluorescente, q-PCR e ou qualquer outro método como Southern blot, PCR, sequenciamento) ainda compreendendo o evento (ou eventos) de edição de DNA [mutação (ou mutações)] conforme desejado são isolados para processamento adicional.

[0343] Esses clones podem, portanto, ser armazenados (por exemplo, criopreservados).

[0344] Alternativamente, as células (por exemplo, protoplastos) podem ser regeneradas em plantas inteiras primeiro crescendo em um grupo de células vegetais que se desenvolvem em um calo e depois pela regeneração de brotos (caulogênese) do calo usando métodos de cultura de tecidos vegetais. O crescimento de protoplastos em calos e a regeneração de brotos exige o equilíbrio adequado dos reguladores de crescimento das plantas no meio de cultura de tecidos que deve ser personalizado para cada espécie de planta

[0345] Os protoplastos também podem ser usados para o melhoramento de plantas, usando uma técnica chamada fusão de protoplastos. Os protoplastos de diferentes espécies são induzidos a se fundirem com o uso de um campo elétrico ou uma solução de polietileno glicol. Essa técnica pode ser usada para gerar híbridos somáticos na cultura de tecidos.

[0346] Os métodos de regeneração de protoplastos são bem conhecidos na técnica. Vários fatores afetam o isolamento, a cultura e a regeneração de protoplastos, a saber, o genótipo, o tecido do doador e seu pré-tratamento, o tratamento enzimático para o isolamento de protoplastos, o método de cultura de protoplastos, a cultura, o meio de cultura e o ambiente físico. Para uma análise completa, consultar Maheshwari

et al. 1986 Differentiation of Protoplasts and of Transformed Plant Cells: 3 a 36. Springer-Verlag, Berlim.

[0347] As plantas regeneradas podem ser submetidas à melhoramento e seleção adicionais, conforme o versado entenda.

[0348] A planta ou células da mesma são desprovidas de um transgene que codifica um agente de edição de DNA.

[0349] O fenótipo das linhagens finais, plantas ou produtos de melhoramento intermediários pode ser analisado de tal como por determinação da sequência de gene que codifica o componente da via de biossíntese de etileno, expressão do mesmo no nível de mRNA ou proteína, atividade da proteína expressão análise das propriedades do fruto (meia-vida).

[0350] Produção de etileno: A biossíntese de etileno pode ser medida em plântulas pequenas através de cromatografia gasosa (GC) ou ensaios baseados em laser (Cristescu SM, Mandon J, Arslanov D, De Pessemier J, Hermans C, Harren FJM. Current methods for detecting ethylene in plants. Ann Bot-London. 2013;111(3):347 a 360).

[0351] Conforme é ilustrado no presente documento e na seção Exemplos a seguir. Os presentes inventores foram capazes de transformar banana com um agente (ou agentes) de edição de genoma, enquanto é evitada a transgênese estável.

[0352] Portanto, a presente metodologia permite a edição do genoma sem a integração de um repórter triável ou selecionável.

[0353] Assim, as modalidades da invenção ainda se referem a plantas, células vegetais e produto processado de plantas que compreendem o evento (ou eventos) de edição de genes gerados de acordo com os presentes ensinamentos.

[0354] Assim, os presentes ensinamentos também se referem a partes das plantas conforme descrito no presente documento ou a produtos processados das mesmas.

[0355] Fruto de banana e produtos à base de fruto de banana assim como seus métodos de produção são contemplados com o uso das plantas descritas no presente documento.

[0356] São também contemplados subprodutos de banana e métodos para produzir os mesmos, tais como cascas, folhas, pseudocaule, caule e inflorescência em várias aplicações alimentícias e não alimentícias que servem como agente espessante, coloração e sabor, fonte alternativa de macronutrientes e micronutrientes, nutracêuticos, ração para gado, fibras naturais e fontes de compostos bioativos naturais e biofertilizantes.

[0357] De acordo com uma modalidade específica, os produtos processados compreendem DNA.

[0358] Espera-se que, durante a vida de uma patente que amadurece a partir deste pedido, muitos agentes de edição de DNA relevantes sejam desenvolvidos e o escopo do termo agente de edição de DNA é concebido incluindo todas essas novas tecnologias *a priori*.

[0359] Conforme usado no presente documento, o termo "aproximadamente" refere-se a $\pm 10\%$.

[0360] Os termos "compreende", "que compreende", "inclui", "que inclui", "que tem" e seus conjugados significam "incluindo, porém sem limitação".

[0361] O termo "consistir em" significa "que inclui e limitado a".

[0362] O termo "que consistindo essencialmente em" significa que a composição, método ou estrutura pode incluir ingredientes, etapas e/ou partes adicionais, mas apenas se os ingredientes, etapas e/ou partes adicionais não alterarem materialmente as características básicas e inovadoras da composição, método ou estrutura reivindicados.

[0363] Conforme usado no presente documento, as formas singulares "um", "uma", "o" e "a" incluem referências no plural a menos que o contexto determine claramente de outro modo. Por exemplo, o termo "um composto" ou "pelo menos um composto" pode incluir uma pluralidade de compostos, incluindo misturas dos mesmos.

[0364] Ao longo deste pedido, várias modalidades desta invenção podem ser apresentadas em um formato de faixa. Deve-se compreender que a descrição em

formato de faixa é meramente para conveniência e brevidade e não deve ser interpretada como uma limitação inflexível ao escopo da invenção. Consequentemente, a descrição de uma faixa deve ser considerada como tendo especificamente revelado todas as subfaixas possíveis assim como valores numéricos individuais nesta faixa. Por exemplo, uma descrição de uma faixa tal como de 1 a 6 deve ser considerada como tendo especificamente revelado subfaixas tais como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., assim como números individuais nessa faixa, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Isso se aplica a despeito da amplitude da faixa.

[0365] Sempre que uma faixa numérica é indicada no presente documento, a mesma deve incluir qualquer numeral citado (fracionário ou integral) dentro da faixa indicada. Os sintagmas "que está na faixa de/na faixa entre" um primeiro número indicado e um segundo número indicado e "que varia/varia de" um primeiro número indicado "a" um segundo número indicado são usados no presente documento intercambiavelmente e significam que incluem o primeiro e o segundo números indicados e todos os fracionados e números inteiros entre os mesmos.

[0366] Conforme usado no presente documento, o termo "método" refere-se a maneiras, meios, técnicas e procedimentos para realizar uma dada tarefa, incluindo, porém sem limitação, aquelas maneiras, meios, técnicas e procedimentos conhecidos ou prontamente desenvolvidos a partir de maneiras, meios, técnicas e procedimentos conhecidos por profissionais das técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas e médicas.

[0367] Quando é feita referência a listagens específicas de sequências, essa referência deve também compreender sequências que correspondem substancialmente à sua sequência complementar, incluindo variações menores de sequência, resultantes de, por exemplo, erros de sequenciamento, erros de clonagem ou outras alterações que resultam na substituição da base, exclusão ou adição de bases, desde que a frequência de tais variações seja menor que 1 em 50 nucleotídeos, alternativamente, menor que 1 em 100 nucleotídeos, alternativamente, menor que 1

em 200 nucleotídeos, alternativamente, menor que 1 em 500 nucleotídeos, alternativamente, menos de 1 em 1.000 nucleotídeos, alternativamente, menos de 1 em 5.000 nucleotídeos, alternativamente, menos de 1 em 10.000 nucleotídeos.

[0368] Entende-se que qualquer Número de Identificação de Sequência (SEQ ID NO) divulgado no presente pedido pode se referir a uma sequência de DNA ou a uma sequência de RNA, dependendo do contexto em que a SEQ ID NO é mencionada, mesmo que essa SEQ ID NO seja expressa somente em um formato de sequência de DNA ou um formato de sequência de RNA. Por exemplo, uma determinada SEQ ID NO: é expressa em um formato de sequência de DNA (por exemplo, mencionando T para timina), mas pode se referir a uma sequência de DNA que corresponde a uma determinada sequência de ácidos nucleicos ou a sequência de RNA de um RNA sequência de ácidos nucleicos da molécula. Da mesma forma, embora algumas sequências sejam expressas em um formato de sequência de RNA (por exemplo, mencionando U para uracila), dependendo do tipo real de molécula sendo descrito, o mesmo pode se referir à sequência de uma molécula de RNA que compreende um dsRNA ou à sequência de uma molécula de DNA que corresponde à sequência de RNA mostrada. Em qualquer caso, estão previstas moléculas de DNA e RNA com as sequências divulgadas com quaisquer substitutos.

[0369] Observa-se que determinados recursos da invenção, que são descritos, a título de esclarecimento, no contexto de modalidades separadas, também podem ser fornecidos em combinação em combinação em uma modalidade única. Em contrapartida, várias características da invenção que são, por brevidade, descritas no contexto de uma única modalidade, podem também ser fornecidas separadamente ou em qualquer subcombinação ou conforme adequado em qualquer outra modalidade descrita da invenção. Certos recursos descritos no contexto de várias modalidades não devem ser considerados recursos essenciais dessas modalidades, a não ser que a modalidade seja inoperante sem esses elementos.

[0370] Várias modalidades e aspectos da presente invenção, conforme delineado acima no presente documento e conforme reivindicado na seção de reivindicações

abaixo, encontram suporte experimental nos exemplos a seguir.

[0371] Conforme usado no presente documento, o termo "aproximadamente" refere-se a $\pm 10\%$.

[0372] Os termos "compreende", "que compreende", "inclui", "que inclui", "que tem" e seus conjugados significam "incluindo, porém sem limitação".

[0373] O termo "consistir em" significa "que inclui e limitado a".

[0374] O termo "que consistindo essencialmente em" significa que a composição, método ou estrutura pode incluir ingredientes, etapas e/ou partes adicionais, mas apenas se os ingredientes, etapas e/ou partes adicionais não alterarem materialmente as características básicas e inovadoras da composição, método ou estrutura reivindicados.

[0375] Conforme usado no presente documento, as formas singulares "um", "uma", "o" e "a" incluem referências no plural a menos que o contexto determine claramente de outro modo. Por exemplo, o termo "um composto" ou "pelo menos um composto" pode incluir uma pluralidade de compostos, incluindo misturas dos mesmos.

[0376] Ao longo deste pedido, várias modalidades desta invenção podem ser apresentadas em um formato de faixa. Deve-se compreender que a descrição em formato de faixa é meramente para conveniência e brevidade e não deve ser interpretada como uma limitação inflexível ao escopo da invenção. Consequentemente, a descrição de uma faixa deve ser considerada como tendo especificamente revelado todas as subfaixas possíveis assim como valores numéricos individuais nesta faixa. Por exemplo, uma descrição de uma faixa tal como de 1 a 6 deve ser considerada como tendo especificamente revelado subfaixas tais como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., assim como números individuais nessa faixa, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Isso se aplica a despeito da amplitude da faixa.

[0377] Sempre que uma faixa numérica é indicada no presente documento, a mesma deve incluir qualquer numeral citado (fracionário ou integral) dentro da faixa

indicada. Os sintagmas "que está na faixa de/na faixa entre" um primeiro número indicado e um segundo número indicado e "que varia/varia de" um primeiro número indicado "a" um segundo número indicado são usados no presente documento intercambiavelmente e significam que incluem o primeiro e o segundo números indicados e todos os fracionados e números inteiros entre os mesmos.

[0378] Conforme usado no presente documento, o termo "método" refere-se a maneiras, meios, técnicas e procedimentos para realizar uma dada tarefa, incluindo, porém sem limitação, aquelas maneiras, meios, técnicas e procedimentos conhecidos ou prontamente desenvolvidos a partir de maneiras, meios, técnicas e procedimentos conhecidos por profissionais das técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas e médicas.

[0379] Conforme usado no presente documento, o termo "tratamento" inclui revogar, inibir substancialmente, retardar ou reverter a progressão de uma afecção 65, melhorar substancialmente os sintomas clínicos ou estéticos de uma condição ou impedir substancialmente o aparecimento de sintomas clínicos ou estéticos de uma condição.

[0380] Quando é feita referência a listagens específicas de sequências, essa referência deve também compreender sequências que correspondem substancialmente à sua sequência complementar, incluindo variações menores de sequência, resultantes de, por exemplo, erros de sequenciamento, erros de clonagem ou outras alterações que resultam na substituição da base, exclusão ou adição de bases, desde que a frequência de tais variações seja menor que 1 em 50 nucleotídeos, alternativamente, menor que 1 em 100 nucleotídeos, alternativamente, menor que 1 em 200 nucleotídeos, alternativamente, menor que 1 em 500 nucleotídeos, alternativamente, menos de 1 em 1.000 nucleotídeos, alternativamente, menos de 1 em 5.000 nucleotídeos, alternativamente, menos de 1 em 10.000 nucleotídeos.

[0381] Entende-se que qualquer Número de Identificação de Sequência (SEQ ID NO) divulgado no presente pedido pode se referir a uma sequência de DNA ou a uma sequência de RNA, dependendo do contexto em que a SEQ ID NO é mencionada,

mesmo que essa SEQ ID NO seja expressa somente em um formato de sequência de DNA ou um formato de sequência de RNA. Por exemplo, uma SEQ ID NO: é expressa em um formato de sequência de DNA (por exemplo, mencionando T para timina), mas pode se referir a uma sequência de DNA que corresponde a uma sequência de ácidos nucleicos ou a sequência de RNA de um RNA sequência de ácidos nucleicos da molécula. Da mesma forma, embora algumas sequências sejam expressas em um formato de sequência de RNA (por exemplo, mencionando U para uracila), dependendo do tipo real de molécula sendo descrito, o mesmo pode se referir à sequência de uma molécula de RNA que compreende um dsRNA ou à sequência de uma molécula de DNA que corresponde à sequência de RNA mostrada. Em qualquer caso, estão previstas moléculas de DNA e RNA com as sequências divulgadas com quaisquer substitutos.

[0382] Observa-se que determinados recursos da invenção, que são descritos, a título de esclarecimento, no contexto de modalidades separadas, também podem ser fornecidos em combinação em combinação em uma modalidade única. Em contrapartida, várias características da invenção que são, por brevidade, descritas no contexto de uma única modalidade, podem também ser fornecidas separadamente ou em qualquer subcombinação ou conforme adequado em qualquer outra modalidade descrita da invenção. Certos recursos descritos no contexto de várias modalidades não devem ser considerados recursos essenciais dessas modalidades, a não ser que a modalidade seja inoperante sem esses elementos.

[0383] Várias modalidades e aspectos da presente invenção, conforme delineado acima no presente documento e conforme reivindicado na seção de reivindicações abaixo, encontram suporte experimental nos exemplos a seguir.

EXEMPLOS

[0384] É feita agora referência aos exemplos a seguir, que, juntamente com as descrições acima, ilustram algumas modalidades da invenção de uma forma não limitante.

[0385] Geralmente, a nomenclatura usada no presente documento e os

procedimentos laboratoriais usados na presente invenção incluem técnicas de DNA molecular, bioquímicas, microbiológicas e de DNA recombinante. Tais técnicas são completamente explicadas na literatura. Consultar, por exemplo, "Molecular Cloning: A laborator Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, RM, ed.(1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley e Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nova York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nova York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", volumes 1 a 4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologias conforme estabelecidas nas Patentes nºs U.S. 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 e 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" , Volumes I-III Cellis, J.E., ed.(1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" de Freshney, Wiley-Liss, NY (1994), terceira edição; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan JE, ed.(1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edição), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); os imunoensaios disponíveis são extensivamente descritos na literatura de patente e científica, consultar, por exemplo, as Patentes nºs U.S. 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 e 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., e Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, RI, ed.(1986); "Células e enzimas imobilizadas" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) e "Methods in Enzymology" volume 1 a 317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todos os quais estão incorporados a título de referência como se aqui

totalmente estabelecidos. Outras referências gerais são fornecidas ao longo deste documento. Acredita-se que os procedimentos contidos no mesmo sejam bem conhecidos na técnica e são fornecidos para a conveniência do leitor. Todas as informações contidas no mesmo estão incorporadas ao presente documento a título de referência.

MATERIAIS E MÉTODOS

CALO EMBRIOGÊNICO E GERAÇÃO E MANUTENÇÃO DE SUSPENSÃO DE CÉLULAS.

[0386] Um calo embriogênico é desenvolvido a partir de um explante inicial, tais como flores macho imaturas ou ponta de broto, conforme descrito por Ma, 1988 (Ma S.S. 1991 Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture of banana. In Proceedings of Symposium on Tissue culture of horticultural crops, Taipei, Taiwan, 8 a 9 de março de 1988, páginas 181 a 188) e Schoofs, 1997 (Schoofs H. 1997. The origin of embryogenic cells in Musa. PhD thesis, KULeuven, Bélgica). As suspensões de células embriogênicas são iniciadas a partir de calos altamente embriogênicos recém-desenvolvidos em meio líquido. 80% do meio são renovados a cada 12 a 14 dias até a suspensão de células iniciada ser completamente estabelecida (6 a 9 meses).

CLONAGEM DE sgRNA

[0387] O plasmídeo de transfecção utilizado foi composto por 4 módulos compreendendo 1, eGFP acionado pelo promotor CaMV35s terminado por uma sequência de terminação G7; 2, Cas9 (códon humano otimizado) acionado pelo promotor CaMV35s terminado pela sequência de terminação Mas; 3, promotor AtU6 dirigindo sgRNA para o guia 1; 4 Promotor AtU6 dirigindo sgRNA para o guia 2. Um vetor binário pode ser usado, tal como pCAMBIA ou DNA pRI-201-AN.

VALIDAÇÃO DE SISTEMA DE EDIÇÃO DE GENE POR ALVEJAMENTO DE GENE-REPÓRTER EXÓGENO GFP

[0388] O sistema de GE não transgênico proposto aqui foi validado através de alvejamento do DNA de gene exógeno (GFP). Para analisar a força de diferentes

promotores de RNA polimerase III (pol-III), sgRNA foram projetados para alvejar eGFP no complexo de CRISPR Cas9 e, então, o efeito de diferentes promotores em knocking out de expressão de eGFP em células transformadas foi testado.

[0389] Especificamente, os plasmídeos (por exemplo, pBluescript, pUC19) continham quatro unidades transcricionais contendo Cas9, eGFP, dsRED e sgRNA-GFP acionadas por diferentes promotores de pol-II e pol-III (por exemplo, CAMV 35S, U6). Esses plasmídeos foram transfectadas em culturas de protoplasto e analisados por FACS após um período de incubação de 24 a 72 horas. Alta frequência em expressão de dsRED (ou mCherry, RFP) indicou alta eficiência de transfecção, enquanto baixa frequência em expressão de eGFP indicou edição de gene bem-sucedida através de CRISPR-Cas9. Portanto, a linhagem que mostrou a razão de expressão de eGFP:dsRED mais baixa foi o promotor de pol-III escolhido visto que o mesmo causou a proporção mais alta de inativação de eGFP através de complexos de CRISPR Cas9.

PROJETO DE PLASMÍDEO FINAL

[0390] Para expressão temporária, um plasmídeo contendo quatro unidades transcricionais foi usado. A primeira unidade transcricional continha a expressão de acionamento por promotor de CaMV-35S de Cas9 e o terminador do vírus do mosaico do tabaco (TMV). A unidade transcricional seguinte de outro promotor de CaMV-35S que aciona a expressão de eGFP e o terminador nos. A terceira e a quarta unidades transcricionais continham, cada uma, o promotor U6 de Arabidopsis que expressam sgRNA em genes alvo (conforme mencionado, cada vetor compreende dois sgRNAs).

ISOLAMENTO DE PROTOPLASTOS

[0391] Os protoplastos foram isolados incubando-se material vegetal (por exemplo, folhas, calos, suspensões de células) em uma solução de digestão (1% de celulase, 0,5% de macerozima, 0,5% de driselase, manitol 0,4 M, NaCl 154 mM, KCl 20 mM, MES 20 mM pH 5,6, CaCl₂ 10 mM) por 4 a 24 h à temperatura ambiente e agitação suave. Após digestão, o material vegetal restante foi lavado com solução W5 (NaCl 154 mM, CaCl₂ 125 mM, KCl 5 mM, MES 2 mM pH 5,6) e suspensão de

protoplastos foi filtrada através de um manchador de 40 µm. Após centrifugação a 80 g por 3 min à temperatura ambiente, os protoplastos foram ressuspensos em 2 ml de tampão W5 e precipitados por gravidade em gelo. O pélete de protoplasto final foi ressuspensão em 2 ml de MMg (manitol 0,4 M, MgCl₂ 15 mM, MES 4 mM pH 5,6) e a concentração de protoplastos foi determinada com o uso de um hemocítmetro. A viabilidade de protoplastos foi estimada com o uso de manchaamento com azul de tripano.

TRANSFEÇÃO DE PLASMÍDEO MEDIADA POR POLIETILENO GLICOL (PEG).

[0392] A transfecção por PEG de protoplastos de banana foi realizada com o uso de uma versão modificada da estratégia relatada por Wang et al. (2015) [Wang, H., *et al.*, An efficient PEG-mediated transient gene expression system in grape protoplasts and its application in subcellular localization studies of flavonoids biosynthesis enzymes. *Scientia Horticulturae*, 2015. **191**: páginas 82 a 89]. Os protoplastos foram ressuspensos até uma densidade de 2 a 5 x 10⁶ protoplastos/ml em solução de MMg. Foram adicionados 100 a 200 µl de suspensão de protoplastos a um tubo contendo o plasmídeo. A razão plasmídeo:protoplasto afeta muito a eficiência da transformação, portanto, uma faixa de concentrações de plasmídeo na suspensão de protoplastos, 5 a 300 µg/µl, foi testada. A solução de PEG (100 a 200 µl) foi adicionada à mistura e incubada a 23 °C por vários períodos que variam de 10 a 60 minutos. A concentração PEG4000 foi otimizada, uma faixa de 20 a 80% de PEG4000 em manitol 200 a 400 mM, solução de CaCl₂ 100 a 500 mM foi testada. Os protoplastos foram então lavados em W5 e centrifugados a 80 g por 3 min, ressuspensão prévia em 1 ml de W5 e incubados no escuro a 23 °C. Após incubação por 24 a 72 h, a fluorescência foi detectada por microscopia.

ELETROPORAÇÃO

[0393] Um plasmídeo contendo GFP/RFP, Pol2-NLS-Cas9 e sgRNA de Pol2, que alveja os genes relevantes foi introduzido nas células por eletroporação (BIORAD-GenePulserII; Miao e Jian 2007 *Nature Protocols* 2 (10): 2.348 a 2.353. Foram

transferidos 500 µl de protoplastos para cubetas de eletroporação e misturados com 100 µl de plasmídeo (10 a 40 µg de DNA). Os protoplastos foram eletroporados a 130 V e 1.000 F e incubados em temperatura ambiente por 30 minutos. Foi adicionado 1 ml de meio de cultura de protoplastos a cada cubeta e a suspensão de protoplastos foi vertida em uma pequena placa de Petri. Após incubação por 24 a 48 h, a fluorescência foi detectada por microscopia.

CLASSIFICAÇÃO FACS DE CÉLULAS QUE EXPRESSAM PROTEÍNAS FLUORESCENTES

[0394] 48 horas após a entrega do plasmídeo/RNA, as células foram coletadas e classificadas para expressão de proteínas fluorescentes usando um citômetro de fluxo para enriquecer as células que expressam GFP/agente de edição [[Chiang, T.W., et al., *CRISPR-Cas9(D10A) nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing*. Sci Rep, 2016. **6**: página 24.356]. Essa etapa de enriquecimento permite ignorar a seleção de marcadores e coletar apenas células que expressam temporariamente a proteína fluorescente, Cas9 e o sgRNA. Essas células podem ainda ser testadas quanto à edição do gene-alvo por união final não homóloga (NHEJ) e perda da expressão do gene correspondente.

FORMAÇÃO DE COLÔNIA

[0395] As células positivas para proteínas fluorescentes foram parcialmente amostradas e usadas para extração de DNA e testes de edição de genoma (GE) e parcialmente plaqueadas em alta diluição em meio líquido para permitir a formação de colônias por 28 a 35 dias. As colônias foram colhidas, cultivadas e divididas em duas alíquotas. Uma alíquota foi usada para testes de extração de DNA e edição de genoma (GE) e testes livres de DNA CRISPR (consultar abaixo), enquanto as outras foram mantidas em cultura até que sua situação fosse verificada. Somente aquelas que claramente se mostraram livres de DNA de GE e CRISPR foram selecionadas adiante.

[0396] Após 20 dias no escuro (da divisão para análise GE, isto é, 60 dias, portanto, 80 dias no total), as colônias foram transferidas para o mesmo meio, mas

com glicose reduzida (0,46 M) e agarose a 0,4% e incubadas em baixa intensidade de luz. Após seis semanas, a agarose foi cortada em fatias e colocada em meio de cultura de protoplastos com glicose 0,31 M e gelrita 0,2%. Após um mês, as protocônias (ou calos) foram subcultivadas em meio de regeneração (meia força MS + vitaminas B5, 20 g/l de sacarose). As plântulas regeneradas foram colocadas em meios solidificados (0,8 % de ágar) a uma baixa intensidade de luz a 28 °C. Após 2 meses, as plântulas foram transferidas para o solo e colocadas em uma estufa a 80 a 100% de umidade.

TRIAGEM PARA MODIFICAÇÃO GENÉTICA E AUSÊNCIA DE DNA DO SISTEMA CRISPR

[0397] De cada colônia, o DNA foi extraído de uma alíquota de protoplastos classificados por GFP (etapa opcional) e de colônias derivadas de protoplastos e uma reação de PCR foi realizada com iniciadores que flanqueiam o gene-alvo. Medidas são tomadas para amostrar a colônia, visto que colônias positivas serão usadas para regenerar a planta. Uma reação de controle de protoplastos submetidos ao mesmo método, mas sem Cas9-sgRNA é incluída e considerada como tipo selvagem (WT). Os produtos de PCR foram então separados em um gel de agarose para detectar quaisquer alterações no tamanho do produto em comparação com o WT. Os produtos da reação de PCR que variam dos produtos WT foram clonados em pBLUNT ou PCR-TOPO (Invitrogen). Como alternativa, o sequenciamento foi usado para verificar o evento de edição. As colônias resultantes foram colhidas, os plasmídeos foram isolados e sequenciados para determinar a natureza das mutações. Os clones (colônias ou calos), portando, mutações que foram previstas que resultassem em alteração de domínio ou perda completa da proteína correspondente, foram escolhidos para o sequenciamento de genoma inteiro, a fim de validar que estavam livres do DNA/RNA do sistema CRISPR e para detectar as mutações no nível do DNA genômico.

[0398] Os clones positivos exibindo o GE desejado foram testados primeiro quanto à expressão de GFP por análise de microscopia (em comparação com WT). Em

seguida, foram testados os grupos negativos para GFP quanto à presença do cassete Cas9 por PCR, com o uso de iniciadores específicos (ou sequenciamento de nova geração, NGS) para a sequência Cas9 ou qualquer outra sequência do cassete de expressão. Outras regiões do construto também podem ser testadas para garantir que nada do construto original esteja no genoma.

REGENERAÇÃO DE PLANTAS

[0399] Produção de etileno: A biossíntese de etileno pode ser medida em plântulas pequenas através de cromatografia gasosa (GC) ou ensaios baseados em laser (Cristescu et al., 2013, Supra).

EXEMPLO 2:

EDIÇÃO DE GENOMA EM GENES DE ACS E ACO DE BANANA E REGENERAÇÃO DE PLANTA

TABELA 1 LISTA DE INICIADORES

ID	Sequência/SEQ ID NO:
42	Atgaggatctacggcgaggagcac/55
44	Atggggctccacgttgatgaacac/56
46	Atggggattcccggtgacgag/57
50	Atggcgtgctccttcccgg/58
236	Gtggcactgaataggaggagttg/59
237	Cgatcggctcatcctcaaacag/60
239	Gagtttcgagccttctgtaagca/61
240	Cctgaagtctcgatcgaatctgg/62
242	Gtggcagcgaataggaggagctg/63
243	Gaacggggaagtgacgacgcaattac/64
245	Gaggcgatcgacatcctgttgcc/65
246	Ctctatctgatctccgaggttgacc/66

ID	Sequência/SEQ ID NO:
249	Ggtgcaccacgctctgtac/67
250	Atggattccttccggttatcgacatg/68
251	Ctcgagctggcgccgag/69
277	Accgaagcccctttaaccc/70
278	Gtatggctgacaccatcacc/71
321	Ggggtcatccaaatgggacttg/72
322	Ggctatatataagtagcaacg/73
323	Acactccagatagaaagcac/74

[0400] sgRNAs e sequências-alvo são descritos na Figura 26.

[0401] Um protocolo robusto para o isolamento eficaz de protoplastos de células de *Musa acuminata* foi seguido de acordo com o Exemplo 1 acima, para transfectar subsequentemente os mesmos com plasmídeos que portam o mecanismo de CRISPR/Cas9 para alvejar os genes de interesse (genes de ACS e ACO endógenos) e enriquecer células que expressam um repórter cm o uso de classificação de FACS. Para atingir esse objetivo, os presentes inventores (i) geraram e mantiveram material embriogênico; (ii) protoplasos isolados desse material; (iii) transfectaram com plasmídeos específicos que alvejam genes de ACS e/ou ACO; (iv) enriqueceram células que expressam um marcador fluorescente como um substituto para células (por exemplo, mCherry) que portam o complexo de CRISPR/Cas9 e sgRNAs que alvejam o gene de interesse; e (v) avançaram os protoplastos classificados através de uma cadeia de regeneração de protoplasto para regenerar plântulas.

[0402] Para testar se protoplastos viáveis de material de planta de *Musa acuminata* poderiam ser recuperados, o material de planta de banana (suspensões de células) foi incubado em uma solução de digestão por 4 a 24 h à temperatura ambiente com agitação suave. Após a digestão, o material vegetal foi lavado, filtrado e

ressuspenso em 2 ml de tampão MMG (manitol 0,4 M, MagCl₂ 15 mM, MES 4 mM pH 5,6)). A concentração de protoplasto foi determinada e ajustada em 1×10^6 . Em seguida, o plasmídeo de DNA pAC2010 (que porta mCherry como marcador fluorescente) foi incubado com os protoplastos derivados de banana na presença de polietileno glicol (PEG). A expressão de mCherry nos protoplastos foi detectada por microscopia de fluorescência 3 dias após a transfecção (Figura 3).

[0403] A etapa seguinte na recuperação de plantas com edição de gene foi entregar o complexo de CRISPR/Cas9 e sgRNAs que alvejam genes de interesse em protoplastos de banana e enriquecer para células que portam tal complexo por classificação de células ativadas por fluorescência (FACS), separando, assim, células de banana transfectadas com sucesso que expressam temporariamente a proteína fluorescente, Cas9 e o sgRNA. Com o uso de FACS, protoplastos que expressam mCherry positivo foram enriquecidos e coletados (Figura 4A). Foi confirmado que os protoplastos classificados estavam ainda intactos e, de fato, expressaram o marcador fluorescente por microscopia de fluorescência (Figura 4B).

[0404] A natureza temporária da transfecção do complexo de CRISPR/Cas9 e sgRNAs que alvejam genes de interesse em protoplastos de *Musa acuminata* foi examinada em seguida. Visto que todos os presentes plasmídeos consistiram em um marcador fluorescente (por exemplo, dsRed, mCherry), Cas9 e sgRNAs (sob um promotor de U6 e alvejamento de um gene endógeno de interesse), a expressão do marcador fluorescente em protoplastos de banana transfectados foi acompanhada ao longo do tempo e o número de protoplastos positivos para mCherry foi usado como um substituto para obter uma indicação de por quanto tempo o complexo de CRISPR/Cas9 e sgRNAs podem ser expressos (Figuras 5A a C). FACS foi usado para quantificar a porcentagem de protoplastos de banana positivos para mCherry ao longo do tempo e definir o número total de protoplastos de banana positivos para mCherry em 3 dias após a transfecção (dpt) como 100%. Foi constatado que, já em 10 dpt, protoplastos de banana positivos para mCherry diminuíram em 30% do número inicial de protoplastos de banana positivos para mCherry e em 25 dpt quase 80% de

protoplastos de banana transfetados não mostraram qualquer fluorescência (Figura 5C). A expressão de mCherry foi também monitorada em protoplastos de banana não classificados por microscopia em 3 dpt (Figura 5A; Figura 6A), 6 dpt (Figura 6A) e 10 dpt (Figura 5B; Figura 6A), o que confirmou que, de fato, a expressão de mCherry diminui ao longo do tempo. Além disso, a microscopia de fluorescência de protoplastos de banana classificados mostra a redução progressiva no número e intensidade de protoplastos positivos para mCherry (Figura 6B) conforme visto por FACS (Figura 4A). Considerados em conjunto, esses resultados indicam que a expressão de vetores que portam o complexo de CRISPR/Cas9 e sgRNAs é temporária e nenhuma atividade de Cas9 adicional ou integração no genoma da planta é esperada.

[0405] Para reduzir os níveis de etileno em plantas de banana, o que pode resultar em meia-vida estendida de frutos de banana, foi tentado knockout de genes envolvido na biossíntese de etileno, incluindo a ACS e a ACO destacadas (Figura 7A, 7B). Entretanto, o genoma de banana contém múltiplas sequências que são homólogas a esses genes.

[0406] A fim de identificar os genes dentro do genoma de banana, que codificam sequências homólogas de ACS e ACO funcionais, sequências homólogas de vias caracterizadas em modelo ou espécies de cultura foram identificadas. O processo envolve uma série de etapas sequenciais para análise comparativa de sequências de DNA e proteína que visam reconstruir o histórico evolucionário de genes através de análise filogenética, filtrar candidatos validando sua expressão em tecido geral e alvo e sequenciamento de genes candidatos para assegurar o projeto de sgRNA adequado (para evitar pareamentos errados). Esse procedimento permitir a seleção de genes, a identificação de regiões alvo otimizadas para knockout (domínios conservados e potencialmente catalíticos) e o projeto de sgRNAs adequados.

[0407] Essa cadeia é baseada na suposição de que proteínas homólogas com um ancestral comum podem ter uma função similar e, realizando-se uma reconstrução filogenética, famílias de genes são estabelecidas e avaliadas quanto à diversidade funcional no contexto evolucionário. Isso é particularmente importante para espécies

de planta que sofreram duplicações de genoma de grande escala e para famílias de genes expandidas. No entanto, os parálogos dentro de uma família do gene não têm necessariamente a mesma função e parte do processo é alvejar uma seleção de genes dentro de uma família individualmente ou como um grupo para também considerar a redundância.

[0408] Brevemente, a síntese de etileno envolve uma reação em três etapas: a enzima S-adenosil-metionina sintase (S-AdoMet) catalisa a adenosilação de metionina. Então, S-AdoMet é metabolizado no primeiro composto comprometido com a biossíntese de etileno ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela enzima ACC sintase (ACS). Finalmente, ACC é convertido em etileno pela enzima ACC oxidase (ACO) (Figura 7A) (Cara e Giovannoni. 2008. Plant Science. Volume 175. Páginas 106 a 113). Durante o amadurecimento, em frutos climactéricos como banana, tanto ACC sintase (ACS) quanto ACC oxidase (ACO) são induzidas e contribuem para a regulação de biossíntese de etileno (Figura 7B) (Liu et al., 1999. Plant Physiology. Volume 121, páginas 1.257 a 1.265). A regulação de etileno foi proposta como um processo de dois sistemas em que o sistema 1 é funcional durante crescimento vegetativo normal e o etileno tem um papel autoinibidor e é responsável por produzir níveis de etileno basais que são detectados em todos os tecidos, incluindo aqueles de frutos não climactéricos enquanto o Sistema 2 funciona durante o amadurecimento de frutos climactéricos e pode ser senescência (Figuras 7A e B). No estágio de transição, reguladores de amadurecimento, tal como RIN, CNR etc., e também a indução de gene de ACS específico (*LeACS4*) que leva à autocatálise de etileno, que resulta em retroalimentação negativa no sistema 1. Adicionalmente, outros genes de ACS e ACO (*LeACS2*, 4 e *LeACO1*, 4) são induzidos e são responsáveis pela alta produção de etileno através do sistema 2 (Figura 7A) (Cara e Giovannoni. 2008. Plant Science. Volume 175. Páginas 106 a 113).

[0409] A análise de sequências de genoma inteiro de *Musa acuminata* revelou duplicações de genoma inteiro ancestral específicas (WGD) na linhagem de *Musa* e seu impacto sobre o fracionamento de gene (D'Hont et al., 2012. Nature. Volume 488;

Martin et al., 2016. BMC Genomics. 17:243). Além disso, foi relatado que algumas famílias de genes de banana envolvidas na biossíntese de etileno e sinalização envolvida através de WGD foram, de preferência, mantidas (Jourda et al., 2014. New Phytologist. Volume 202. Páginas 986 a 1.000). De modo interessante, os principais genes na via de etileno são expandidos e os perfis de expressão de genes sugeriram redundância funcional para diversos desses genes derivados de WGD (Jourda et al., 2014. New Phytologist. Volume 202. Páginas 986 a 1.000). Portanto, a seleção de genes candidatos exige avaliação cuidadosa.

[0410] A via de biossíntese de etileno foi bem estudada em tomate e genes de ACS e ACO envolvidos nas etapas ao longo do sistema 1 e 2 foram caracterizados. Esses genes caracterizados foram usados como sequências de consulta e estão destacados na Figura 9 e na Figura 10 para ACS e ACO, respectivamente. Buscas de similaridade confirmaram que ambas as famílias de ACS e ACO estão na banana (Figuras 8, Figura 9, respectivamente) e diversos candidatos de gene de ACS e ACO foram selecionados para estudos adicionais. O sequenciamento desses candidatos em variedades de banana distintas permitiu o projeto e a seleção específicos de sgRNAs conforme mostrado na Figura 10. Adicionalmente, para obter alguma compreensão sobre os possíveis papéis desses genes, os dados de expressão publicamente disponíveis de frutos de banana em amadurecimento foram recuperados para todos os genes candidatos de ACS e ACO (ACS: Ma09_g19150; Ma04_g35640; Ma04_g31490. ACO: Ma01_g11540; Ma07_g19730) (Figura 11 e Figura 12, respectivamente). Os dados de RPKM de cada gene do banco de dados de transcriptoma de banana indicam que ACS Ma04_g35640 e ACO Ma07_g19730 são os genes candidatos para alvejar e reduzir a biossíntese de etileno (Figura 11 e Figura 12, respectivamente). As modalidades da invenção também contemplam alvejar outros genes de ACO e/ou ACS para obter um fenótipo robusto.

[0411] Os genes de ACO (Ma09_g19150; Ma04_g35640; Ma04_g31490) foram alvejados com dois pares de sgRNAs conforme indicado na Figura 13A, Figura 14A e na Figura 15A. Os sgRNAs estão posicionados entre o éxon 1 e o éxon 3 dos genes

candidatos e essas regiões foram selecionadas devido ao fato de que estão altamente conservadas entre todos os 3 genes candidatos. Similarmente, os genes de ACO (Ma01_g11540; Ma07_g19730) foram alvejados com dois pares de sgRNAs conforme indicado na Figura 6A e na Figura 17A. Os sgRNAs estão posicionados entre o éxon 1 e o éxon 4 dos genes candidatos e são especificamente projetados para cada gene, mas combinados no plasmídeo de transfecção. Os sgRNAs foram clonados em plasmídeos de transfecção que continham mCherry, Cas 9 e dois sgRNAs acionados por um promotor de U6 pol 3.

[0412] Em seguida, o complexo de CRISPR/Cas9 e sgRNAs que alvejam genes candidatos de ACS e ACO foi transfectado em protoplastos de banana e enriquecidos para células que portal tal complexo por classificação de células ativadas por fluorescência (FACS). Com o uso do marcador mCherry, as células de banana transfectadas que expressam temporariamente a proteína fluorescente, Cas9 e o sgRNA foram separadas, classificadas e tiveram coletados os protoplastos de banana positivos para mCherry 3 dias após a transfecção (dpt). O DNA foi extraído de 5.000 protoplastos classificados (kit de extração Qiagen Plant Dneasy) a 6 dpt. A PCR Nested foi realizada para aumentar a sensibilidade usando os iniciadores mostrados nas Figuras 13A, 14A, 15A, 16A, 17A. Os géis de agarose da região amplificada para todos os genes de ACS e ACO candidatos são mostrados nas Figuras 13B, 14B, 15B, 16B, 17B. Apenas para o gene de ACO Ma01_g11540, uma deleção clara é observada de cerca de 350 bp (Figura 17B).

[0413] Para avaliar se os sgRNAs e o complexo de CRISPR/Cas9 estava ativo e induziu eventos de edição de genoma em todos os outros genes de ACS e ACO, um ensaio de T7E1 foi realizado. Foi constatado que todas as combinações de sgRNA induziram eventos de edição de genoma em todos os genes de ACS e ACO (ACS: Ma09_g19150; Ma04_g35640; Ma04_g31490. ACO: Ma01_g11540; Ma07_g19730) Figuras 13C, 14C, 15C, 16C, 17C. Além disso, a clonagem e o sequenciamento confirmaram os resultados de T7E1 para alguns dos genes e foi constatado que alguns dos sgRNAs usados de fato induziram indels conforme mostrado nas Figuras

13D, 15D, 18, 19, 20A, 20B. Em conclusão, esses resultados demonstram que o sistema de CRISPR/Cas9 pode ser usado com sucesso para introduzir mutações precisas nos genes de ACS e ACO endógenos e que o projeto e a seleção de sgRNAs impactam a eficiência de edição de genoma.

[0414] Em paralelo, protoplastos positivos para mCherry classificados adicionais foram avançados na regeneração de protoplastos. Brevemente, protoplastos classificados foram colocados em placas em alta diluição em meio líquido para permitir a formação de colônias por 28 a 35 dias. As colônias foram colhidas, cultivadas e divididas em duas alíquotas. Uma alíquota foi usada para testes de extração de DNA e edição de genoma (GE) e testes livres de DNA CRISPR, enquanto as outras foram mantidas em cultura até a verificação da situação. Somente aquelas que claramente se mostraram livres de DNA de GE e CRISPR foram selecionadas adiante.

[0415] Após 20 dias no escuro (da divisão para análise GE, isto é, 60 dias, portanto, 80 dias no total), as colônias foram transferidas para o mesmo meio, mas com glicose reduzida (0,46 M) e agarose a 0,4% e incubadas em baixa intensidade de luz. Após seis semanas, a agarose foi cortada em fatias e colocada em meio de cultura de protoplastos com glicose 0,31 M e gelrita 0,2%. Após um mês, as protocolônias (ou calos) foram subcultivadas em meio de regeneração (meia força MS + vitaminas B5, 20 g/l de sacarose). (Figura 23A a E). Em seguida, os embriões maduros foram passados ao meio de germinação (GM) contendo sais de MS e vitaminas, onde os embriões começaram a germinar 1 a 2 semanas após a transferência. 3 a 4 semanas depois, os embriões em germinação estão prontos para serem transferidos para o meio de proliferação para alongamento de broto (Figura 24A a D).

[0416] Adicionalmente, a suspensão de células embriogênicas de banana (ECS) foram bombardeadas com os mesmos plasmídeos usados para transfecção (pAC2007, pAC2008, pAC2010, pAC2011 e pAC2012) para estender a meia-vida. ECS com três dias de vida após o bombardeio das células foram movidas para o meio de proliferação e conforme os embriões se desenvolveram a partir das ECS

bombardeadas, os embriões foram passados para o meio de desenvolvimento de embrião (EDM) e o meio de maturação (Figura 25A a E).

[0417] Embora a invenção tenha sido descrita em conjunto com modalidades específicas da mesma, é evidente que muitas alternativas, modificações e variações serão percebidas por aqueles versados na técnica. Desse modo, todas as alternativas, modificações e variações que estão dentro do espírito e amplo escopo das reivindicações anexas são abrangidas pela presente invenção.

[0418] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente mencionados no presente documento são incorporados em sua totalidade a título de referência no relatório descritivo igualmente a se cada publicação, patente ou pedido de patente individual foi indicado específica e individualmente para ser incorporado no presente documento a título de referência. Além disso, a citação ou identificação de qualquer referência no presente pedido não deve ser interpretada como uma admissão de que tal referência está disponível na técnica à presente invenção. Até o ponto em que os cabeçalhos de seção são usados, os mesmos não devem ser interpretados como necessariamente limitantes.

REIVINDICAÇÕES

1. Planta de banana **caracterizada por** compreender um genoma que compreende uma perda de mutação de função em uma sequência de ácido nucleico que codifica um componente em uma via de biossíntese de etileno da banana.

2. Método para aumentar a meia-vida de banana, sendo que o método é **caracterizado por** compreender:

(a) submeter uma célula vegetal de banana a um agente de edição de DNA direcionado a uma sequência de ácido nucleico que codifica um componente em uma via de biossíntese de etileno da banana para resultar em uma perda de mutação de função na dita sequência de ácido nucleico que codifica a dita via de biossíntese de etileno e

(b) regenerar uma planta da dita célula vegetal.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado por** compreender adicionalmente a colheita do fruto da dita planta.

4. Planta ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, **caracterizado por** a planta ser desprovida de um transgene que codifica o agente de edição de DNA.

5. Planta ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado por** a dita mutação estar em uma forma homozigota.

6. Planta, de acordo com a reivindicação 1, 4 ou 5, ou ancestral da mesma **caracterizada por** ter sido tratada com um agente de edição de DNA direcionado à dita sequência genômica que codifica o dito componente na dita via de biossíntese de etileno.

7. Planta ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado por** a dita mutação ser selecionada a partir do grupo que consiste numa deleção, uma inserção, uma inserção/deleção (Indel) e uma substituição.

8. Planta ou método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado por** o dito componente na dita via de biossíntese de etileno ser selecionado a partir do grupo que consiste em 1-aminociclopropano-1-carboxilato

sintase (ACS) e ACC oxidase (ACO)

9. Construto de ácido nucleico **caracterizado por** compreender uma sequência de ácido nucleico que codifica um agente de edição de DNA direcionado a uma sequência de ácido nucleico que codifica um componente em uma via de biossíntese de etileno de uma banana ligado de modo operacional a um promotor vegetal.

10. Planta, método ou construto de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 8, **caracterizado por** o dito agente de edição de DNA ser de um sistema de edição de DNA selecionado a partir do grupo que consiste em meganucleases, nucleases de dedo de Zinco (ZFNs), nucleases efetoras do tipo ativador de transcrição (TALENs) e CRISPR-Cas.

11. Planta, método ou construto de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 8, **caracterizado por** o dito agente de edição de DNA ser de um sistema de edição de DNA que compreende CRISPR-Cas.

12. Planta, método ou construto de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado por** o dito componente na dita via de biossíntese de etileno ser selecionado a partir do grupo que consiste em Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9) e Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

13. Planta, método ou construto de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado por** o dito componente na dita via de biossíntese de etileno ser selecionado a partir do grupo que consiste em Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9), Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8), Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20) e Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

14. Planta, método ou construto de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado por** o dito componente na dita via de biossíntese de etileno ser selecionado a partir do grupo que consiste em Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9) e Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27).

15. Planta, método ou construto de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado por** o dito componente na

dita via de biossíntese de etileno ser selecionado a partir do grupo que consiste em Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g31490 (SEQ ID NO: 8) e Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20).

16. Planta, método ou construto de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado por** o dito agente de edição de DNA ser direcionado em coordenadas de ácido nucleico que alvejam especificamente mais do que uma sequência de ácido nucleico que codifica o dito componente na dita via de biossíntese de etileno.

17. Planta, método ou construto de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado por** o dito agente de edição de DNA compreender uma sequência de ácido nucleico pelo menos 99% idêntica a uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste na SEQ ID NO: 47-54.

18. Planta, método ou construto de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado por** o dito agente de edição de DNA compreender uma sequência de ácido nucleico pelo menos 99% idêntica a uma sequência de ácido nucleico estabelecida na SEQ ID NO: 47.

19. Planta, método ou construto de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado por** o dito agente de edição de DNA compreender um ácido nucleico estabelecido na SEQ ID NO: 47.

20. Planta, método ou construto de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado por** o dito agente de edição de DNA compreender uma pluralidade de sequências de ácido nucleico estabelecidas na SEQ ID NO: 47-54.

21. Planta, método ou construto de ácido nucleico, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado por** o dito agente de edição de DNA compreender uma pluralidade de sequências de ácido nucleico estabelecidas na SEQ ID NO: 47, 49 ou 50.

22. Planta, método ou construto de ácido nucleico, de acordo com

qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado por** o dito agente de edição de DNA compreender uma pluralidade de sequências de ácido nucleico estabelecidas na SEQ ID NO: 51 e 53.

23. Parte de planta **caracterizada por** ser da planta, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 4 a 8, 10 a 11.

24. Parte de planta, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizada por** ser um fruto.

25. Fruto, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado por** ser seco.

26. Método para produzir banana, sendo que o método é **caracterizado por** compreender:

(a) cultivar a planta de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 4 a 8 e 10 a 11; e

(b) colher o fruto da planta.

27. Produto de banana processado **caracterizado por** compreender DNA de banana genômico que compreende uma perda de mutação de função em uma sequência de ácido nucleico que codifica um componente em uma via de biossíntese de etileno da banana.

28. Planta ou método ou produtos processados, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8 e 10 a 27, **caracterizado por** a planta de banana ser não transgênica.

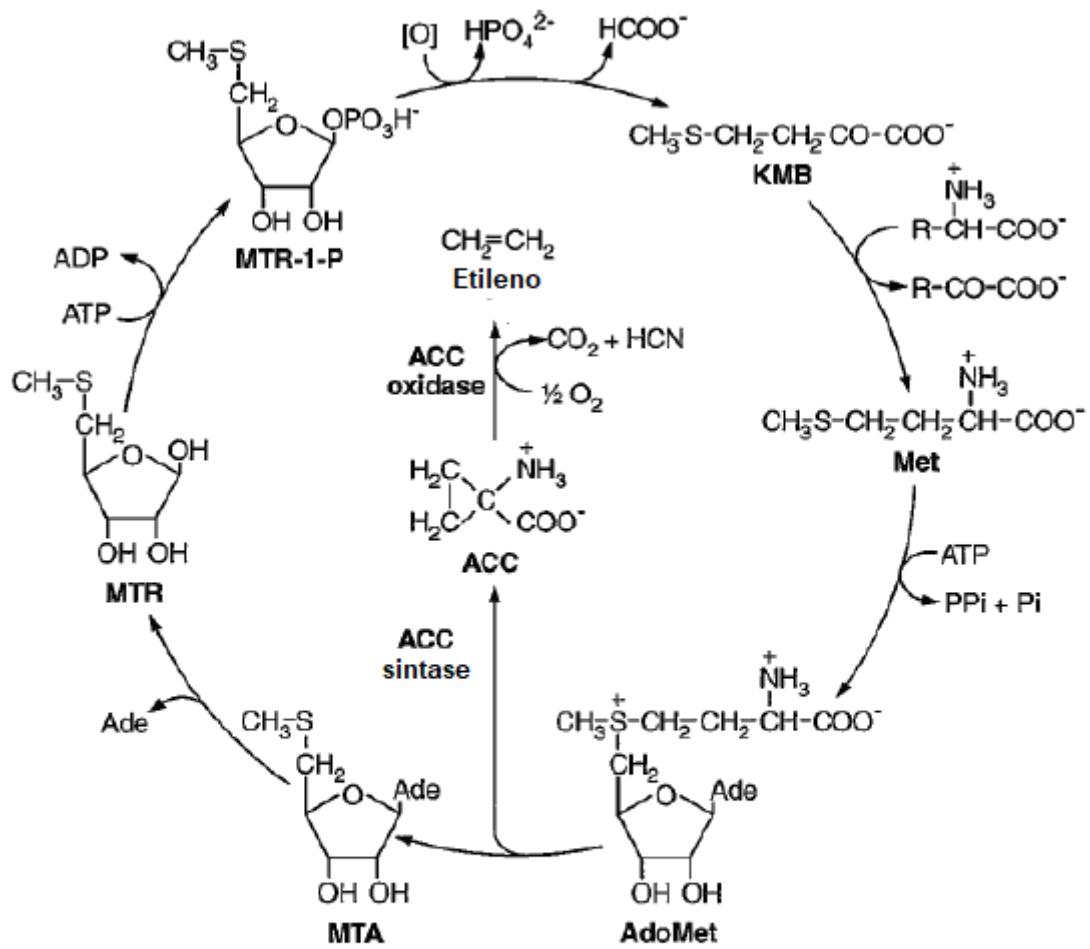


Fig. 1

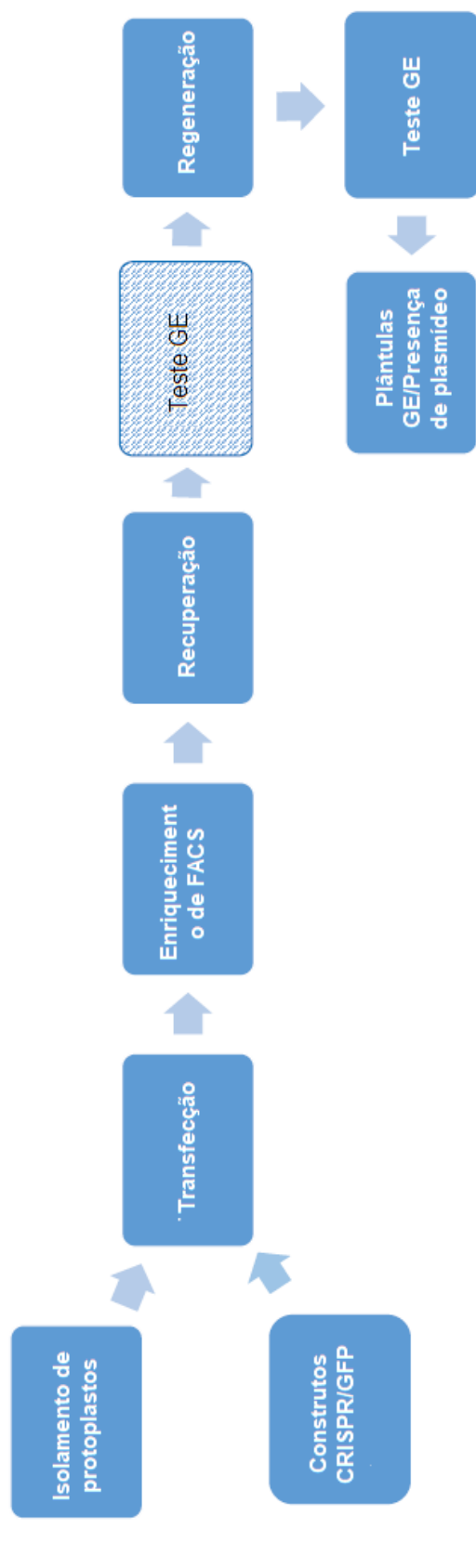


Fig. 2

 Etapa opcional

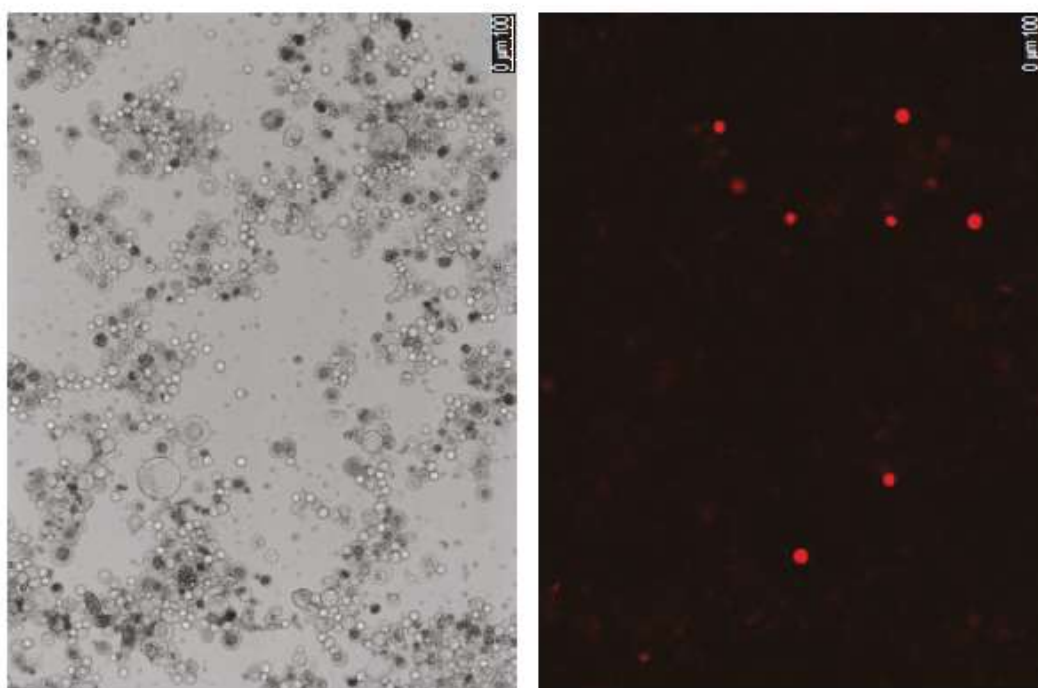
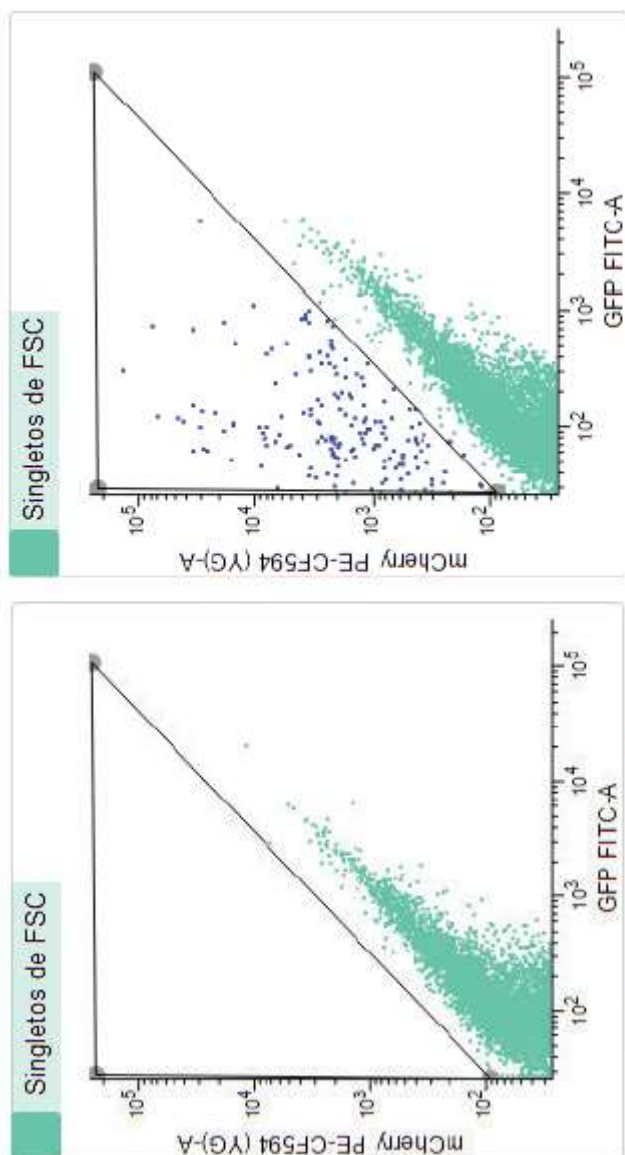


Fig. 3



Protoplastos mCherry positivos
são coletados (em azul)

Fig. 4A

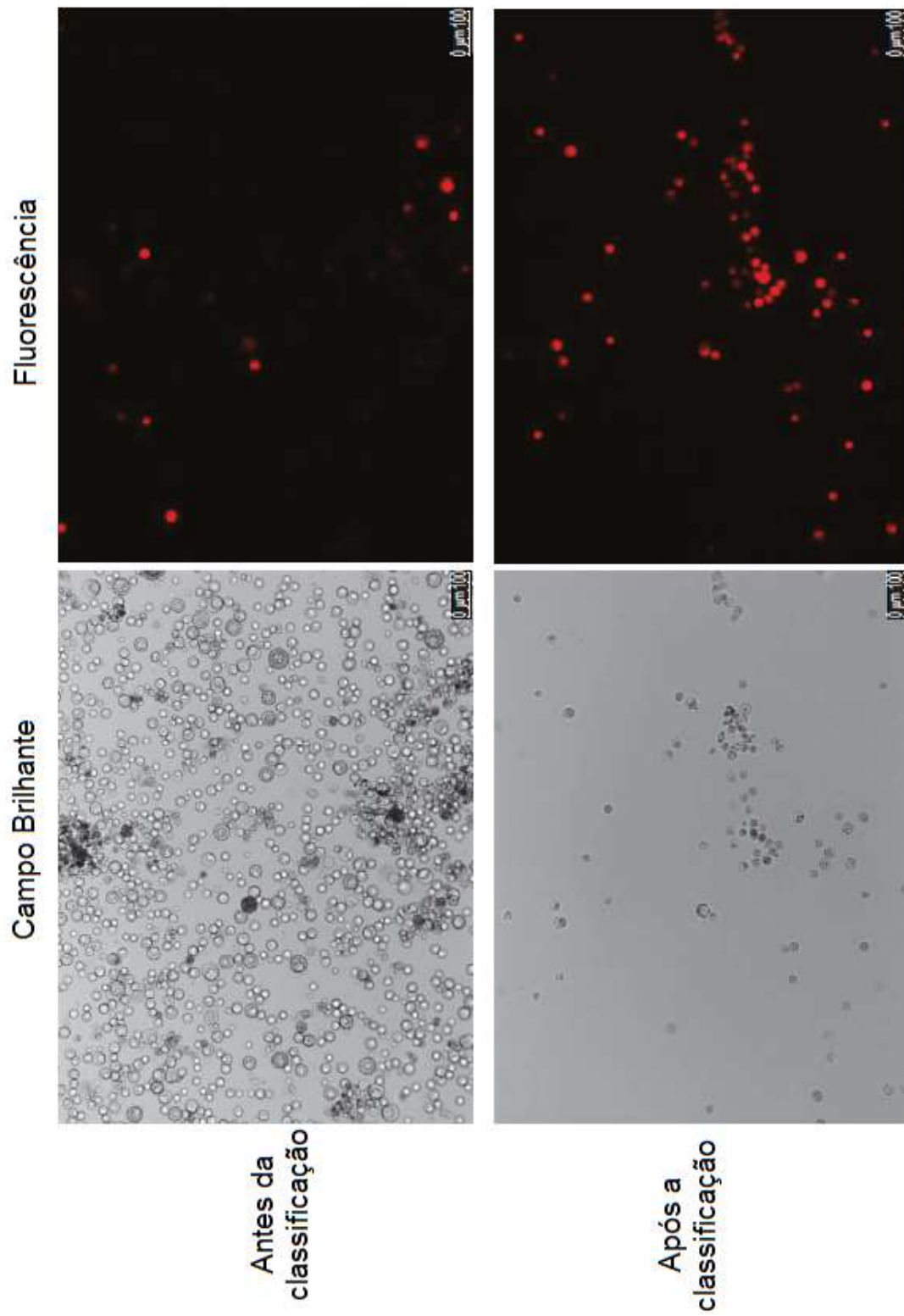


Fig. 4B

Fig. 5A

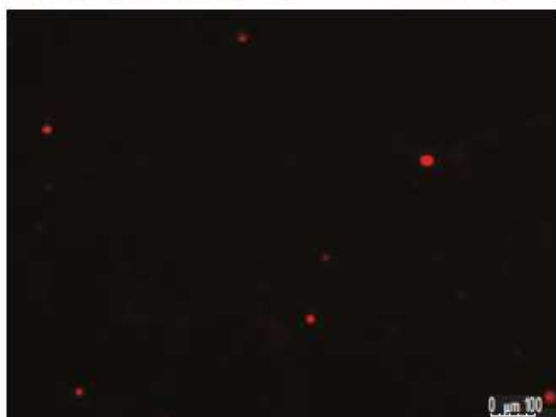
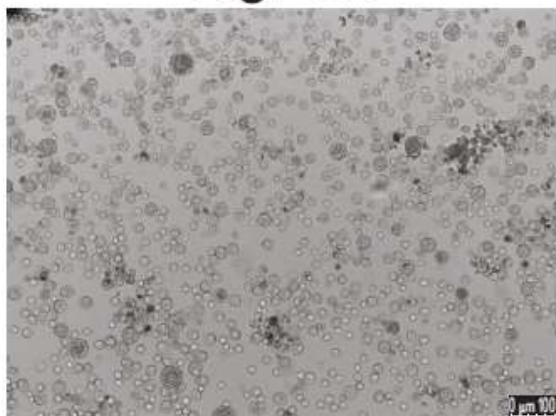
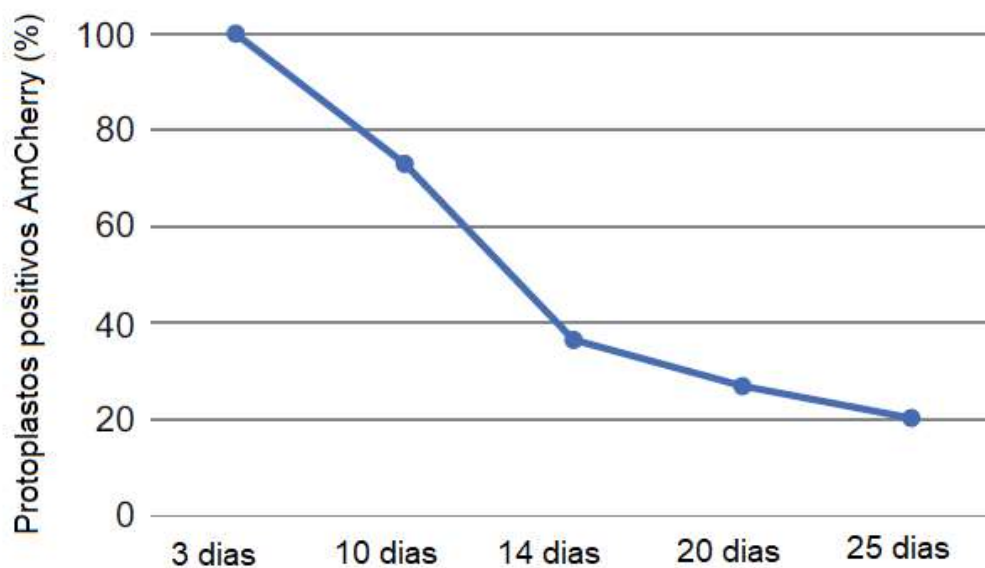


Fig. 5B



Fig. 5C



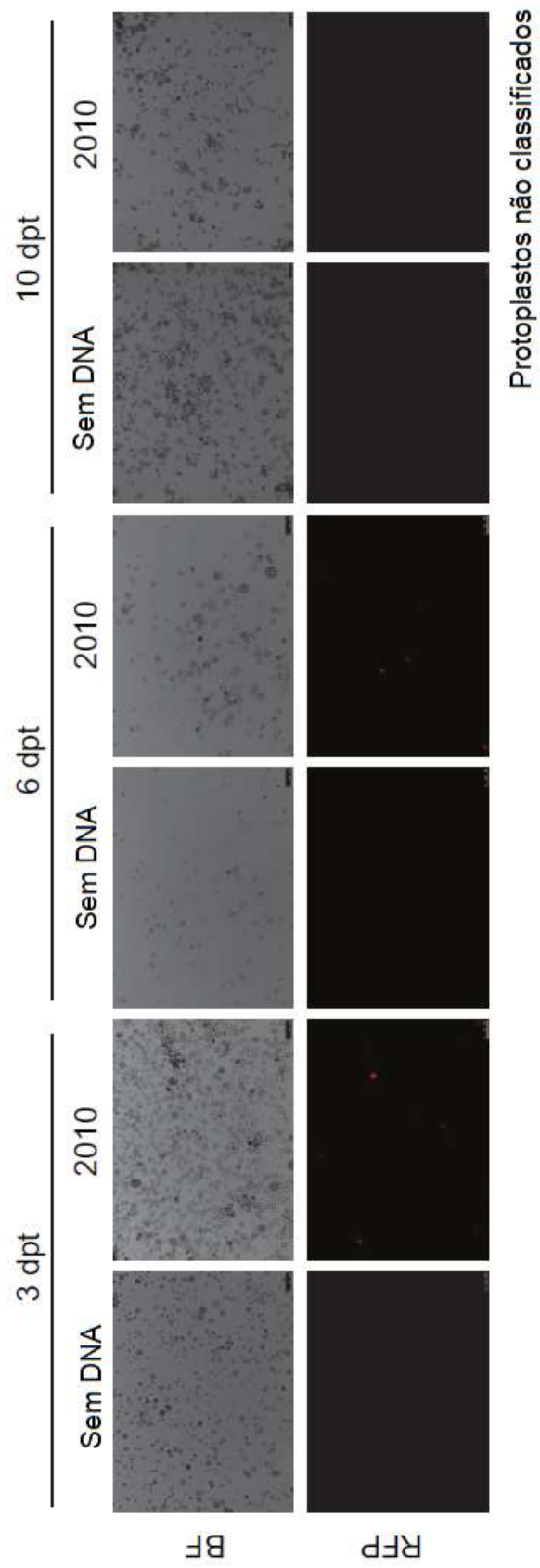


Fig. 6A

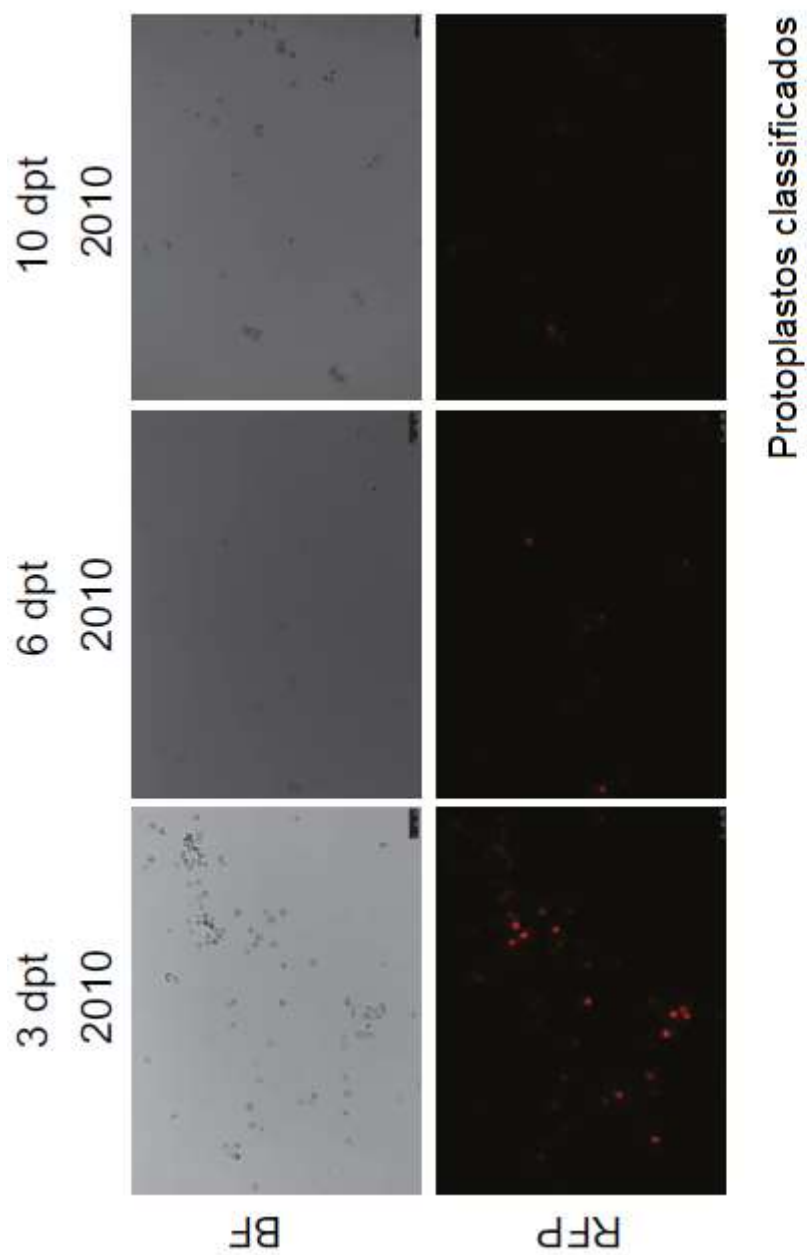
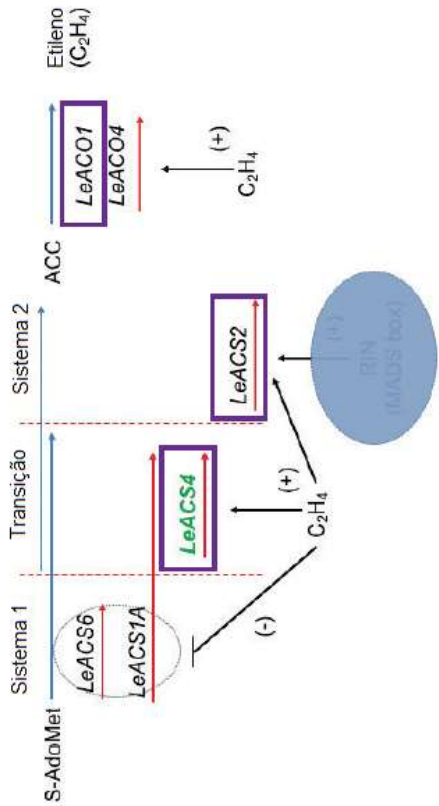


Fig. 6B

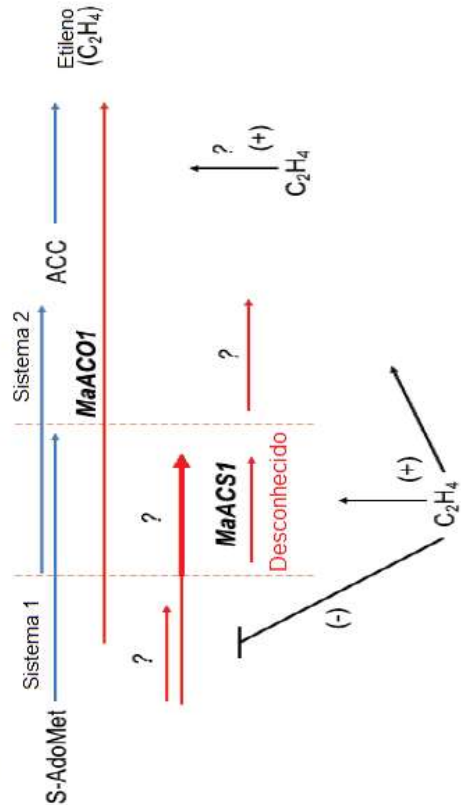
Fig. 7A



Papel principal na fase de transição

Tomate: *Solanum lycopersicum*
Anteriormente: *Lycopersicon esculentum*

Fig. 7B

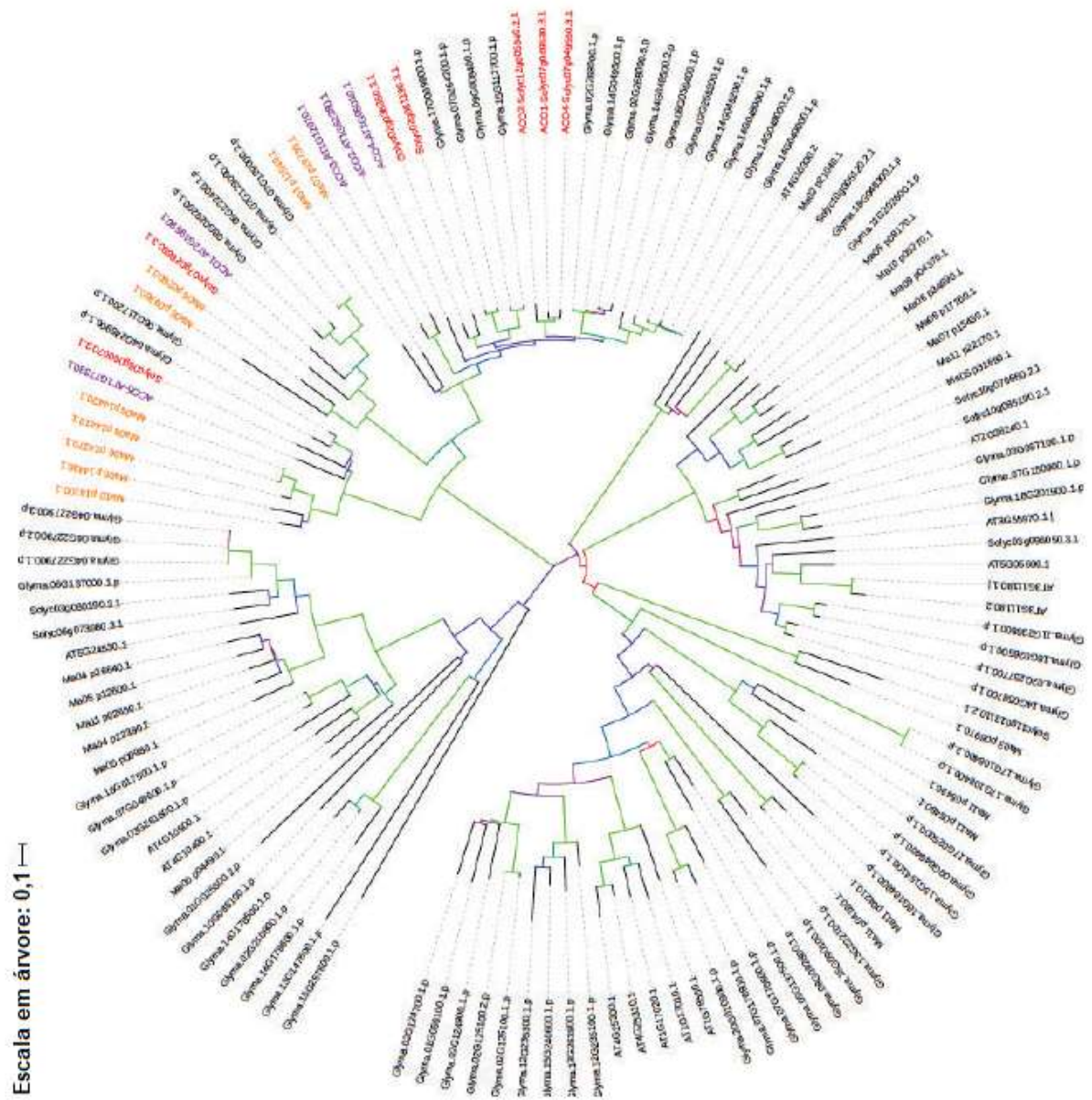


Banana: *Musa acuminata*

Fig. 8



Fig. 9



```

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
ATGAGGATCTACGGCGAGGACCCAAATCAGCAGATCTCTCTCGGATCGCGACCAACGACGGCATGGCGGAGAACTCCTCTACTTCTATGGGTGGA
TACTCTAGATCCCGCTCCTCGTGGTTTAGTCGTCTAGCAGAGAGAGCTTACCGCGATTCTCTCGGTACCGCTCTTGAGGAGCATGAAGTACCAACCT
M R I Y G E E H P N Q I L S R I A T N D G H G E N S S Y F D G W>
TRANSLATION OF CS219_MA04G_35640-EXON 1-3-ONLY-NUCL (A)
>Ma-35640-Exon_{Split}
>_{Split}
>_{Split}

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
AGGCTACGAGAAGGATCCTTTCCACCTCACCGACAAACCCACCGGGGTGATCCCAATGGGACTCGCAGAAACAGCTTTCCCTCGACTGATCCGAGA
TCCGATGCTCTTCTTAGGAAAGGTGGGTGGCTGTGGGTGCTTCCAGAGTCTCAAGTTTCGTTAACGGTTGAAAGTCTGATAGTACCGGAGGTGG
K A Y E K D P F H L T D N P T G V I Q M G L A E N Q L S L D L I R D>
TRANSLATION OF CS219_MA04G_35640-EXON 1-3-ONLY-NUCL (A)
>Ma-35640
>_{Split}
>_{Split}

<C9R_EF00281992_{Split}
310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
TTCCGAAAGCCATCGCCCTTTTGCTGGCTGATCTGGCGAGGCGCTTCTTGATTCCAAACGCCATATTATCCGGG
AAGGCTTTCGGTAGCGGGTCAAGTACCTTCCACTTCCCTCTGCTCGGTCTAACTGGGTCTGGCTTAGCACTATCTGCTCCTGTTGGTGGCCACGAG
F R K A I A Q F M E K V R G R A R F D P D R I V M S G G A T G A>
TRANSLATION OF CS219_MA04G_35640-EXON 1-3-ONLY-NUCL (A)
<_{Split}

410 420 430 440 450 460 470
AGGAAACCATCGCCCTTTTGCTGGCTGATCTGGCGAGGCGCTTCTTGATTCCAAACGCCATATTATCCGGG
TCTTTGGTAGCGGAAACGGACCGACTAGGACCGCTCCGGAAGAACTAAGTTGGGTATATAGGCCCC
Q E T I A F C L A D P G E A F L I P T P Y P>
TRANSLATION OF CS219_MA04G_35640-EXON 1-3-ONLY-NUCL (A)

```

Fig. 10

ACS

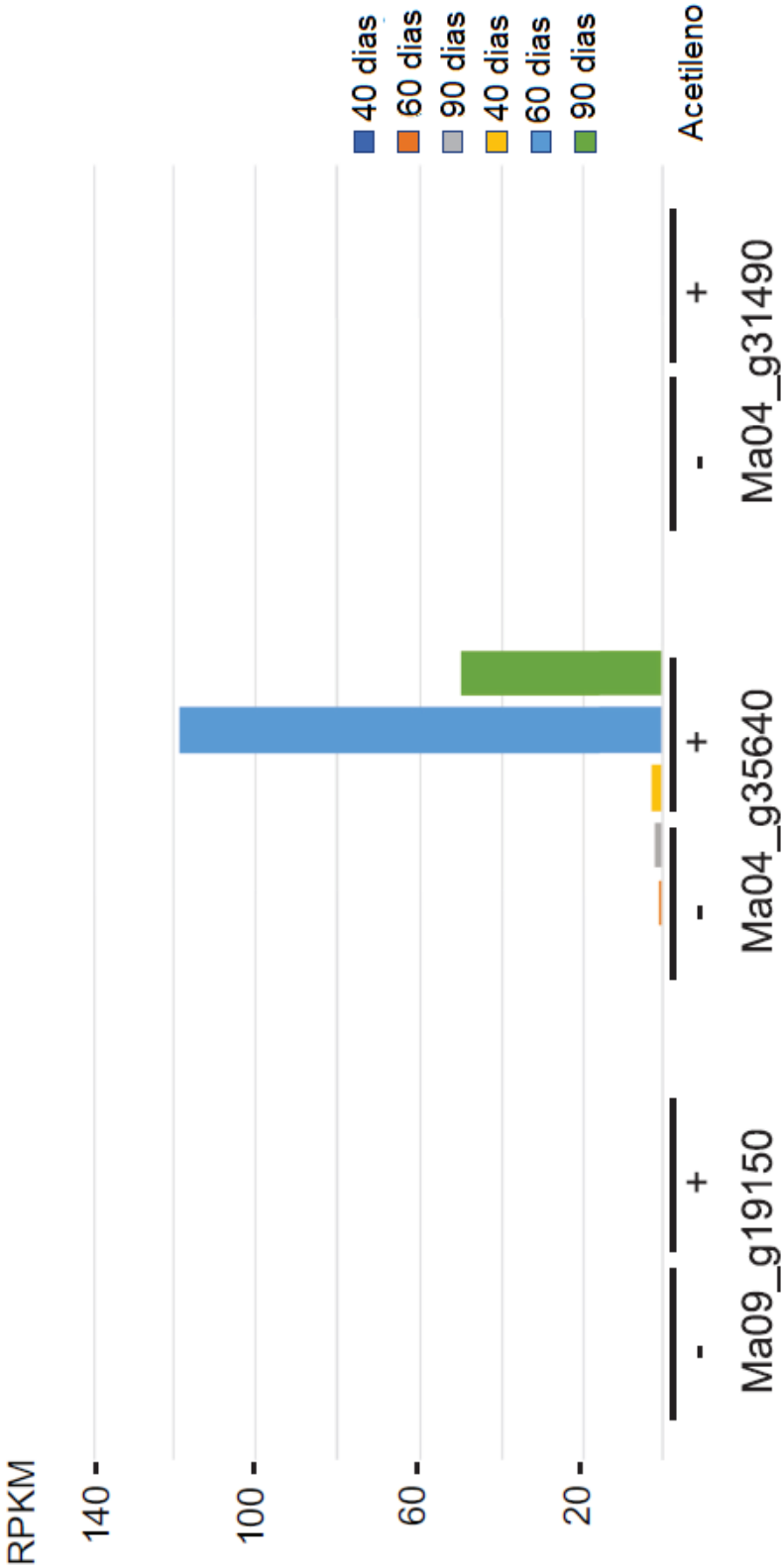


Fig. 11

ACO

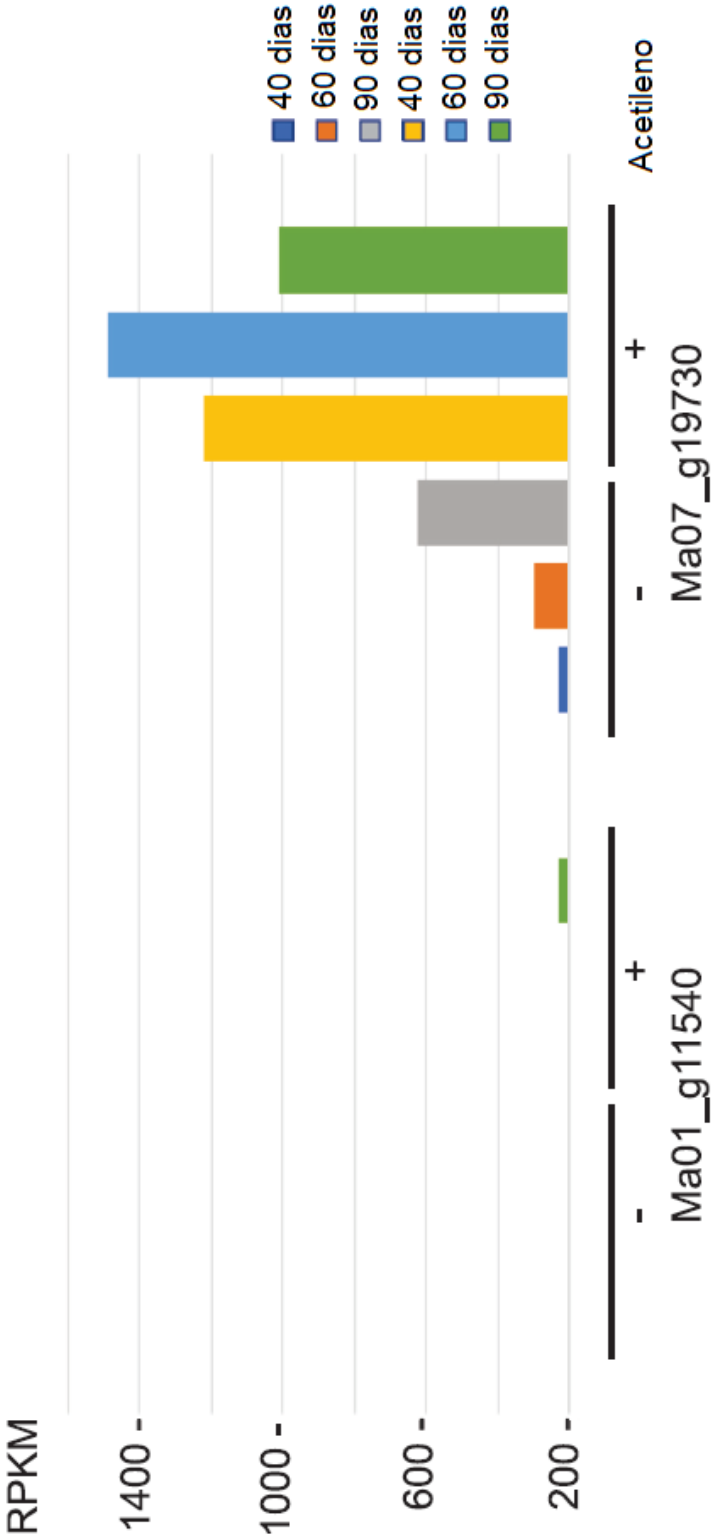


Fig. 12

Fig. 13A

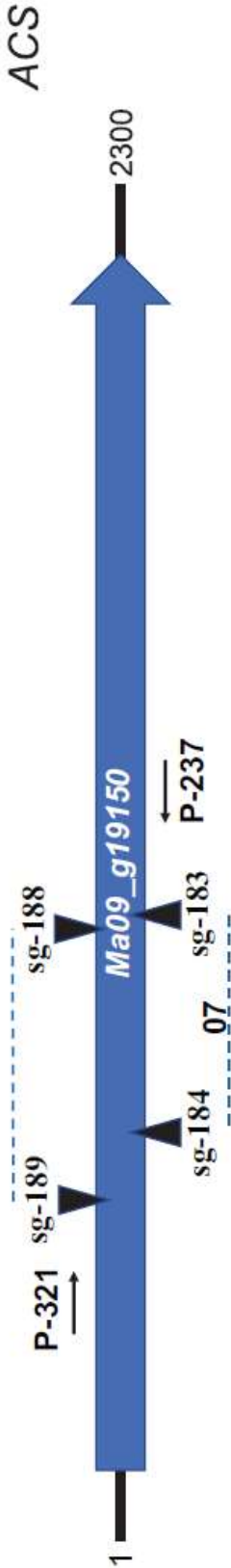


Fig. 13B

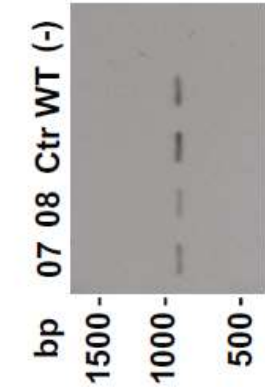


Fig. 13C

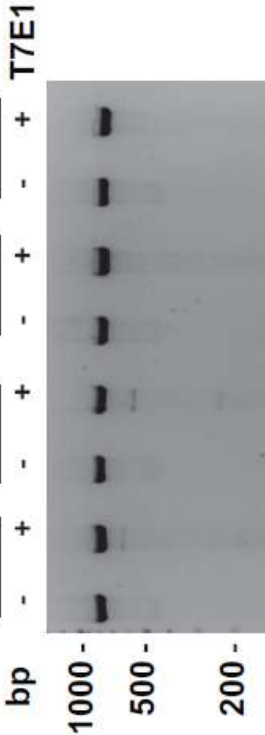
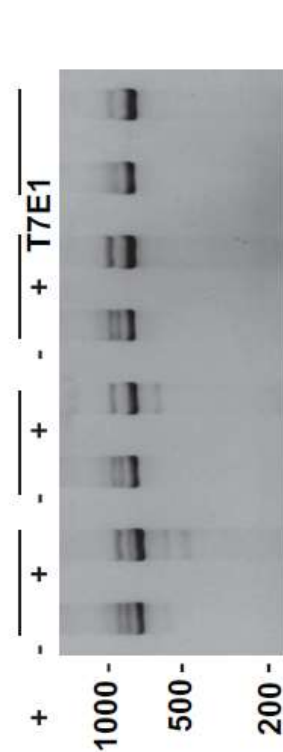
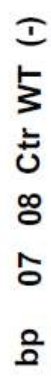


Fig. 13D

	sg-188	PAM
WT	GATGTGATTTGTGGAAACACGACGCGGATTGCTAGGTTTCATGGGAAAGCCGAGAGGAGGAGAGCTACGTTCCACCCCGAGCGCATTTGTAATGAGCGGCGGAGCCAC	
C1	GATGTGATTTGTGGAAACACGACGCGGATTGCTAGGTTTCATGGGAA-----AGGAGGAGAGCTACGTTCCACCCCGAGCGCGTTGTAATGAGCGGCGGAGCCAC	
C2	GATGTGATTTGTGGAAACACGACGCGGATTGCTAGGTTTCATGGGAA-----AGGAGGAGAGCTACGTTCCACCCCGAGCGCGTTGTAATGAGCGGCGGAGCCAC	

Fig. 14B



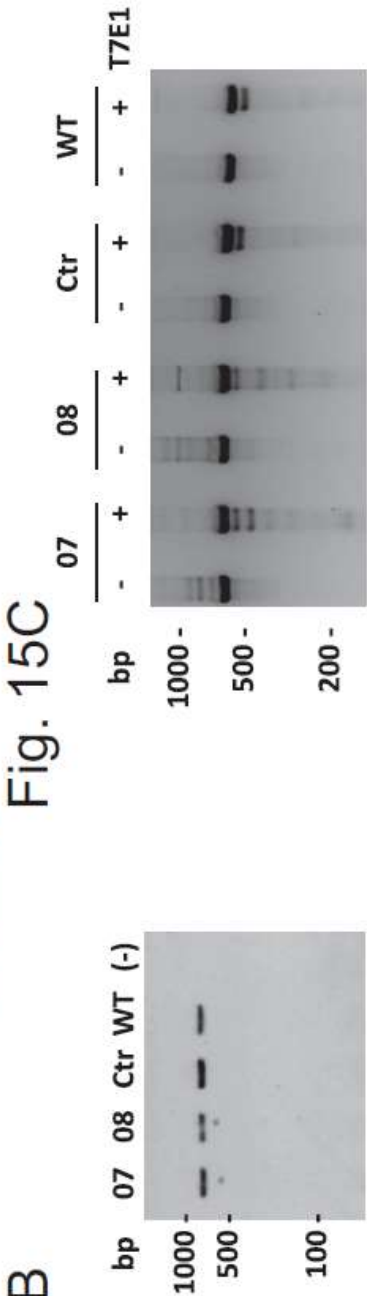
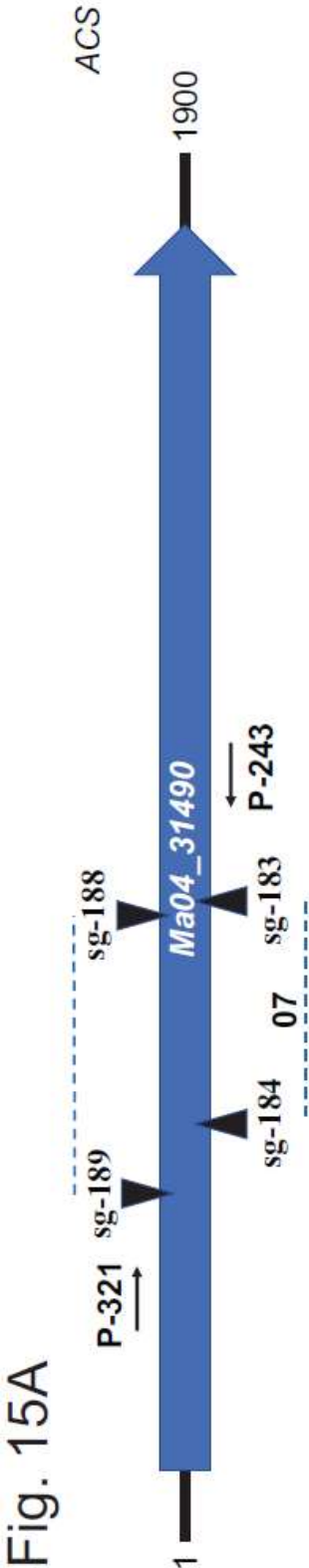


Fig. 16A

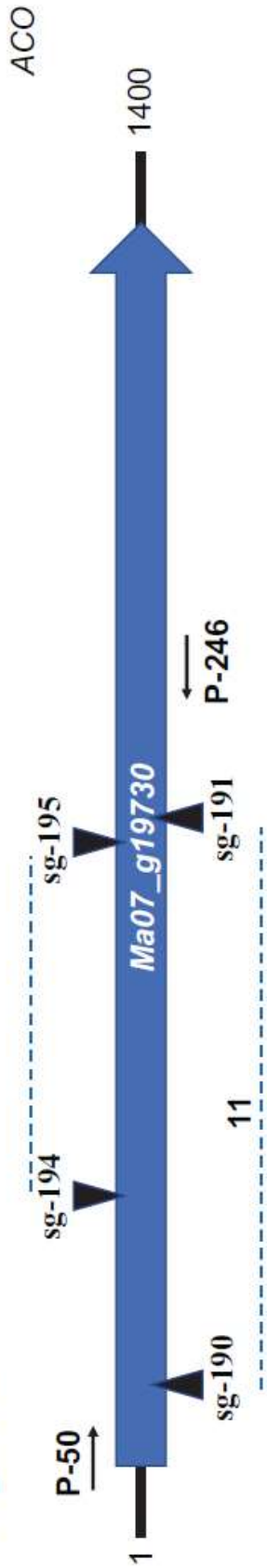


Fig. 16B

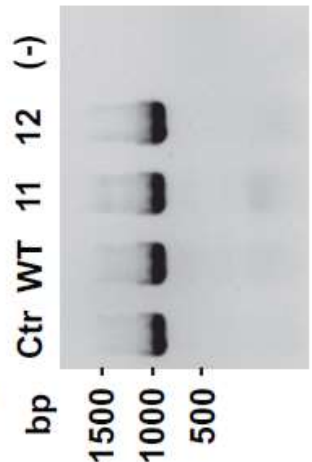


Fig. 16C

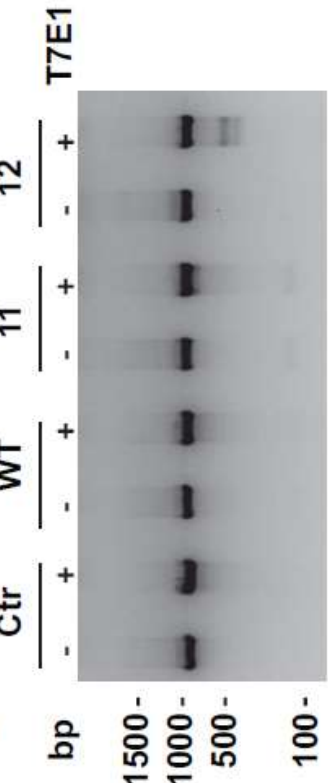


Fig. 17A

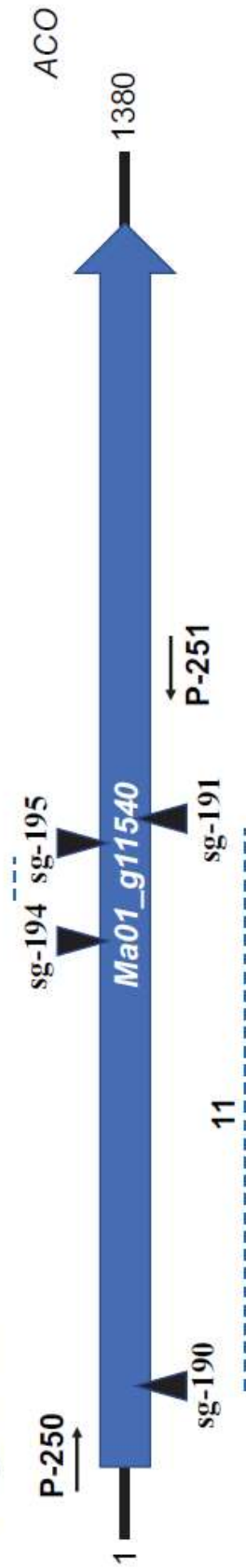


Fig. 17B

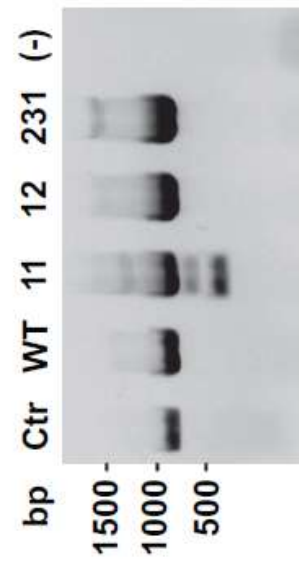


Fig. 17C

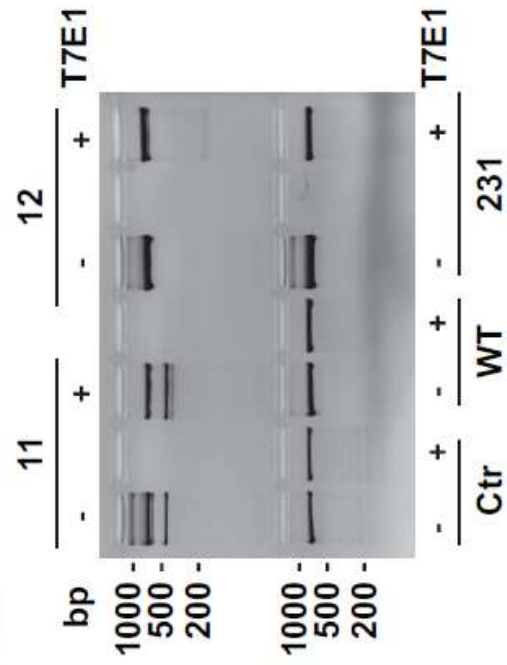


Fig. 18

ACO : Ma01_g11540

```

Clone_25      ATGGCGTGCCTCCCGTCCCTCGACTTGGAAAGCTCCGTGGAGAGGAGAGAGCAGTTTCATGGACCTCCTTCTGTGACGCTTGGGAGAAATGGGCTTCTTTGAGG
Clone_13      ATGGCGTGCCTCCCGTCCCTCGACTTGGAAAGCTCCGTGGAGAGGAGAGAGCAGTTTCATGGACCTCCTTCTGTGACGCTTGGGAGAAATGGGCTTCTTTGAGG
Clone_16      ATGGCGTGCCTCCCGTCCCTCGACTTGGAAAGCTCCGTGGAGAGGAGAGAGCAGTTTCATGGACCTCCTTCTGTGACGCTTGGGAGAAATGGGCTTCTTTGAGG
Clone_15      ATGGCGTGCCTCCCGTCCCTCGACTTGGAAAGCTCCGTGGAGAGGAGAGAGCAGTTTCATGGACCTCCTTCTGTGACGCTTGGGAGAAATGGGCTTCTTTGAGG
Clone_14      ATGGCGTGCCTCCCGTCCCTCGACTTGGAAAGCTCCGTGGAGAGGAGAGAGCAGTTTCATGGACCTCCTTCTGTGACGCTTGGGAGAAATGGGCTTCTTTGAGG
Clone_17      ATGGCGTGCCTCCCGTCCCTCGACTTGGAAAGCTCCGTGGAGAGGAGAGAGCAGTTTCATGGACCTCCTTCTGTGACGCTTGGGAGAAATGGGCTTCTTTGAGG
Clone_18      ATGGCGTGCCTCCCGTCCCTCGACTTGGAAAGCTCCGTGGAGAGGAGAGAGCAGTTTCATGGACCTCCTTCTGTGACGCTTGGGAGAAATGGGCTTCTTTGAGG
11540-wt-C6   *****
Clone_25      TGCTCTCATTTTACGTGAACAAGTTGATGCCACGAGCATTTGAAGTAAITATCATGGCTTCCATTGCTGACGTAGCTGCTCAACCATGGGATCTCGCA
Clone_13      TGCTCTCATTTTACGTGAACAAGTTGATGCCACGAGCATTTGAAGTAAITATCATGGCTTCCATTGCTGACGTAGCTGCTCAACCATGGGATCTCGCA
Clone_16      TGCTCTCATTTTACGTGAACAAGTTGATGCCACGAGCATTTGAAGTAAITATCATGGCTTCCATTGCTGACGTAGCTGCTCAACCATGGGATCTCGCA
Clone_15      -----
Clone_14      TGCTCTCATTTTACGTGAACAAGTTGATGCCACGAGCATTTGAAGTAAITATCATGGCTTCCATTGCTGACGTAGCTGCTCAACCATGGGATCTCGCA
Clone_17      TGCTCTCATTTTACGTGAACAAGTTGATGCCACGAGCATTTGAAGTAAITATCATGGCTTCCATTGCTGACGTAGCTGCTCAACCATGGGATCTCGCA
Clone_18      TGCTCTCATTTTACGTGAACAAGTTGATGCCACGAGCATTTGAAGTAAITATCATGGCTTCCATTGCTGACGTAGCTGCTCAACCATGGGATCTCGCA
11540-wt-C6   PAM
Clone_25      GATGTCACCGACATGGACTGGGAGAGCACCTTCTTCTGCGCATCTCCCGCTCCAAACATGTCCGACTTCCAGACATGGACGAGGAGTACCGGTACCGCTTCGATT
Clone_13      GATGTCACCGACATGGACTGGGAGAGCACCTTCTTCTGCGCATCTCCCGCTCCAAACATGTCCGACTTCCAGACATGGACGAGGAGTACCGGTACCGCTTCGATT
Clone_16      GATGTCACCGACATGGACTGGGAGAGCACCTTCTTCTGCGCATCTCCCGCTCCAAACATGTCCGACTTCCAGACATGGACGAGGAGTACCGGTACCGCTTCGATT
Clone_15      -----
Clone_14      GATGTCACCGACATGGACTGGGAGAGCACCTTCTTCTGCGCATCTCCCGCTCCAAACATGTCCGACTTCCAGACATGGACGAGGAGTACCGGTACCGCTTCGATT
Clone_17      GATGTCACCGACATGGACTGGGAGAGCACCTTCTTCTGCGCATCTCCCGCTCCAAACATGTCCGACTTCCAGACATGGACGAGGAGTACCGGTACCGCTTCGATT
Clone_18      GATGTCACCGACATGGACTGGGAGAGCACCTTCTTCTGCGCATCTCCCGCTCCAAACATGTCCGACTTCCAGACATGGACGAGGAGTACCGGTACCGCTTCGATT
11540-wt-C6   PAM
Clone_25      TCCTTCGTTACAGCGCACCCCCACCAACCATCGACTGTAGTCTGCCCGGACTAACCTTCGCCCTCAGGAAGGCGATGAGGAAATTCGGACGGGTTAGAGAAGCTGGC
Clone_13      TCCTTCGTTACAGCGCACCCCCACCAACCATCGACTGTAGTCTGCCCGGACTAACCTTCGCCCTCAGGAAGGCGATGAGGAAATTCGGACGGGTTAGAGAAGCTGGC
Clone_16      TCCTTCGTTACAGCGCACCCCCACCAACCATCGACTGTAGTCTGCCCGGACTAACCTTCGCCCTCAGGAAGGCGATGAGGAAATTCGGACGGGTTAGAGAAGCTGGC
Clone_15      -----CCACCACCATCGACTGTAGTCTGCCCGGACTAACCTTCGCCCTCAGGAAGGCGATGAGGAAATTCGGACGGGTTAGAGAAGCTGGC
Clone_14      TCCTTCGTTACAGCGCACCCCCACCAACCATCGACTGTAGTCTGCCCGGACTAACCTTCGCCCTCAGGAAGGCGATGAGGAAATTCGGACGGGTTAGAGAAGCTGGC
Clone_17      TCCTTCGTTACAGCGCACCCCCACCAACCATCGACTGTAGTCTGCCCGGACTAACCTTCGCCCTCAGGAAGGCGATGAGGAAATTCGGACGGGTTAGAGAAGCTGGC
Clone_18      TCCTTCGTTACAGCGCACCCCCACCAACCATCGACTGTAGTCTGCCCGGACTAACCTTCGCCCTCAGGAAGGCGATGAGGAAATTCGGACGGGTTAGAGAAGCTGGC
11540-wt-C6   *****

```

Fig. 19

ACO : Ma01_g11540

```

Clone_25      GGAGCGTCTTCTCGATCTGCTCTGCGAGAACTCGGCTGGAGGAGGTTACCTCAAGAACGCTTCTACGGATCCAAAGCTCCGAACCTTTGGCACCAAGGTGAGCAAC
Clone_13      GGAGCGTCTTCTCGATCTGCTCTGCGAGAACTCGGCTGGAGGAGGTTACCTCAAGAACGCTTCTACGGATCCAAAGCTCCGAACCTTTGGCACCAAGGTGAGCAAC
Clone_16      GGAGCGTCTTCTCGATCTGCTCTGCGAGAACTCGGCTGGAGGAGGTTACCTCAAGAACGCTTCTACGGATCCAAAGCTCCGAACCTTTGGCACCAAGGTGAGCAAC
Clone_15      GGAGCGTCTTCTCGATCTGCTCTGCGAGAACTCGGCTGGAGGAGGTTACCTCAAGAACGCTTCTACGGATCCAAAGCTCCGAACCTTTGGCACCAAGGTGAGCAAC
Clone_14      GGAGCGTCTTCTCGATCTGCTCTGCGAGAACTCGGCTGGAGGAGGTTACCTCAAGAACGCTTCTACGGATCCAAAGCTCCGAACCTTTGGCACCAAGGTGAGCAAC
Clone_17      GGAGCGTCTTCTCGATCTGCTCTGCGAGAACTCGGCTGGAGGAGGTTACCTCAAGAACGCTTCTACGGATCCAAAGCTCCGAACCTTTGGCACCAAGGTGAGCAAC
Clone_18      GGAGCGTCTTCTCGATCTGCTCTGCGAGAACTCGGCTGGAGGAGGTTACCTCAAGAACGCTTCTACGGATCCAAAGCTCCGAACCTTTGGCACCAAGGTGAGCAAC
11540-wt-C6   *****

sg-194      PAM      sg-195
TACCCGCCATGCCCCGCCC-----TCCA CGGCTGGAGGCCACACCGAGCGTGGCGGCATCATCTTGTCTTCCAAGACGACCGGCTCAGGGCCCTCCAGCTT
TACCCGCCATGCCCTCGCCGGAGCTGA-TCCA CGGCTGGAGGCCACACCGAGCGTGGCGGCATCATCTTGTCTTCCAAGACGACCGGCTCAGGGCCCTCCAGCTT
TACCCGCCATGCCCTCGCCGGAGCTGA-TCCA CGGCTGGAGGCCACACCGAGCGCGGGCGCATCATCTTGTCTTCCAAGACGACCGGCTCAGGGCCCTCCAGCTT
TACCCGCCATGCCCTCGCCGGAGCTGA-TCCA CGGCTGGAGGCCACACCGAGCGCGGGCGCATCATCTTGTCTTCCAAGACGACCGGCTCAGGGCCCTCCAGCTT
TACCCGCCATGCCCTCGCCGGAGCTGA-TCCA CGGCTGGAGGCCACACCGAGCGCGGGCGCATCATCTTGTCTTCCAAGACGACCGGCTCAGGGCCCTCCAGCTT
TACCCGCCATGCCCTCGCCGGAGCTGA-TCCA CGGCTGGAGGCCACACCGAGCGCGGGCGCATCATCTTGTCTTCCAAGACGACCGGCTCAGGGCCCTCCAGCTT
TACCCGCCATGCCCTCGCCGGAGCTGA-TCCA CGGCTGGAGGCCACACCGAGCGCGGGCGCATCATCTTGTCTTCCAAGACGACCGGCTCAGGGCCCTCCAGCTT
TACCCGCCATGCCCTCGCCGGAGCTGA-TCCA CGGCTGGAGGCCACACCGAGCGCGGGCGCATCATCTTGTCTTCCAAGACGACCGGCTCAGGGCCCTCCAGCTT
*****
11540-wt-C6

```

Fig. 20A

ACO : Ma01_g11540

sg-190 PAM

11540-wt-C6	ATGGCGTGCCTCCTTCCCGGTCCCTCGACTTGGAGAAGCTCCGTGGAGAGGACAGACGAGTTCATGGACCTCCTT	CGTGA	CGCTTGGAGAAA	TGGGGCTTCTTTTGAGG
Clone_34	ATGGCGTGCCTCCTTCCCGGTCCCTCGACTTGGAGAAGCTCCGTGGAGAGGACAGACGAGTTCATGGACCTCCTT	CGTGA	CGCTTGGAGAAA	TGGGGCTTCTTTTGAGG
Clone_35	ATGGCGTGCCTCCTTCCCGGTCCCTCGACTTGGAGAAGCTCCGTGGAGAGGACAGACGAGTTCATGGACCTCCTT	CGTGA	CGCTTGGAGAAA	TGGGGCTTCTTTTGAGG
Clone_37	ATGGCGTGCCTCCTTCCCGGTCCCTCGACTTGGAGAAGCTCCGTGGAGAGGACAGACGAGTTCATGGACCTCCTT	CGTGA	CGCTTGGAGAAA	TGGGGCTTCTTTTGAGG
Clone_38	ATGGCGTGCCTCCTTCCCGGTCCCTCGACTTGGAGAAGCTCCGTGGAGAGGACAGACGAGTTCATGGACCTCCTT	CGTGA	CGCTTGGAGAAA	TGGGGCTTCTTTTGAGG
Clone_36	ATGGCGTGCCTCCTTCCCGGTCCCTCGACTTGGAGAAGCTCCGTGGAGAGGACAGACGAGTTCATGGACCTCCTT	CGTGA	CGCTTGGAGAAA	TGGGGCTTCTTTTGAGG

11540-wt-C6	TGCTCTCATTTCTTTACGTGAACAAGTTGATGCCACAGACATTTGAAGCTAATTTATCATGGCTTTCCATTTGCTTCATGTAGCTGCTCAACCATGGGATCTCGCA			
Clone_34	TGCTCTCATTTCTTTACGTGAACAAGTTGATGCCACAGACATTTGAAGCTAATTTATCATGGCTTTCCATTTGCTTCATGTAGCTGCTCAACCATGGGATCTCGCA			
Clone_35	TGCTCTCATTTCTTTACGTGAACAAGTTGATGCCACAGACATTTGAAGCTAATTTATCATGGCTTTCCATTTGCTTCATGTAGCTGCTCAACCATGGGATCTCGCA			
Clone_37	-----			
Clone_38	-----			
Clone_36	-----			

11540-wt-C6	TGAGCTGATGGACGAGGTGGAGAGGGCGGACCAAGCGCACTACGAGCAATGCAGGGAGCAAAAGTTCAAAACAGTTGGCGTGCAGGCTCTCAAGAGCGGACCCGGGACG			
Clone_34	TGAGCTGATGGACGAGGTGGAGAGGGCGGACCAAGCGCACTACGAGCAATGCAGGGAGCAAAAGTTCAAAACAGTTGGCGTGCAGGCTCTCAAGAGCGGACCCGGTACG			
Clone_35	TGAGCTGATGGACGAGGTGGAGAGGGCGGACCAAGCGCACTACGAGCAATGCAGGGAGCAAAAGTTCAAAACAGTTGGCGTGCAGGCTCTCAAGAGCGGACCCGGTACG			
Clone_37	-----			
Clone_38	-----			
Clone_36	-----			

ACO: Ma01 g11540

sg-191

11540-wt-C6
Clone_34
Clone_35
Clone_37
Clone_38
Clone_36

GATGTCACCGACATGGACTGGGAGAGCACTTCCTTCTCGGCCATCTCCCGCTCCAAACATGTCGACTTCCAGACATGGACGAGGAGTACCGGTACCGCTTCGATT
 GATGTCACCGACATGGACTGGGAGAGCACTTCCTTCTCGGCCATCTCCCGCTCCAAACATGTCGACTTCCAGACATGGACGAGGAGTACCGGTACCGCTTCGATT
 GATGTCACCGACATGGACTGGGAGAGCACTTCCTTCTCGGCCATCTCCCGCTCCAAACATGTCGACTTCCAGACATGGACGAGGAGTACCGGTACCGCTTCGATT

11540-wt-C6
Clone_34
Clone_35
Clone_37
Clone_38
Clone_36

TCCTTCGTTACAGCGGACCCCGACCAACCATCGACTGTAGTCTGCCCGACTTAACCTTCGGCTTCAGGAAGGCGATGAGGGAAATTCGCGACGGGGTTAGAGAAAGCTGGC
 TCCTTCGTTACAGCGGACCCCGACCAACCATCGACTGTAGTCTGCCCGACTTAACCTTCGGCTTCAGGAAGGCGATGAGGGAAATTCGCGACGGGGTTAGAGAAAGCTGGC
 TCCTTCGTTACAGCGGACCCCGACCAACCATCGACTGTAGTCTGCCCGACTTAACCTTCGGCTTCAGGAAGGCGATGAGGGAAATTCGCGACGGGGTTAGAGAAAGCTGGC
 -----CCACCACCATCGACTGTAGTCTGCCCGACTTAACCTTCGGCTTCAGGAAGGCGATGAGGGAAATTCGCGACGGGGTTAGAGAAAGCTGGC
 -----CCACCACCATCGACTGTAGTCTGCCCGACTTAACCTTCGGCTTCAGGAAGGCGATGAGGGAAATTCGCGACGGGGTTAGAGAAAGCTGGC
 -----CCACCACCATCGACTGTAGTCTGCCCGACTTAACCTTCGGCTTCAGGAAGGCGATGAGGGAAATTCGCGACGGGGTTAGAGAAAGCTGGC

11540-wt-C6
Clone_34
Clone_35
Clone_37
Clone_38
Clone_36

[illegible]

111540-wt-C6
Clone_34
Clone_35
Clone_37
Clone_38
Clone_36

TACCGGCCATGCCCTGCCCGAGCTGATCCACGGCCCTGCGAGCCACACACGACGCGCGCGGCGCATCATCTTGCTCTTCCAAAGACGACGCGCTCAGCGGGCTCCAGGTTTT
TACCGGCCATGCCCTGCCCGAGCTGATCCACGGCCCTGCGAGCCACACACGACGCGTGGCGGATCATCTTGCTCTTCCAAAGACGACGCGCTCAGCGGGCTCCAGGTTTT
TACCGGCCATGCCCTGCCCGAGCTGATCCACGGCCCTGCGAGCCACACACGACGCTGGCGGATCATCTTGCTCTTCCAAAGACGACGCGCTCAGCGGGCTCCAGGTTTT
TACCGGCCATGCCCTGCCCGAGCTGATCCACGGCCCTGCGAGCCACACACGACGCGCGCGGCGCATCATCTTGCTCTTCCAAAGACGACGCGCTCAGCGGGCTCCAGGTTTT
TACCGGCCATGCCCTGCCCGAGCTGATCCACGGCCCTGCGAGCCACACACGACGCGCGCGCGGCGCATCATCTTGCTCTTCCAAAGACGACGCGCTCAGCGGGCTCCAGGTTTT
TACCGGCCATGCCCTGCCCGAGCTGATCCACGGCCCTGCGAGCCACACACGACGCGCGCGCGGCGCATCATCTTGCTCTTCCAAAGACGACGCGCTCAGCGGGCTCCAGGTTTT
TACCGGCCATGCCCTGCCCGAGCTGATCCACGGCCCTGCGAGCCACACACGACGCGCGCGCGGCGCATCATCTTGCTCTTCCAAAGACGACGCGCTCAGCGGGCTCCAGGTTTT
TACCGGCCATGCCCTGCCCGAGCTGATCCACGGCCCTGCGAGCCACACACGACGCGCGCGCGGCGCATCATCTTGCTCTTCCAAAGACGACGCGCTCAGCGGGCTCCAGGTTTT

	ACS	Ma09_g19150	Ma04_g35640		Ma04_31490	
		Evidência de eventos de edição de genoma				
		Clonagem e Sequenciamento	T7EI	Clonagem e Sequenciamento	T7EI	
sgRNA-2007	sgRNA 183 (19150) (58/83%) (RGEN/MIT)	N	Y	N	Y	Y
	sgRNA 184 (31490) (74/79%)	N	N	N	N	Y
sgRNA-2008	sgRNA 188 (19150) (68/71%)	Y	N	N	Y	Y
	sgRNA 189 (35640) (72/40%)	N	Y	N	Y	X

Fig. 21

	ACO	Ma07_g19730	Ma01_g11540
		Evidência de eventos de edição de genoma	
		Clonagem e Sequenciamento	T7
sgRNA-2011	sgRNA 190 (11540) (60/13%) (RGEN/MIT)	N	Y
	sgRNA 191 (19730) (57/80%)	N	N
sgRNA-2012	sgRNA 194 (19730) (75/43%)	N	Y
	sgRNA 195 (11540) (71/77)	N	N

Fig. 22

Fig. 23C



Fig. 23B

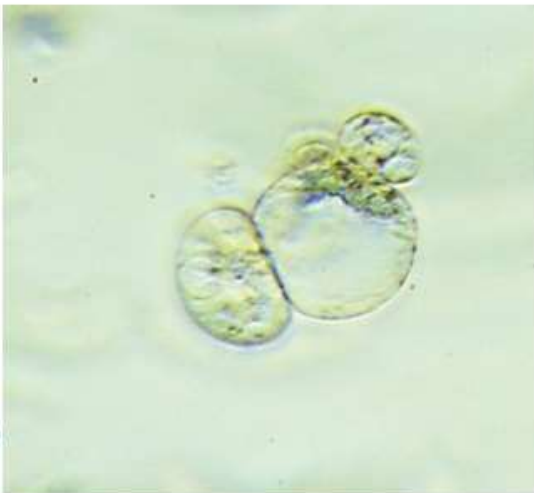


Fig. 23E



Fig. 23A

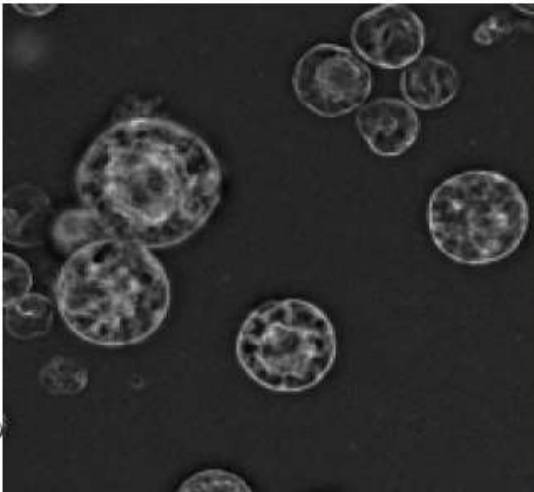


Fig. 23D





Fig. 24D

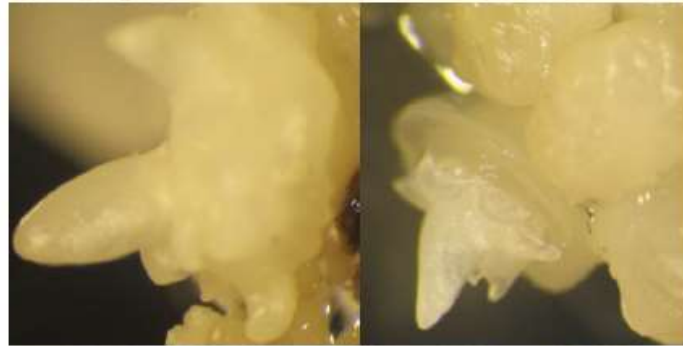


Fig. 24C

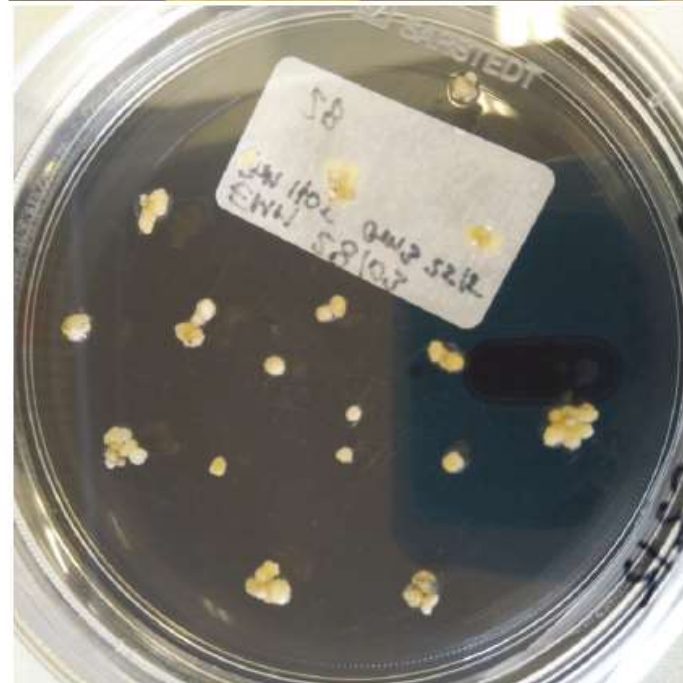


Fig. 24A

Fig. 24B



Fig. 25C

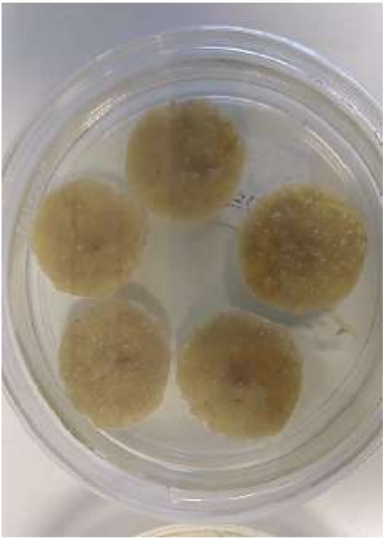


Fig. 25B



Fig. 25A



Fig. 25 E



Fig. 25D

Fig. 26

Tabela 1: Sumário de genes alvo de banana e sítios de edição potenciais

Nome de gene	Versões de gene (não alelos)	Cópias totais por genoma triploide	Número total de sgRNAs
ACS	3 (Ma09_g19150 (SEQ ID NO: 13), Ma04_g35640 (SEQ ID NO: 9), Ma04_31490) (SEQ ID NO: 8)	9	4
ACO	2 (Ma07_g19730 (SEQ ID NO: 27), Ma01_g11540 (SEQ ID NO: 20))	6	4

Tabela 2: Sumário de tratamentos (as SEQ ID Nos. são fornecidas abaixo)

Plasmid ID	sgRNAs
------------	--------

Fig. 26 Continuação

pAC2007	183 + 184
pAC2008	188 + 189
pAC2007 + pAC2008	183 + 184 + 188 + 189
pAC2011	190 + 191
pAC2012	194 + 195
pAC2011 + pAC2012	190 + 191 + 194 + 195
pAC2008 + pAC2012	188 + 189 + 194 + 195
pAC2007 + pAC2011	183 + 184 + 190 + 191
pAC	
pAC	

Sequências validadas de genes relacionados a ACS:

- Variação entre alelos marcados em verde
- sgRNA são marcados em vermelho
- NGG destacado em verde
- Em azul: sequência não validada

>Ma09_g19150
TAGCTCGTGTCTCCCTTCTCCCCAGGCTTCCCAGTACTCGCCTAAGATCGTAACGTCGGCAATGGGGCTCCACGTTGATGAACACTCAAATTACAATGT
CCTCTCCAGCATCGCAACGAGCGATGGCCACGGGGAGAACTCCTCATACTTCGATGGCTGGAAGGCCTACGATAATGATCCTTTCCACCCCATCGACAAT
CCTCAGGGGGTCATCCAAATGGGACTTGCAGAAACCAGGTAATGCTGTTTCACAACTAGTTCGGTAATTATGGTAGTTTTTTCATGGCCTATGGCCAA
AAATATGCCTTCCGTATTCTCTACTACTTGGAA TGCTAACGGTGCTGCTTTTCTTATCTCAGCTCTGCTGGACTTGATGCAGCATGGAATCAAGC
AGAACCCACAGGCTTCCATTTGCACCGCGAGGGGCTTCCGAGTTTAAGGACGTCGCGAACTTCCAGACTACCACGGCCTCCAGACTTCCGAAAGGT
AATAACCATCACAGTGCA GCTCTTTAGTTAGTTCCTTATCATGTCAATAACTGTGGACCTCGAGAATAGATTACATCACTCAGATAAAAGATGTGCGCAT
TATGACTCACGTACATGAGTCCAGAACTTGATCTACTTGTAAACGACGTCAAGAGGATTCTGGAAATGGTGCCTGCTGGCTAGGGACAACCTCACTAGA
TTGCTTTGCTGTTTCTGAAAGGCTAATGATGTGATTTGTGGAAACACGACGGCGATTGCTAGGTTATGGGAAACGAGAGGAGGAGGAGCTACGTTTCG
ACCCGGAGCGCAATTGTAATGAGCGGCGGAGCCA CCGGAGCTCAGGAACCATCGCATTTTGTCTAGCGAATCTCTGGGAGGCCTTCTGATTCCAACGCC
ATATTATCCAGGGTACGTAGACCTATCTACATCAAGATTTTATGTTTTATGTATATTTTACAGTGACACTAATCTGTTTTAAAGAAACTGTTTGAGGA
TGAGCCGATCGAACTACGGAGGCAACATTAATAATCCAGCTTACTGGTATAACCAAAAAAATTAGTAGCAATATTTGCCATCGCACGACTGTGACGTC

Fig. 26 Continuação

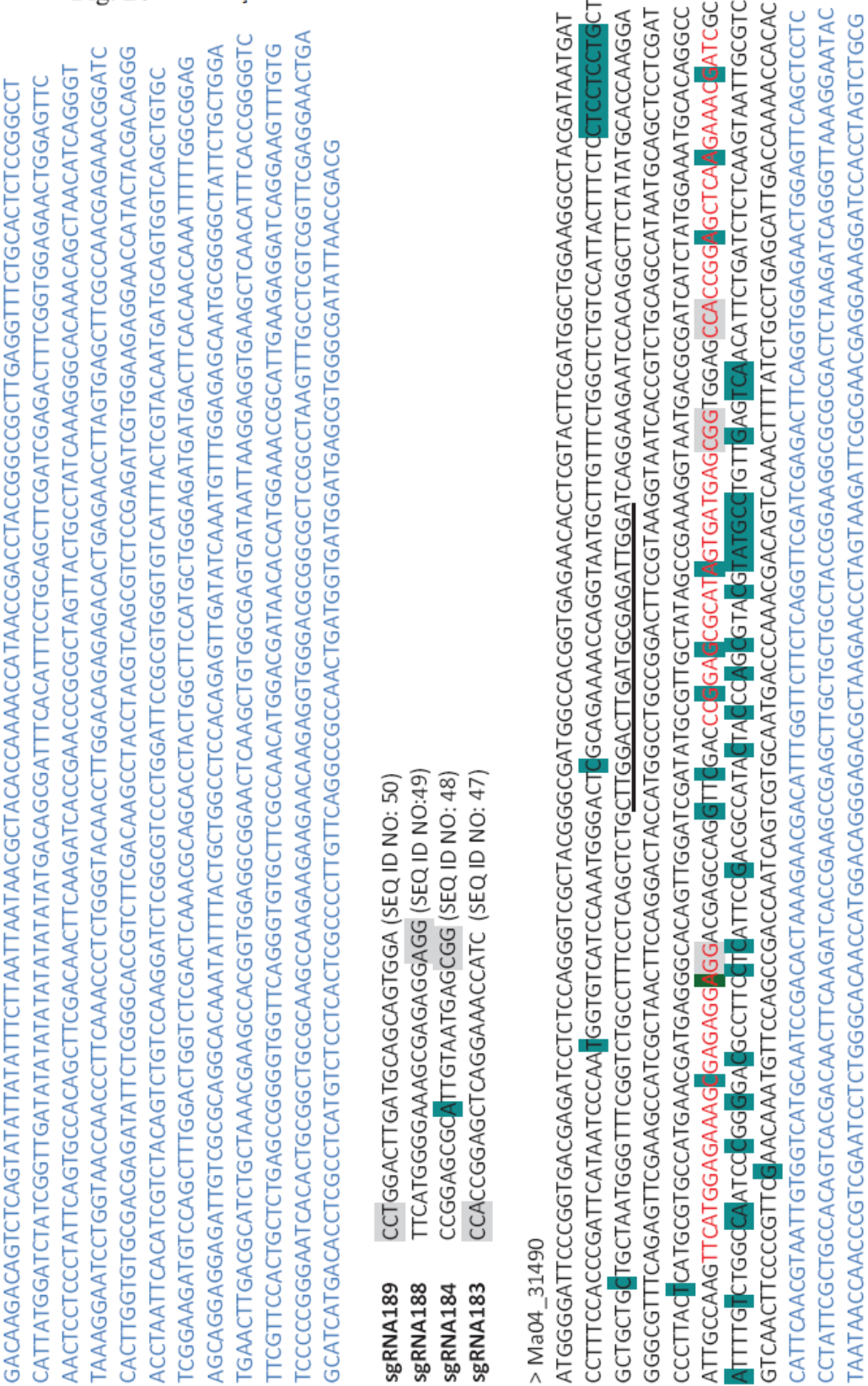


Fig. 26 Continuação

ACGAGATCTTCTCCGGCACAGTCTTTCGACGGCGCGGAATATGTCAGTGTGGGGAGATATTGCAAGAGGATCCGTGACCTGCGAGACCTAATCCACAT
CGTCTACAGCCTGTGAAAGGACCTCGGCGTCCCGGATTCCGTCGGCATCATATACTCGTTCAACGACGCGGTGGTCACTGCGCTCGGAGGATGTCCAGC
TTCGGAATGGTCTCGACGACGACTCAACGCTGCTTCCATGCTGGAGACGACGACTTCAACACCGACCTTTGGCGGAGAGCAGGAGGAGATTAAATGC
ACAGGCACAGGACGTTTACTGCGGCTCGAAGGCTCGGATTCGTTGCTTACAGAGCAACGCCGACTATTCTGCTGGATGAGCTTGAAGCCTCTGCTGAA
AGACCCACGGCGGAGGCGAGTTCGAGCTGTGGGGTGTAGTGAACGAGGTGAAGCTCAACATCTCTCCGGGTCCTCGTTCACTGCACCGAGCCGG
GGTGTTCAGGGCGTCTTTCGCAACATGGACGAGGAGACCATGGAGACGGCCCTCGGGGATCAGGACGTTCTGCGCGGCGAAGCAGCAGCTACT
GCCGCCAAGACCAAGAGGTGGGACACATCGCTTGGCTGAGCTTGCCACGAAAGTTGAGGAGATGACCGTCTTGACACCGCGTCTGATGTCCTCTCGCT
CTCGCTCGTTACGGCCGCCACCTGA

sgRNA183	CCACCGGAGCTCAAGAAACGATC
sgRNA184	CCGGAGCGCATAGTGATGAGCGG
sgRNA188	TTCATGGAGAAAGCGAGAGGAGG

>Ma04_g35640

ATGAGGATCTACGGGAGGAGCACCCAAATCAGCAGATCCTCTCGGATCGGACCAACGACGGCCATGGCGAGAACTCCTCCTACTTCGATGGGTGGAAG
GCCTACGAGAAGGATCCTTCCACCTCACCGACCAACCCACGGGGTCAATCCAAATGGGACTCGCAGAAACACGAGTTAGAGTTCCTTCATGGTGATGATTAAT
CGCATGCTTCCGTCAAATTGGCACTCCCTGCGGTGCTAATCTAATCTGTATGTGGGTTTGGGTCTTCTTCTCTCAGCTTTCCCTCGACTTGATCCGAGACTG
GATGAAGAAAGAACCCGAGGCTTCGATCTGCACCGAAGAGGGTCTCAGAGTTCAAGCAATTGCCAACTTTCAGGACTATCATGGCCTCCCACTCTTCCGA
AAGGTAATGATTTCAACCCAAACGACGCGCTGCAGCTGCTTGCTCACTGTCCAAGTAGCTACATACGTCCTCAATATGATAAAGCTGGGACTGACAGCCACTT
ACGCCCGAGCCCTGCTGCTCACCCCTGGATAAGGGATAAGCTAAATGATGGTGATTTGCTGACACGCGCAGGCCATCGCCAGTTCATGGAGAAAGGTGAG
AGGGGACGAGCCAGATTGACCCAGACCGCATCTGTAGCGGTGGAGCCACCGGTGGAGCCAGTCTCAGGAAACCATCGCTTTTGCCTGGCTGATCCTGGCGGGC
CTTCTTATTCCACGCCATATTATCCGGGGTAAGTTTAAAGTGTAATACTACGAGTTCTTATCCGGCAGAGGATCTAATGGCATCTGCATGGTTCCAG
ATTCGATCGAGACTTCAGGTGGAGACAGGAGTTCACTCCTCCCATTCAGTCCCACTCCCAAGTTCAAGATCAACCAAGCCGCACTGGAGACTGCTT
ACAGGAAGGCTCGAACTCACATTAGAGTCAAGGAATACTGGTGACCAACCCATCGAACCTCTGGGCAACCATGGACAGAGAGCGTGAGAACCC
TAGTCAGCTTCGTCAACGAGAAAGGATGCACTTGGTGTGCGACGAGATCTTCTCCGGAACCGTTCGACAAAGCCGAGTTACGTGAGCGTCTCCGAGGTGAT
CGAAGACGATCCCTACTGCGACAGGGATCTGATTACATCGCTACAGCCTCTCAAGGACCTGGCGTCCCTGGCTTCCGCTGCGCTCATATACCTCTACA
ACGACGCCGTGGTCAGCTGCGGAGGAAGATGTGAGCTTTGGACTGGTCTGTCGAGACGACGACCTGCTCGCTTCCATGTTGGGAGACGAGGAGTTCA
CCACGAGTTTCTTAGCGACGAGCCGACGAGGTTGTGCGGGCGGCGAGGGTCTTACGGACGGCCTCAAGCGAGTCGGGATTCATTGCTTGGACGGCAACG
CGGGGCTGTTCTGCTGGATGACTTGAGGCCGTTGCTGAAGGAAGCGACGGTGGAGCGGAGCTCCGGCTGTGGCGGGTGATCATCAACGACGTGAAGCTC

Fig. 26 Continuação

AAACATCTCGCCGGGTCGTCTTCCACTGCTCGGAGCCGGGTGGTTCAGGGTATGCTTCGCCAACATGGACGACACGGCCATGAAGATAGCGCTGAGGAGG
ATCGAGAGATTTCTGTACCGGAGAACGACGCCGCTGTGCAGGCGAAGAAACAAGAGAGAGTGCGGACGAGCGCTGCGGCTGAGCTTGCTCGCTCGGAGGTT
CGAGGATCCGACCATCATGACACCATCTGATGTCCTCCCACTCGCTCGTTCAAGCCGCCACTGAAACATCGACAGCGGGCTGCTGATGTCAACGAAAG
GTTAATTACGCTGATGTTGCACATTTCTTTGTTCTTGGATTATTATTTTTTTTTTTTTGGGAAAAATGGGTGAATGTTCCCACTAAGTTATATTAGATTGT
TGTTCCGTCTCATTCATGTTATAGGAACGAGGATAGAATTGCTGCTCTCTTTTATATATGGAATATGTTACAAITGGCCTAAGCTTATTTGATGAC
ATTAATTTACAAGACAAAGCCTCTTAATTAATGTTTTCGGACCAATGCAGGAGCTCACTACATACATTTGTACACTTCATATGTTCAAAATTAGTCCAGTTTAC
CGGTGACTCAGTTTTAAAGGTTATAAATGGTCTGATTCAGTACTTATCTTTGGTCTGTTAATGGTTCAAAACCGAATCGA TTTTAAATTTAAACAATATTAAATTT
AATTAATTTTTTAATTGGTTAAATCGATTAAATCAAAATCAGTTGATCAGGGGAAAAATATTATTGATGCTTACTCAACTCGATATGGTCTATACTCACGTGCGTAG
GAATGTCGAGATGCTCTGAGATAAAAAACATCGTGCTTTCGTGAT

sgRNA183	CCACCGTGCTCAGGAACCATC
sgRNA184	CCAGACCGCATGATGACGG
sgRNA188	TTCATGGAGAAGTGAGAGGGG
sgRNA189	CCTCGACTTGATCCGAGACTGGA

Um alinhamento de ACS1/ACS2/ACS3 (sgRNAs são marcados em vermelho)

Ma09_g19150	-----TAGTCGTGTCTCCCTCTCCCAAGGCTTC-----CCAGTACTCGCCTAAGA
Ma04_g31490	-----
Ma04_g35640	GCAGCAGTGCTTCTCCTTCTCTCTGTCTCGTTCAGCCTTTTCGGTACGTACCTGAGA
Ma09_g19150	TCGTAACTCGGCAATGGGCTCAAGTTGATGAACACTCAAATTACAATGTCTCTCTCCA
Ma04_g31490	-----ATGGGATTCGGGTGAG-----AGATCTCTCTCCA
Ma04_g35640	---TAAAGGCTCAGATGAGGATCTACGGCGAGGAGCACCCAAATCAGCAGATCTCTCTC
	*** ** * ** * * * * *
Ma09_g19150	GCATCGCAACGAGCGATGGCCACGGGAGAACTCTCTCATCTTCGATGGCTGGAAGGCCT
Ma04_g31490	GGTTCGTACGGGGATGGCCACGGTGAAACACTCGTACTTCGATCGTGGAAAGGCCT
Ma04_g35640	GGATCGCGACCAAACGACGGCCATGGCGAGAACTCTCTCTACTTCGATCGGTGGAAGGCCT
	* **** ** *** ***** ** ***** * * * * *
Ma09_g19150	ACGATAATGATCCTTTCACCCCATCGACAAATCCTCAGGGGTCATCCAAATGGGACTTG
Ma04_g31490	ACGATAATGATCCTTTCACCCGATTCATAATCCCAATGGTGTATGCATAATGGGACTCG

Fig. 26 Continuação

```

Ma04_g35640      ACGAGAAGGATCCTTTCCACCTCACGACAAACCCACGGGGGTCA1TC2CA3AAATGGGACTCG
                **** * * **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ma09_g19150      CAGAAAACCAAGTAAATGCTGTTTCA1CA2AACTAGTTCGGTA3AAATATGGTAGT4TTTTTCATG
Ma04_g31490      CAGAAAACCAAGTAAATGCTGTTT1C-----TG2CTCTG-----
Ma04_g35640      CAGAAAACCAAGT1AGAGTTCCTTCA-----TGGTGA2TGATTAA3TCGCACATG
                **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ma09_g19150      GCCTATGGCCAAA1AAATATGCCTTC2CGTATTCTCCTACTACTT3GGA-ATGCTAA4CGGGTGC
Ma04_g31490      ---T---CCATTACTTTCTCCTCCTCTGCTGCTGCTG-----CTGCTAA2TGGGTTT
Ma04_g35640      CCTT---CCGTC1CAATTGCCACTCC--CTGCGGT2TGCTAAATCTAATCTGTATGTGGGTTT
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                sgRNA189
Ma09_g19150      TGGGTTTTCCTTTATCTCAGCTCTG1CCTGGACTTGA2TGCGAGCAGTGGATCAAGCAGAAACCC
Ma04_g31490      C-GGTCTGCCCTTTCCTCAGCTCTGCTTGGACTTGA1TGGGAGATTGGATCAGGAAGAATCC
Ma04_g35640      TGGGTCCTTCTTCTCCTCAGCTTT1CCTCGACTTGA2TCGAGACTGGATGAAGAAGAACCC
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ma09_g19150      ACAGGCTTCCATTGCAACGGCGAGGGCGTTTCCGAGTTTAA1GGACGTCGGAACTTCCA
Ma04_g31490      ACAGGCTTCTATATGCACCAAGGAGGGCGTTTCAGAGTTCGAAGCCATCGCTAACTTCCA
Ma04_g35640      GCAGGCTTCGATCTGCACCGAAGAGGGGTCTCAGAGTTC1AAAGCAATTGCCAACTTTC2CA
                **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ma09_g19150      AGACTACCA1CGGCTGCCAGACTTCGGAAGGTAATAACCAT-----CACAGTGCAGC
Ma04_g31490      GGACTACCATGGCTGCCGACTTCGGTAAGGTAATCA1CCGCTCGCAGCCATAATGCAGC
Ma04_g35640      GGACTATCATGGCTCCAGCCTTCGGAAGGTAATGA--TTTCAACCCAAACGCAGC
                **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ma09_g19150      TCTTTAGTTA--GTCCTTATCATGTCA1TAAACTGTGGACCCCTCGAGAATAGATTACATC
Ma04_g31490      TCCTCGAT-----CCCTTACT-----
Ma04_g35640      GCTGCAGCTGCTTGTCCTCACTGTCCAAGTAGCTA-----
                * * * * *
Ma09_g19150      ACTCAGATAAAAGATGTGGCATTATGACTCAGGTACA1TGAGTCCAGAACTGTATCTAC
Ma04_g31490      -----CATGGTGCC-----
Ma04_g35640      -----CATACGTCCA-----
                *** * * *
Ma09_g19150      TTGTAA1CGACGTCAAGAGGATTCTCGAAATGGTGCCCTGCTGGGCTAGGGACAACCTCACT

```

Fig. 26 Continuação

[illegible]

Fig. 26 Continuação

```

Ma09_g19150      GACAGTCTCAGTATATATATTTCTTAATTAATAACGCTACACCAAAACCATAAACCGACC
Ma04_g31490      ATCAGTCGTGCAATG-----ACCCAACGACAGTCAAAC
Ma04_g35640      -----T

Ma09_g19150      TACCGGGCCGCTTGAGGTTT-----CTGCACTCTCCGGCCTCATTAATGGATCTATCGG
Ma04_g31490      TTTTATCTGCCTGAGCATTGACCAAAACCAACCATTCACGTAATTGTGGTCATGCAAT
Ma04_g35640      CTTTATCCGGCAGAGATC-----TAAATGCGATCTGCATGGTTTC--CAGATTCGATCGAGA
* * * * *
* * * * *

Ma09_g19150      TTGATATATATATATATATATATGACAGCGATTTACATTTCTCTGCAGCTTCGATCGAGA
Ma04_g31490      CCGACAC-----TAAAGAAACGACATTTG-GTTCTTCT--CAGGTTTCGATCGAGA
Ma04_g35640      -----TAAATGCGATCTGCATGGTTTC--CAGATTCGATCGAGA
* * * * *
* * * * *

Ma09_g19150      CTTTCGGTGGAGAACTGGAGTTCAACTCCTCCCTATTAGTGCCACAGCTTCGACAACTT
Ma04_g31490      CTTTCAGGTGGAGAACTGGAGTTCAAGTCTCCTCCCTATTGCTGCCACAGTCACGACAACTT
Ma04_g35640      CTTTCAGGTGGAGGACAGGAGTTCAGTCTCCTCCCATTCAGTGCCACAGTCCAAACAAGTT
* * * * *
* * * * *

Ma09_g19150      CAAGATCACCGAACCCGGGCTAGTTACTGCCTATCAAAGGGCAAAACAGCTAACATCAG
Ma04_g31490      CAAGATCACCGAAGCCGAGCTTGCTGCTGCTACCGGAAGCGCGGACTCTAAGATCAG
Ma04_g35640      CAAGATCACCGAAGCCGCACTGGAGACTGCTTACAGGAAGGCTCGAAACTCACACATTAG
* * * * *
* * * * *

Ma09_g19150      GGTTAAAGGAATCCTGGTAACCAACCCCTTCAACCCCTCTGGGTACAACCTTGGACAGAGA
Ma04_g31490      GGTTAAAGGAATACTATAAACCACCCCTCGAATCCTCTGGGCACAACCA TGGACAGGGA
Ma04_g35640      AGTCAAAGGAATACTGGTGACCAACCCATCGAACCCCTCTGGGCACAACCA TGGACAGAGA
* * * * *
* * * * *

Ma09_g19150      GACACTGAGAACTTTAGTGAGGTTTCGCCAACGAGAAACGGATCCACTTGGTGTGCGACGA
Ma04_g31490      GACGCTAAGAACCCCTAGTAAGATTTCGGAAACGAGGAAAGGATCCACCTAGTCTGCGACGA
Ma04_g35640      GACGCTGAGAAACCCCTAGTCAGCTTCGTCAACGAGAAAGGATGCACCTGGTGTGCGACGA
* * * * *
* * * * *

Ma09_g19150      GATATTCCTCGGGCACCGTCTTCGACAAGCCTACCTACGTACGGTCTCCGAGATCGTGGA
Ma04_g31490      GATCTTCCTCGGCACAGTCTTCGACGGCCGGAATATGTAGTGTGCGGAGATATTGCA
Ma04_g35640      GATCTTCCTCGGGAACCGTCTTCGACAAGCCGAGTTACGTAGCGGTCTCCGAGGTGATCGA

```

Fig. 26 Continuação

```

Ma09_g19150      *** **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ma04_g31490      AGAGGAACCAT ---ACTACGACAGGACCTAATTCAATCGTCTACAGTCTGTCCAAGGA
Ma04_g35640      AGAGGATCCGTGACCTGCGACGGAGACCTAATCCACATCGTCTACAGCTGTGGAAGGA
                    AGACGATCCCT ---ACTGCGACAGGATCTGATTCACATCGCTACAGCTCTCCAAGGA
                    *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ma09_g19150      TCTCGGCGTCCCTGGATTCCGCGTGGGTGTCAATTACTCGTACAATGATGCAGTGGTCAG
Ma04_g31490      CCTCGGCGTCCCGGATTCCGTGTGGCATCATATACTCGTTCAACGACGGTGGTCAG
Ma04_g35640      CCTGGGCGTCCCTGGCTTCGGCGTGGCGTCAATATACTCCTACAACGACGCCGTGGTCAG
                    ** **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ma09_g19150      CTGTGCTCGGAAGATGTCCAGCTTTGGACTGGTCTCGACTCAAAACGACACCTACTGGC
Ma04_g31490      CTGCGCTCGGAGGATGTCCAGCTTTGGACTGGTCTCGACGAGACTCAACGCTGCTTGC
Ma04_g35640      CTGCGCGAGGAAGATGTCCAGCTTTGGACTGGTCTCGTCCGACGACGACCTGCTCGC
                    *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ma09_g19150      TTCCAATGCTGGGAGATGATGACTTCACAAACCAATTTTGGCGGAGAGCAGGAGGATT
Ma04_g31490      TTCCAATGCTGGGAGACGACGACTTCACCAACGACCTCTTGGCGGAGAGCAGGAGGATT
Ma04_g35640      TTCCAATGTTGGGAGACGAGGAGTTCAACACGAGTTCTTAGCGACGAGCCGGACGAGGTT
                    ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ma09_g19150      GTCGGCGAGGCACAAATATTTTACTGTGGCTCCACAGAGTTGATATCAAAATGTTTGA
Ma04_g31490      AATGCACAGGCACAGGACGTTTACTGCCGGCTCGAAGCGTCGGCATTCGTTGCTTACA
Ma04_g35640      GTGCGGGCGGCGCAGGGTCTTTACGGACGGCTCAAGCGAGTCGGGATTCATTGCTTGA
                    *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ma09_g19150      GAGCAA TGCGGGGCTATTCTGTGGATGAACTTGACGATCTGCTAAACGAAGCCACGGT
Ma04_g31490      GAGCAA CGCCGGACTATTCTGTGGATGAGCTTGAAGCTCTGTGTAAGACGCCACGGC
Ma04_g35640      CGGCAA CGCGGGGCTGTTCTGTGGATGGACTTGAGGCGCTTGTGAAGGAAGCGACGGT
                    **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ma09_g19150      GGAGGGGGAACCTCAAGCTGTGCGGAGTGATAATTAAAGGAGTGAAGCTCAACATTTCAAC
Ma04_g31490      GGAGGGCGAGGTCGAGCTGTGCGGGTGATAGTGAACGAGGTGAAGCTCAACATCTCTCC
Ma04_g35640      GGAGGGGAGCTCCGGCTGTGCGGGTGATCATCAACGACGTGAAGCTCAACATCTCGCC
                    ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ma09_g19150      GGGTCTTTCGTTCCACTGCTGAGCCGGGTGGTTACAGGTGTGCTTCGCCAACATGGA
Ma04_g31490      GGGTCTCTCGTTCCACTGCACCGAGCCGGGTGGTTACAGGCGTGTTCGCCAACATGGA

```

Fig. 26 Continuação

```

Ma04_g35640      GGGGTGCTCTTCCACTGCTCGAGCCGGGTGGTTTCAGGGTATGCTTCGCCAACATGGA
                    ***** * ***** ***** *****
Ma09_g19150      CGATAACACCATGGAACCGCATTTGAAGAGGATCAGGAAGTTTGTGTCGCCCGGGAATCA
Ma04_g31490      CGAGGAGACCATGGAGACGGCCCTGGCGGATCAGGACGTTCTGCGCGCGGCGGAACGA
Ma04_g35640      CGACACGGCCATGAAGATAGCGGTGAGGAGGATCGAGTTTCTGTACCGGGAGAACGA
                    ***          ***** * * * * * * * * * * * * * * *
Ma09_g19150      CACTGCGGCTGCGCAAGCCAAAGAAACAAGAGTGGGACGGGGCTCCGCCCTAAG
Ma04_g31490      C---GCAGTACTGCGCGCCAAAGCCAAAG---AAGAGTGGGACACATCGCTTCGCCCTGAG
Ma04_g35640      C---GCCGCTGTGCAGGCGCAACAAG---AGGAGTGGGACGAGCGCTGCGGCTGAG
                    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ma09_g19150      TTTGCCTCGTC---GGTTGAGGAACTGAGCATCATGACACCTCGCCCTCATGTCTCTCTCA
Ma04_g31490      CTTGCCACGAA---GGTTGAGGAGATGACCGTCTGTGACACCGGCTGTGATGTCTCTCTCG
Ma04_g35640      CTTGCCTCGTCGGAGTTGAGGATCCGACCATCATGACACCATCATGTGTCTCTCCCA
                    ***** * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ma09_g19150      CTCGCCCTTGTTCAGGCGGCCAACTGATGGTGTGATGATGAGCGTGGGGATATTAAACCG
Ma04_g31490      CTCTCCGCTCGTTCAGGCGGCCAACCTGA-----
Ma04_g35640      CTCGCCCTCTCGTTCAGGCGGCCAACCTGAAAACATCGACAGCGGGGTGTCTGTATGTCAACGA
                    *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Ma09_g19150      ACG-----
Ma04_g31490      -----
Ma04_g35640      AGGTTAATTACCGTCTGATATGTTGCACATTTCTTTTCTTTTGGATTATTTATTTT

```

Fig. 26 Continuação

Sequências validadas de genes relacionados a ACS:

- Variação entre alelos marcados em verde
- sgRNA são marcados em vermelho
- NGG destacado em verde
- Em azul: sequência não validada

>Ma07_g19730

[illegible]

sgRNA190 CGAGATGCTTGCAGAAATGGG (SEQ ID NO: 51)

sgRNA191
CCGACGCCGGAGGCATCATCTTG (SEQ ID NO: 52)

[illegible]

sgRNA190 CGTGACGCTTGCGAGAAATGGGG
sgRNA191 CCGACGCCGGGCATCATCTTG
sgRNA194 CCCGTCTCAACATGTCGACT
sgRNA195 CCTGCCCGGAGCTGATCCACGG

Um alinhamento de ACO1/ACO2 (sgRNAs são marcados em vermelho)

Ma07_g19730
Ma01_g11540

Fig. 26 Continuação

Fig. 26 Continuação

Accession	Sequence
Ma07_g19730	TCATGGATTCTTCCGGTTATCGACATGGAGAAAGCTTTTGGGAAGGAGAGAGAGAGAAG
Ma01_g11540	-----CTCTTCCCGGTCTCGACTTGGAGAAAGCTCCGTGGAGAGGAGAGAGACGAGT
Ma07_g19730	CCATGGAGATCTCCGAGATGCTTGGGAGAAAATGGGGCTTCTTTTGAGGTGCTGAAG----
Ma01_g11540	CCATGGACCTCTTTCGTGACGCTTGGGAGAAAATGGGGCTTCTTTTGAGGTGCTCTCATTTCT
Ma07_g19730	CATACATAACTGGTTTGTCTTCTTTGAACTATATATATATTGCTAAAATGTACTA----T
Ma01_g11540	TTTACGTGAACAAGTTGATGCCACGAGC-----ATTTGAAGCTAA---TTATCATGGCT
Ma07_g19730	TTGCACATGCAATCTGTGTGTAGATTTTAAACCATGGCATCTCACATGACCTCATGGATG
Ma01_g11540	TTCCATTGTCTGTG-TAGTGTGCTCAACCATGGGATCTCGCATGAGCTGATGGACG
Ma07_g19730	AAGTGGAGAAAGGTGAACAAAGACCAGTACAACAAATGCAGGGAGCAAAAGTTCAACGAGT
Ma01_g11540	AGGTGGAGAGGGGACCAAGCGCACTACGAGCAATGCAGGAAGCAAAAGTTCAAAACAGT
Ma07_g19730	TCGCCAACAAAGCACTGGAAAACG--CCGACTCAGAAATCGACCACCTCGACTGGGAAA
Ma01_g11540	TGGCGTCAAGGCTCTCAAGAGCGGACCCGGACGGATGTCACCGACATGGACTGGGAGA
Ma07_g19730	GCACCTTTTTCCTGCGTCATCTCCCGGTCTCCAAACATTTCTGAGATCCCGATCTTGATG
Ma01_g11540	GCACCTTCTTCTGCGCCATCTCCCGGTCTCCAAACATGTCGGACTTCCACAGACATGGACG
Ma07_g19730	ACCAAGTATAGGTTCACAGATCTGATCATGATGTCATCTTCTGGCCTGGTCTTTTCACTTT
Ma01_g11540	AGGAGTACCGGTACCGC--TTTCGATT-----TCCTTCGTTACAGCGCACCCCCCAC
Ma07_g19730	GCTCATCG--TTTCGTTTCTTTGGGAC-GATGACTGGTGCAGGAAGGCGATGAAGGAATT
Ma01_g11540	CACCATCGACTGTAGTCTGCCCGGACTAACCTTCGCCTTCAGGAAGGCGATGACGGAAATT
Ma07_g19730	TGCGGCAGAGATGGAGAAAGCTGGCAGAGCGGCTGCTCGACTTGTCTGGGTGAGAACCTGGG
Ma01_g11540	CGCGACGGGGTTAGAGAAAGCTGGCGGAGCGTCTTCTCGATCTGCTCTCGGAGAACCTCGG

Fig. 26 Continuação

[illegible]

Fig. 26 Continuação

```

**      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Ma07_g19730      TTGCCACCCACCCCAATCGCTACCTCTTAAGTGACAGCCCCCAAGTTAGTGCATGTCGCTG
Ma01_g11540      TCAATGGCCAAACCTACGCCCTACACCTTAGG-----ACACCACGA
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Ma07_g19730      TACTTCGCGTTAGGAAGCTGTCGTCTAT--GTCTATGTAACCCGATGGAATGTGTGG----
Ma01_g11540      CGTCTCACGTGGAGATGCCACCATCTATTAGAAATGTGGCATCCAAT-----TGTGGAAT
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Ma07_g19730      -----TATGTACGTGTGTGAGCCCTTTTCTAATGAAGCAAATCATATAATAT
Ma01_g11540      AATAAGCGAAGCACTATGAACGTG-----GCTTTTTTTTAGTCTCGAGGGTTATGTCGTCG
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
Ma07_g19730      ATATATATATATATATATA
Ma01_g11540      ATCCCAATTTTCCACTTCT-
**      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

```

Resumo da Patente de Invenção para: **“PLANTA DE BANANA E SUA PARTE, MÉTODO PARA PRODUÇÃO E AUMENTO DA MEIA-VIDA DE BANANA, FRUTO, CONSTRUTO DE ÁCIDO NUCLEICO, PLANTA OU MÉTODO OU PRODUTOS PROCESSADOS.”**

Trata-se de uma planta de banana que compreende um genoma que compreende uma perda de mutação de função em uma sequência de ácido nucleico que codifica um componente em uma via de biossíntese de etileno da banana. Também é fornecido um método para aumentar a meia-vida de banana.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P4947- List de sequência.txt
- Data de Geração do Código: 29/01/2020
- Hora de Geração do Código: 14:39:16
- Código de Controle:
 - Campo 1: C0E9CBCE1670CF29
 - Campo 2: A955F90B86AA4415