República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020005444-5 A2

(22) Data do Depósito: 18/09/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 29/09/2020

(54) Título: MODIFICAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE MOLÉCULAS DE RNA NÃO CODIFICANTE DE PLANTAS PARA SILENCIAR EXPRESSÃO GÊNICA

(51) Int. Cl.: C12N 15/113; C12N 15/11; C12N 15/82.

(30) Prioridade Unionista: 19/09/2017 GB 1715113.5; 19/09/2017 GB 1715116.8; 23/11/2017 GB 1719516.5.

(71) Depositante(es): TROPIC BIOSCIENCES UK LIMITED.

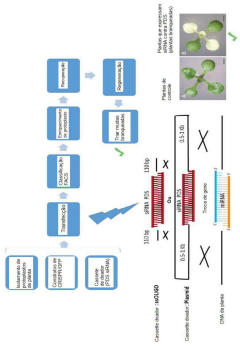
(72) Inventor(es): MAORI, EYAL; GALANTY, YARON; PIGNOCCHI, CRISTINA; CHAPARRO GARCIA, ANGELA; MEIR, OFIR.

(86) Pedido PCT: PCT IB2018057160 de 18/09/2018

(87) Publicação PCT: WO WO/2019/058255 de 28/03/2019

(85) Data da Fase Nacional: 18/03/2020

(57) Resumo: MODIFICAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE MOLÉCULAS DE RNA NÃO CODIFICANTE DE PLANTAS PARA SILENCIAR EXPRESSÃO GÊNICA, por meio de método aplicado a um gene que codifica ou é processado em uma molécula de RNA não codificante que não possui atividade de silenciamento de RNA em uma célula vegetal. O método compreende a introdução na célula vegetal de um agente de edição de DNA que confere uma especificidade de silenciamento da molécula de RNA não codificante em relação a um RNA alvo de interesse. Também é divulgado um método de modificação de um gene que codifica ou é processado uma molécula de silenciamento de RNA em uma célula vegetal. O método compreende a introdução na célula da planta de um agente de edição de DNA que redireciona a especificidade de silenciamento da molécula de RNA não codificante em direção a um RNA alvo de interesse. Células vegetais, sementes vegetais, plantas e métodos de geração de plantas também são divulgados.



“MODIFICAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE MOLÉCULAS DE RNA NÃO CODIFICANTE DE PLANTAS PARA SILENCIAR EXPRESSÃO GÊNICA”

CAMPO E FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção, em algumas modalidades da mesma, refere-se à modificação de genes que codificam ou são processados em moléculas de RNA não codificantes, incluindo moléculas de silenciamento de RNA e, mais particularmente, mas não exclusivamente, ao uso das mesmas para silenciar a expressão de genes alvo endógenos ou exógenos de interesse em plantas.

[002] O silenciamento de RNA ou a interferência de RNA (RNAi), o mecanismo de regulação genética co- ou pós-transcricional endógeno no qual as moléculas de RNA inibem a expressão ou tradução de genes, geralmente é mediado por moléculas de RNA não codificantes, incluindo microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs de interferência (siRNAs), siRNA de ação trans (ta-siRNA), RNAs que interagem com piwi (piRNA), RNA anti-sentido, etc. Recentemente, RNAs não codificantes adicionais foram implicados para abrigar uma atividade de silenciamento de RNA, incluindo RNA de transferência (tRNA), pequeno RNA nuclear (snoRNA), pequeno RNA nucleolar (snoRNA) e RNA derivado de repetição. Essas moléculas de silenciamento de RNA canônicas e não canônicas diferem em seus substratos, biogênese, proteínas efetoras e modos de infrarregulação do alvo.

[003] Além disso, as proteínas Argonaute, em complexos com pequenos RNAs, formam o núcleo do complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), o complexo efetor de interferência de RNA (RNAi). A superfamília Argonaute segregou em dois clados, denominados Ago e Piwi. Agoproteínas (por exemplo, Ago1 e Ago2) tipicamente complexam com miRNAs e siRNAs, enquanto as proteínas Piwi (por exemplo, Piwi, Ago3 e Aubergine (Aub)) tipicamente complexam com piRNA.

[004] Pequenos RNAs interferentes (siRNAs) são

moléculas de RNA de fita dupla com 20 a 25 nucleotídeos (nt) de comprimento, que interferem na expressão de genes específicos com sequências nucleotídicas complementares, degradando seu transcrito durante ou após a transcrição, resultando em nenhuma tradução.

[005] Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes endógenos (ncRNAs) de 20 a 24 nt de comprimento, originários de longos precursores auto-complementares. Os miRNAs maduros regulam a expressão gênica de duas maneiras; (i) inibindo a tradução ou (ii) degradando mRNAs codificantes por complemento perfeito ou quase perfeito com a transcrição alvo. A maioria dos mRNAs alvo da planta contém um único local complementar ao miRNA, o que resulta no fato de os mRNAs alvo serem clivados e degradados pela molécula de silenciamento de RNA e pelo mecanismo de decomposição do RNA.

[006] Os RNAs que interagem com Piwi (piRNAs) são pequenos RNAs não codificantes, que são o produto de moléculas precursoras longas de fita única e que são gerados sem uma etapa de corte (*dicing*). Os piRNAs têm tipicamente 26 a 31 nt de comprimento e são principalmente anti-sentido. Os piRNAs formam complexos RNA-proteína através de interações com proteínas Piwi. Os piRNAs anti-sentido são normalmente carregados no Piwi ou Aub.

[007] O siRNA de transação (tasiRNA) é uma classe de pequeno RNA interferente (siRNA) que reprime a expressão gênica por meio do silenciamento gênico pós-transcricional. Sua biogênese é iniciada pela associação de miRNAs a precursores de tasiRNA, que recruta RNA-polimerases dependentes de RNA (RdRp) que sintetizam dsRNA do modelo precursor de tasiRNA. Em seguida, esse dsRNA é processado por DICER-LIKE 4 (DCL4) em intervalos de 21 nucleotídeos “em fase” de tasiRNAs maduros.

[008] Avanços recentes nas técnicas de edição de genoma tornaram possível alterar as sequências de DNA nas células vivas.

Editando apenas alguns dos bilhões de nucleotídeos nas células das plantas, essas novas técnicas podem ser a maneira mais eficaz de fazer com que as culturas cresçam melhor em climas adversos (desempenho das culturas e estresse abiótico) e aumentem a resistência ao estresse biótico (insetos, vírus, bactérias, besouros, nematóides etc.). Existem abordagens limitadas para obter resistência a pragas usando tecnologias de edição de genoma, como CRISPR/Cas9: knock-out de genes suscetíveis a plantas (como os conhecidos genes MLO), através da introdução de códons de parada, mudanças de estrutura, inserções, deleções etc.; ou suprarregulação dos genes de resistência, como os genes R, pela modificação de elementos reguladores, como promotores, locais de ligação ao microRNA etc. No entanto, abordagens que visam especificamente o patógeno são limitadas a aplicações transgênicas de CRISPR.

[009] Trabalhos anteriores sobre edição de genoma de moléculas de RNA em vários organismos (por exemplo, murinos, humanos, camarões, plantas), focados em eliminar a atividade do miRNA ou alterar seu local de ligação nos RNAs alvo, por exemplo:

[010] Zhao *et al*., [Zhao *et al*., *Scientific Reports* (2014) 4: 3943] forneceram uma estratégia de inibição de miRNA empregando o sistema CRISPR em células murinas. Zhao usou um gRNAs projetado especificamente para cortar um gene de miRNA em um único local por Cas9, resultando em knockdown do miRNA em células murinas.

[011] Jiang *et al*. [Jiang *et al*., *RNA Biology* (2014) 11 (10): 1243-9] usaram CRISPR/Cas9 para esgotar o miR-93 humano de um cluster, visando sua região 5' nas células HeLa. Várias indels pequenas foram induzidas na região alvo que contém o local de processamento de Drosha (ou seja, a posição em que Drosha, uma enzima RNase III específica de RNA de fita dupla, se liga, cliva e, assim, processa miRNAs primários (pri-miRNAs) em pré-miRNA no núcleo de uma célula hospedeira) e sequências de sementes

(isto é, as sequências heptamétricas conservadas que são essenciais para a ligação do miRNA ao mRNA, tipicamente situadas nas posições 2-7 da extremidade 5' do miRNA). De acordo com Jiang *et al*. mesmo uma única deleção de nucleotídeo levou ao knockout completo do miRNA alvo com alta especificidade.

[012] No que diz respeito à edição do genoma da planta, Bortesi e Fischer [Bortesi e Fischer, *Biotechnology Advances* (2015) 33: 41–52] discutiram o uso da tecnologia CRISPR-Cas9 em plantas em comparação com ZFNs e TALENs e Basak e Nithin [Basak e Nithin, *Front Plant Sci*. (2015) 6: 1001] demonstraram o uso da tecnologia CRISPR-Cas9 para derrubar genes de codificação de proteínas em plantas-modelo como *Arabidopsis* e tabaco e culturas como trigo, milho e arroz.

[013] Além da interrupção da atividade do miRNA ou dos locais de ligação ao alvo, foi utilizado o silenciamento de genes usando silenciamento de genes de microRNAs artificiais (amiRNAs) de genes alvo endógenos e exógenos [Tiwari *et al*. *Plant Mol Biol* (2014) 86: 1]. Semelhante aos microRNAs, os amiRNAs são de fita única, com aproximadamente 21 nt de comprimento, e projetados substituindo as sequências maduras de miRNA do duplex nos pré-miRNAs [Tiwari *et al*. (2014) supra]. Esses amiRNAs são introduzidos como um transgene dentro de um cassete de expressão artificial (incluindo um promotor, terminador etc.) [Carbonell *et al*., *Plant Physiology* (2014) pp.113.234989], são processados através de biogênese de pequeno RNA e mecanismos de silenciamento e infrarregulação da expressão do alvo. De acordo com Schwab *et al*. [Schwab *et al*. *The Plant Cell* (2006) vol. 18, 1121-1133], os amiRNAs são ativos quando expressos sob promotores específicos de tecidos ou induzíveis e podem ser usados para silenciar genes específicos em plantas, especialmente quando vários genes-alvo relacionados, mas não idênticos, precisam ser infrarregulados.

[014] Senis *et al*. [Senis *et al*., *Nucleic Acids Research*

(2017) vol. 45(1): e3] divulgam a engenharia de um amiRNA anti-viral sem promotor em um locus de miRNA endógeno. Especificamente, Senis *et al*. inseriram um transgene precursor de amiRNA (pri-amiRNA em grampo de cabelo (hairpin)) adjacente a um gene de miRNA de ocorrência natural (por exemplo, miR122) por recombinação de DNA direcionada por homologia que é induzida por nuclease específica de sequência, como Cas9 ou TALEN. Essa abordagem utiliza amiRNAs livres de promotor e terminador, utilizando DNA transcricionalmente ativo que expressa miRNA natural (miR122), ou seja, o promotor endógeno e o terminador dirigiram e regularam a transcrição do transgene amiRNA inserido.

[015] Vários métodos sem DNA de introdução de RNA e/ou proteínas nas células foram descritos anteriormente. Por exemplo, a transfecção de RNA usando eletroporação e lipofecção foi descrita no Pedido de Patente US No. 20160289675. A entrega direta de complexos de ribonucleoproteína Cas9/gRNA (RNP) às células por microinjeção de complexos de proteína Cas9 e gRNA foi descrita por Cho [Cho *et al*., “Heritable gene knockout in Caenorhabditis elegans by direct injection of Cas9-sgRNA ribonucleoproteins”, *Genetics* (2013) 195: 1177-1180]. A entrega de complexos de proteína Cas9/gRNA por eletroporação foi descrita por Kim [Kim *et al*., “Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins” *Genome Res.* (2014) 24: 1012-1019]. A entrega de complexos de gRNA associados à proteína Cas9 via lipossomos foi relatada por Zuris [Zuris *et al*., “Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*” *Nat Biotechnol.* (2014) doi: 10.1038/nbt.3081].

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[016] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um método para modificar um gene que codifica ou processado em uma molécula de RNA não codificante

que não possui atividade de silenciamento de RNA em uma célula vegetal, o método compreendendo a introdução na célula vegetal de um agente de edição de DNA que confere uma especificidade de silenciamento da molécula de RNA não codificante para um RNA alvo de interesse, modificando assim o gene que codifica ou é processado na molécula de RNA não codificante.

[017] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um método para modificar um gene que codifica ou processado em uma molécula de RNA não codificante que não possui atividade de silenciamento de RNA em uma célula vegetal, o método compreendendo a introdução na célula vegetal de um agente de edição de DNA que confere uma especificidade de silenciamento da molécula de RNA não codificante para um RNA alvo de interesse.

[018] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um método para modificar um gene que codifica ou processado em uma molécula de silenciamento de RNA para um RNA alvo em uma célula vegetal, compreendendo o método a introdução na célula vegetal de um agente de edição de DNA que redireciona uma especificidade de silenciamento da molécula de silenciamento de RNA para um segundo RNA alvo, sendo o RNA alvo e o segundo RNA alvo distintos, modificando assim o gene que codifica a molécula de silenciamento de RNA.

[019] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um método para modificar um gene que codifica ou processado em uma molécula de silenciamento de RNA para um RNA alvo em uma célula vegetal, compreendendo o método a introdução na célula vegetal de um agente de edição de DNA que redireciona uma especificidade de silenciamento da molécula de silenciamento de RNA para um segundo RNA alvo, sendo o RNA alvo e o segundo RNA alvo distintos.

[020] De acordo com um aspecto de algumas

modalidades da presente invenção, é fornecida uma célula vegetal gerada de acordo com o método de algumas modalidades da invenção.

[021] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecida uma planta compreendendo a célula vegetal de algumas modalidades da invenção.

[022] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um método para produzir uma planta com expressão reduzida de um gene alvo, o método compreendendo: (a) cultivar a planta de algumas modalidades da invenção; e (b) selecionar as plantas da progênie que tenham expressão reduzida do RNA alvo de interesse ou o segundo RNA alvo, ou progênie que compreenda uma especificidade de silenciamento na molécula de RNA não codificante em relação a um RNA alvo de interesse e que não compreendem o agente de edição de DNA, produzindo assim a planta com expressão reduzida de um gene alvo.

[023] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um método para gerar uma planta com tolerância a estresse aumentada, rendimento aumentado, taxa de crescimento aumentada ou qualidade de rendimento aumentada, compreendendo o método a modificação de um gene que codifica ou processado em uma molécula de RNA não codificante ou em uma molécula de silenciamento de RNA em uma célula vegetal de acordo com algumas modalidades da invenção, em que o RNA alvo de interesse é de um gene da planta que confere sensibilidade ao estresse, diminuição do rendimento, diminuição da taxa de crescimento ou diminuição da qualidade do rendimento, gerando assim a planta.

[024] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um método para gerar uma planta resistente ou tolerante a patógenos, o método compreendendo a modificação de um gene que codifica ou processado em uma molécula de RNA

não codificante ou uma molécula de silenciamento de RNA em um célula vegetal de acordo com algumas modalidades da invenção, em que o RNA alvo de interesse é de um gene da planta que confere sensibilidade ao patógeno, gerando desse modo a planta resistente ou tolerante a patógenos.

[025] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um método para gerar uma planta resistente ou tolerante a patógenos, o método compreendendo a modificação de um gene que codifica ou processado em uma molécula de RNA não codificante ou uma molécula de silenciamento de RNA em um célula vegetal de acordo com algumas modalidades da invenção, em que o RNA alvo de interesse é de um gene do patógeno, gerando desse modo a planta resistente ou tolerante a patógenos.

[026] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um método para gerar uma planta resistente ou tolerante a pragas, o método compreendendo a modificação de um gene que codifica ou processado em uma molécula de RNA não codificante ou uma molécula de silenciamento de RNA em um célula vegetal de acordo com algumas modalidades da invenção, em que o RNA alvo de interesse é de um gene da praga, gerando desse modo a planta resistente ou tolerante a pragas.

[027] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um método para gerar uma planta resistente ou tolerante a pragas, o método compreendendo a modificação de um gene que codifica ou processado em uma molécula de RNA não codificante ou uma molécula de silenciamento de RNA em um célula vegetal de acordo com algumas modalidades da invenção, em que o RNA alvo de interesse é de um gene da planta que confere sensibilidade à praga, gerando desse modo a planta resistente ou tolerante a pragas.

[028] De acordo com um aspecto de algumas

modalidades da presente invenção, é fornecido um método para gerar uma planta resistente a herbicidas, o método compreendendo a modificação de um gene que codifica ou processado em uma molécula de RNA não codificante ou uma molécula de silenciamento de RNA em um célula vegetal de acordo com algumas modalidades da invenção, em que o RNA alvo de interesse é de um gene da planta que confere sensibilidade ao herbicida, gerando desse modo a planta resistente a herbicidas.

[029] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecida uma planta gerada de acordo com o método de algumas modalidades da invenção.

[030] De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecida uma semente da planta de algumas modalidades da invenção.

[031] De acordo com algumas modalidades da invenção, o gene que codifica ou processa a molécula de RNA não codificante é endógeno para a célula da planta.

[032] De acordo com algumas modalidades da invenção, o gene que codifica a molécula de silenciamento de RNA é endógeno para a célula vegetal.

[033] De acordo com algumas modalidades da invenção, a modificação do gene que codifica ou processa a molécula de RNA não codificante compreende transmitir a molécula de RNA não codificante com pelo menos 45% de complementaridade em relação ao RNA alvo de interesse.

[034] De acordo com algumas modalidades da invenção, a modificação do gene que codifica a molécula de silenciamento de RNA compreende transmitir a molécula de silenciamento de RNA com pelo menos 45% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo.

[035] De acordo com algumas modalidades da invenção,

a especificidade de silenciamento da molécula de RNA não codificante é determinada medindo um nível de RNA ou proteína do RNA alvo de interesse.

[036] De acordo com algumas modalidades da invenção, a especificidade de silenciamento da molécula de silenciamento de RNA é determinada medindo um nível de RNA do segundo RNA alvo.

[037] De acordo com algumas modalidades da invenção, a especificidade de silenciamento da molécula de RNA não codificante ou da molécula de silenciamento de RNA é determinada fenotipicamente.

[038] De acordo com algumas modalidades da invenção, a determinação de fenótipo é efetuada pela determinação de pelo menos um fenótipo de planta selecionado do grupo que consiste em plantar uma coloração de folhas, uma coloração de flores, uma taxa de crescimento, um tamanho de planta, um rendimento de culturas, uma característica de fruto, uma resistência ao estresse biótico e uma resistência ao estresse abiótico.

[039] De acordo com algumas modalidades da invenção, a especificidade de silenciamento da molécula de RNA não codificante é determinada genotipicamente.

[040] De acordo com algumas modalidades da invenção, o fenótipo da planta é determinado antes do genótipo da planta.

[041] De acordo com algumas modalidades da invenção, o genótipo da planta é determinado antes de um fenótipo da planta.

[042] De acordo com algumas modalidades da invenção, a molécula de RNA não codificante ou a molécula de silenciamento de RNA é processada a partir de um precursor.

[043] De acordo com algumas modalidades da invenção, a molécula de RNA não codificante ou a molécula de silenciamento de RNA é uma molécula de interferência de RNA (RNAi).

[044] De acordo com algumas modalidades da invenção, a

molécula de RNAi é selecionada do grupo que consiste em um pequeno RNA interferente (siRNA), um RNA de grampo de cabelo curto (shRNA), um microRNA (miRNA), um RNA que interage com Piwi (piRNA) e siRNA de transação (tasiRNA).

[045] De acordo com algumas modalidades da invenção, a molécula de RNA não codificante é selecionada do grupo que consiste em um pequeno RNA nuclear (snRNA), um pequeno RNA nucleolar (snoRNA), um RNA não codificante longo (lncRNA), um RNA ribossômico (rRNA), RNA de transferência (tRNA), um RNA derivado de repetição e um RNA de elemento transponível.

[046] De acordo com algumas modalidades da invenção, a molécula de RNA ou molécula de RNAi é projetada de modo que uma sequência da molécula de RNAi seja modificada para preservar a originalidade da estrutura e ser reconhecida por fatores celulares de RNAi.

[047] De acordo com algumas modalidades da invenção, a modificação do gene é efetuada por uma modificação selecionada do grupo que consiste em uma deleção, uma inserção, uma mutação pontual e uma combinação dos mesmos.

[048] De acordo com algumas modalidades da invenção, a modificação está em uma região-tronco da molécula de RNA não codificante ou da molécula de silenciamento de RNA.

[049] De acordo com algumas modalidades da invenção, a modificação está em uma região de laço da molécula de RNA não codificante ou da molécula de silenciamento de RNA.

[050] De acordo com algumas modalidades da invenção, a modificação está em uma região não estruturada da molécula de RNA não codificante ou da molécula de silenciamento de RNA.

[051] De acordo com algumas modalidades da invenção, a modificação está em uma região-tronco e uma região de laço da molécula de

RNA não codificante ou da molécula de silenciamento de RNA.

[052] De acordo com algumas modalidades da invenção, a modificação está em uma região-tronco e uma região de laço e em uma região não estruturada da molécula de RNA não codificante ou da molécula de silenciamento de RNA.

[053] De acordo com algumas modalidades da invenção, a modificação é uma inserção.

[054] De acordo com algumas modalidades da invenção, a modificação é uma deleção.

[055] De acordo com algumas modalidades da invenção, a modificação é uma mutação pontual.

[056] De acordo com algumas modalidades da invenção, a modificação compreende uma modificação de no máximo 200 nucleotídeos.

[057] De acordo com algumas modalidades da invenção, o método compreende ainda a introdução dos oligonucleotídeos doadores nas células vegetais.

[058] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA compreende pelo menos um gRNA operacionalmente ligado a um promotor expressável por planta.

[059] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA não compreende uma endonuclease.

[060] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA compreende uma endonuclease.

[061] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA é de um sistema de edição de DNA selecionado do grupo que consiste em uma meganuclease, uma nuclease de dedo de zinco (ZFN), um ativador de transcrição como nuclease efetora (TALEN) e CRISPR.

[062] De acordo com algumas modalidades da invenção, a endonuclease compreende Cas9.

[063] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA é aplicado à célula como DNA, RNA ou RNP.

[064] De acordo com algumas modalidades da invenção, o agente de edição de DNA está ligado a um repórter para monitorar a expressão em uma célula vegetal.

[065] De acordo com algumas modalidades da invenção, o repórter é uma proteína fluorescente.

[066] De acordo com algumas modalidades da invenção, o RNA alvo de interesse ou o segundo RNA alvo é endógeno à célula vegetal.

[067] De acordo com algumas modalidades da invenção, o RNA alvo de interesse ou o segundo RNA alvo é exógeno à célula vegetal.

[068] De acordo com algumas modalidades da invenção, a célula vegetal é um protoplasto.

[069] De acordo com algumas modalidades da invenção, a criação compreende cruzamento ou autopolinização.

[070] De acordo com algumas modalidades da invenção, a planta é não geneticamente modificada (sem GMO).

[071] De acordo com algumas modalidades da invenção, a planta é selecionada do grupo que consiste em uma planta de colheita, uma flor e uma árvore.

[072] A menos que definidos de outra maneira, todos os termos técnicos e/ou científicos usados neste documento têm o mesmo significado que compreendido geralmente por alguém versado na técnica a qual esta invenção pertence. Embora os métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos neste documento possam ser usados na prática ou

teste das modalidades da invenção, métodos e/ou materiais exemplificativos adequados são descritos a seguir. Em caso de conflito, o relatório descritivo, incluindo definições, servirá de base para controle. Adicionalmente, os materiais, métodos e exemplos são apenas ilustrativos e não pretendem ser necessariamente limitantes.

BREVE DESCRIÇÃO DAS VÁRIAS VISTAS DOS DESENHOS

[073] Algumas modalidades da invenção são descritas neste documento, a título de exemplo apenas, com referência às figuras em anexo. Com referência específica agora aos desenhos em detalhe, salienta-se que as particularidades mostradas são a título de exemplo e com o propósito de discussão ilustrativa de modalidades da invenção. A este respeito, a descrição juntamente com os desenhos torna evidente para as pessoas versadas na técnica como as modalidades da invenção podem ser praticadas.

Nos desenhos

[074] A Figura 1 é um fluxograma da modalidade da substituição por silenciamento de gene induzido por edição de genoma (GEiGS) do miRNA endógeno por siRNA direcionado ao gene PDS, induzindo assim o silenciamento genético do gene PDS endógeno. Para introduzir a modificação, um sistema de 2 componentes está sendo usado. Primeiro, um sistema CRISPR/CAS9, em um vetor contendo GFP, gera uma clivagem nos locais escolhidos, por meio de RNAs guia específicos projetados para promover o reparo homólogo do DNA (HDR) no local. Segundo, uma sequência DONOR, com a modificação desejada da sequência miRNA, para direcionar os genes recentemente designados, é introduzida como um modelo para o HDR. Este sistema está sendo usado na transformação de protoplastos, enriquecido por FACS devido ao sinal GFP no vetor CRISPR/CAS9, recuperado e regenerado para as plantas.

[075] As Figuras 2A-C são fotografias que ilustram que o

silenciamento do gene PDS causa fotodegradação. O silenciamento do gene PDS nas plantas *Nicotiana* (Figuras 2A-B) e *Arabidopsis* (Figura 2C) causa fotodegradação em *N. benthamiana* (Figura 2B) e *Arabidopsis* (Figura 2C, lado direito). As fotografias foram tiradas três semanas e meia após o silenciamento do PDS.

[076] Figura 3A-D são fotografias de derrubada dos níveis de expressão de GFP em *Arabidopsis* usando GEiGS. Os protoplastos de *Arabidopsis* que expressam GFP são ilustrados como controle (Figuras 3A-B) em comparação com protoplastos editados usando GEiGS para expressar o siRNA de GFP (Figuras 3C-D). De notar, os protoplastos ou plantas GEiGS são silenciados para expressão da proteína GFP.

[077] Figura 4 é um fluxograma da modalidade da substituição GEiGS de miRNA endógeno por siRNA visando GFP, gerando plantas de *Arabidopsis* com RNAi ativo contra GFP. Para introduzir a modificação, um sistema CRISPR/CAS9, em um vetor contendo GFP, gera uma clivagem nos locais escolhidos, por meio de RNAs guia específicos projetados para promover o reparo homólogo do DNA (HDR) no local. Segundo, uma sequência DONOR, com a modificação desejada da sequência miRNA, para direcionar os genes recentemente designados, é introduzida como um modelo para o HDR. Este sistema está sendo usado em protoplastos que expressam GFP. O enriquecimento de células putativamente modificadas por FACS devido ao sinal de RFP no vetor CRISPR/CAS9 está sendo realizado e recuperado. As plantas regeneradas estão sendo analisadas quanto à intensidade do sinal GFP.

[078] Figura 5 é um fluxograma de modalidade da substituição GEiGS de miRNA endógeno por siRNA direcionado a GFP, gerando plantas de *Arabidopsis* com RNAi dirigido por GEiGS contra GFP. Deve ser notado que as plantas GEiGS são silenciadas para expressão de GFP após a transformação da planta. A RFP está sendo usada para o enriquecimento de células com presença transitória do vetor CRISPR/CAS9.

[079] A Figura 6 é um fluxograma da modalidade da substituição GEiGS do miRNA endógeno pelo siRNA direcionado à GFP, gerando plantas resistentes à infecção viral, por exemplo, infecção por TMV (isto é, gene exógeno). A RFP está sendo usada para o enriquecimento de células com presença transitória do vetor CRISPR/CAS9.

[080] A Figura 7 é uma fotografia de um conjunto de bananeiras que sofrem da doença de Toppling causada pelo nemátodo escavador, *Radopholus similis*.

[081] A Figura 8 é uma tabela que ilustra a ocorrência de *Radopholus similis* e *Pratylenchus coffeae* em diferentes culturas na área de Tay Nguyen.

[082] A Figura 9 é um fluxograma da modalidade de segmentação de instruções (“pipeline”) computacional para gerar modelos GEiGS. A segmentação de instruções GEiGS computacional aplica metadados biológicos e permite a geração automática de modelos de doadores de DNA GEiGS que são usados para editar minimamente genes de RNA não codificantes endógenos (por exemplo, genes miRNA), levando a um novo ganho de função, ou seja, redirecionando sua capacidade de silenciamento para expressão do gene alvo de interesse.

[083] Figura 10 é um fluxograma da modalidade que ilustra o projeto de plantas resistentes a pragas tendo como alvo qualquer gene de praga exógeno desejado. Substituição GEiGS do miRNA endógeno pelo siRNA direcionado ao gene essencial de patógeno/praga, gerando plantas resistentes à infecção por patógeno/praga.

[084] Figura 11 é um desenho de modalidade ilustrando os principais estágios necessários para projetar a molécula de silenciamento de RNA e com bases genéticas de miRNA minimamente editadas.

[085] As Figuras 12A-G ilustram transcritos primários da

estrutura miR-390 e miR390- modificada e sequências direcionadas. Representação da estrutura secundária dos transcritos primários do miR390 e suas versões modificadas - (Figura 12A) do tipo selvagem; (Figuras 12B-C) versão modificada para atingir GFP; (Figuras 12D-E) versão modificada para atingir AtPDS3; (Figuras 12F-G) versão modificada para atingir AtADH1. Os miRNAs/siRNAs maduros são destacados em vermelho, exibindo a conservação da estrutura através do design. As regiões alvo para manipulação pelo sistema CRISPR/CAS9 são descritas em roxo e a sequência NGG é destacada em amarelo (Figura 12A).

[086] As Figuras 13A-G ilustram transcritos primários de miR-173 e estrutura miR173- modificada e sequências alvo. Representação da estrutura secundária dos transcritos primários do miR173 e suas versões modificadas - (Figura 13A) do tipo selvagem; (Figuras 13B-C) versão modificada para atingir GFP; (Figura 13D-E) versão modificada para atingir o AtPDS3; (Figura 13F-G) versão modificada para atingir o AtADH1. Os miRNAs/siRNAs maduros são destacados em vermelho, exibindo a conservação da estrutura através do design. As regiões alvo para manipulação pelo sistema CRISPR/CAS9 são descritas em roxo e a sequência NGG é destacada em amarelo (Figura 13A).

[087] Figura 13H ilustra exemplos de modalidades de projetos de oligo GEiGS nos quais a estrutura precursora não desempenha um papel na biogênese, portanto, não é necessário que seja mantida. Projeto baseado no Brassica rapa bnTAS3B tasiRNA. De cima para baixo: tasiRNA do tipo selvagem, o projeto de GEiGS com alterações mínimas na sequência e o projeto de GEiGS com alterações máximas na sequência. As seleções de precursores de RNA não codificantes que dão origem a pequenas moléculas de RNA maduras são destacadas em verde. As diferenças de sequência entre os oligos GEiGS e a sequência do tipo selvagem são destacadas em vermelho. É importante notar que a biogênese do tasiRNA, diferentemente dos miRNAs e tRNAs, não depende da estrutura secundária precursora.

[088] As Figuras 14A-D ilustram o direcionamento de genes por miR-173 e suas versões modificadas. (Figura 14A) O miR-173 de tipo selvagem tem como alvo o transcrito de TAS1c por complementaridade de sequência do miRNA maduro com uma sequência no gene (em vermelho). Os miRNAs recém-modificados (SWAPs 1, 2, 3, 4, 9 e 10) foram projetados para serem direcionados a (Figura 14B) GFP, (Figura 14C) AtPDS3 e (Figura 14D) AtADH1 por complementaridade de sequência à sua sequência (em vermelho). Os nucleotídeos modificados da sequência de tipo selvagem são escritos em minúsculas.

[089] As Figuras 15A-D ilustram o direcionamento de genes por miR-390 e suas versões modificadas. (Figura 15A) O miR-390 de tipo selvagem tem como alvo o transcrito de TAS3 por complementaridade de sequência do miRNA maduro com uma sequência no gene (em vermelho). Os miRNAs recém-modificados (SWAPs 5, 6, 7, 8, 11 e 12) foram projetados para serem direcionados a (Figura 15B) GFP, (Figura 15C) AtPDS3 e (Figura 15D) AtADH1 por complementaridade de sequência à sua sequência (em vermelho). Os nucleotídeos modificados da sequência de tipo selvagem são escritos em minúsculas.

[090] Figura 16 ilustra o fenótipo/genótipo PDS3: as plantas fenotípicas branqueadas foram selecionadas e genotipadas através de PCR de amplicon interno seguido de análise de digestão por restrição com BtsαI (NEB) para verificar a presença do doador versus a sequência do tipo selvagem. Pista 1: Plantas tratadas com NO DONOR, restrito, Pistas 2-4: plantas tratadas com PDS3 contendo DONOR restrito, Pista 5: Controle positivo de plasmídeo DONOR irrestrito, Pista 6: Controle de água sem modelo, Pista 7: Plasmídeo positivo DONOR restrito, Pista 8: Plantas bombardeadas com DONOR negativo restrito, Faixa 9: Plantas de controle não tratadas restritas. A amplificação por PCR externa subsequente do amplicon foi processada e sequenciada para validar a inserção.

[091] A Figura 17 ilustra o fenótipo/genótipo ADH1: As plantas foram selecionadas através da resistência ao álcool alílico e

genotipadas através de PCR de amplicon interno seguido de digestão com restrição BccI (NEB) para verificar a presença do doador. Pista 1: Planta de controle sensível ao álcool alílico restrita, Pista 2-4: Plantas resistentes ao álcool alílico contendo DONOR restrito, Pista 5: Controle DONOR do plasmídeo positivo irrestrito, Pista 6: sem controle de modelo, Pista 7: Plasmídeo positivo restrito a DONOR, Pista 8: Planta bombardeada com DONOR não específico restrito, Pista 9: controle não tratado com álcool alílico restrito.

[092] Figura 18 é um gráfico que ilustra a análise da expressão gênica na planta modificada com miR-173 direcionada ao transcrito de AtPDS3. A análise da expressão de AtPDS3 foi realizada através do qRT-PCR, na regeneração de plantas bombardeadas com GEiGS#4 e SWAP3 em comparação com plantas bombardeadas com GEiGS#5 e SWAP1 e 2 (GFP). É importante notar que, em média, foi observada uma redução de 82 % no nível de expressão gênica, quando o miR-173 foi modificado para serem direcionados a AtPDS3, em comparação com as plantas de controle (barras de erro apresentam DP; valor de $p < 0,01$ calculado para os valores de Ct).

[093] Figura 19 é um gráfico que ilustra a análise da expressão gênica na planta modificada com miR-390 direcionada ao transcrito de AtPDS3. A análise da expressão de AtADH1 foi realizada através do qRT-PCR, na regeneração de plantas bombardeadas com GEiGS#1 e SWAP11 em comparação com plantas bombardeadas com GEiGS#5 e SWAP1 e 2 (GFP). É importante notar que, em média, foi observada uma redução de 82 % no nível de expressão gênica, quando o miR-390 foi modificado para atingir o AtADH1, em comparação com as plantas de controle (as barras de erro representam SD; valor de $p < 0,01$ calculado nos valores de Ct).

DESCRIÇÃO DE MODALIDADES ESPECÍFICAS DA INVENÇÃO

[094] A presente invenção, em algumas modalidades da mesma, refere-se à modificação de genes que codificam ou são processados

em moléculas de RNA não codificantes, incluindo moléculas de silenciamento de RNA e, mais particularmente, mas não exclusivamente, ao uso das mesmas para silenciar o RNA alvo endógeno ou exógeno de interesse em plantas.

[095] Os princípios e operação da presente invenção podem ser mais bem compreendidos com referência aos desenhos e descrições anexas.

[096] Antes de explicar pelo menos uma modalidade da invenção em detalhes, deve-se entender que a invenção não é necessariamente limitada em sua aplicação aos detalhes estabelecidos na descrição a seguir ou exemplificados pelos exemplos. A invenção é capaz de outras modalidades ou de ser praticada ou realizada em várias maneiras. Além disso, deve ser entendido que a fraseologia e terminologia aqui empregadas são para fins de descrição e não devem ser consideradas limitativas.

[097] Trabalhos anteriores sobre edição de genoma de moléculas de RNA em vários organismos (por exemplo, murinos, humanos, plantas), focados na interrupção da atividade do miRNA ou em locais de ligação ao alvo usando a transgênese. A edição do genoma em plantas concentrou-se ainda mais no uso da tecnologia CRISPR-Cas9, ZFNs e TALENs, para derrubar genes ou inserções em plantas modelo. Além disso, foram descritos os silenciamentos de genes em plantas usando transgenes de microRNAs artificiais para silenciar genes alvo endógenos e exógenos [Molnar A *et al.* Plant J. (2009) 58(1): 165-74. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03767.x. Epub 19 de janeiro de 2009; Borges e Martienssen, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*| AOP, publicado on-line em 4 de novembro de 2015; doi: 10.1038/nrm4085]. Os transgenes de miRNAs artificiais são introduzidos nas células vegetais dentro de um cassete de expressão artificial (incluindo um promotor, terminador, marcador de seleção etc.) e infrarregulam a expressão do alvo.

[098] Ao reduzir a presente invenção à prática, os

presentes inventores desenvolveram uma tecnologia de edição de genes direcionada a moléculas de RNA não codificantes (por exemplo, endógenas) projetadas para atingir e interferir com um gene alvo não natural de interesse (endógeno ou exógeno para a célula vegetal). A tecnologia de edição de genes aqui descrita não implementa as ferramentas genéticas moleculares e transgênicas clássicas que compreendem cassetes de expressão que possuem um promotor, terminador, marcador de seleção.

[099] Como é mostrado aqui abaixo e na seção de exemplos a seguir, os presentes inventores projetaram uma plataforma de Silenciamento Genético Induzido por Edição de Genoma (GEiGS) capaz de utilizar moléculas de RNA não codificante endógenas de uma célula vegetal, incluindo, por exemplo, moléculas de silenciamento de RNA (por exemplo, siRNA, miRNA, piRNA, tasiRNA, tRNA, rRNA, RNA anti-sentido, snRNA, snoRNA etc.) e modificá-los para atingir e regular negativamente qualquer alvo de RNA de interesse (ver Fluxograma exemplar na Figura 1). Usando o GEiGS, o presente método permite a triagem de possíveis moléculas de RNA não codificante, editando nucleotídeos nessas moléculas de RNA endógenas e, assim, redirecionando sua especificidade para serem direcionados a, e suprarregular de maneira eficaz e específica, qualquer RNA de interesse, incluindo RNA codificado endógeno e/ou exógeno por patógenos e pragas (ver Fluxograma exemplar na Figura 9). Em conjunto, o GEiGS pode ser utilizado como uma nova tecnologia não-GMO para aumentar o rendimento das culturas, a taxa de crescimento das culturas, a qualidade das culturas bem como para a proteção das culturas contra o estresse, patógenos, pragas e herbicidas.

[100] Portanto, de acordo com um aspecto da invenção, é fornecido um método para modificar um gene que codifica ou processado em uma molécula de RNA não codificante que não possui atividade de silenciamento de RNA em uma célula vegetal, o método compreendendo a introdução na célula vegetal de um agente de edição de DNA que confere uma

especificidade de silenciamento da molécula de RNA não codificante para um RNA alvo de interesse, modificando assim o gene que codifica ou é processado na molécula de RNA não codificante.

[101] De acordo com um outro aspecto da invenção, é fornecido um método para modificar um gene que codifica ou processado em uma molécula de silenciamento de RNA para um RNA alvo em uma célula vegetal, compreendendo o método a introdução na célula vegetal de um agente de edição de DNA que redireciona a especificidade da molécula de silenciamento de RNA para um segundo RNA alvo, sendo o RNA alvo e o segundo RNA alvo distintos, modificando assim o gene que codifica a molécula de silenciamento de RNA.

[102] O termo “planta”, conforme usado neste documento, abrange plantas inteiras, uma planta enxertada, ancestrais e descendentes das plantas e partes de plantas, incluindo sementes, brotos, caules, raízes (incluindo tubérculos), porta-enxerto, enxerto e células vegetais, tecidos e órgãos. A planta pode estar em qualquer forma, incluindo culturas em suspensão, embriões, regiões meristemáticas, tecido caloso, folhas, gametófitos, esporófitos, pólen e micrósporos. As plantas que podem ser úteis nos métodos da invenção incluem todas as plantas pertencentes à superfamília Viridiplantee, em particular plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas, incluindo leguminosas forrageiras, plantas ornamentais, culturas alimentares, árvores ou arbustos selecionados da lista que compreende Acacia spp., Acer spp., Actinidia spp., Aesculus spp., Agathis australis, Albizia amara, Alsophila tricolor, Andropogon spp., Arachis spp, Areca catechu, Astelia fragrans, Astragalus cicer, Baikiaea plurijuga, Betula spp., Brassica spp., Bruguiera gymnorrhiza, Burkea africana, Butea frondosa, Cadaba farinosa, Calliandra spp, Camellia sinensis, Canna indica, Capsicum spp., Cassia spp., Centroema pubescens, Chacoomeles spp., Cinnamomum cassia, Coffea arabica, Colophospermum mopane, Coronillia varia, Cotoneaster serotina, Crataegus spp., Cucumis spp., Cupressus spp., Cyathea dealbata, Cydonia oblonga,

Cryptomeria japonica, Cymbopogon spp., Cynthea dealbata, Cydonia oblonga, Dalbergia monetaria, Davallia divaricata, Desmodium spp., Dicksonia squarosa, Dibeteropogon amplectens, Dioclea spp, Dolichos spp., Dorycnium rectum, Echinochloa pyramidalis, Ehraffia spp., Eleusine coracana, Eragrestis spp., Erythrina spp., Eucalypfus spp., Euclea schimperi, Eulalia vi/losa, Pagopyrum spp., Feijoa sellowlana, Fragaria spp., Flemingia spp, Freycinetia banksli, Geranium thunbergii, GinAgo biloba, Glycine javanica, Gliricidia spp, Gossypium hirsutum, Grevillea spp., Guibourtia coleosperma, Hedysarum spp., Hemaffhia altissima, Heteropogon contoffus, Hordeum vulgare, Hyparrhenia rufa, Hypericum erectum, Hypeffhelia dissolute, Indigo incamata, Iris spp., Leptarrhena pyrolifolia, Lespediza spp., Lettuca spp., Leucaena leucocephala, Loudetia simplex, Lotonus bainesli, Lotus spp., Macrotyloma axillare, Malus spp., Manihot esculenta, Medicago saliva, Metasequoia glyptostroboides, Musa sapientum, banana, Nicotianum spp., Onobrychis spp., Ornithopus spp., Oryza spp., Peltophorum africanum, Pennisetum spp., Persea gratissima, Petunia spp., Phaseolus spp., Phoenix canariensis, Phormium cookianum, Photinia spp., Picea glauca, Pinus spp., Pisum sativam, Podocarpus totara, Pogonarthria fleckii, Pogonaffhria squarrosa, Populus spp., Prosopis cineraria, Pseudotsuga menziesii, Pterolobium stellatum, Pyrus communis, Quercus spp., Rhaphiolepsis umbellata, Rhopalostylis sapida, Rhus natalensis, Ribes grossularia, Ribes spp., Robinia pseudoacacia, Rosa spp., Rubus spp., Salix spp., Schyzachyrium sanguineum, Sciadopitys vefficillata, Sequoia sempervirens, Sequoiadendron giganteum, Sorghum bicolor, Spinacia spp., Sporobolus fimbriatus, Stiburus alopecuroides, Stylosanthos humilis, Tadehagi spp, Taxodium distichum, Themeda triandra, Trifolium spp., Triticum spp., Tsuga heterophylla, Vaccinium spp., Vicia spp., Vitis vinifera, Watsonia pyramidata, Zantedeschia aethiopica, Zea mays, amaranto, alcachofra, aspargo, brócolis, couve de Bruxelas, repolho, canola, cenoura, couve-flor, aipo, couve, linho, lentilha, colza, quiabo, cebola, batata, arroz, soja, palha, beterraba, cana de açúcar, girassol, tomate, chá de abóbora, árvores.

Alternativamente, algas e outras não-viridiplantae podem ser usadas para os métodos de algumas modalidades da invenção.

[103] De acordo com uma modalidade específica, a planta é uma planta de colheita, uma flor ou uma árvore.

[104] De acordo com uma modalidade específica, a planta é uma espécie lenhosa, por exemplo, Actinidia chinensis (Actinidiaceae), Manihotesculenta (Euphorbiaceae), Firiodendron tulipifera (Magnoliaceae), Populus (Salicaceae), Santalum album (Santalaceae), Ulmus (Ulmaceae) e espécies diferentes das Rosaceae (Malus, Prunus, Pyrus) e Rutaceae (Citrus, Microcitrus), Gymnospermae, por exemplo, Picea glauca e Pinus taeda, árvores da floresta (por exemplo, Betulaceae, Fagaceae, Gymnospermae e espécies de árvores tropicais), árvores frutíferas, arbustos ou ervas, por exemplo, (banana, cacau, coco, café, tâmara, uva e chá) e azeite de dendê.

[105] De acordo com uma modalidade específica, a planta é de uma planta de colheita tropical, por exemplo, café, macadâmia, banana, abacaxi, taro, mamão, manga, cevada, feijão, mandioca, grão de bico, cacau (chocolate), feijão-de-corda, milho, millet, arroz, sorgo, cana de açúcar, batata doce, tabaco, taro, chá, inhame.

[106] “Grão”, “semente” ou “feijão” refere-se à unidade de reprodução de uma planta com flores, capaz de se transformar em outra dessas plantas. Como usado aqui, os termos são usados como sinônimos e intercambiavelmente.

[107] De acordo com uma modalidade específica, a planta é uma célula vegetal, por exemplo, célula vegetal em uma suspensão de células embrionárias.

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

[109] Os protoplastos são derivados de qualquer tecido

vegetal, como por exemplo, frutas, flores, raízes, folhas, embriões, suspensão de células embrionárias, calos ou tecidos de mudas.

[110] Como aqui utilizado, o termo “molécula de RNA não codificante” refere-se a uma sequência de RNA que não é traduzida em uma sequência de aminoácidos e não codifica uma proteína.

[111] De acordo com uma modalidade, a molécula de RNA não codificante está tipicamente sujeita ao mecanismo ou atividade de processamento de silenciamento de RNA. No entanto, também aqui são contempladas algumas alterações nos nucleotídeos (por exemplo, para miRNA de até 24 nucleotídeos) que podem provocar um mecanismo de processamento que resulta em interferência de RNA ou inibição da tradução.

[112] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante é endógena (que ocorre naturalmente, por exemplo, nativa) à célula. Será apreciado que a molécula de RNA não codificante também pode ser exógena à célula (isto é, adicionada externamente e que não ocorre naturalmente na célula).

[113] De acordo com algumas modalidades, a molécula de RNA não codificante compreende uma atividade de inibição de tradução intrínseca.

[114] De acordo com algumas modalidades, a molécula de RNA não codificante compreende uma atividade de RNAi intrínseca.

[115] De acordo com algumas modalidades, a molécula de RNA não codificante não compreende uma atividade de inibição de tradução intrínseca ou uma atividade intrínseca de RNAi (isto é, a molécula de RNA não codificante não possui uma atividade de silenciamento de RNA).

[116] De acordo com uma modalidade da invenção, a molécula de RNA não codificante é específica para um RNA alvo (por exemplo, um RNA alvo natural) e não inibe ou silencia cruzadamente um segundo RNA

alvo ou RNA alvo de interesse, a menos que seja projetado para fazê-lo (como discutido abaixo) exibindo 100% ou menos de homologia global com o gene alvo, por exemplo, menos de 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81% de homologia global ao gene alvo; conforme determinado no nível de RNA ou proteína por RT-PCR, Western blot, imuno-histoquímica e/ou citometria de fluxo, sequenciamento ou quaisquer outros métodos de detecção.

[117] De acordo com uma modalidade, a molécula de RNA não codificante é uma molécula de silenciamento de RNA ou interferência de RNA (RNAi).

[118] O termo “silenciamento de RNA” ou RNAi refere-se a um mecanismo regulador celular no qual moléculas de RNA não codificantes (a “molécula de silenciamento de RNA” ou “molécula de RNAi”) mediam, de uma maneira específica de sequência, inibição co- ou pós-transcricional de expressão ou tradução gênica.

[119] De acordo com uma modalidade, a molécula de silenciamento de RNA é capaz de mediar a repressão do RNA durante a transcrição (silenciamento gênico co-transcricional).

[120] De acordo com uma modalidade específica, o silenciamento gênico co-transcricional inclui silenciamento epigenético (por exemplo, estado cromático que impede a expressão funcional do gene).

[121] De acordo com uma modalidade, a molécula de silenciamento de RNA é capaz de mediar a repressão do RNA após a transcrição (silenciamento de genes pós-transcricional).

[122] O silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) refere-se tipicamente ao processo (tipicamente ocorrendo no citoplasma celular) de degradação ou clivagem de moléculas de RNA mensageiro (mRNA) que diminuem sua atividade impedindo a tradução. Por exemplo, e como

discutido em detalhes abaixo, uma fita-guia de uma molécula de silenciamento de RNA emparelha-se com uma sequência complementar em uma molécula de mRNA e induz a clivagem, por exemplo, Argonaute 2 (Ago2).

[123] O silenciamento gênico co-transcricional refere-se tipicamente à inativação da atividade gênica (isto é, repressão à transcrição) e ocorre tipicamente no núcleo celular. Essa repressão da atividade genética é mediada por fatores relacionados à epigenética, como, por exemplo, metil-transferases, que metilam o DNA e as histonas alvo. Assim, no silenciamento gênico co-transcricional, a associação de um pequeno RNA com um RNA alvo (interação entre pequeno RNA e transcrito) desestabiliza o transcrito nascente alvo e recruta enzimas modificadoras de DNA e histona (isto é, fatores epigenéticos) que induzem a remodelação da cromatina em uma estrutura que reprime a atividade e a transcrição de genes. Além disso, no silenciamento gênico co-transcricional, os scaffolds de RNA não codificante longos associados à cromatina podem recrutar complexos modificadores de cromatina independentemente de pequenos RNAs. Esses mecanismos de silenciamento co-transcricional formam sistemas de vigilância de RNA que detectam e silenciam eventos inapropriados de transcrição e fornecem uma memória desses eventos por meio de laços epigenéticos auto-reforçados [como descrito em D. Hoch e D. Moazed, RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression, *Nat Rev Genet*. (2015) 16(2): 71-84].

[124] De acordo com uma modalidade da invenção, o mecanismo de biogênese/processamento de RNAi gera a molécula de silenciamento de RNA.

[125] De acordo com uma modalidade da invenção, o mecanismo de biogênese/processamento de RNAi gera a molécula de silenciamento de RNA, mas nenhum alvo específico foi identificado.

[126] De acordo com uma modalidade, a molécula de RNA não codificante é capaz de induzir a interferência do RNA (RNAi).

[127] A seguir é apresentada uma descrição detalhada de moléculas de RNA não codificantes que compreendem uma atividade intrínseca de RNAi (por exemplo, são moléculas de silenciamento de RNA) que podem ser utilizadas de acordo com modalidades específicas da presente invenção.

[128] De acordo com uma modalidade, a molécula de RNA não codificante ou a molécula de silenciamento de RNA é processada a partir de um precursor.

[129] De acordo com uma modalidade, a molécula de RNA não codificante ou a molécula de silenciamento de RNA é processada a partir de um precursor de RNA de fita simples (ssRNA).

[130] De acordo com uma modalidade, a molécula de RNA não codificante ou a molécula de silenciamento de RNA é processada a partir de um precursor de RNA de fita simples de estrutura duplex.

[131] De acordo com uma modalidade, a molécula de RNA não codificante ou a molécula de silenciamento de RNA é processada a partir de um precursor de dsRNA (por exemplo, compreendendo o emparelhamento de bases perfeito e imperfeito).

[132] De acordo com uma modalidade, a molécula de RNA não codificante ou a molécula de silenciamento de RNA é processada a partir de um precursor de RNA não estruturado.

[133] De acordo com uma modalidade, a molécula de RNA não codificante ou a molécula de silenciamento de RNA é processada a partir de um precursor de RNA codificante de proteína.

[134] De acordo com uma modalidade, a molécula de RNA não codificante ou a molécula de silenciamento de RNA é processada a partir de um precursor de RNA não codificante.

[135] De acordo com uma modalidade, o dsRNA pode ser

derivado de dois RNAs complementares diferentes ou de um único RNA que se dobra para formar um dsRNA.

[136] O *RNA pareado com base perfeita e imperfeita (ou seja, RNA de fita dupla; dsRNA), siRNA e shRNA* - A presença de dsRNAs longos nas células estimula a atividade de uma enzima da ribonuclease III referida como dicer. O Dicer (também conhecido como endoribonuclease Dicer ou helicase com motivo RNase) é uma enzima que nas plantas é normalmente chamada de proteína do tipo Dicer (DCL). Plantas diferentes têm números diferentes de genes DCL, portanto, por exemplo, o genoma de Arabidopsis normalmente possui quatro genes DCL, o arroz possui oito genes DCL e o genoma do milho possui cinco genes DCL. O Dicer está envolvido no processamento do dsRNA em pequenos pedaços de dsRNA, conhecidos como RNAs interferentes curtos (siRNAs). Os siRNAs derivados da atividade de dicer têm tipicamente cerca de 21 a cerca de 23 nucleotídeos de comprimento e compreendem cerca de 19 pares de bases duplex com dois overhangs de nucleotídeos 3'.

[137] Por conseguinte, algumas modalidades da invenção contemplam a modificação de um gene que codifica um dsRNA para redirecionar uma especificidade de silenciamento (incluindo atividade de silenciamento) em direção a um segundo RNA alvo (isto é, RNA de interesse).

[138] De acordo com uma modalidade, são utilizados precursores de dsRNA maiores que 21 bp. Vários estudos demonstram que dsRNAs longos podem ser usados para silenciar a expressão gênica sem induzir a resposta ao estresse ou causar efeitos fora do alvo significativos - ver, por exemplo, [Strat *et al*., Nucleic Acids Research, 2006, vol. 34, n° 13 3803-3810; Bhargava A *et al*. Brain Res. Protoc. 2004; 13: 115–125; Diallo M., *et al*, Oligonucleotides. 2003; 13: 381–392; Paddison PJ, *et al*., Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002; 99: 1443-1448; Tran N. *et al*., FEBS Lett. 2004; 573: 127–134].

[139] O termo “siRNA” refere-se a pequenos duplexes de

RNA inibidores (geralmente entre 18 a 30 pares de bases) que induzem a via de interferência de RNA (RNAi). Normalmente, os siRNAs são quimicamente sintetizados como 21 mers com uma região duplex central de 19 bp e 3'-overhangs simétricos de 2-base nas extremidades, embora tenha sido recentemente descrito que duplexes de RNA sintetizados quimicamente de 25 a 30 de comprimento de base podem ter tanto como um aumento de 100 vezes na potência em comparação com 21 mers no mesmo local. Sugere-se que a potência aumentada observada obtida usando RNAs mais longos no desencadeamento de RNAi forneça ao Dicer um substrato (27 mer) em vez de um produto (21 mer) e que isso melhore a taxa ou eficiência de entrada do siRNA duplex no RISC.

[140] Verificou-se que a posição, mas não a composição, do 3'-overhang influencia a potência de um siRNA e os duplexes assimétricos com 3'-overhang na fita anti-sentido são geralmente mais potentes do que aqueles com o 3'-overhang no sentido da fita (Rose *et al*., 2005).

[141] As fitas de um RNA interferente de fita dupla (por exemplo, um siRNA) podem ser conectadas para formar uma estrutura em grampo de cabelo ou em laço de grampo de cabelo (por exemplo, um shRNA). Assim, como mencionado, a molécula de silenciamento de RNA de algumas modalidades da invenção também pode ser um RNA em grampo de cabelo curto (shRNA).

[142] O termo RNA de grampo de cabelo curto, “shRNA”, como aqui utilizado, refere-se a uma molécula de RNA que possui uma estrutura de haste-laço, compreendendo uma primeira e uma segunda região de sequência complementar, sendo o grau de complementaridade e orientação das regiões suficientes para que o emparelhamento de base ocorra entre as regiões, sendo a primeira e a segunda regiões unidas por uma região de laço, o laço sendo resultante da falta de emparelhamento de bases entre nucleotídeos (ou análogos de nucleotídeos) dentro da região de laço. O

número de nucleotídeos no laço é um número entre e incluindo 3 a 23, ou 5 a 15, ou 7 a 13, ou 4 a 9, ou 9 a 11. Alguns dos nucleotídeos no laço podem estar envolvidos em interações de pares de bases com outros nucleotídeos no laço. Exemplos de sequências de oligonucleotídeos que podem ser utilizados para formar o laço incluem 5'-CAAGAGA-3'e 5'-UUACAA-3' (pedidos de patente internacionais nos. WO2013126963 e WO2014107763). Será reconhecido por um especialista na técnica que o oligonucleotídeo de fita única resultante forma uma estrutura de haste-laço ou grampo de cabelo que compreende uma região de fita dupla capaz de interagir com o mecanismo RNAi.

[143] A molécula de silenciamento de RNA de algumas modalidades da invenção não precisa se limitar às moléculas contendo apenas RNA, mas abrange ainda nucleotídeos e não nucleotídeos quimicamente modificados.

[144] Vários tipos de siRNAs são contemplados pela presente invenção, incluindo siRNAs de ação trans (Ta-siRNAs), siRNAs associados à repetição (Ra-siRNAs) e siRNAs derivados de transcrição anti-sentido natural (Nat-siRNAs).

[145] De acordo com uma modalidade, o RNA de silenciamento inclui “piRNA”, que é uma classe de RNAs que interagem com Piwi com cerca de 26 e 31 nucleotídeos de comprimento. Os piRNAs tipicamente formam complexos de RNA-proteína através de interações com proteínas Piwi, ou seja, piRNAs anti-sentido são tipicamente carregados nas proteínas Piwi (por exemplo, Piwi, Ago3 e Aubergine (Aub)).

[146] *miRNA* - De acordo com outra modalidade, a molécula de silenciamento de RNA pode ser um miRNA.

[147] O termo “microRNA”, “miRNA” e “miR” são sinônimos e se referem a uma coleção de moléculas de RNA de fita simples não codificantes com cerca de 19-24 nucleotídeos de comprimento, que

regulam a expressão gênica. Os miRNAs são encontrados em uma ampla gama de organismos (por exemplo, insetos, mamíferos, plantas, nemátodos) e demonstraram desempenhar um papel no desenvolvimento, homeostase e etiologia da doença.

[148] Inicialmente, o pré-miRNA está presente como um RNA de haste-laço de fita duplo não perfeito longo que é posteriormente processado por Dicer em um duplex semelhante a siRNA, compreendendo a fita guia madura (miRNA) e um fragmento de tamanho semelhante conhecido como fita passageira (miRNA*). O miRNA e o miRNA* podem ser derivados de braços opostos do pri-miRNA e pré-miRNA. As sequências de miRNA* podem ser encontradas em bibliotecas de miRNAs clonados, mas normalmente em menor frequência que os miRNAs.

[149] Embora inicialmente presente como uma espécie de fita dupla com miRNA*, o miRNA acaba sendo incorporado como um RNA de fita simples em um complexo de ribonucleoproteínas conhecido como complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Várias proteínas podem formar o RISC, o que pode levar a variabilidade na especificidade dos duplexes de miRNA/miRNA *, local de ligação do gene alvo, atividade do miRNA (reprimir ou ativar) e em qual fita do duplex miRNA/miRNA * é carregada para o RISC.

[150] Quando a fita de miRNA do duplex miRNA: miRNA* é carregada no RISC, o miRNA* é removido e degradado. A fita do miRNA:miRNA* duplex que é carregada no RISC é a fita cuja extremidade 5' está emparelhada menos firmemente. Nos casos em que ambas as extremidades do miRNA:miRNA* têm aproximadamente emparelhamento 5' equivalente, tanto o miRNA quanto o miRNA* podem ter atividade de silenciamento de genes.

[151] O RISC identifica os ácidos nucleicos alvo com base em altos níveis de complementaridade entre o miRNA e o mRNA, especialmente pelos nucleotídeos 2-8 do miRNA (referido como “sequência de

sementes”).

[152] Vários estudos analisaram o requisito de emparelhamento de bases entre o miRNA e seu alvo de mRNA para obter uma inibição eficiente da tradução (revisado por Bartel 2004, Cell 116-281). Estudos computacionais, analisando a ligação do miRNA em genomas inteiros, sugeriram um papel específico para as bases 2-8 no 5' do miRNA (também conhecido como “sequência de semente”) na ligação ao alvo, mas o papel do primeiro nucleotídeo, descoberto como geralmente sendo “A” também foi reconhecido (Lewis *et al*. 2005 Cell 120-15). Da mesma forma, os nucleotídeos 1-7 ou 2-8 foram usados para identificar e validar alvos por Krek *et al*. (2005, Nat Genet 37-495). Os locais alvo no mRNA podem estar na UTR 5', na UTR 3' ou na região de codificação. Curiosamente, vários miRNAs podem regular o mesmo alvo de mRNA, reconhecendo o mesmo ou vários locais. A presença de múltiplos locais de ligação ao miRNA na maioria dos alvos geneticamente identificados pode indicar que a ação cooperativa de vários RISCs fornece a inibição de tradução mais eficiente.

[153] Os miRNAs podem direcionar o RISC para infrarregular a expressão gênica por um de dois mecanismos: clivagem de mRNA ou repressão de tradução. O miRNA pode especificar a clivagem do mRNA se o mRNA tiver um certo grau de complementaridade com o miRNA. Quando um miRNA guia a clivagem, o corte é tipicamente entre os nucleotídeos emparelhados com os resíduos 10 e 11 do miRNA. Alternativamente, o miRNA pode reprimir a tradução se o miRNA não tiver o grau necessário de complementaridade com o miRNA. A repressão traducional pode ser mais prevalente em animais, uma vez que os animais podem ter um menor grau de complementaridade entre o miRNA e o local de ligação.

[154] Deve-se notar que pode haver variabilidade nas extremidades 5'e 3' de qualquer par de miRNA e miRNA*. Esta variabilidade pode dever-se à variabilidade no processamento enzimático de Drosha e Dicer

em relação ao local da clivagem. A variabilidade nas extremidades 5' e 3' do miRNA e miRNA* também pode ser devido a incompatibilidades nas estruturas de haste do pri-miRNA e pré-miRNA. As incompatibilidades das fitas da haste podem levar a uma população de diferentes estruturas em grampo de cabelo. A variabilidade nas estruturas da haste também pode levar à variabilidade nos produtos de clivagem por Drosha e Dicer.

[155] Será apreciado que a sequência de pré-miRNA pode compreender de 45-90, 60-80 ou 60-70 nucleotídeos, enquanto a sequência de pri-miRNA pode compreender de 45-30.000, 50-25.000, 100-20.000, 1.000-1.500 ou 80-100 nucleotídeos.

[156] De acordo com uma modalidade, o miRNA compreende miR-390a (como estabelecido na SEQ ID NO: 28).

[157] De acordo com uma modalidade, o miRNA compreende miR-173 (como estabelecido na SEQ ID NO: 29).

[158] *Anti-sentido* - O anti-sentido é um RNA de fita única projetado para impedir ou inibir a expressão de um gene, hibridizando especificamente com seu mRNA. A infrarregulação de um RNA alvo pode ser realizada usando um polinucleotídeo anti-sentido capaz de hibridizar especificamente com um transcrito de mRNA que codifica o RNA alvo.

[159] Como mencionado, a molécula de RNA não codificante pode não compreender uma atividade de RNAi canônica (intrínseca) (por exemplo, não é uma molécula de silenciamento de RNA canônico ou seu alvo não foi identificado). Tais moléculas de RNA não codificantes incluem o seguinte:

[160] De acordo com uma modalidade, a molécula de RNA não codificante é um RNA de transferência (tRNA). O termo “tRNA” refere-se a uma molécula de RNA que serve como ligação física entre a sequência nucleotídica de ácidos nucleicos e a sequência de aminoácidos de

proteínas, anteriormente denominada RNA solúvel ou sRNA. O tRNA tem tipicamente cerca de 76 a 90 nucleotídeos de comprimento.

[161] De acordo com uma modalidade, a molécula de RNA não codificante é um RNA ribossômico (rRNA). O termo “rRNA” refere-se ao componente de RNA do ribossomo, isto é, da subunidade ribossômica pequena ou da subunidade ribossômica grande.

[162] De acordo com uma modalidade, a molécula de RNA não codificante é um pequeno RNA nuclear (snRNA ou U-RNA). Os termos “sRNA” ou “U-RNA” se referem às pequenas moléculas de RNA encontradas nos pontos de união e nos corpos Cajal do núcleo celular nas células eucarióticas. O snRNA tem tipicamente cerca de 150 nucleotídeos de comprimento.

[163] De acordo com uma modalidade, a molécula de RNA não codificante é um pequeno RNA nucleolar (snoRNA). O termo “snoRNA” refere-se à classe de pequenas moléculas de RNA que guiam principalmente modificações químicas de outros RNAs, por exemplo, rRNAs, tRNAs e snRNAs. O snoRNA é tipicamente classificado em uma de duas classes: os snoRNAs da caixa C/D têm tipicamente cerca de 70–120 nucleotídeos de comprimento e estão associados à metilação, e os snoRNAs da caixa H/ACA têm tipicamente cerca de 100-200 nucleotídeos de comprimento e estão associados com pseudouridilação.

[164] Semelhantes aos snoRNAs são os scaRNAs (ou seja, genes de RNA do corpo Cajal pequenos) que desempenham um papel semelhante na maturação do RNA aos snoRNAs, mas seus alvos são snRNAs spliceossômicos e realizam modificações específicas do local dos precursores do snRNA spliceossômico (nos corpos Cajal do núcleo)

[165] De acordo com uma modalidade, a molécula de RNA não codificante é um RNA extracelular (exRNA). O termo “exRNA” refere-se a espécies de RNA presentes fora das células a partir das quais foram

transcritas (por exemplo, RNA exossômico).

[166] De acordo com uma modalidade, a molécula de RNA não codificante é um RNA longo não codificante (lncRNA). O termo “lncRNA” ou “ncRNA longo” refere-se a transcritos que não codificam proteínas geralmente com mais de 200 nucleotídeos.

[167] De acordo com uma modalidade, exemplos não limitativos de moléculas de RNA não codificantes incluem, mas não estão limitados a, microRNA (miRNA), RNA de interação com piwi (piRNA), RNA interferente curto (siRNA), RNA com grampo de cabelo curto (shRNA) , siRNA de ação trans (tasiRNA), pequeno RNA nuclear (snRNA ou URNA), pequeno RNA nucleolar (snoRNA), pequeno RNA de corpo Cajal (scaRNA), RNA de transferência (tRNA), RNA ribossômico (rRNA), RNA extracelular (exRNA), RNA derivado de repetição, RNA de elemento transponivel e RNA longo não codificante (lncRNA).

[168] De acordo com uma modalidade, exemplos não limitativos de moléculas de RNAi incluem, mas não estão limitados a, pequeno RNA interferente (siRNA), RNA em grampo de cabelo curto (shRNA), microRNA (miRNA), RNA que interage com Piwi (piRNA) e siRNA de ação trans (tasiRNA).

[169] Como mencionado acima, os métodos de algumas modalidades da invenção são utilizados para redirecionar uma atividade de silenciamento e/ou especificidade da molécula de RNA não codificante (ou para gerar uma atividade de silenciamento e/ou especificidade se a molécula de RNA não codificante não possuir uma capacidade intrínseca de silenciar uma molécula de RNA) em direção a um segundo RNA alvo ou em direção a um RNA alvo de interesse.

[170] De acordo com uma modalidade, o RNA alvo e o segundo RNA alvo são distintos.

[171] De acordo com uma modalidade, o método de modificar um gene que codifica ou processa uma molécula de silenciamento de RNA para um RNA alvo em uma célula vegetal compreende introduzir na célula vegetal um agente de edição de DNA que redireciona uma atividade de silenciamento e/ou de especificidade da molécula de silenciamento de RNA em direção a um segundo RNA alvo, sendo o RNA alvo e o segundo RNA alvo distintos, modificando assim o gene que codifica a molécula de silenciamento de RNA.

[172] Como aqui utilizado, o termo “redireciona uma especificidade de silenciamento” refere-se à reprogramação da especificidade original do RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) em direção a um alvo não natural do RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA). Por conseguinte, a especificidade original do RNA não codificante é abolida (isto é, perda de função) e a nova especificidade é para um alvo de RNA distinto do alvo natural (isto é, RNA de interesse), isto é, ganho de função. Será apreciado que apenas ganho de função ocorre nos casos em que o RNA não codificante não possui atividade de silenciamento.

[173] Como aqui utilizado, o termo “RNA alvo” refere-se a uma sequência de RNA naturalmente ligada por uma molécula de RNA não codificante. Assim, o RNA alvo é considerado pelo especialista na técnica como um substrato para o RNA não codificante.

[174] Como aqui utilizado, o termo “segundo RNA alvo” refere-se a uma sequência de RNA (codificante ou não codificante) não naturalmente ligada por uma molécula de RNA não codificante. Assim, o segundo RNA alvo não é um substrato natural do RNA não codificante.

[175] Como aqui utilizado, o termo “RNA alvo de interesse” refere-se a uma sequência de RNA (codificante ou não codificante) a ser silenciada pela molécula de RNA não codificante projetada.

[176] Como aqui utilizado, a frase “silenciando um gene alvo” refere-se à ausência ou redução observável no nível de mRNA e/ou produtos proteicos do gene alvo (por exemplo, devido ao silenciamento gênico co- e/ou pós-transcricional). Assim, o silenciamento de um gene alvo pode ser de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 100% em comparação com um gene alvo que não é alvo da molécula de RNA não codificante projetada da invenção.

[177] As consequências do silenciamento podem ser confirmadas pelo exame das propriedades externas de uma célula vegetal ou planta inteira ou outro organismo que absorve o RNA não codificante projetado da planta ou por técnicas bioquímicas (como discutido abaixo).

[178] Será apreciado que a molécula de RNA não codificante projetada de algumas modalidades da invenção pode ter algum (s) efeito (s) de especificidade fora do alvo, desde que não afete uma característica agrícola valiosa (por exemplo, biomassa, rendimento etc.).

[179] De acordo com uma modalidade, o segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse é endógeno à célula vegetal. Exemplos de segundo RNA alvo endógeno ou RNA alvo de interesse incluem, mas não estão limitados a, um produto de um gene que confere sensibilidade ao estresse, à infecção, a herbicidas ou a um produto de um gene relacionado à taxa de crescimento de plantas, rendimento de culturas, como discutido aqui mais abaixo.

[180] De acordo com uma modalidade, o segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse é exógeno à célula vegetal (também aqui referida como heteróloga). Nesse caso, o segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse é um produto de um gene que não faz parte naturalmente do genoma da planta. Exemplos de segundo RNA alvo exógeno incluem, mas não estão limitados a, um produto de um gene de um patógeno de planta, tal como, mas não se limitando a, um inseto, um vírus, uma bactéria, um fungo, um nemátodo,

como mais discutido abaixo. Um RNA alvo exógeno (codificante ou não codificante) pode compreender uma sequência de ácido nucleico que compartilha a identidade da sequência com uma sequência de RNA endógena (por exemplo, pode ser parcialmente homóloga a uma sequência de ácido nucleico endógena) da planta.

[181] A ligação específica de uma molécula de RNA não codificante endógena a um RNA alvo pode ser determinada por algoritmos computacionais (como BLAST) e verificada por métodos que incluem, por exemplo, Northern blot, hibridização In Situ, QuantiGene Plex Assay etc.

[182] Por uso do termo “complementaridade” ou “complementar”, entende-se que a molécula de RNA não codificante (ou pelo menos uma parte dela que está presente na forma do pequeno RNA processado, ou pelo menos uma fita de um polinucleotídeo de fita dupla ou uma parte da mesma, ou uma parte de um polinucleotídeo de fita única) hibridiza sob condições fisiológicas com o RNA alvo, ou um fragmento do mesmo, para efetuar a regulação ou função ou supressão do gene alvo. Por exemplo, em algumas modalidades, uma molécula de RNA não codificante possui 100% de identidade de sequência ou pelo menos cerca de 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99% de identidade de sequência quando comparado a uma sequência de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500 ou mais nucleotídeos contíguos no RNA alvo (ou membros da família de um determinado gene alvo).

[183] Como aqui utilizado, diz-se que moléculas de RNA não codificantes ou suas formas de pequeno RNA processadas exibem “complementaridade completa” quando todos os nucleotídeos de uma das sequências lida 5'a 3' são complementares a todos os nucleotídeos da outra

sequência quando lida 3'a 5'. Uma sequência nucleotídica que é completamente complementar a uma sequência nucleotídica de referência exibirá uma sequência idêntica à sequência complemento reversa da sequência nucleotídica de referência.

[184] Os métodos para determinar a complementaridade de sequência são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não se limitam a, ferramentas de bioinformática que são bem conhecidas na técnica (por exemplo, BLAST, alinhamento de múltiplas sequências).

[185] De acordo com uma modalidade, se a molécula de RNA não codificante for ou processada em um siRNA, a complementaridade estará na faixa de 90-100% (por exemplo, 100%) à sua sequência alvo.

[186] De acordo com uma modalidade, se a molécula de RNA não codificante for ou processada em um miRNA ou piRNA, a complementaridade estará na faixa de 33 a 100% em relação à sua sequência alvo.

[187] De acordo com uma modalidade, se a molécula de RNA não codificante é um miRNA, a complementaridade da sequência de sementes (isto é, nucleotídeos 2-8 do 5') está na faixa de 85-100% (por exemplo, 100%) à sua sequência alvo.

[188] De acordo com uma modalidade, o RNA não codificante pode ser posteriormente processado em uma forma de pequeno RNA (por exemplo, o pré-miRNA é processado em um miRNA maduro). Nesse caso, a homologia é medida com base na forma de pequeno RNA processado (por exemplo, a sequência de miRNA madura).

[189] Como usado aqui, o termo “forma de pequeno RNA” refere-se ao pequeno RNA maduro capaz de hibridizar com um RNA alvo (ou fragmento do mesmo). De acordo com uma modalidade, a forma de pequeno RNA tem uma atividade de silenciamento.

[190] De acordo com uma modalidade, a complementaridade com a sequência alvo é pelo menos cerca de 33% da forma de pequeno RNA processado (por exemplo, 33% dos 21-28 nt). Assim, por exemplo, se a molécula de RNA não codificante for um miRNA, 33% da sequência de miRNA maduro (por exemplo, 21 nt) compreende complementação de sementes (por exemplo, 7 nt dos 21 nt).

[191] De acordo com uma modalidade, a complementaridade com a sequência alvo é pelo menos cerca de 45% da forma de pequeno RNA processado (por exemplo, 45% dos 21-28 nt). Assim, por exemplo, se a molécula de RNA não codificante for um miRNA, 45% da sequência de miRNA maduro (por exemplo, 21 nt) compreenderá complementação de sementes (por exemplo, 9-10 nt dos 21 nt).

[192] De acordo com uma modalidade, a molécula de RNA não codificante (ou seja, antes da modificação) é tipicamente selecionada como uma que possui cerca de 10%, 20%, 30%, 33%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou até 99% de complementaridade em relação à sequência do segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[193] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (isto é, antes da modificação) é tipicamente selecionada como tendo uma complementaridade não superior a 99% em relação à sequência do segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[194] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (isto é, antes da modificação) é tipicamente selecionada como tendo uma complementaridade não superior a 98% em relação à sequência do segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[195] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (isto é, antes da modificação) é tipicamente selecionada como tendo uma complementaridade não superior a 97% em relação à sequência do segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[196] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (isto é, antes da modificação) é tipicamente selecionada como tendo uma complementaridade não superior a 96% em relação à sequência do segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[197] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (isto é, antes da modificação) é tipicamente selecionada como tendo uma complementaridade não superior a 95% em relação à sequência do segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[198] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (isto é, antes da modificação) é tipicamente selecionada como tendo uma complementaridade não superior a 94% em relação à sequência do segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[199] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (isto é, antes da modificação) é tipicamente selecionada como tendo uma complementaridade não superior a 93% em relação à sequência do segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[200] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (isto é, antes da modificação) é tipicamente selecionada como tendo uma complementaridade não superior a 92% em relação à sequência do segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[201] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (isto é, antes da modificação) é tipicamente selecionada como tendo uma complementaridade não superior a 91% em relação à sequência do segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[202] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (isto é, antes da modificação) é tipicamente selecionada como tendo uma complementaridade não superior a 90% em relação à sequência do segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[203] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (isto é, antes da modificação) é tipicamente selecionada como tendo uma complementaridade não superior a 85% em relação à sequência do segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[204] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (isto é, antes da modificação) é tipicamente selecionada como tendo uma complementaridade não superior a 50% em relação à sequência do segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[205] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (isto é, antes da modificação) é tipicamente selecionada como tendo uma complementaridade não superior a 33% em relação à sequência do segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[206] De acordo com uma modalidade, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender pelo menos cerca de 33%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mesmo 100% de complementaridade em relação à sequência do segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[207] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender um mínimo de 33% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse (por exemplo, 85-100% de correspondência de sementes).

[208] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender um mínimo de 40% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[209] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender um mínimo de 45% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[210] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender um mínimo de 50% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[211] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender um mínimo de 45% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[212] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender um mínimo de 60% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[213] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender um mínimo de 70% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[214] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender um mínimo de 80% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[215] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender um mínimo de 85% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[216] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender um mínimo de 90% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[217] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender um mínimo de 91% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[218] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender um mínimo de 92% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[219] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender um mínimo de 93% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[220] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender um mínimo de 94% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[221] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender um mínimo de 95% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[222] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender um mínimo de 96% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[223] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender um mínimo de 97% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[224] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender um mínimo de 98% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[225] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender um mínimo de 99% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[226] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é projetada de modo a compreender 100% de complementaridade em relação ao segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[227] Para induzir atividade de silenciamento e/ou especificidade de uma molécula de RNA não codificante ou redirecionar uma atividade de silenciamento e/ou especificidade de uma molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) em direção a um segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse, o gene que codifica uma molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é modificado usando um agente de edição de DNA.

[228] 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 que codifica uma molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) e agentes para implementar a mesma que podem ser usados de acordo com modalidades específicas da presente divulgação.

[229] Edição de genoma usando endonucleases modificadas - essa abordagem se refere a um método genético reverso usando nucleases modificadas artificialmente para tipicamente cortar e criar quebras de fita dupla (DSBs) específicas em um (s) local (is) desejado (s) no genoma, que são então reparadas por processos endógenos celulares como recombinação homóloga (HR) ou união final não homóloga (NHEJ). O NHEJ une diretamente as extremidades do DNA em uma ruptura de fita dupla (DSB) com ou sem corte mínimo das extremidades, enquanto a HR utiliza uma sequência de doadores homólogos como modelo (isto é, a cromátide irmã formada durante a fase S) para regenerar/copiar o DNA ausente sequência no local da ruptura. A fim de introduzir modificações nucleotídicas específicas no DNA genômico, um modelo de reparo de DNA de doador contendo a sequência desejada deve estar presente durante a HR (DNA de fita única ou fita dupla fornecido exogenamente).

[230] 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 vários cortes que não se limitam ao local desejado. Para superar esse desafio e criar quebras de fita única ou dupla (DSBs) específicas do local, várias classes distintas de nucleases foram descobertas e biomodificadas até o momento. Isso inclui as meganucleases, nucleases de dedo de zinco (ZFNs), nucleases efetoras do tipo ativador de transcrição (TALENs) e sistema CRISPR/Cas9.

[231] *Meganucleases* - As meganucleases são geralmente agrupadas em quatro famílias: a família LAGLIDADG, a família GIY-YIG, a família His-Cys box 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 possuir uma ou duas cópias do motivo LAGLIDADG conservado. As quatro famílias de meganucleases são amplamente separadas uma da outra em relação aos elementos estruturais conservados e, consequentemente, 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 (>14pb), tornando-as naturalmente muito específicas para o corte no local desejado.

[232] Isso pode ser explorado para fazer quebras de fita dupla (DSBs) específicas do local na edição do genoma. Um especialista na técnica pode usar essas meganucleases de ocorrência natural, porém o número dessas meganucleases de ocorrência natural é limitado. Para superar esse desafio, métodos de triagem de mutagênese e 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.

[233] Alternativamente, os aminoácidos que interagem com o DNA da meganuclease podem ser alterados para projetar meganucleases específicas de sequência (ver, por exemplo, Patente US No. 8.021.867). As meganucleases podem ser projetadas usando os métodos descritos em, por exemplo, Certo, MT *et al.* Nature Methods (2012) 9: 073-975; Patentes US Nos. 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, o conteúdo de cada um deles sendo incorporado aqui por referência na sua totalidade. Como alternativa, as meganucleases com características de corte específicas do local podem ser obtidas usando tecnologias disponíveis comercialmente, por exemplo, a tecnologia de edição de genoma do Directed Nuclease Editor ™ da Precision Biosciences.

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

[235] Basicamente, a tecnologia de endonuclease de restrição de ZFNs e TALEN 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 porção 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 exemplar com essas propriedades é FokI. Além disso, FokI tem a vantagem de exigir que a dimerização tenha atividade de nuclease e isso significa que a especificidade aumenta dramaticamente 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 (DSB).

[236] Assim, por exemplo, para serem direcionados a um local específico, ZFNs e TALENs são construídos como pares de nucleases, com cada membro do par sendo projetado para ligar sequências adjacentes no local alvo. 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 (DSB). O reparo dessas quebras de fita dupla (DSBs) através da via de junção de extremidade não homóloga (NHEJ) geralmente resulta em pequenas deleções ou pequenas inserções de sequência (Indels). 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 inserções ou deleções diferentes no local alvo.

[237] Em geral, o NHEJ é relativamente preciso (cerca de 85% dos DSBs nas células humanas são reparados pelo NHEJ em cerca de 30 minutos após a detecção) na edição de genes. É considerado o NHEJ errôneo. 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.

[238] 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 com a região alvo é introduzido em conjunção com o par de nucleases, a quebra da fita dupla (DSB) pode ser reparada via recombinação homóloga (HR) para gerar modificações

específicas (Li *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2010; Urnov *et al.*, 2005).

[239] Embora as porções de nuclease de ambas ZFNs e TALENs tenham propriedades semelhantes, a diferença entre essas nucleases modificadas está em seu peptídeo de reconhecimento de DNA. Os ZFNs dependem dos dedos de zinco Cys2-His2 e nos TALENs nos TALEs. Ambos os domínios peptídicos que reconhecem o DNA têm a característica de serem naturalmente encontrados em combinações em suas proteínas. Os dedos de zinco de Cys2-His2 são tipicamente encontrados em repetições com 3 bp de distância e são encontrados em diversas combinações em uma variedade de proteínas que interagem com ácidos nucleicos. 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. Como os dedos de zinco e os TALEs ocorrem em padrões repetidos, diferentes combinações podem ser tentadas para criar uma ampla variedade de especificidades de sequência. As abordagens para a produção de endonucleases de dedo de zinco específicas do local incluem, por exemplo, montagem modular (onde os dedos de zinco correlacionados com uma sequência de trinca são anexados em uma linha para cobrir a sequência requerida), OPEN (seleção de baixo rigor dos domínios peptídicos vs. trinca de nucleotídeos seguidos por seleções de alto rigor da combinação de peptídeos vs. o alvo final em sistemas bacterianos) e triagem one-hybrid bacteriana de bibliotecas de dedos de zinco, entre outras. Os ZFNs também podem ser projetados e obtidos comercialmente, por exemplo, na Sangamo Biosciences™ (Richmond, CA).

[240] Os métodos para projetar e obter TALENs são descritos em, por exemplo, Reyon *et al.* Nature Biotechnology 2012 May; 30 (5): 460-5; Miller *et al.* Nat Biotechnol. (2011) 29: 143-148; Cermak *et al.* Nucleic Acids Research (2011) 39 (12): e82 e Zhang *et al.* Nature Biotechnology (2011) 29 (2): 149–53. Um programa com base na Web recentemente desenvolvido, chamado Mojo Hand, foi introduzido pela Mayo

Clinic para projetar construtos TAL e TALEN para aplicativos de edição de genoma (pode ser acessado através de www(ponto)talendesign(ponto)org). Os TALEN também podem ser projetados e obtidos comercialmente, por exemplo, na Sangamo Biosciences™ (Richmond, CA).

[241] *O sistema T-GEE* (TargetGene's Genome Editing Engine) - Um complexo molecular de nucleoproteínas programável que contém uma fração polipeptídica e um ácido nucleico que confere especificidade (SCNA) que é montado *in vivo*, em uma célula alvo, e é capaz de interagir com a sequência de ácido nucleico alvo predeterminada é fornecida. O complexo molecular de nucleoproteína programável é capaz de modificar e/ou editar especificamente um local alvo na sequência de ácido nucleico alvo e/ou modificar a função da sequência de ácido nucleico alvo. A composição de nucleoproteínas compreende (a) molécula de polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo quimérico e compreende (i) um domínio funcional capaz de modificar o local alvo e (ii) um domínio de ligação que é capaz de interagir com um ácido nucleico que confere especificidade, e (b) ácido nucleico que confere especificidade (SCNA) compreendendo (i) uma sequência nucleotídica complementar a uma região do ácido nucleico alvo que flanqueia o local alvo e (ii) uma região de reconhecimento capaz de se ligar especificamente ao domínio de ligação do polipeptídeo. A composição permite modificar um alvo de sequência de ácido nucleico predeterminado de forma precisa, confiável e econômica, com alta especificidade e capacidade de ligação do complexo molecular ao ácido nucleico alvo através do emparelhamento de bases de ácido nucleico que confere especificidade e um ácido nucleico alvo. A composição é menos genotóxica, modular em sua montagem, utiliza uma plataforma única sem personalização, prática para uso independente fora de instalações especializadas e possui um prazo de desenvolvimento mais curto e custos reduzidos.

[242] *O sistema CRISPR-Cas* e todas as suas variantes (também aqui referidas como “CRISPR”) - Muitas bactérias e arcéias contêm

sistemas imunes adaptativos com base em RNA endógenos que podem degradar ácidos nucleicos de fagos e plasmídeos invasores. Estes sistemas consistem em sequências de nucleotídeos de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (CRISPR) que produzem componentes de RNA e genes associados a CRISPR (Cas) que codificam componentes de proteína. Os RNAs de 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 de 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*:* 816–821).

[243] 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 gRNAs sintéticos pode ser usada para produzir quebras de fita dupla direcionadas (DSBs) 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).

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

[245] O gRNA (também aqui referido como RNA guia curto (sgRNA)) 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 uma única

transcrição quimérica. 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 do Cas9, a sequência alvo genômica também deve conter a sequência correta do Motivo Adjacente ao Protoespaçador (PAM) imediatamente após a sequência alvo. A ligação do complexo gRNA/Cas9 localiza o Cas9 na sequência alvo genômica, para que o Cas9 possa cortar os dois filamentos do DNA, causando uma quebra de filamento duplo (DSB). Assim como com ZFNs e TALENs, as quebras de fita dupla (DSBs) produzidas por CRISPR/Cas podem sofrer recombinação homóloga ou NHEJ e são suscetíveis à modificação de sequência específica durante o reparo do DNA.

[246] A nuclease Cas9 possui dois domínios funcionais: RuvC e HNH, cada um cortando uma fita de DNA diferente. Quando esses dois domínios estão ativos, o Cas9 causa quebras de fita dupla (DSBs) no DNA genômico.

[247] Uma vantagem significativa do CRISPR/Cas é que a alta eficiência desse sistema é associada à capacidade de criar facilmente gRNAs sintéticos. Isso cria um sistema que pode ser facilmente modificado para ser direcionado a modificações em diferentes locais genômicos e/ou ser direcionado a diferentes modificações no mesmo local. Além disso, foram estabelecidos protocolos que permitem o direcionamento simultâneo de múltiplos genes. A maioria das células portadoras da mutação apresenta mutações bialélicas nos genes alvo.

[248] No entanto, a flexibilidade aparente nas interações de emparelhamento 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.

[249] Versões modificadas da enzima Cas9 contendo um único domínio catalítico inativo, RuvC- ou HNH-, são chamadas de 'nicases'.

Com apenas um domínio de nuclease ativo, a nicase Cas9 corta apenas uma fita do DNA alvo, criando uma quebra de fita simples ou 'nick'. Uma quebra de fita simples, ou nick, é reparada principalmente por um mecanismo de reparo de quebra de fita única envolvendo proteínas como, mas sem se limitar a, PARP (sensor) e complexo XRCC1/LIG III (ligação). Se uma quebra de fita simples (SSB) for gerada por venenos da topoisomerase I ou por drogas que prendem a PARP1 em SSBs naturais, eles poderão persistir e quando a célula entrar na fase S e o garfo de replicação encontrar esses SSBs, eles se tornarão DSBs de extremidade única que só pode ser reparado pelo HR. No entanto, dois nicks de fitas opostas proximais introduzidos por uma nickase Cas9 são tratados como uma quebra de fita dupla, no que é geralmente chamado de sistema CRISPR de 'nick duplo'. Um nick 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 HR é de muito mais baixa abundância e só pode ocorrer nos estágios S e G2 do ciclo celular). Portanto, se a especificidade e os efeitos fora do alvo reduzidos são cruciais, o uso da nicase Cas9 para criar um nick duplo ao projetar dois gRNAs com sequências alvo próximas e em fitas opostas do DNA genômico diminuiria o efeito fora do alvo, pois qualquer gRNA sozinho já resultaria em nicks que provavelmente não mudariam o DNA genômico, mesmo que esses eventos não sejam impossíveis.

[250] Versões modificadas da enzima Cas9 contendo dois domínios catalíticos inativos (Cas9 morto ou dCas9) não possuem atividade de nuclease enquanto ainda são capazes de 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.

[251] Existem várias ferramentas disponíveis publicamente para ajudar a escolher e/ou projetar sequências alvo, bem como listas de gRNAs únicos determinados com bioinformática para genes diferentes em espécies diferentes tais como, mas sem se limitar a, o Target Finder do laboratório de Feng Zhang, o Target Finder do laboratório de Michael Boutros (E-CRISP), as ferramentas RGEN: Cas-OFFinder, o CasFinder: algoritmo flexível para identificar alvos Cas9 específicos nos genomas e o CRISPR Optimal Target Finder.

[252] Para usar o sistema CRISPR, ambos o gRNA e uma endonuclease Cas (*por exemplo*, Cas9) devem ser expressos ou presentes (por exemplo, como um complexo de ribonucleoproteínas) em uma célula alvo. 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 (75 Sidney St, Suite 550A • Cambridge, MA 02139). O uso da tecnologia de RNA guia associado (Cas) a repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (CRISPR) e uma endonuclease Cas para modificar genomas vegetais também são divulgados pelo menos por Svitashev *et al.*, 2015, Plant Physiology, 169 (2): 931-945; Kumar e Jain, 2015, J Exp Bot 66: 47–57; e na publicação do pedido de patente US n° 20150082478, que é especificamente incorporado aqui por referência na sua totalidade. As endonucleases de Cas que podem ser usadas para efetuar a edição de DNA com gRNA incluem, mas não estão limitadas a, Cas9, Cpf1 (Zetsche *et al*., 2015, Cell. 163 (3): 759-71), C2c1, C2c2 e C2c3 (Shmakov *et al*., Mol Cell. 2015 nov 5; 60 (3): 385-97).

[253] De acordo com uma modalidade específica, o CRISPR compreende um RNA guia curto (sgRNA) compreendendo uma sequência de ácido nucleico selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 1-4 ou SEQ ID NOs: 235-366.

[254] *“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 selecionável positivo/negativo duplo é usado para introduzir a alteração de sequência desejada. O vetor de inserção contém uma única região contínua de homologia para o local alvo e é modificado para transportar a mutação de interesse. Este construto de direcionamento é linearizado com uma enzima de restrição em um local dentro da região de homologia, introduzido nas células, e a seleção positiva é realizada para isolar eventos mediados por recombinação homóloga. O DNA portador da sequência homóloga pode ser fornecido como um plasmídeo, oligo de fita simples ou dupla. Estes recombinantes homólogos contêm uma duplicação local que é separada pela sequência do vetor interveniente, incluindo o cassete de seleção. Na segunda etapa, os clones direcionados são submetidos a seleção negativa para identificar células que perderam a fita de seleção por recombinação intra-cromossômica 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.

[255] A estratégia de “substituição dupla” ou “marcação e troca” envolve um procedimento de seleção em duas etapas semelhante à abordagem de hit and run, mas requer o uso de duas construções de segmentação diferentes. Na primeira etapa, um vetor de direcionamento 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 mediados pela FC podem ser identificados. Em seguida, um segundo vetor de direcionamento 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.

[256] De acordo com uma modalidade específica, o agente de edição de DNA compreende um módulo de direcionamento de DNA (por exemplo, gRNA).

[257] De acordo com uma modalidade específica, o agente de edição de DNA não compreende uma endonuclease.

[258] De acordo com uma modalidade específica, o agente de edição de DNA compreende uma nuclease (por exemplo, uma endonuclease) e um módulo de direcionamento de DNA (por exemplo, gRNA).

[259] De acordo com uma modalidade específica, o agente de edição de DNA é CRISPR/Cas, por exemplo, gRNA e Cas9.

[260] De acordo com uma modalidade específica, o agente de edição de DNA é TALEN.

[261] De acordo com uma modalidade específica, o agente de edição de DNA é ZFN.

[262] De acordo com uma modalidade específica, o agente de edição de DNA é a meganuclease.

[263] De acordo com uma modalidade, o agente de edição de DNA está ligado a um repórter para monitorar a expressão em uma célula vegetal.

[264] De acordo com uma modalidade, o repórter é uma proteína repórter fluorescente.

[265] O termo “uma proteína fluorescente” refere-se a um polipeptídeo que emite fluorescência e é tipicamente detectável por citometria de fluxo, microscopia ou qualquer sistema de imagem fluorescente, portanto, pode ser usado como base para a seleção de células que expressam tal proteína.

[266] Exemplos de proteínas fluorescentes que podem ser usadas como repórteres são, sem se limitar a, a proteína fluorescente verde (GFP), a proteína fluorescente azul (BFP) e as proteínas fluorescentes vermelhas (por exemplo, dsRed, mCherry, RFP). Uma lista não limitativa 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 uma proteína fluorescente vermelha (por exemplo, dsRed, mCherry, RFP) ou GFP.

[267] Uma revisão de novas classes de proteínas fluorescentes e aplicações pode ser encontrada em Trends in Biochemical Sciences [*Rodriguez, Erik A.; Campbell, Robert E.; Lin, John Y.; Lin, Michael Z.; Miyawaki, Atsushi; Palmer, Amy E.; Shu, Xiaokun; Zhang, Jin; Tsien, Roger Y. "The Growing and Glowing Toolbox of Fluorescent and Photoactive Proteins". Trends in Biochemical Sciences. doi:10.1016/j.tibs.2016.09.010].*

[268] De acordo com outra modalidade, o repórter é um gene endógeno de uma planta. Um repórter exemplar é o gene do fitoeno dessaturase (*PDS3*) que codifica uma das enzimas importantes na via da biossíntese de carotenóides. Seu silenciamento produz um fenótipo albino/branqueado. Assim, plantas com expressão reduzida de *PDS3* exibem níveis reduzidos de clorofila, até o completo albinismo e nanismo. Genes adicionais que podem ser utilizados de acordo com os presentes ensinamentos incluem, mas não estão limitados a, genes que participam da proteção de culturas. Genes exemplares são descritos na Tabela 1B abaixo.

[269] De acordo com outra modalidade, o repórter é um marcador de seleção de antibióticos. Exemplos de marcadores de seleção de antibióticos que podem ser usados como repórteres são, sem se limitar a, neomicina fosfotransferase II (nptII) e higromicina fosfotransferase (hpt). Genes marcadores adicionais que podem ser utilizados de acordo com os presentes

ensinamentos incluem, mas não estão limitados a, genes de resistência à gentamicina acetiltransferase (accC3) e de resistência à bleomicina e fleomicina.

[270] Deverá ser apreciado que a enzima NPTII inativa por fosforilação vários antibióticos aminoglicosídeos, como canamicina, neomicina, geneticina (ou G418) e paromomicina. Destes, a canamicina, a neomicina e a paromomicina são utilizadas em diversas espécies de plantas.

[271] De acordo com outra modalidade, o repórter é um marcador de seleção tóxico. Um marcador de seleção tóxico exemplar que pode ser usado como repórter é, sem se limitar a, seleção de álcool alílico usando o gene Alcohol deshydrogenase (ADH1). O ADH1, compreendendo um grupo de enzimas desidrogenase que catalisa a interconversão entre álcoois e aldeídos ou cetonas com a redução concomitante de NAD+ ou NADP+, decompõe substâncias tóxicas alcoólicas nos tecidos. As plantas com expressão reduzida de ADH1 exibem aumento da tolerância ao álcool alílico. Consequentemente, plantas com *ADH1* reduzido são resistentes ao efeito tóxico do álcool alílico.

[272] Independentemente do agente de edição de DNA utilizado, o método da invenção é empregado de modo que o gene que codifica a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) seja modificado por pelo menos um de uma deleção, uma inserção ou uma mutação pontual.

[273] De acordo com uma modalidade, a modificação está em uma região estruturada da molécula de RNA não codificante ou da molécula de silenciamento de RNA.

[274] De acordo com uma modalidade, a modificação está em uma região de haste da molécula de RNA não codificante ou da molécula de silenciamento de RNA.

[275] De acordo com uma modalidade, a modificação está em uma região de laço da molécula de RNA não codificante ou da molécula de silenciamento de RNA.

[276] De acordo com uma modalidade, a modificação está em uma região de haste e uma região de laço da molécula de RNA não codificante ou da molécula de silenciamento de RNA.

[277] De acordo com uma modalidade, a modificação está em uma região não estruturada da molécula de RNA não codificante ou da molécula de silenciamento de RNA.

[278] De acordo com uma modalidade, a modificação está em uma região de haste e uma região de laço e em uma região não estruturada da molécula de RNA não codificante ou da molécula de silenciamento de RNA.

[279] De acordo com uma modalidade específica, a modificação compreende uma modificação de cerca de 10-250 nucleotídeos, cerca de 10-200 nucleotídeos, cerca de 10-150 nucleotídeos, cerca de 10-100 nucleotídeos, cerca de 10-50 nucleotídeos, cerca de 1-50 nucleotídeos, cerca de 1-10 nucleotídeos, cerca de 50-150 nucleotídeos, cerca de 50-100 nucleotídeos ou cerca de 100-200 nucleotídeos (em comparação com a molécula de RNA não codificante nativa, por exemplo, molécula de silenciamento de RNA).

[280] De acordo com uma modalidade, a modificação compreende uma modificação de no máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 ou no máximo 250 nucleotídeos (em comparação com a molécula de RNA não codificante nativa, por exemplo, molécula de silenciamento de RNA).

[281] De acordo com uma modalidade, a modificação

pode estar em uma sequência consecutiva de ácido nucleico (por exemplo, pelo menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200 bases).

[282] De acordo com uma modalidade, a modificação pode ser de maneira não consecutiva, por exemplo, ao longo de uma sequência de ácidos nucleicos de 20, 50, 100, 150, 200, 500, 1000.

[283] De acordo com uma modalidade específica, a modificação compreende uma modificação de no máximo 200 nucleotídeos.

[284] De acordo com uma modalidade específica, a modificação compreende uma modificação de no máximo 150 nucleotídeos.

[285] De acordo com uma modalidade específica, a modificação compreende uma modificação de no máximo 100 nucleotídeos.

[286] De acordo com uma modalidade específica, a modificação compreende uma modificação de no máximo 50 nucleotídeos.

[287] De acordo com uma modalidade específica, a modificação compreende uma modificação de no máximo 25 nucleotídeos.

[288] De acordo com uma modalidade específica, a modificação compreende uma modificação de no máximo 20 nucleotídeos.

[289] De acordo com uma modalidade específica, a modificação compreende uma modificação de no máximo 15 nucleotídeos.

[290] De acordo com uma modalidade específica, a modificação compreende uma modificação de no máximo 10 nucleotídeos.

[291] De acordo com uma modalidade específica, a modificação compreende uma modificação de no máximo 5 nucleotídeos.

[292] De acordo com uma modalidade, a modificação depende da estrutura da molécula de silenciamento de RNA.

[293] Por conseguinte, quando a molécula de silenciamento de RNA contém uma estrutura não essencial (isto é, uma

estrutura secundária da molécula de silenciamento de RNA que não desempenha um papel em sua biogênese e/ou função adequada) ou é puramente dsRNA (isto é, a molécula de silenciamento de RNA tendo um dsRNA perfeito ou quase perfeito), algumas modificações (por exemplo, 20 a 30 nucleotídeos, por exemplo, 1-10 nucleotídeos, por exemplo, 5 nucleotídeos) são introduzidas para redirecionar a especificidade de silenciamento da molécula de silenciamento de RNA.

[294] De acordo com outra modalidade, quando a molécula de silenciamento de RNA tem uma estrutura essencial (isto é, a biogênese e/ou a atividade adequadas da molécula de silenciamento de RNA depende de sua estrutura secundária), modificações maiores (por exemplo, 10-200 nucleotídeos, por exemplo, 50-150 nucleotídeos, por exemplo, mais de 30 nucleotídeos e não excedendo 200 nucleotídeos, 30-200 nucleotídeos, 35-200 nucleotídeos, 35-150 nucleotídeos, 35-100 nucleotídeos) são introduzidos para redirecionar a especificidade de silenciamento da molécula de silenciamento de RNA.

[295] De acordo com uma modalidade, a modificação é tal que o motivo de reconhecimento/local de corte/PAM da molécula de silenciamento de RNA é modificado para abolir o local de reconhecimento de PAM original.

[296] De acordo com uma modalidade específica, a modificação está em pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais ácidos nucleicos em um motivo PAM.

[297] De acordo com uma modalidade, a modificação compreende uma inserção.

[298] De acordo com uma modalidade específica, a inserção compreende uma inserção de cerca de 10-250 nucleotídeos, cerca de 10-200 nucleotídeos, cerca de 10-150 nucleotídeos, cerca de 10-100 nucleotídeos, cerca de 10-50 nucleotídeos, cerca de 1-50 nucleotídeos, cerca

de 1-10 nucleotídeos, cerca de 50-150 nucleotídeos, cerca de 50-100 nucleotídeos ou cerca de 100-200 nucleotídeos (em comparação com a molécula de RNA não codificante nativa, por exemplo, molécula de silenciamento de RNA).

[299] De acordo com uma modalidade, a inserção compreende uma inserção de no máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 ou no máximo 250 nucleotídeos (em comparação com a molécula de RNA não codificante nativa, por exemplo, molécula de silenciamento de RNA).

[300] De acordo com uma modalidade específica, a inserção compreende uma inserção de no máximo 200 nucleotídeos.

[301] De acordo com uma modalidade específica, a inserção compreende uma inserção de no máximo 150 nucleotídeos.

[302] De acordo com uma modalidade específica, a inserção compreende uma inserção de no máximo 100 nucleotídeos.

[303] De acordo com uma modalidade específica, a inserção compreende uma inserção de no máximo 50 nucleotídeos.

[304] De acordo com uma modalidade específica, a inserção compreende uma inserção de no máximo 25 nucleotídeos.

[305] De acordo com uma modalidade específica, a inserção compreende uma inserção de no máximo 20 nucleotídeos.

[306] De acordo com uma modalidade específica, a inserção compreende uma inserção de no máximo 15 nucleotídeos.

[307] De acordo com uma modalidade específica, a inserção compreende uma inserção de no máximo 10 nucleotídeos.

[308] De acordo com uma modalidade específica, a

inserção compreende uma inserção de no máximo 5 nucleotídeos.

[309] De acordo com uma modalidade, a modificação compreende uma deleção.

[310] De acordo com uma modalidade específica, a deleção compreende uma deleção de cerca de 10-250 nucleotídeos, cerca de 10-200 nucleotídeos, cerca de 10-150 nucleotídeos, cerca de 10-100 nucleotídeos, cerca de 10-50 nucleotídeos, cerca de 1-50 nucleotídeos, cerca de 1-10 nucleotídeos, cerca de 50-150 nucleotídeos, cerca de 50-100 nucleotídeos ou cerca de 100-200 nucleotídeos (em comparação com a molécula de RNA não codificante nativa, por exemplo, molécula de silenciamento de RNA).

[311] De acordo com uma modalidade, a deleção compreende uma deleção de no máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 ou no máximo 250 nucleotídeos (em comparação com a molécula de RNA não codificante nativa, por exemplo, molécula de silenciamento de RNA).

[312] De acordo com uma modalidade específica, a deleção compreende uma deleção de no máximo 200 nucleotídeos.

[313] De acordo com uma modalidade específica, a deleção compreende uma deleção de no máximo 150 nucleotídeos.

[314] De acordo com uma modalidade específica, a deleção compreende uma deleção de no máximo 100 nucleotídeos.

[315] De acordo com uma modalidade específica, a deleção compreende uma deleção de no máximo 50 nucleotídeos.

[316] De acordo com uma modalidade específica, a deleção compreende uma deleção de no máximo 25 nucleotídeos.

[317] De acordo com uma modalidade específica, a

deleção compreende uma deleção de no máximo 20 nucleotídeos.

[318] De acordo com uma modalidade específica, a deleção compreende uma deleção de no máximo 15 nucleotídeos.

[319] De acordo com uma modalidade específica, a deleção compreende uma deleção de no máximo 10 nucleotídeos.

[320] De acordo com uma modalidade específica, a deleção compreende uma deleção de no máximo 5 nucleotídeos.

[321] De acordo com uma modalidade, a modificação compreende uma mutação pontual.

[322] De acordo com uma modalidade específica, a mutação pontual compreende uma mutação pontual de cerca de 10-250 nucleotídeos, cerca de 10-200 nucleotídeos, cerca de 10-150 nucleotídeos, cerca de 10-100 nucleotídeos, cerca de 10-50 nucleotídeos, cerca de 1-50 nucleotídeos, cerca de 1-10 nucleotídeos, cerca de 50-150 nucleotídeos, cerca de 50-100 nucleotídeos ou cerca de 100-200 nucleotídeos (em comparação com a molécula de RNA não codificante nativa, por exemplo, molécula de silenciamento de RNA).

[323] De acordo com uma modalidade, a mutação pontual compreende uma mutação pontual de no máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 ou no máximo 250 nucleotídeos (em comparação com a molécula de RNA não codificante nativa, por exemplo, molécula de silenciamento de RNA).

[324] De acordo com uma modalidade específica, a mutação pontual compreende uma mutação pontual em no máximo 200 nucleotídeos.

[325] De acordo com uma modalidade específica, a mutação pontual compreende uma mutação pontual em no máximo 150 nucleotídeos.

[326] De acordo com uma modalidade específica, a mutação pontual compreende uma mutação pontual em no máximo 100 nucleotídeos.

[327] De acordo com uma modalidade específica, a mutação pontual compreende uma mutação pontual em no máximo 50 nucleotídeos.

[328] De acordo com uma modalidade específica, a mutação pontual compreende uma mutação pontual em no máximo 25 nucleotídeos.

[329] De acordo com uma modalidade específica, a mutação pontual compreende uma mutação pontual em no máximo 20 nucleotídeos.

[330] De acordo com uma modalidade específica, a mutação pontual compreende uma mutação pontual em no máximo 15 nucleotídeos.

[331] De acordo com uma modalidade específica, a mutação pontual compreende uma mutação pontual em no máximo 10 nucleotídeos.

[332] De acordo com uma modalidade específica, a mutação pontual compreende uma mutação pontual em no máximo 5 nucleotídeos.

[333] De acordo com uma modalidade, a modificação compreende uma combinação de qualquer uma de uma deleção, uma inserção e/ou uma mutação pontual.

[334] De acordo com uma modalidade, a modificação compreende a substituição de nucleotídeos (por exemplo, troca de nucleotídeos).

[335] De acordo com uma modalidade específica, a troca

compreende uma troca de cerca de 10-250 nucleotídeos, cerca de 10-200 nucleotídeos, cerca de 10-150 nucleotídeos, cerca de 10-100 nucleotídeos, cerca de 10-50 nucleotídeos, cerca de 1-50 nucleotídeos, cerca de 1-10 nucleotídeos, cerca de 50-150 nucleotídeos, cerca de 50-100 nucleotídeos ou cerca de 100-200 nucleotídeos (em comparação com a molécula de RNA não codificante nativa, por exemplo, molécula de silenciamento de RNA).

[336] De acordo com uma modalidade, a troca de nucleotídeos compreende uma troca de nucleotídeos de no máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 ou no máximo 250 nucleotídeos (em comparação com a molécula de RNA não codificante nativa, por exemplo, molécula de silenciamento de RNA).

[337] De acordo com uma modalidade específica, a troca de nucleotídeos compreende uma substituição de nucleotídeos em no máximo 200 nucleotídeos.

[338] De acordo com uma modalidade específica, a troca de nucleotídeos compreende uma substituição de nucleotídeos em no máximo 150 nucleotídeos.

[339] De acordo com uma modalidade específica, a troca de nucleotídeos compreende uma substituição de nucleotídeos em no máximo 100 nucleotídeos.

[340] De acordo com uma modalidade específica, a troca de nucleotídeos compreende uma substituição de nucleotídeos em no máximo 50 nucleotídeos.

[341] De acordo com uma modalidade específica, a troca de nucleotídeos compreende uma substituição de nucleotídeos em no máximo 25 nucleotídeos.

[342] De acordo com uma modalidade específica, a troca de nucleotídeos compreende uma substituição de nucleotídeos em no máximo 20 nucleotídeos.

[343] De acordo com uma modalidade específica, a troca de nucleotídeos compreende uma substituição de nucleotídeos em no máximo 15 nucleotídeos.

[344] De acordo com uma modalidade específica, a troca de nucleotídeos compreende uma substituição de nucleotídeos em no máximo 10 nucleotídeos.

[345] De acordo com uma modalidade específica, a troca de nucleotídeos compreende uma substituição de nucleotídeos em no máximo 5 nucleotídeos.

[346] De acordo com uma modalidade, o gene que codifica a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é modificado pela troca de uma sequência de uma molécula de silenciamento de RNA endógena (por exemplo, miRNA) por uma sequência de silenciamento de RNA de escolha (por exemplo, siRNA).

[347] De acordo com uma modalidade específica, a sequência de um siRNA usado para a troca de genes de uma molécula de silenciamento de RNA endógena (por exemplo, miRNA) compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 5-12 ou SEQ ID NOs: 103- 234.

[348] De acordo com uma modalidade, a fita guia da molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA, como precursores de miRNA (pri/pre-miRNAs) ou precursores de siRNA (dsRNA)) é modificada para preservar a originalidade da estrutura e manter o mesmo perfil de emparelhamento de bases.

[349] De acordo com uma modalidade, a fita passageira

da molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA, como precursores de miRNA (pri/pre-miRNAs) ou precursores de siRNA (dsRNA)) é modificada para preservar a originalidade da estrutura e manter o mesmo perfil de emparelhamento de bases.

[350] Como usado aqui, o termo “originalidade da estrutura” refere-se à estrutura secundária do RNA (ou seja, perfil de emparelhamento de bases). Manter a originalidade da estrutura é importante para a biogênese/processamento correto e eficiente do RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA, como siRNA ou miRNA) que é dependente da estrutura e não é puramente dependente da sequência.

[351] De acordo com uma modalidade, o RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é modificado na fita guia (fita de silenciamento) de modo a compreender cerca de 50 a 100% de complementaridade com o RNA alvo (como discutido acima) enquanto a fita passageira é modificada preservar a estrutura de RNA não codificante original (não modificada).

[352] De acordo com uma modalidade, o RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) é modificado de modo que a sequência de sementes (por exemplo, para os nucleotídeos de miRNA 2-8 do terminal 5') seja complementar à sequência alvo.

[353] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de silenciamento de RNA (isto é, molécula de RNAi) é projetada de modo que uma sequência da molécula de RNAi seja modificada para preservar a originalidade da estrutura e ser reconhecida pelos fatores de processamento e execução de RNAi celular.

[354] De acordo com uma modalidade específica, a molécula de RNA não codificante (isto é, rRNA, tRNA, lncRNA, snoRNA, etc.) é projetada de modo que uma sequência da molécula de RNAi seja modificada para ser reconhecida pelos fatores de processamento e execução do RNAi celular.

[355] O agente de edição de DNA da invenção pode ser introduzido nas células vegetais usando métodos de entrega de DNA (por exemplo, por vetores de expressão) ou métodos livres de DNA.

[356] De acordo com uma modalidade, o gRNA (ou qualquer outro módulo de reconhecimento de DNA usado, dependente do sistema de edição de DNA que é usado) pode ser fornecido como RNA para a célula.

[357] Assim, será apreciado que as presentes técnicas se relacionam à introdução do agente de edição de DNA usando métodos transitórios de DNA ou sem DNA, como transfecção de RNA (por exemplo, transfecção de mRNA + gRNA) ou transfecção de ribonucleoproteína (RNP) (por exemplo, transfecção de complexo RNA-proteína, por exemplo, transfecção do complexo ribonucleoproteína Cas9/gRNA (RNP)).

[358] Por exemplo, Cas9 pode ser introduzido como um plasmídeo de expressão de DNA, transcrito *in vitro* (por exemplo, RNA) ou como uma proteína recombinante ligada à porção de RNA em uma partícula de ribonucleoproteína (RNP). O gRNA, por exemplo, pode ser entregue como um plasmídeo de DNA ou como um transcrito *in vitro* (isto é, RNA).

[359] Qualquer método conhecido na técnica para transfecção de RNA ou RNP pode ser usado de acordo com os presentes ensinamentos, tais como, mas não se limitando a, microinjeção [como descrito por Cho *et al*., “Heritable gene knockout in Caenorhabditis elegans by direct injection of Cas9-sgRNA ribonucleoproteins” *Genetics* (2013) 195: 1177-1180, incorporado aqui por referência], eletroporação [como descrito por Kim *et al*.,”Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins” *Genome Res.* (2014) 24: 1012-1019, incorporado aqui por referência], ou transfecção mediada por lipídios, por exemplo, usando lipossomos [como descrito por Zuris *et al*., “Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in*

vitro and *in vivo*" *Nat Biotechnol.* (2014) doi: 10.1038/nbt.3081, aqui incorporado por referência]. Métodos adicionais de transfecção de RNA são descritos no Pedido de Patente US No. 20160289675, incorporado aqui por referência na sua totalidade.

[360] Uma vantagem dos métodos de transfecção de RNA da invenção é que a transfecção de RNA é essencialmente transitória e livre de vetores. Um transgene de RNA pode ser entregue a uma célula e expresso nela, como um cassete de expressão mínima, sem a necessidade de sequências adicionais (por exemplo, sequências virais).

[361] De acordo com uma modalidade, o agente de edição de DNA da invenção é introduzido na célula vegetal usando vetores de expressão.

[362] O "vetor de expressão" (também aqui referido como "um construto de ácido nucleico", "vetor" ou "construto") de algumas modalidades da invenção inclui sequências adicionais que tornam esse vetor adequado para replicação em procariontes, eucariontes ou, de preferência, ambos (por exemplo, vetores shuttle).

[363] Construtos úteis nos métodos de acordo com algumas modalidades da invenção podem ser construídos usando tecnologia de DNA recombinante bem conhecida dos especialistas na técnica. As sequências de ácidos nucleicos podem ser inseridas em vetores, que podem estar disponíveis comercialmente, adequados para a transformação em plantas e adequados para a expressão transitória do gene de interesse nas células transformadas. O construto genético pode ser um vetor de expressão em que a sequência de ácido nucleico está operacionalmente ligada a uma ou mais sequências reguladoras que permitem a expressão nas células vegetais.

[364] De acordo com uma modalidade, para expressar um agente de edição de DNA funcional, nos casos em que o módulo de clivagem (nuclease) não é parte integrante da unidade de reconhecimento de DNA, o

vetor de expressão pode codificar o módulo de clivagem e a unidade de reconhecimento de DNA (por exemplo, gRNA no caso de CRISPR/Cas).

[365] Alternativamente, o módulo de clivagem (nuclease) e a unidade de reconhecimento de DNA (por exemplo, gRNA) podem ser clonados em vetores de expressão separados. Nesse caso, pelo menos dois vetores de expressão diferentes devem ser transformados na mesma célula vegetal.

[366] Alternativamente, quando uma nuclease não é utilizada (isto é, não é administrada de uma fonte exógena à célula), a unidade de reconhecimento de DNA (por exemplo, gRNA) pode ser clonada e expressa usando um único vetor de expressão.

[367] Os vetores de expressão típicos também podem conter uma sequência de iniciação de transcrição e tradução, terminador de transcrição e tradução e, opcionalmente, um sinal de poliadenilação.

[368] De acordo com uma modalidade, o agente de edição de DNA compreende um agente de ácido nucleico que codifica pelo menos uma unidade de reconhecimento de DNA (por exemplo, gRNA) operacionalmente ligada a um elemento regulador de ação cis ativo em células vegetais (por exemplo, promotor).

[369] De acordo com uma modalidade, a nuclease (por exemplo, endonuclease) e a unidade de reconhecimento de DNA (por exemplo, gRNA) são codificadas a partir do mesmo vetor de expressão. Esse vetor pode compreender um único elemento regulador de ação cis ativo em células vegetais (por exemplo, promotor) para expressão de ambas a nuclease e a unidade de reconhecimento de DNA. Alternativamente, a nuclease e a unidade de reconhecimento de DNA podem estar operacionalmente ligadas a um elemento regulador de ação cis ativo em células vegetais (por exemplo, promotor).

[370] De acordo com uma modalidade, a nuclease (por exemplo, endonuclease) e a unidade de reconhecimento de DNA (por exemplo, gRNA) são codificadas a partir de diferentes vetores de expressão, sendo que cada um deles está operacionalmente ligado a um elemento regulador de ação cis ativo nas células vegetais (por exemplo, promotor).

[371] Como aqui utilizada, a frase “expressável por plantas” ou “ativa em células vegetais” refere-se a uma sequência promotora, incluindo quaisquer elementos reguladores adicionais adicionados a ela ou nela contidos, que são pelo menos capazes de induzir, conferir, ativar ou melhorar a expressão em um célula, tecido ou órgão vegetal, de preferência uma célula, tecido ou órgão de uma planta monocotiledônea ou dicotiledônea.

[372] O promotor de planta utilizado pode ser um promotor constitutivo, um promotor específico de tecido, um promotor indutível, um promotor quimérico ou um promotor regulado pelo desenvolvimento.

[373] Exemplos de promotores preferidos úteis para os métodos de algumas modalidades da invenção são apresentados nas Tabelas I, II, III e IV.

Tabela I: Promotores constitutivos exemplares para uso no desempenho de algumas modalidades da invenção

Fonte do Gene	***Padrão de expressão***	***Referência***
Actina	constitutivo	McElroy *et al*., Plant Cell, 2: 163-171, 1990
CAMV 35S	constitutivo	Odell *et al*., Nature, 313: 810-812, 1985
CaMV 19S	constitutivo	Nilsson *et al*., Physiol. Plant 100: 456-462, 1997
GOS2	constitutivo	de Pater *et al*., Plant J Nov; 2 (6): 837-44, 1992
ubiquitina	constitutivo	Christensen *et al*, Plant Mol. Biol. 18: 675-689, 1992
Ciclofilina de arroz	constitutivo	Bucholz *et al*, Plant Mol Biol. 25(5):837-

		43, 1994
Histona de milho H3	constitutivo	Lepetit *et al*, Mol. Gen. Genet. 231: 276-285, 1992
Actina 2	constitutivo	An *et al*, Plant J. 10(1);107121, 1996
CVMV (vírus do mosaico da nervura da mandioca	constitutivo	Lawrenson *et al*, Gen Biol 16:258, 2015
U6 (AtU626; TaU6)	constitutivo	Lawrenson *et al*, Gen Biol 16:258, 2015

Tabela II: Promotores preferidos de semente exemplares para uso no desempenho de algumas modalidades da invenção

Fonte do Gene	***Padrão de expressão***	***Referência***
Genes específicos de sementes	semente	Simon, *et al*., Plant Mol. Biol. 5. 191, 1985; Scofield, *et al*., J. Biol. Chem. 262: 12202, 1987; Baszczynski, *et al*., Plant Mol. Biol. 14: 633, 1990.
Albumina de castanha do Pará	semente	Pearson' *et al*., Plant Mol. Biol. 18: 235-245, 1992.
leguminosa	semente	Ellis, *et al*. Plant Mol. Biol. 10: 203-214, 1988
Glutelina (arroz)	semente	Takaiwa, *et al*., Mol. Gen. Genet. 208: 15-22, 1986; Takaiwa, *et al*., FEBS Letts. 221: 43-47, 1987
Zeína	semente	Matzke *et al* Plant Mol Biol, 143).323-32 1990
napA	semente	Stalberg, *et al*, Planta 199: 515-519, 1996
glutenina-1 LMW e HMW de trigo,	endosperma	Mol Gen Genet 216:81-90, 1989; NAR 17: 461-2,
Trigo SPA	semente	Albanietal, Plant Cell, 9: 171- 184, 1997
gliadinas a, b e g de trigo	endosperma	EMBO3:1409-15, 1984
Promotor ltrl de cevada	endosperma	
cevada B1, C, D hordeína	endosperma	Theor Appl Gen 98:1253-62, 1999; Plant J 4:343-55, 1993; Mol Gen Genet 250:750-60,

		1996
Cevada DOF	endosperma	Mena *et al*, The Plant Journal, 116(1): 53-62, 1998
Biz2	endosperma	EP99106056.7
Promotor sintético	endosperma	Vicente-Carbajosa *et al*., Plant J. 13: 629-640, 1998
prolamina de arroz NRP33	endosperma	Wu *et al*, Plant Cell Physiology 39(8) 885-889, 1998
globulina de arroz Glb-1	endosperma	Wu *et al*, Plant Cell Physiology 398) 885-889, 1998
arroz OSH1	emryo	Sato *et al*, Proc. Nati. Acad. Sci. EUA, 93: 8117-8122
alfa-globulina de arroz REB/OHP-1	endosperma	Nakase *et al*. Plant Mol. Biol. 33: 513-S22, 1997
ADP-glicose PP de arroz	endosperma	Trans Res 6:157-68, 1997
família do gene ESR do milho	endosperma	Plant J 12:235-46, 1997
sorgum gamma-kafirin	endosperma	PMB 32:1029-35, 1996
KNOX	emryo	Postma-Haarsma ef al, Plant Mol. Biol. 39: 257-71, 1999
oleosina de arroz	Embrião e aleuton	Wu et at, J. Biochem., 123:386, 1998
oleosina de girassol	Semente (embrião e semente seca)	Cummins, *et al*., Plant Mol. Biol. 19: 873-876, 1992

Tabela III: Promotores específicos de flores exemplares para uso no desempenho da invenção

Fonte do Gene	***Padrão de expressão***	***Referência***
AtPRP4	flores	www(ponto)salus(ponto) medium(ponto)edu/m mg/tierney/html
caleno sintase (chsA)	flores	Van der Meer, *et al*., Plant Mol.

		Biol. 15, 95-109, 1990.
LAT52	antera	Twell *et al* Mol. Gen. Genet. 217:240-245 (1989)
apetala- 3	flores	

Tabela IV: Promotores de arroz alternativos para uso no desempenho da invenção

PRO #	***Gene***	***Expressão***
PR00001	Metalotioneína Mte	camada de transferência de embrião + calos
PR00005	putativa beta-amilase	camada de transferência de embrião
PR00009	Celulose sintase putativa	Fraco em raízes
PR00012	lipase (putativa)	
PR00014	Transferase (putativa)	
PR00016	peptidil prolil cis-trans isomerase (putativa)	
PR00019	desconhecido	
PR00020	proteína prp (putativa)	
PR00029	nodulina (putativa)	
PR00058	Inibidor da proteinase Rgpi9	semente
PR00061	EXPB9 expansina beta	Fraco em flores jovens
PR00063	Proteína estrutural	tecidos jovens + calos + embrião
PR00069	xilosidase (putativa)	
PR00075	Prolamine 10Kda	forte no endosperma
PR00076	alérgeno RA2	forte no endosperma
PR00077	prolamina RP7	forte no endosperma
PR00078	CBP80	
PR00079	enzima de ramificação do amido I	

PR00080	ML2 tipo metalotioneína	camada de transferência de embrião + calos
PR00081	cafeína-CoA putativa 3-0 metiltransferase	broto
PR00087	prolamina RM9	forte no endosperma
PR00090	prolamina RP6	forte no endosperma
PR00091	prolamina RP5	forte no endosperma
PR00092	alérgeno RA5	
PR00095	metionina aminopeptidase putativa	embrião
PR00098	proteína de ligação a GTP relacionada com ras	
PR00104	EXPB1 expansina beta	
PR00105	Proteína rica em glicina	
PR00108	proteína (putativa) semelhante a metalotioneína	
PR00110	raiz forte RCc3	
PR00111	proteína semelhante à uclacianina 3	centro de discriminação fraco/meristema de broto
PR00116	proteasome regulatório 26S subunidade não-ATPase de partículas 11	meristema muito fraco específico
PR00117	proteína ribossômica 40S putativa	fraco no endosperma
PR00122	clorofila de ligação a a/lo precursor de proteínas (Cab27)	muito fraco no broto
PR00123	redutase protoclorofilida putativa	Folhas fortes
PR00126	metalotioneína RiCMT	forte discriminação meristema do broto central
PR00129	GOS2	Forte constituinte
PR00131	GOS9	
PR00133	quitinase Cht-3	meristema muito fraco específico

PR00135	alfa-globulina	Forte no endosperma
PR00136	alanina aminotransferase	Fraco no endosperma
PR00138	Ciclina A2	
PR00139	Ciclina D2	
PR00140	Ciclina D3	
PR00141	Ciclofilina 2	Broto e semente
PR00146	sacarose sintase SS1 (cevada)	constitutinte médio
PR00147	inibidor de tripsina ITR1 (cevada)	fraco no endosperma
PR00149	ubiquitina 2 com íntron	forte constituinte
PR00151	WSI18	Embrião e estresse
PR00156	Homólogo HVA22 (putativo)	
PR00157	EL2	
PR00169	aquaporina	constitutinte médio em plantas jovens
PR00170	Proteína do grupo de alta mobilidade	Forte constituinte
PR00171	proteína reversivelmente glicosilada RGP1	constituinte fraco
PR00173	MDH citosólico	broto
PR00175	RAB21	Embrião e estresse
PR00176	CDPK7	
PR00177	Cdc2-1	muito fraco no meristema
PR00197	sacarose sintase 3	
PRO0198	OsVP1	
PRO0200	OSH1	muito fraco em jovens meristema vegetal
PRO0208	clorofilase putativa	
PRO0210	OsNRT1	
PRO0211	EXP3	
PRO0216	transportador de fosfato OjPT1	

PRO0218	oleosina 18kd	aleurona + embrião
PRO0219	ubiquitina 2 sem íntron	
PRO0220	RFL	
PRO0221	íntron delta de UBI de milho	não detectado
PRO0223	glutelina-1	
PRO0224	fragmento de prolamina promotor de RP6	
PRO0225	4xABRE	
PRO0226	glutelina OSGLUA3	
PRO0227	BLZ-2_short (cevada)	
PR00228	BLZ-2_long (cevada)	

[374] O promotor indutível é um promotor induzido em um tecido vegetal específico, por um estágio de desenvolvimento ou por um estímulo específico, como condições de estresse que compreendem, por exemplo, luz, temperatura, produtos químicos, seca, alta salinidade, choque osmótico, condições oxidantes ou, no caso de patogenicidade e incluem, sem se limitar a, o promotor induzível à luz derivado do gene de rbcS de ervilha, o promotor do gene de rbcS de alfafa, os promotores DRE, MYC e MYB ativos na seca; os promotores INT, INPS, prxEa, Ha hsp17.7G4 e RD21 ativos em alta salinidade e estresse osmótico, e os promotores hsr203J e str246C ativos em estresse patogênico.

[375] De acordo com uma modalidade, o promotor é um promotor induzível por patógenos. Esses promotores direcionam a expressão de genes em plantas após a infecção por um patógeno, como bactérias, fungos, vírus, nematóides e insetos. Tais promotores incluem os de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR), que são induzidas após a infecção por um patógeno; por exemplo, proteínas PR, proteínas SAR, beta-1,3-glucanase, quitinase, etc. Ver, por exemplo, Redolfi *et al*. (1983) *Neth. J. Plant Pathol* 89:245-254; Uknes *et al*. (1992) *Plant Cell* 4:645-656; e Van Loon (1985)

Plant Mol. Virol. 4:111-116.

[376] De acordo com uma modalidade, quando mais de um promotor é usado no vetor de expressão, os promotores são idênticos (por exemplo, todos idênticos, pelo menos dois idênticos).

[377] De acordo com uma modalidade, quando mais de um promotor é usado no vetor de expressão, os promotores são diferentes (por exemplo, pelo menos dois diferentes, todos diferentes).

[378] De acordo com uma modalidade, o promotor no vetor de expressão inclui, mas não está limitado a, CaMV 35S, 2x CaMV 35S, CaMV 19S, ubiquitina, AtU626 ou TaU6.

[379] De acordo com uma modalidade específica, o promotor no vetor de expressão compreende um promotor 35S.

[380] De acordo com uma modalidade específica, o promotor no vetor de expressão compreende um promotor U6.

[381] Os vetores de expressão também podem compreender sequências de iniciação de transcrição e tradução, sequências terminadoras de transcrição e tradução e opcionalmente um sinal de poliadenilação.

[382] De acordo com uma modalidade específica, o vetor de expressão compreende uma sequência de terminação, tal como, mas sem se limitar a, uma sequência de terminação G7, uma sequência de terminação AtuNos ou uma sequência terminadora de CaMV-35S.

[383] As células vegetais podem ser transformadas de maneira estável ou transitória com os construtos 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 transitória, a molécula de ácido nucleico é expressa pela célula

transformada, mas não é integrada ao genoma e, como tal, representa uma característica transitória.

[384] Existem vários métodos de introdução de genes estranhos em plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas (Potrykus, I., Annu. Rev. Plant. Physiol., Plant. Mol. Biol. (1991) 42:205-225; Shimamoto *et al*., Nature (1989) 338:274-276).

[385] Os métodos principais de causar integração estável do DNA exógeno no DNA genômico da planta incluem duas abordagens principais:

(i) Transferência de genes mediada por Agrobacterium: Klee *et al*. (1987) Annu. Rev. Plant Physiol. 38:467-486; Klee and Rogers em Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes, eds. Schell, J., and Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) p. 2-25; Gatenby, na Plant Biotechnology, eds. Kung, S. e Arntzen, CJ, Butterworth Publishers, Boston, Mass. (1989) p. 93-112.

(ii) captação direta de DNA: Paszkowski *et al*., in Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes eds. Schell, J. e Vasil, LK, Academic Publishers, San Diego, Califórnia (1989) p. 52-68; incluindo métodos para captação direta de DNA em protoplastos, Toriyama, K. *et al*. (1988) Bio/Technology 6:1072-1074. Captação de DNA induzida por choque elétrico breve de células vegetais: Zhang *et al*. Plant Cell Rep. (1988) 7:379-384. Fromm *et al*. Nature (1986) 319:791-793. Injeção de DNA em células ou tecidos vegetais por bombardeio de partículas, Klein *et al*. Bio/Technology (1988) 6:559-563; McCabe *et al*. Bio/Technology (1988) 6:923-926; Sanford, Physiol. Plantar. (1990) 79: 206-209; pelo uso de sistemas de micropipetas: Neuhaus *et al*., Theor. Appl. Genet. (1987) 75:30-36; Neuhaus and Spangenberg, Physiol. Plant. (1990) 79: 213-217; transformação de fibras de vidro ou whisker de carboneto de silício de culturas celulares, embriões ou tecido caloso, Pat. US No. 5.464.765 ou pela incubação direta de DNA com pólen em

germinação, DeWet *et al*. em Experimental Manipulation of Ovule Tissue, eds. Chapman, G. P. and Mantell, S. H. e Daniels, W. Longman, London, (1985) p. 197-209; e Ohta, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:715-719.

[386] O sistema Agrobacterium inclui o uso de vetores plasmídicos que contêm segmentos de DNA definidos que se integram ao DNA genômico da planta. Os métodos de inoculação do tecido vegetal variam dependendo da espécie da planta e do sistema de administração de Agrobacterium. Uma abordagem amplamente usada é o procedimento de disco foliar que pode ser realizado com qualquer explante de tecido que forneça uma boa fonte para o início da diferenciação de plantas inteiras. Horsch *et al*. em Plant Molecular Biology Manual A5, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988) p. 1-9. Uma abordagem suplementar emprega o sistema de administração de Agrobacterium em combinação com a infiltração a vácuo. O sistema Agrobacterium é especialmente viável na criação de plantas dicotiledôneas transgênicas.

[387] De acordo com uma modalidade, um método de expressão livre de agrobactérias é usado para introduzir genes estranhos nas células vegetais. De acordo com uma modalidade, o método de expressão livre de agrobactérias é transitório. De acordo com uma modalidade específica, um método de bombardeio é usado para introduzir genes estranhos nas células vegetais. De acordo com outra modalidade específica, o bombardeio de uma raiz de planta é usado para introduzir genes estranhos nas células vegetais. Um exemplo de método de bombardeio que pode ser usado de acordo com algumas modalidades da invenção é discutido na seção de exemplos a seguir.

[388] Além disso, vários kits de clonagem ou síntese gênica podem ser utilizados de acordo com os ensinamentos de algumas modalidades da invenção.

[389] De acordo com uma modalidade, o construto de ácido nucleico é um vetor binário. 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)).

[390] Exemplos de outros vetores a serem utilizados em outros métodos de entrega de DNA (por exemplo, transfecção, eletroporação, bombardeio, inoculação viral, como discutido abaixo) 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), pAHC25 (Christensen, A.H. & P.H. Quail, 1996. Vetores baseados em promotores de ubiquitina para expressão de alto nível de genes marcadores selecionáveis e/ou triados em plantas monocotiledôneas. Transgenic Research 5: 213–218), pHBT-sGFP(S65T)-NOS (Sheen *et al*. A atividade da fosfatase proteica é necessária para a expressão de genes induzíveis à luz no milho, EMBO J. 12 (9), 3497-3505 (1993).

[391] De acordo com uma modalidade, o método de algumas modalidades da invenção compreende ainda a introdução dos oligonucleotídeos doadores nas células vegetais.

[392] De acordo com uma modalidade, quando a modificação é uma inserção, o método compreende ainda a introdução dos oligonucleotídeos doadores nas células vegetais.

[393] De acordo com uma modalidade, quando a modificação é uma deleção, o método compreende ainda a introdução dos oligonucleotídeos doadores nas células vegetais.

[394] De acordo com uma modalidade, quando a modificação é uma deleção e inserção (por exemplo, troca), o método compreende ainda a introdução dos oligonucleotídeos doadores nas células vegetais.

[395] De acordo com uma modalidade, quando a modificação é uma mutação pontual, o método compreende ainda a introdução dos oligonucleotídeos doadores nas células vegetais.

[396] Como usado aqui, o termo “oligonucleotídeos doadores” ou “oligos doadores” refere-se a nucleotídeos exógenos, isto é, introduzidos externamente na célula vegetal para gerar uma mudança precisa no genoma. De acordo com uma modalidade, os oligonucleotídeos doadores são sintéticos.

[397] De acordo com uma modalidade, os oligos doadores são oligos de RNA.

[398] De acordo com uma modalidade, os oligos doadores são oligos de DNA.

[399] De acordo com uma modalidade, os oligos doadores são oligos sintéticos.

[400] De acordo com uma modalidade, os oligonucleotídeos doadores compreendem oligonucleotídeos doadores de fita única (ssODN).

[401] De acordo com uma modalidade, os oligonucleotídeos doadores compreendem oligonucleotídeos doadores de fita dupla (dsODN).

[402] De acordo com uma modalidade, os oligonucleotídeos doadores compreendem DNA de fita dupla (dsDNA).

[403] De acordo com uma modalidade, os oligonucleotídeos doadores compreendem duplex de DNA-RNA de fita dupla (duplex de DNA-RNA).

[404] De acordo com uma modalidade, os oligonucleotídeos doadores compreendem híbrido de DNA-RNA de fita dupla

[405] De acordo com uma modalidade, os oligonucleotídeos doadores compreendem híbrido DNA-RNA de fita única.

[406] De acordo com uma modalidade, os oligonucleotídeos doadores compreendem DNA de fita única (ssDNA).

[407] De acordo com uma modalidade, os oligonucleotídeos doadores compreendem RNA de fita dupla (dsRNA).

[408] De acordo com uma modalidade, os oligonucleotídeos doadores compreendem RNA de fita simples (ssRNA).

[409] De acordo com uma modalidade, os oligonucleotídeos doadores compreendem a sequência de DNA ou RNA para troca (como discutido acima).

[410] De acordo com uma modalidade, os oligonucleotídeos doadores são fornecidos em um formato de vetor não expresso ou oligo.

[411] De acordo com uma modalidade, os oligonucleotídeos doadores compreendem um plasmídeo doador de DNA (por exemplo, plasmídeo circular ou linearizado).

[412] De acordo com uma modalidade, os oligonucleotídeos doadores compreendem cerca de 50-5000, cerca de 100-5000, cerca de 250-5000, cerca de 500-5000, cerca de 750-5000, cerca de 1000-5000, cerca de 1500-5000, cerca de 2000-5000, cerca de 2500-5000, cerca de 3000-5000, cerca de 4000-5000, cerca de 50-4000, cerca de 100-4000, cerca de 250-4000, cerca de 500-4000, cerca de 750-4000, cerca de 1000-4000, cerca de 1500-4000, sobre 2000-4000, cerca de 2500-4000, cerca de 3000-4000, cerca de 50-3000, cerca de 100-3000, cerca de 250-3000, cerca de 500-3000, cerca de 750-3000, cerca de 1000-3000, cerca de 1500-3000, sobre 2000-3000, cerca de 50-2000, cerca de 100-2000, cerca de 250-2000, cerca de 500-2000, cerca de 750-2000, cerca de 1000-2000, cerca de 1500-

2000, cerca de 50-1000, cerca de 50-1000, cerca de 100-1000, cerca de 250-1000, cerca de 500-1000, cerca de 750-1000, cerca de 50-750, cerca de 150-750, cerca de 250-750, cerca de 500-750, cerca de 50-500, cerca de 150-500, cerca de 200-500, sobre 250-500, cerca de 350-500, cerca de 50-250, cerca de 150-250 ou cerca de 200-250 nucleotídeos.

[413] De acordo com uma modalidade específica, os oligonucleotídeos doadores compreendendo o ssODN (por exemplo, ssDNA ou ssRNA) compreendem cerca de 200-500 nucleotídeos.

[414] De acordo com uma modalidade específica, os oligonucleotídeos doadores compreendendo o dsODN (por exemplo, dsDNA ou dsRNA) compreendem cerca de 250-5000 nucleotídeos.

[415] De acordo com uma modalidade, para a troca genética de uma molécula de silenciamento de RNA endógena (por exemplo, miRNA) com uma sequência de silenciamento de RNA de escolha (por exemplo, siRNA), o vetor de expressão ssODN (por exemplo, ssDNA ou ssRNA) ou dsODN (por exemplo, dsDNA ou dsRNA) não precisa ser expresso em uma célula vegetal e pode servir como um modelo não-expressivo. De acordo com uma modalidade específica, nesse caso, apenas o agente de edição de DNA (por exemplo, módulos Cas9/sgRNA) precisa ser expresso se fornecido na forma de DNA.

[416] De acordo com algumas modalidades, para edição de genes de uma molécula de RNA não codificante endógena (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) sem o uso de uma nuclease, o agente de edição de DNA (por exemplo, gRNA) pode ser introduzido na célula eucariótica com ou sem (por exemplo DNA ou RNA doador de oligonucleotídeo, como discutido aqui).

[417] De acordo com uma modalidade, a introdução dos oligonucleotídeos doadores nas células vegetais é realizada usando qualquer um dos métodos descritos acima (por exemplo, usando os vetores de

expressão ou transfecção de RNP).

[418] De acordo com uma modalidade, o gRNA e os oligonucleotídeos doadores de DNA são co-introduzidos na célula vegetal (por exemplo, via bombardeio). Será apreciado que quaisquer fatores adicionais (por exemplo, nuclease) podem ser co-introduzidos com eles.

[419] De acordo com uma modalidade, o gRNA é introduzido na célula vegetal antes dos oligonucleotídeos doadores de DNA (por exemplo, dentro de alguns minutos ou algumas horas). Será apreciado que quaisquer fatores adicionais (por exemplo, nuclease) podem ser introduzidos antes, concomitantemente ou após o gRNA ou oligonucleotídeos doadores de DNA.

[420] De acordo com uma modalidade, o gRNA é introduzido na célula vegetal depois dos oligonucleotídeos doadores de DNA (por exemplo, dentro de alguns minutos ou algumas horas). Será apreciado que quaisquer fatores adicionais (por exemplo, nuclease) podem ser introduzidos antes, concomitantemente ou após o gRNA ou oligonucleotídeos doadores de DNA.

[421] De acordo com uma modalidade, é fornecida uma composição compreendendo pelo menos um oligonucleotídeo doador de gRNA e DNA para edição do genoma.

[422] De acordo com uma modalidade, é fornecida uma composição compreendendo pelo menos um gRNA, uma nuclease (por exemplo, endonuclease) e oligonucleotídeos doadores de DNA para edição do genoma.

[423] Existem vários métodos de transferência direta de DNA para as células vegetais, e o especialista na técnica saberá qual selecionar. Na eletroporação, os protoplastos são brevemente expostos a um forte campo elétrico. Na microinjeção, o DNA é injetado mecanicamente de

forma direta nas células usando micropipetas muito pequenas. No bombardeio de micropartículas, o DNA é adsorvido em microprojéteis, como cristais de sulfato de magnésio ou partículas de ouro ou tungstênio, e os microprojéteis são fisicamente acelerados em protoplastos, células ou tecidos vegetais.

[424] Assim, a entrega de ácidos nucléicos pode ser introduzida em uma célula vegetal em modalidades da invenção por qualquer método conhecido dos especialistas na técnica, incluindo, por exemplo e sem limitação: por transformação de protoplastos (ver, por exemplo, Pat. US. No. 5.508.184); por captação de DNA mediada por dessecação/inibição (Ver, por exemplo, Potrykus *et al*. (1985) Mol. Gen. Genet. 199: 183-8); por eletroporação (Ver, por exemplo, Pat. U.S. No. 5.384.253); por agitação com fibras de carboneto de silício (ver, por exemplo, Pat. U.S. 5.302.523 e 5.464.765); por transformação mediada por Agrobacterium (Ver, por exemplo, Pat. U.S. Nos. 5.563.055, 5.591.616, 5.693.512, 5.824.877, 5.981.840 e 6.384.301); por aceleração de partículas revestidas de DNA (Ver, por exemplo, Pat. 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 que penetram nas células (WO201126644A2; WO2009046384A1; WO2008148223A1) nos métodos para fornecer DNA, RNA, peptídeos e/ou proteínas ou combinações de ácidos nucleicos e peptídeos em células vegetais.

[425] 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, 4897-902), peptídeos de penetração celular (Mäe *et al*., 2005, Internalização de peptídeos de penetração celular em protoplastos de tabaco, Biochimica et Biophysica Acta 1669 (2): 101-7) ou poliaminas (Zhang e Vinogradov, 2010, Poliaminas biodegradáveis curtas para entrega de genes e transfecção de células endoteliais capilares cerebrais, J Control Release, 143(3):359-366).

[426] De acordo com uma modalidade específica, para a

introdução de DNA nas células vegetais (por exemplo, protoplastos), o método compreende a captação de DNA mediada por polietileno glicol (PEG). Para mais detalhes, ver Karesch *et al*. (1991) Plant Cell Rep. 9:575-578; Mathur *et al*. (1995) Plant Cell Rep. 14:221-226; Negrutiu *et al*. (1987) Plant Cell Mol. Biol. 8:363-373. As células vegetais (por exemplo, protoplastos) são então cultivadas sob condições que lhes permitem desenvolver paredes celulares, começar a se dividir para formar um calo, desenvolver brotos e raízes e regenerar plantas inteiras.

[427] Após a transformação estável, a propagação de plantas é exercida. O método mais comum de propagação de plantas é por sementes. A regeneração por propagação de sementes, no entanto, tem a deficiência de que, devido à heterozigose, há falta de uniformidade na cultura, uma vez que as sementes são produzidas pelas plantas de acordo com as variações genéticas governadas pelas regras mendelianas. Basicamente, cada semente é geneticamente diferente e cada uma crescerá com suas próprias características específicas. Portanto, é preferível que a planta transformada seja produzida de modo que a planta regenerada tenha os mesmos traços e características da planta transgênica original. Portanto, é preferido que a planta transformada seja regenerada por micropropagação, o que fornece uma reprodução rápida e consistente das plantas transformadas geneticamente idênticas.

[428] A micropropagação é um processo de cultivo de plantas de nova geração a partir de um único pedaço de tecido que foi retirado de uma planta ou cultivar parental selecionada. Este processo permite a reprodução em massa de plantas com a característica desejada. As novas plantas geradas são geneticamente idênticas e possuem todas as características da planta original. A micropropagação (ou clonagem) permite a produção em massa de material vegetal de qualidade em um curto período de tempo e oferece uma rápida multiplicação de cultivares selecionadas na preservação das características da planta transgênica ou transformada original.

As vantagens de clonar plantas são a velocidade de multiplicação das plantas e a qualidade e uniformidade das plantas produzidas.

[429] A micropropagação é um procedimento de múltiplos estágios que requer alteração do meio de cultura ou condições de crescimento entre os estágios. Assim, o processo de micropropagação envolve quatro estágios básicos: estágio um, cultura inicial de tecidos; estágio dois, multiplicação da cultura de tecidos; estágio três, diferenciação e formação de plantas; e estágio quatro, cultivo e endurecimento em estufa. Durante o estágio um, a cultura inicial de tecidos, a cultura de tecidos é estabelecida e certificada como livre de contaminantes. Durante o estágio dois, a cultura inicial de tecido é multiplicada até que um número suficiente de amostras de tecido seja produzido para atender às metas de produção. Durante o estágio três, as amostras de tecido cultivadas no estágio dois são divididas e cultivadas em plântulas individuais. No estágio quatro, as plântulas transformadas são transferidas para uma estufa para endurecimento, onde a tolerância das plantas à luz é gradualmente aumentada para que possa ser cultivada no ambiente natural.

[430] Embora a transformação estável seja presentemente preferida, a transformação transitória de células da folha, células meristemáticas ou de toda a planta também é contemplada por algumas modalidades da invenção.

[431] A transformação transitória pode ser efetuada por qualquer um dos métodos de transferência direta de DNA descritos acima ou por infecção viral usando vírus de plantas modificados.

[432] Os vírus que demonstraram ser úteis para a transformação de hospedeiros vegetais incluem CaMV, TMV, TRV e BV. A transformação de plantas usando vírus de plantas é descrita na Pat. U.S. 4.855.237 (BG3V), EP-A 67.553 (TMV), pedido publicado japonês No. 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, New York, pp. 172-189 (1988). Partículas de pseudovírus para uso na expressão de DNA estranho em muitos hospedeiros, incluindo plantas, são descritas no documento WO 87/06261.

[433] A construção de vírus de RNA de plantas para a introdução e expressão de sequências de ácidos nucleicos exógenos não virais em plantas é demonstrada pelas referências acima, bem como por Dawson, WO *et al*., Virology (1989) 172: 285-292; Takamatsu *et al*. EMBO J. (1987) 6:307-311; French *et al*. Science (1986) 231: 1294-1297; e Takamatsu *et al*. FEBS Letters (1990) 269:73-76.

[434] Quando o vírus é um vírus de DNA, modificações adequadas podem ser feitas no próprio vírus. Alternativamente, o vírus pode primeiro ser clonado em um plasmídeo bacteriano para facilitar a construção do vetor viral desejado com o DNA estranho. O vírus pode então ser retirado do plasmídeo. Se o vírus é 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 deste DNA produzirá a proteína de revestimento que encapsidará o DNA viral. Se o vírus é um vírus de RNA, geralmente o vírus é clonado como um cDNA e inserido em um plasmídeo. O plasmídeo é então usado para fazer todas as construções. O vírus de RNA é então produzido através da transcrição da sequência viral do plasmídeo e da tradução dos genes virais para produzir a(s) proteína(s) de revestimento que encapsidam o RNA viral.

[435] 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 na construção de algumas modalidades da invenção, é demonstrada pelas referências acima, bem como na Pat. U.S. No. 5.316.931.

[436] Em uma modalidade, é fornecido um ácido nucleico

viral da planta em que 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 da sequência de codificação da proteína de revestimento não nativa, capaz de expressão no hospedeiro de planta, foram inseridos, embalando o ácido nucleico viral da planta recombinante e garantindo 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 ácido nucleico 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 é capaz de transcrever ou expressar genes adjacentes ou sequências de ácidos nucleicos no hospedeiro da planta e incapaz de se recombinarem entre si e com promotores subgenômicos nativos. Sequências de ácidos nucleicos não nativas (estranhos) podem ser inseridas adjacentes ao promotor subgenômico viral da planta nativa ou a promotores subgenômicos virais nativos e não nativos se mais de uma sequência de ácido nucleico 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.

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

[438] Numa 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 são capazes de transcrever ou expressar genes adjacentes em um hospedeiro da planta e são incapazes 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 sequências sejam transcritas ou expressas na planta hospedeira sob controle dos promotores subgenômicos para produzir o produto desejado.

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

[440] 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 utilizado para infectar as plantas hospedeiras apropriadas. O ácido nucleico viral da planta recombinante é capaz de replicação no hospedeiro, disseminação sistêmica no hospedeiro e transcrição ou expressão de gene(s) estranho(s) (ácido nucleico isolado) no hospedeiro para produzir a proteína desejada.

[441] Além do acima, a molécula de ácido nucleico de algumas modalidades da invenção também pode ser introduzida em um genoma de cloroplasto, permitindo assim a expressão de cloroplasto.

[442] É conhecida uma técnica para a introdução de sequências de ácido nucleico exógenas no genoma dos cloroplastos. Essa técnica envolve os seguintes procedimentos. Primeiro, as células vegetais são tratadas quimicamente, de modo a reduzir o número de cloroplastos por célula para cerca de um. Em seguida, o ácido nucleico exógeno é introduzido por

meio de bombardeio de partículas nas células, com o objetivo de introduzir pelo menos uma molécula de ácido nucleico exógeno nos cloroplastos. O ácido nucleico exógeno é selecionado de modo que seja integrável ao genoma do cloroplasto por meio de recombinação homóloga que é prontamente efetuada por enzimas inerentes ao cloroplasto. Para este fim, o ácido nucleico exógeno inclui, além de um gene de interesse, pelo menos um trecho de ácido nucleico que é derivado do genoma do cloroplasto. Além disso, o ácido nucleico exógeno inclui um marcador selecionável, que serve por procedimentos de seleção sequencial para verificar se todas ou substancialmente todas as cópias dos genomas de cloroplasto após essa seleção incluirão o ácido nucleico exógeno. Mais detalhes relacionados a esta técnica são encontrados na Pat. U.S. 4.945.050; e 5.693.507 que são incorporadas aqui por referência. Um polipeptídeo pode, assim, ser produzido pelo sistema de expressão de proteínas do cloroplasto e se integrar à membrana interna do cloroplasto.

[443] Independentemente do método de transformação/infecção empregado, os presentes ensinamentos ainda selecionam células transformadas compreendendo um evento de edição de genoma.

[444] De acordo com uma modalidade específica, a seleção é realizada de modo que apenas as células compreendendo uma modificação precisa bem-sucedida (por exemplo, troca, inserção, deleção, mutação pontual) no local específico sejam selecionadas. Por conseguinte, as células que compreendem qualquer evento que inclui uma modificação (por exemplo, uma inserção, deleção, mutação pontual) em um local não intencional não são selecionadas.

[445] De acordo com uma modalidade, a seleção de células modificadas pode ser realizada no nível fenotípico, pela detecção de um evento molecular, pela detecção de um repórter fluorescente ou pelo crescimento na presença de seleção (por exemplo, antibiótico).

[446] De acordo com uma modalidade, a seleção de células modificadas é realizada analisando a biogênese e a ocorrência da molécula de RNA não codificante recém-editada (por exemplo, a presença da nova versão do miRNA, a presença de novos siRNAs, piRNAs, tasiRNAs etc. editados).

[447] De acordo com uma modalidade, a seleção de células modificadas é realizada analisando a atividade de silenciamento e/ou a especificidade da molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) em relação a um segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse, validando pelo menos um fenótipo em a planta ou o organismo que codifica o RNA alvo, por exemplo, coloração das folhas das plantas, por exemplo, perda parcial ou completa de clorofila nas folhas e em outros órgãos (branqueamento), presença/ausência de padrões nacróticos, coloração de flores, características de frutos (como validade, firmeza e sabor), taxa de crescimento, tamanho da planta (por exemplo, nanismo), rendimento da colheita, resistência ao estresse biótico (por exemplo, resistência a doenças, mortalidade de nematóides, taxa de deposição de ovos de besouros ou outros fenótipos resistentes associados a bactérias, vírus, fungos, parasitas, insetos, ervas daninhas e plantas cultivadas ou nativas), resistência ao estresse abiótico (por exemplo, resistência ao calor/frio, resistência à seca, resistência ao sal, resistência ao álcool alílico ou resistente à falta de nutrientes, por exemplo, fósforo (P)).

[448] De acordo com uma modalidade, a especificidade de silenciamento da molécula de RNA não codificante é determinada genotipicamente, por exemplo, pela expressão de um gene ou falta de expressão.

[449] De acordo com uma modalidade, a especificidade de silenciamento da molécula de RNA não codificante é determinada fenotipicamente.

[450] De acordo com uma modalidade, um fenótipo da planta é determinado antes de um genótipo.

[451] De acordo com uma modalidade, um genótipo da planta é determinado antes de um fenótipo.

[452] De acordo com uma modalidade, a seleção de células modificadas é realizada analisando a atividade de silenciamento e/ou a especificidade da molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) em relação a um segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse, medindo um nível de RNA do segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse. Isto pode ser realizado utilizando qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, por transferência de Northern, Ensaios de Proteção de Nuclease, Hibridização In Situ ou RT-PCR quantitativo.

[453] De acordo com uma modalidade, a seleção de células modificadas é realizada através da análise de células ou clones de plantas que compreendem o evento de edição de DNA também aqui referido como “mutação” ou “edição”, dependendo do tipo de edição procurada, por exemplo, inserção, deleção, inserção e deleção (Indel), inversão, substituição e combinações dos mesmos.

[454] Os métodos para detectar alteração de sequência são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não se limitam a, sequenciamento de DNA e RNA (por exemplo, sequenciamento de próxima geração), eletroforese, um ensaio de detecção de incompatibilidade baseado em enzimas e um ensaio de hibridação como análises PCR, RT- PCR, proteção de RNase, hibridação in situ, extensão de iniciador, Southern blot, Northern blot e dot blot. 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 ou PCR seguido de digestão de restrição para detectar a aparência ou desaparecimento do(s) local(is) de restrição.

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

[456] De acordo com uma modalidade, a seleção de células transformadas é efetuada por citometria de fluxo (FACS), selecionando células transformadas que exibem fluorescência emitida pelo repórter fluorescente. Após a classificação por FACS, são coletados conjuntos selecionados positivamente de células vegetais transformadas, exibindo o marcador fluorescente e uma alíquota pode ser usada para testar o evento de edição de DNA, como discutido acima.

[457] Nos casos em que o marcador de seleção de antibióticos foi usado, os clones das células das plantas de transformação são cultivados na presença de seleção (por exemplo, antibióticos) até que se desenvolvam em colônias, isto é, clones e micro-calos. Uma porção das células dos calos é então analisada (validada) para o evento de edição de DNA, conforme discutido acima.

[458] Assim, de acordo com uma modalidade da invenção, o método compreende ainda a validação na complementaridade das células transformadas da molécula de RNA não codificante endógena (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) em relação ao segundo RNA alvo.

[459] Como mencionado acima, após a modificação do gene que codifica a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA), a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA) compreende pelo menos cerca de 30%, 33%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou até 100% de complementaridade com a sequência do segundo RNA alvo ou RNA alvo de interesse.

[460] A ligação específica da molécula de RNA não codificante projetada com um RNA alvo de interesse pode ser determinada por qualquer método conhecido na técnica, como por algoritmos computacionais (por exemplo, BLAST) e verificada por métodos que incluem, por exemplo, Northern blot, hibridização in situ, QuantiGene Plex Assay etc.

[461] Será apreciado que os clones positivos podem ser homozigotos ou heterozigotos para o evento de edição de DNA. No caso de uma célula heterozigótica, a célula (por exemplo, quando diplóide) pode compreender uma cópia de um gene modificado e uma cópia de um gene não modificado da molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de silenciamento de RNA). O especialista na técnica selecionará o clone para posterior cultura/regeneração de acordo com o uso pretendido.

[462] De acordo com uma modalidade, quando um método transitório é desejado, os clones que exibem a presença de um evento de edição de DNA como desejado são ainda analisados e selecionados para a ausência do agente de edição de DNA, a saber, perda de sequências de DNA que codificam para o agente de edição de DNA. Isso pode ser feito, por exemplo, analisando a perda de expressão do agente de edição de DNA (por exemplo, no mRNA, proteína), por exemplo, pela detecção fluorescente de GFP ou q-PCR, HPLC.

[463] De acordo com uma modalidade, quando um método transitório é desejado, as células podem ser analisadas quanto à ausência do construto de ácido nucleico como aqui descrito ou porções das mesmas, por exemplo, sequência de ácido nucleico que codifica o agente de edição de DNA. Isso pode ser afirmado por microscopia fluorescente, q-PCR, FACS e ou qualquer outro método, como Southern blot, PCR, sequenciamento, HPLC).

[464] De acordo com uma modalidade, a planta é cruzada para obter uma planta desprovida de agente de edição de DNA (por exemplo, da endonuclease), como discutido abaixo.

[465] Os clones positivos podem ser armazenados (por exemplo, criopreservados).

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

[467] Os protoplastos também podem ser usados para a reprodução de plantas, usando uma técnica chamada fusão de protoplastos. Protoplastos de diferentes espécies são induzidos a se fundir usando um campo elétrico ou uma solução de polietilenoglicol. Esta técnica pode ser usada para gerar híbridos somáticos na cultura de tecidos.

[468] 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 revisão completa, consulte Maheshwari *et al*. 1986 Differentiation of Protoplasts and of Transformed Plant Cells: 3-36. Springer-Verlag, Berlin.

[469] As plantas regeneradas podem ser submetidas adicionalmente a reprodução e seleção, conforme o especialista ache adequado.

[470] Assim, modalidades da invenção ainda se relacionam com plantas, células vegetais e produto processado de plantas compreendendo a molécula de RNA não codificante (por exemplo, molécula de

silenciamento de RNA) capaz de silenciar um segundo RNA alvo gerado de acordo com os presentes ensinamentos.

[471] De acordo com um aspecto da invenção, é fornecido um método para produzir uma planta com expressão reduzida de um gene alvo, o método compreendendo: (a) cultivar a planta de acordo com algumas modalidades da invenção e (b) selecionar as plantas da progênie que tenham expressão reduzida do RNA alvo de interesse ou o segundo RNA alvo, ou progênie que compreenda uma especificidade de silenciamento na molécula de RNA não codificante em relação a um RNA alvo de interesse e que não compreendem o referido agente de edição de DNA, produzindo assim a planta com expressão reduzida de um gene alvo.

[472] De acordo com uma modalidade, a reprodução compreende cruzamento ou autopolinização.

[473] O termo “cruzamento”, tal como aqui utilizado, refere-se à fertilização de plantas fêmea (ou gametas) por plantas macho (ou gametas). O termo “gameta” refere-se à célula reprodutiva haplóide (óvulo ou esperma) produzida em plantas por mitose de um gametófito e envolvida na reprodução sexual, durante a qual dois gametas de sexo oposto se fundem para formar um zigoto diplóide. O termo geralmente inclui referência a um pólen (incluindo a célula espermática) e um óvulo (incluindo o óvulo (“ovum”)). “cruzamento”, portanto, geralmente refere-se à fertilização de óvulos de um indivíduo com pólen de outro indivíduo, enquanto “autopolinização” refere-se à fertilização de óvulos de um indivíduo com pólen do mesmo indivíduo. O cruzamento é amplamente utilizado na reprodução de plantas e resulta em uma mistura de informações genômicas entre as duas plantas que cruzaram um cromossomo da mãe e um cromossomo do pai. Isso resultará em uma nova combinação de características herdadas geneticamente.

[474] Como mencionado acima, a planta pode ser cruzada para obter uma planta desprovida de fatores indesejados, por

exemplo, agente de edição de DNA (por exemplo, endonuclease).

[475] De acordo com uma modalidade, é fornecido um método para gerar uma planta com tolerância a estresse aumentada, rendimento aumentado, taxa de crescimento aumentada ou qualidade de rendimento aumentada, compreendendo o método a modificação de um gene que codifica ou processado em uma molécula de RNA não codificante ou em uma molécula de silenciamento de RNA em uma célula vegetal de acordo o método de algumas modalidades da invenção, em que o RNA alvo de interesse é de um gene da planta que confere sensibilidade ao estresse, diminuição do rendimento, diminuição da taxa de crescimento ou diminuição da qualidade do rendimento, gerando assim a planta.

[476] A frase “tolerância ao estresse”, conforme aqui utilizada, refere-se à capacidade de uma planta suportar um estresse biótico ou abiótico sem sofrer uma alteração substancial no metabolismo, crescimento, produtividade e/ou viabilidade.

[477] A frase “estresse abiótico”, conforme usado aqui, refere-se à exposição de uma planta, célula vegetal ou similar a um agente físico ou químico não vivo (“abiótico”) que tem um efeito adverso no metabolismo, crescimento, desenvolvimento, propagação ou sobrevivência da planta (coletivamente, o “crescimento”). Um estresse abiótico pode ser imposto a uma planta devido, por exemplo, a um fator ambiental como água (por exemplo, inundações, secas ou desidratação), condições anaeróbicas (por exemplo, um nível mais baixo de oxigênio ou alto nível de CO_2), condições osmóticas anormais (por exemplo, estresse osmótico), salinidade ou temperatura (por exemplo, quente/calor, frio, congelamento ou geada), exposição a poluentes (por exemplo, toxicidade por metais pesados), anaerobiose, deficiência de nutrientes (por exemplo, deficiência de nitrogênio ou nitrogênio limitado), poluição atmosférica ou irradiação UV.

[478] A frase “estresse biótico”, conforme aqui utilizado,

refere-se à exposição de uma planta, célula vegetal ou similar a um organismo vivo (“biótico”) que tenha um efeito adverso no metabolismo, crescimento, desenvolvimento, propagação ou sobrevivência da planta (coletivamente, o “crescimento”). O estresse biótico pode ser causado por, por exemplo, bactérias, vírus, fungos, parasitas, insetos benéficos e prejudiciais, ervas daninhas e plantas cultivadas ou nativas.

[479] A frase “rendimento” ou “rendimento das plantas”, conforme usado aqui, refere-se ao aumento do crescimento das plantas (taxa de crescimento), aumento do crescimento das culturas, aumento da biomassa e/ou aumento da produção de produtos vegetais (incluindo grãos, frutas, sementes, etc.).

[480] De acordo com uma modalidade, a fim de gerar uma planta com tolerância a estresse aumentada, rendimento aumentado, taxa de crescimento aumentada ou qualidade do rendimento aumentada, a molécula de RNA não codificante é projetada para ser direcionada a um RNA de interesse de um gene da planta que confere sensibilidade ao estresse, diminuição do rendimento, diminuição da taxa de crescimento ou diminuição da qualidade do rendimento.

[481] De acordo com uma modalidade, genes de plantas de suscetibilidade exemplares a serem direcionados (por exemplo, knocked out) incluem, mas não estão limitados a, genes S de suscetibilidade, como aqueles que residem em locais genéticos conhecidos como *MLO* (*Mildew Locus O*).

[482] De acordo com uma modalidade, as plantas geradas pelo presente método compreendem aumento da tolerância ao estresse, aumento do rendimento, aumento da qualidade do rendimento, aumento da taxa de crescimento, em pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 100% em comparação com plantas não geradas pelos presentes métodos.

[483] Qualquer método conhecido na técnica para avaliar o aumento da tolerância ao estresse pode ser utilizado de acordo com a presente invenção. Métodos exemplares de avaliação do aumento da tolerância ao estresse incluem, mas não estão limitados a, infrarregulação de *PagSAP1* no álamo para aumentar a tolerância ao estresse salino, conforme descrito em Yoon, SK., Bae, EK., Lee, H. *et al*. Trees (2018) 32: 823. www (ponto) doi (ponto) org/10.1007/s00468-018-1675-2) e aumento da tolerância à seca no tomate pela infrarregulação de *SlbZIP38* (Pan Y *et al*. Genes 2017, 8, 402; doi: 10.3390/genes8120402, aqui incorporados por referência.

[484] Qualquer método conhecido na técnica para avaliar o aumento do rendimento pode ser utilizado de acordo com a presente invenção. Métodos exemplares de avaliação do aumento do rendimento incluem, mas não estão limitados a, expressão reduzida de *DST* no arroz, como descrito em Ar-Rafi Md. Faisal, *et al*., AJPS> Vol.8 No.9, agosto de 2017 DOI: 10.4236/ajps.2017.89149; e a infrarregulação de *BnFTA* na canola resultou em aumento do rendimento, como descrito em Wang Y *et al*., Mol Plant. Janeiro de 2009; 2 (1): 191–200.doi: 10.1093/mp/ssn088), ambos aqui incorporados por referência.

[485] Qualquer método conhecido na técnica para avaliar o aumento da taxa de crescimento pode ser utilizado de acordo com a presente invenção. Métodos exemplares de avaliação do aumento da taxa de crescimento incluem, mas não estão limitados a, expressão reduzida de *BIG BROTHER* em Arabidopsis ou *GA2-OXIDASE* resulta em aumento do crescimento e biomassa, conforme descrito em Marcelo de Freitas Lima *et al*. Biotechnology Research and Innovation (2017) 1,14-25, aqui incorporado por referência.

[486] Qualquer método conhecido na técnica para avaliar o aumento da qualidade do rendimento pode ser utilizado de acordo com a presente invenção. Métodos exemplares de avaliação da qualidade de

produção aumentada incluem, mas não estão limitados a, infrarregulação do *OsCKX2* no arroz resulta na produção de mais perfilhos, mais grãos e os grãos eram mais pesados, como descrito em Yeh S_Y *et al*. Rice (N Y). 2015; 8: 36; e reduzir os níveis de *OMT* em muitas plantas, que resultam em um acúmulo alterado de lignina, aumentam a digestibilidade do material para fins industriais, conforme descrito em Verma SR e Dwivedi UN, South African Journal of Botany Volume 91, março de 2014, páginas 107-125, ambos aqui incorporados por referência.

[487] De acordo com uma modalidade, o método permite ainda a geração de uma planta compreendendo aumento da doçura, aumento do teor de açúcar, aumento do sabor, melhor controle do amadurecimento, maior tolerância ao estresse hídrico, maior tolerância ao estresse térmico e maior tolerância ao sal. Um especialista na técnica saberá como utilizar os métodos aqui descritos para escolher sequências de RNA alvo para modificação.

[488] De acordo com uma modalidade, é fornecido um método para gerar uma planta resistente ou tolerante a patógenos, o método compreendendo a modificação de um gene que codifica ou processado em uma molécula de RNA não codificante ou uma molécula de silenciamento de RNA em um célula vegetal de acordo o método de algumas modalidades da invenção, em que o RNA alvo de interesse é de um gene da planta que confere sensibilidade ao patógeno, gerando desse modo a planta resistente ou tolerante a patógenos.

[489] De acordo com uma modalidade, é fornecido um método para gerar uma planta resistente ou tolerante a patógenos, o método compreendendo a modificação de um gene que codifica ou processado em uma molécula de RNA não codificante ou uma molécula de silenciamento de RNA em um célula vegetal de acordo o método de algumas modalidades da invenção, em que o RNA alvo de interesse é de um gene do patógeno,

gerando desse modo a planta resistente ou tolerante a patógenos.

[490] De acordo com uma modalidade, é fornecido um método para gerar uma planta resistente ou tolerante a pragas, o método compreendendo a modificação de um gene que codifica ou processado em uma molécula de RNA não codificante ou uma molécula de silenciamento de RNA em um célula vegetal de acordo o método de algumas modalidades da invenção, em que o RNA alvo de interesse é de um gene da praga, gerando desse modo a planta resistente ou tolerante a pragas.

[491] Como usado aqui, o termo “patógeno” refere-se a um organismo que afeta negativamente as plantas colonizando, danificando, atacando ou infectando-as. Assim, o patógeno pode afetar o crescimento, desenvolvimento, reprodução, colheita ou rendimento de uma planta. Isso inclui organismos que espalham doenças e/ou danificam o hospedeiro e/ou competem pelos nutrientes do hospedeiro. Os patógenos de plantas incluem, mas não estão limitados a, fungos, oomycetes, bactérias, vírus, viróides, organismos semelhantes a vírus, fitoplasmas, protozoários, nematóides, insetos e plantas parasitárias.

[492] Exemplos não limitativos de patógenos incluem, mas não estão limitados a, brocas de madeiras (Roundheaded Borer), como as long horned borers; psilídeos como red gum lerp psyllids (*Glycaspis brimblecombei)*, psilídeo de blue gum, psilídeos de spotted gum lerp, psilídeos de lemon gum lep; tortoise beetles; snout beetles; leaf beetles; honey fungus; Thaumastocoris peregrinus; vespas sésseis (Cynipidae), como *Leptocybe invasa, Ophelimus maskelli* e *Selitrichodes globules*; lagartas que se alimentam de folhagens, como o Sabulodes aegrotata e a Argyrotaenia franciscana; Homalodisca vitripennis; e aleirodídeos, como a mosca branca gigante. Outros exemplos não limitativos de patógenos incluem pulgões, como *Chaitophorus* spp., Cottonywinged cottonwood e *Periphyllus* spp.; insetos-escama tais como inseto escama Oystershell e inseto-escama San Jose; Carpenterworm;

Clearwing moth borers tais como American hornet moth e Western poplar clearwing; Flatheaded borers tais como Bronze birch borer e Bronze poplar borer; Lagartas que se alimentam de folhagem tais como Fall webworm, Fruit-tree leafroller, Redhumped caterpillar, Satin moth caterpillar, Spiny elm caterpillar, Tent caterpillar, Tussock moths e Western tiger swallowtail; mineradores de folhagem tais como Poplar shield bearer; Ácaros de Gall e blister mites tais como Cottonwood gall mite; afídeos de Gall tais como Poplar petiolegall aphid; Glassy-winged sharpshooter; Leaf beetles e flea beetles; Mealybugs; Poplar and willow borer; Roundheaded borers; Sawflies; Insetos-escama tais como Black scale, Brown soft scale, Cottony maple scale e European fruit lecanium; Treehoppers tais como Buffalo treehopper; e True bugs tais como Lace bugs e Lygus bugs.

[493] Outros exemplos não limitativos de patógenos vegetais virais incluem, mas não estão limitados a Espécies: *Pea early-browning virus* (PEBV), Gênero: *Tobravirus*. Espécie: *Pepper ringspot virus* (PepRSV), Gênero: *Tobravirus*. Espécie: *Watermelon mosaic virus* (WMV), Gênero: *Potyvirus* e outros vírus do gênero Potyvirus. Espécie: *Tobacco mosaic virus* Genus (TMV), Tobamovirus e outros vírus do *gênero* Tobamovirus. Espécie: *Vírus da batata X* gênero (PVX), *Potexvirus* e outros vírus do gênero *Potexvirus*. Assim, os presentes ensinamentos prevêem o direcionamento do RNA e dos vírus de DNA (por exemplo, vírus Gemini ou Bigeminivírus). Os vírus Geminiviridae que podem ser direcionados incluem, mas não se limitam a, Abutilon mosaic bigeminivirus, Ageratum yellow vein bigeminivirus, Bean calico mosaic bigeminivirus, Bean golden mosaic bigeminivirus, Bhendi yellow vein mosaic bigeminivirus, Cassava African mosaic bigeminivirus, Cassava Indian mosaic bigeminivirus, Chino del tomaté bigeminivirus, Cotton leaf crumple bigeminivirus, Cotton leaf curl bigeminivirus, Croton yellow vein mosaic bigeminivirus, Dolichos yellow mosaic bigeminivirus, Euphorbia mosaic bigeminivirus, Horsegram yellow mosaic bigeminivirus, Jatropha mosaic bigeminivirus, Lima bean golden mosaic bigeminivirus, Melon

leaf curl bigeminivirus, Mung bean yellow mosaic bigeminivirus, Okra leaf-curl bigeminivirus, Pepper hausteco bigeminivirus, Pepper Texas bigeminivirus, Potato yellow mosaic bigeminivirus, Rhynchosia mosaic bigeminivirus, Serrano golden mosaic bigeminivirus, Squash leaf curl bigeminivirus, Tobacco leaf curl bigeminivirus, Tomato Australian leafcurl bigeminivirus, Tomato golden mosaic bigeminivirus, Tomato Indian leafcurl bigeminivirus, Tomato leaf crumple bigeminivirus, Tomato mottle bigeminivirus, Tomato yellow leaf curl bigeminivirus, Tomato yellow mosaic bigeminivirus, Watermelon chlorotic stunt bigeminivirus e Watermelon curly mottle bigeminivirus.

[494] Como usado aqui, o termo “praga” refere-se a um organismo que prejudica direta ou indiretamente a planta. Um efeito direto inclui, por exemplo, se alimentar das folhas da planta. Efeito indireto inclui, por exemplo, a transmissão de um agente de doença (por exemplo, vírus, bactérias, etc.) para a planta. Neste último caso, a praga serve como vetor para transmissão de patógenos. Pragas exemplares incluem, mas não estão limitadas a, besouros, psilídeos, insetos, nematóides, caracóis.

[495] De acordo com uma modalidade, o patógeno é um nemátodo. Os nematóides exemplares incluem, entre outros, o nemátodo cavador (*Radopholus similis*), *Caenorhabditis elegans*, *Radopholus arabocoffeae*, *Pratylenchus coffeae,* nemátodo root-knot (*Meloidogyne spp.*), Nemátodo cyst (*Heterodera e Globodera spp.*) Nemátodo root lesion (*Pratylenchus spp.*), Nemátodo stemm (*Ditylenchus dipsaci*), nemátodo pine wilt (*Bursaphelenchusxylophilus*), nemátodo reniform (*Rotylenchulus reniformis*), *Xiphinema index*, *Nacobbus aberrans* e *Aphelenchoides besseyi*.

[496] De acordo com uma modalidade, o patógeno é um fungo. Exemplos de fungos incluem, mas não se limitam a, *Fusarium oxysporum, Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam), Sclerotinia sclerotiorum*, *Pyricularia grisea*, *Gibberella fujikuroi (Fusarium moniliforme), Magnaporthe oryzae, Botrytis cinereal, Puccinia spp., Fusarium graminearum, Blumeria*

graminis, Mycosphaerella graminicola, Colletotrichum spp., Ustilago maydis, Melampsora lini, Phakopsora pachyrhizi e *Rhizoctonia solani*.

[497] De acordo com uma modalidade, a fim de gerar uma planta tolerante ou resistente a patógenos, a molécula de RNA não codificante é projetada para atingir um RNA de interesse sendo um gene da planta que confere sensibilidade a um patógeno.

[498] De acordo com uma modalidade, um gene de planta exemplar a ser direcionado inclui, mas não está limitado ao gene eIF4E, que confere sensibilidade à infecção viral no pepino.

[499] De acordo com uma modalidade, a fim de gerar uma planta tolerante ou resistente a patógenos, a molécula de RNA não codificante é projetada para atingir um RNA de interesse sendo um gene do patógeno.

[500] A determinação dos genes alvo da planta ou do patógeno pode ser alcançada usando qualquer método conhecido na técnica, como por análise de bioinformática de rotina.

[501] De acordo com uma modalidade, o gene do patógeno do nemátodo compreende os genes Calreticulin13 (CRT) ou colágeno 5 (col-5) do *Radopholus similis*.

[502] De acordo com uma modalidade, o gene do patógeno do fungo compreende os genes de *Fusarium oxysporum* FOW2, FRP1 e OPR.

[503] De acordo com uma modalidade, o gene do patógeno inclui, por exemplo, ATPase vacuolar (vATPase), dvssj1 e dvssj2, α-tubulina e snf7.

[504] De acordo com uma modalidade específica, quando a planta é um Brassica napus (colza), o RNA alvo de interesse inclui, mas não está limitado a, um gene de Leptosphaeria maculans (Phoma lingam) (causando, por exemplo, a antracnose de caule de Phoma) (por exemplo,

como definido adiante no número de acesso do GenBank: AM933613.1); um gene do Flea beetle (Phyllotreta vittula ou Chrysomelidae, por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: KT959245.1); ou um gene de Sclerotinia sclerotiorum (causando, por exemplo, a podridão de caule de Sclerotinia) (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: NW_001820833.1).

[505] De acordo com uma modalidade específica, quando a planta é um Citrus x sinensis (Laranja), o RNA alvo de interesse inclui, mas não está limitado a, um gene de Citrus Canker (CCK) (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: AE008925); um gene de Candidatus Liberibacter spp. (causando, por exemplo, doença de Citrus greening) (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: CP001677.5); ou um gene de podridão das raízes por Armillaria (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: KY389267.1).

[506] De acordo com uma modalidade específica, quando a planta é uma Elaeis guineensis (dendê), o RNA alvo de interesse inclui, mas não está limitado a, um gene de Ganoderma spp. (causando, por exemplo, basal stem rot (BSR), também conhecida como podridão de Ganoderma) (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: U56128.1), um gene de Nettle Caterpillar ou um gene de qualquer um de Fusarium spp., Phytophthora spp. , Pythium spp., Rhizoctonia solani (causando, por exemplo, podridão da raiz).

[507] De acordo com uma modalidade específica, quando a planta é uma Fragaria vesca (Morango silvestre), o RNA alvo de interesse inclui, mas não está limitado a, um gene de Verticillium dahlia (causando, por exemplo, Verticillium Wilt) (por exemplo, conforme estabelecido no GenBank Accession No: DS572713.1); ou um gene de Fusarium oxysporum f.sp. fragariae(causando, por exemplo, Fusarium wilt) (por exemplo, conforme

estabelecido no número de acesso do GenBank: KR855868.1);

[508] De acordo com uma modalidade específica, quando a planta é uma Glycine max (Soja), o RNA alvo de interesse inclui, mas não está limitado a, um gene de P. pachyrhizi (causando, por exemplo, ferrugem da soja, também conhecida como ferrugem asiática) (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: DQ026061.1); um gene de Soybean Aphid (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: KJ451424.1); um gene do vírus Soybean Dwarf (SbDV) (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso do GenBank: NC_003056.1); ou um gene do Green Stink Bug (Acrosternum hilare) (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: NW_020110722.1).

[509] De acordo com uma modalidade específica, quando a planta é um Gossypium raimondii (Algodão), o RNA alvo de interesse inclui, mas não está limitado a, um gene de Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum (causando, por exemplo, Fusarium wilt) (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso do GenBank: JN416614.1); um gene de Soybean Aphid (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: KJ451424.1); ou um gene de Pink bollworm (Pectinophora gossypiella) (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: KU550964.1).

[510] De acordo com uma modalidade específica, quando a planta é uma Oryza sativa (Rice), o RNA alvo de interesse inclui, mas não está limitado a, um gene de Pyricularia grisea (causando, por exemplo, Rice Blast) (por exemplo, conforme estabelecido no GenBank Accession No: AF027979.1); um gene de Gibberella fujikuroi (Fusarium moniliforme) (causando, por exemplo, doença de Bakanae) (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: AY862192.1); ou um gene de um Stem borer, por exemplo, Scirpophaga incertulas Walker - Yellow Stem

Borer, S. innota Walker - White Stem Borer, Chilo suppressalis Walker - Striped Stem Borer, Sesa- mia inferens Walker - Pink Stem Borer (por exemplo, conforme estabelecido no GenBank De acesso: KF290773.1).

[511] De acordo com uma modalidade específica, quando a planta é um Solanum lycopersicum (Tomate), o RNA alvo de interesse inclui, mas não está limitado a, um gene de Phytophthora infestans (causando, por exemplo, Late blight) (por exemplo, conforme estabelecido no GenBank Accession No: AY855210.1); um gene de Bemisia tabaci de mosca branca (por exemplo, Gennadius, por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: KX390870.1); ou um gene do yellow leaf curl geminivírus do tomate (TYLCV) (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: LN846610.1).

[512] De acordo com uma modalidade específica, quando a planta é um Solanum tuberosum (Batata), o RNA alvo de interesse inclui, mas não está limitado a, um gene de Phytophthora infestans (causando, por exemplo, Late Blight) (por exemplo, conforme estabelecido em GenBank Accession Não: AY050538.3); um gene de Erwinia spp. (causando, por exemplo, Blackleg e Soft Rot) (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: CP001654.1); ou um gene de Cyst Nematodes (por exemplo, Globodera pallida e G.rostochiensis) (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: KF963519.1).

[513] De acordo com uma modalidade específica, quando a planta é um Theobroma cacao (Cacau), o RNA alvo de interesse inclui, mas não está limitado a, um gene de um gene do basidiomycete Moniliophthora roreri (causando, por exemplo, Frosty Pod Rot) (conforme estabelecido no número de acesso do GenBank: LATX01001521.1); um gene de Moniliophthora perniciosa (causando, por exemplo, a doença de Witches' Broom); ou um gene de Mirids, por exemplo, Distantiella theobroma e Sahlbergella singularis, Helopeltis spp, espécie Monalonion.

[514] De acordo com uma modalidade específica, quando a planta é uma Vitis vinifera (Uva ou Videira), o RNA alvo de interesse inclui, mas não está limitado a, um gene de closterovirus GVA (causando, por exemplo, a doença da madeira Rugose) (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: AF007415.2); um gene do Grapevine leafroll virus (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: FJ436234.1); um gene do Grapevine fanleaf degeneration disease virus (GFLV) (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso do GenBank: NC_003203.1); ou um gene da doença da Grapevine fleck (GFkV) (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: NC_003347.1).

[515] De acordo com uma modalidade específica, quando a planta é uma Zea mays (milho (“maize”) também conhecido como milho (“corn”)), o RNA alvo de interesse inclui, mas não está limitado a, um gene de uma Fall Armyworm (por exemplo, Spodoptera frugiperda) (por exemplo, como estabelecido no número de acesso do GenBank: AJ488181.3); um gene do European corn borer (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: GU329524.1); ou um gene dos Northern and western corn rootworms (por exemplo, conforme estabelecido no número de acesso ao GenBank: NM_001039403.1).

[516] De acordo com uma modalidade específica, quando a planta é uma cana-de-açúcar, o RNA alvo de interesse inclui, mas não está limitado a, um gene de um Internode Borer (por exemplo, Chilo Saccharifagus Indicus), um gene de um Xanthomonas Albileneans (causando, por exemplo, Leaf Scald) ou um gene de Sugercane Yellow Leaf Virus (SCYLV).

[517] De acordo com uma modalidade específica, quando a planta é um trigo, o RNA alvo de interesse inclui, mas não está limitado a, um gene de uma Puccinia striiformis (causando, por exemplo, stripe rust) ou um gene de um Aphid.

[518] De acordo com uma modalidade específica, quando a planta é uma cevada, o RNA alvo de interesse inclui, mas não está limitado a, um gene de uma Puccinia hordei (causando, por exemplo, ferrugem da folha), um gene de Puccinia striiformis f. sp. Hordei (causando, por exemplo, stripe rust), ou um gene de um Aphid.

[519] De acordo com uma modalidade específica, quando a planta é um girassol, o RNA alvo de interesse inclui, mas não está limitado a, um gene de uma Puccinia helianthi (causando, por exemplo, doença de Ferrugem); um gene de Boerema macdonaldii (causando, por exemplo, Phoma black stem); um gene de Seed weevil (por exemplo, vermelho e cinza), por exemplo, Smicronyx fulvus (vermelho); Smicronyx sordidus (cinza); ou um gene de Sclerotinia sclerotiorum (causando, por exemplo, doença de Sclerotinia stalk e head rot).

[520] De acordo com uma modalidade específica, quando a planta é uma seringueira, o RNA alvo de interesse inclui, mas não está limitado a, um gene de um Microcyclus ulei (causando, por exemplo, South Americaan leaf blight (SALB)); um gene de Rigidoporus microporus (causando, por exemplo, doença da raiz branca); um gene de Ganoderma pseudoferreum (causando, por exemplo, doença da raiz vermelha).

[521] De acordo com uma modalidade específica, quando a planta é uma macieira, o RNA alvo de interesse inclui, mas não está limitado a, um gene de Neonectria ditissima (causando, por exemplo, Apple Canker), um gene de Podosphaera leucotricha (causando, por exemplo, Apple Powdery Mildew) ou um gene de Venturia inaequalis (causando, por exemplo, Apple Scab).

[522] Moléculas de RNA não codificantes endógenas exemplificativas que podem ser modificadas para serem direcionadas ao RNA de interesse (por exemplo, um gene de um patógeno), sequências exemplificativas de gRNA (isto é, um agente de edição de DNA) que podem ser

usadas para modificar as moléculas de RNA não codificantes endógenas e sequências nucleotídicas exemplares para redirecionar uma especificidade de silenciamento da molécula de RNA não codificante endógena em direção ao RNA alvo de interesse são fornecidas na Tabela 1B, abaixo.

Tabela 1B: Exemplos de projetos de oligo GEiGS para gerar diferentes características em vários hosts

Hospedeiro, característica e modelo miRNA	**Informação Oligo**	**oligo_seq**	**diferença seq do peso**	**Sg_seq**	**pam_ diferença**	**sgRNA_ fita**
Hospedeiro (negrito); *Patógeno/praga/ doença (itálico)*		**Sequência de GEiGS oligo, consistindo da sequência precursora com sua correspondente maduro substituído por um siRNA direcionada à molécula desejada - SEQ ID NO:**	**Número de alterações nucleotídicas entre o tipo selvagem precursor e o oligo GeiGs**	**Sequência do pequeno CRISPR/cas9 RNA guia direcionado a sequência precursora para trocar - SEQ ID NO:**	**Número do nucleotídeo mudanças entre o precursor do tipo selvagem e a sequência GEiGS que cai na região PAM do sgRNA**	
Brassica napus (colza)						
AM933613.1/Antracnose de caule de Phoma (causado por leptosphaeria maculans ou phoma lingam - patógeno fúngico)						
bna-MIR169e	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**103**	132	**235**	3	rv
bna-MIR156d	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**104**	25	**236**	1	fw
bna-MIR169e	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**105**	128	**237**	3	Rv

bna-MIR169e	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**106**	131	**238**	3	rv
KT959245.1/Flea beetle (Phyllotreta vittula ou Chrysomelidae)						
bna-MIR169e	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**107**	138	**239**	3	rv
bna-MIR156d	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**108**	29	**240**	1	fw
bna-MIR156b	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**109**	76	**241**	1	fw
bna-MIR169e	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**110**	133	**242**	3	rv
NW_001820833.1/ Podridão do caule da esclerotinia (causada por Sclerotinia sclerotiorum, um patógeno fúngico)						
bna-MIR169e	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**111**	130	**243**	3	rv
bna-MIR390b	Alteração mínima/ estrutura perfeita/característica específica siRNA	**112**	23	**244**	3	fw
bna-MIR156b	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**113**	68	**245**	1	fw
bna-MIR169e	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**114**	135	**246**	3	rv

Citrus x sinensis (laranja)						
AE008925/Antracnose de citrus (CCK)						
csi-MIR167c	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**115**	173	**247**	3	fw
csi-MIR156a	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**116**	24	**248**	3	rv
csi-MIR167c	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**117**	150	**249**	3	fw
csi-MIR167c	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**118**	173	**250**	2	fw
CP001677.5/Doença nos Citrus causada por um patógeno transmitido por vetor (Candidatus Liberibacter spp.)						
csi-MIR164a	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**119**	115	**251**	2	rv
csi-MIR482f	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**120**	22	**252**	2	rv
csi-MIR398a	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**121**	88	**253**	3	fw
csi-MIR164a	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**122**	119	**254**	3	rv
KY389267.1/Podridão da raiz por Armillaria						

csi-MIR167c	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**123**	168	**255**	3	fw
csi-MIR171a	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**124**	21	**256**	3	rv
csi-MIR167c	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**125**	144	**257**	1	fw
csi-MIR167c	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**126**	182	**258**	3	fw
Elaeis guineensis (Azeite de dendê)						
U56128.1/Podridão do caule basal (BSR), também conhecida como Ganoderma butt rot (Ganoderma spp.)						
egu-MIR172c	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**127**	89	**259**	1	rv
egu-MIR172c	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**128**	53	**260**	1	rv
egu-MIR172c	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**129**	74	**261**	1	rv
egu-MIR172c	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**130**	94	**262**	1	rv
Fragaria vesca (Morango silvestre)						
DS572713.1/ Verticillium Wilt (Verticillium dahlia)						

fve-MIR159c	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**131**	100	**263**	3	fw
fve-MIR160b	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**132**	22	**264**	3	rv
fve-MIR166a	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**133**	56	**265**	3	fw
fve-MIR164b	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**134**	95	**266**	3	fw
KR855868.1/ Fusarium wilt (Fusarium oxysporum f.sp. fragariae)						
fve-MIR159c	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**135**	97	**267**	3	fw
fve-MIR167b	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**136**	17	**268**	1	rv
fve-MIR169a	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**137**	69	**269**	3	rv
fve-MIR164b	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**138**	94	**270**	3	fw
Glycine max (Soja)						
DQ026061.1/ Ferrugem da soja causada por P. pachyrhizi (também conhecido como ferrugem asiática)						

gma-MIR167c	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**139**	166	**271**	3	rv
gma-MIR1511	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**140**	23	**272**	3	fw
gma-MIR167c	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**141**	141	**273**	3	rv
gma-MIR167c	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**142**	163	**274**	3	rv
KJ451424.1/ Aphid de Soja						
gma-MIR167c	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**143**	163	**275**	3	rv
gma-MIR168a	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**144**	23	**276**	0	rv
gma-MIR167c	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**145**	132	**277**	3	rv
gma-MIR167c	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**146**	161	**278**	3	rv
NC_003056.1/ Soja Virus Dwarf (SbDV)						
gma-MIR167c	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**147**	165	**279**	3	rv

gma-MIR1516a	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**148**	23	**280**	1	fw
gma-MIR167c	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**149**	135	**281**	3	rv
gma-MIR167c	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**150**	163	**282**	3	rv
NW_020110722.1/ Percevejo verde (Acrosternum hilare)						
gma-MIR167c	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**151**	158	**283**	3	rv
gma-MIR162a	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**152**	22	**284**	1	rv
gma-MIR167c	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**153**	135	**285**	3	rv
gma-MIR167c	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**154**	164	**286**	3	rv
Gossypium raimondii (Algodão)						
JN416614.1/ Fusarium wilt (Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum)						
gra-MIR8637	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**155**	154	**287**	3	rv

gra-MIR7486e	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**156**	21	**288**	3	fw
gra-MIR8633	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**157**	58	**289**	3	fw
gra-MIR8635	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**158**	149	**290**	3	fw
KJ451424.1/ Aphid de Soja						
gra-MIR8637	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**159**	153	**291**	3	rv
gra-MIR157a	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**160**	16	**292**	1	fw
gra-MIR8636	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**161**	62	**293**	3	fw
gra-MIR8637	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**162**	149	**294**	3	rv
KU550964.1/ Pink bollworm (Pectinophora gossypiella)						
gra-MIR8637	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**163**	155	**295**	3	rv
gra-MIR157a	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**164**	21	**296**	1	fw

gra-MIR8644	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**165**	53	**297**	3	rv
gra-MIR8635	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**166**	154	**298**	3	fw
Oryza sativa (arroz)						
AF027979.1/Rice Blast (doença fúngica causada por Pyricularia grisea)						
osa-MIR166b	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**167**	105	**299**	1	fw
osa-MIR156e	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**168**	21	**300**	0	fw
osa-MIR160b	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**169**	59	**301**	3	rv
osa-MIR166b	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**170**	100	**302**	3	fw
AY862192.1/ Bakanae Doença (doença fúngica causada por Fusarium moniliforme e Gibberella fujikuroi)						
osa-MIR166b	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**171**	100	**303**	3	fw
osa-MIR160c	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**172**	22	**304**	1	rv

osa-MIR156j	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**173**	68	**305**	1	rv
osa-MIR166b	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**174**	104	**306**	3	fw
KF290773.1/ Stem borer (Scirpophaga incertulas Walker - Yellow Stem Borer, S. innota Walker - White Stem Borer, Chilo suppressalis Walker – Striped Stem Borer, Sesa- mia inferens Walker - Pink Stem Borer						
osa-MIR166b	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**175**	100	**307**	1	fw
osa-MIR156j	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**176**	21	**308**	3	rv
osa-MIR160b	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**177**	57	**309**	3	rv
osa-MIR166b	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**178**	103	**310**	3	fw
Solanum lycopersicum (Tomate)						
AY855210.1/Late blight (Phytophthora infestans)						
sly-MIR319b	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**179**	143	**311**	3	fw

sly-MIR156b	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**180**	24	**312**	0	fw
sly-MIR395a	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**181**	75	**313**	3	fw
sly-MIR319b	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**182**	145	**314**	3	fw
KX390870.1/ whitefly Bemisia tabaci (Gennadius)						
sly-MIR319b	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**183**	144	**315**	3	fw
sly-MIR391	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**184**	16	**316**	3	fw
sly-MIR319c	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**185**	79	**317**	1	rv
sly-MIR319b	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**186**	138	**318**	3	fw
LN846610.1/ Tomate geminivírus de yellow leaf curl (TYLCV)						
sly-MIR319b	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**187**	141	**319**	3	fw
sly-MIR156b	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**188**	24	**320**	0	fw

sly-MIR395a	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**189**	81	**321**	3	fw
sly-MIR319b	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA não-específica	**190**	143	**322**	3	fw
Solanum tuberosum (Batata)						
AY050538.3/ Late Blight (Phytophthora infestans)						
stu-MIR6022	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**191**	110	**323**	1	fw
stu-MIR7988	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**192**	19	**324**	1	rv
stu-MIR482d	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**193**	50	**325**	3	rv
stu-MIR6022	Alteração máxima/ estrutura perfeita/inespecífica siRNA	**194**	106	**326**	1.	fw
CP001654.1/Blackleg e Podridão-mole (Erwinia spp.)						
stu-MIR6022	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**195**	110	**327**	1.	fw
stu-MIR7988	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**196**	16	**328**	1.	rv
stu-MIR482d	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**197**	50	**329**	2	rv

stu-MIR6022	Alteração máxima / estrutura perfeita/inespecífica siRNA	**198**	104	**330**	1.	fw
KF963519.1/Cyst Nematóides (Globodera pallida e G.rostochiensis)						
stu-MIR6022	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**199**	107	**331**	1.	fw
stu-MIR7985	Alteração mínima / estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**200**	20	**332**	3	fw
stu-MIR6024	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**201**	49	**333**	0	rv
stu-MIR6022	Alteração máxima/ estrutura perfeita/inespecífica siRNA	**202**	107	**334**	1.	fw
Theobroma cacao (cacau)						
LATX01001521.1/ Frosty Pod Rot causada pelo basidiomiceto Moniliophthora roreri						
tcc-MIR169b	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**203**	100	**335**	3	fw
tcc-MIR167a	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**204**	25	**336**	3	rv
tcc-MIR167b	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**205**	52	**337**	1.	fw

tcc-MIR169b	Alteração máxima/ estrutura perfeita/inespecífica siRNA	**206**	104	**338**	3	fw
Vitis vinifera (Uva)						
AF007415.2/Doença de madeira Rugose (closterovirus GVA)						
vvi-MIR167a	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**207**	154	**339**	3	fw
vvi-MIR164b	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**208**	22	**340**	3	fw
vvi-MIR167a	Alteração máxima / estrutura alterada/siRNA de característica específica	**209**	108	**341**	3	fw
vvi-MIR167a	Alteração máxima/ estrutura perfeita/inespecífica siRNA	**210**	153	**342**	2	fw
FJ436234.1/ Videira vírus leafroll						
vvi-MIR167a	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**211**	152	**343**	2	fw
vvi-MIR167c	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**212**	20	**344**	3	rv
vvi-MIR167a	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**213**	118	**345**	2	fw
vvi-MIR167a	Alteração máxima/ estrutura perfeita/inespecífica siRNA	**214**	152	**346**	3	fw

NC_003203.1/Vírus da doença da degeneração de folhas de videira (GFLV) - um nepovírus						
vvi-MIR167a	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**215**	158	**347**	2	fw
vvi-MIR166h	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**216**	19	**348**	3	fw
vvi-MIR167a	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**217**	118	**349**	2	fw
vvi-MIR167a	Alteração máxima/ estrutura perfeita/inespecífica siRNA	**218**	156	**350**	3	fw
NC_003347.1/Grapevine doença de mancha (GFkV)						
vvi-MIR167a	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**219**	161	**351**	2	fw
vvi-MIR166b	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**220**	19	**352**	3	fw
vvi-MIR167a	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**221**	127	**353**	2	fw
vvi-MIR167a	Alteração máxima / estrutura perfeita/inespecífica siRNA	**222**	157	**354**	2	fw
Zea mays (milho)						
AJ488181.3/ Fall Armyworm (Spodoptera frugiperda)						

zma-MIR166a	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**223**	100	**355**	0	fw
zma-MIR160c	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**224**	20	**356**	2	fw
zma-MIR156f	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**225**	64	**357**	0	fw
zma-MIR166a	Alteração máxima/ estrutura perfeita/inespecífica siRNA	**226**	101	**358**	3	fw
GU329524.1/ European broca de milho						
zma-MIR166a	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**227**	103	**359**	1.	fw
zma-MIR166h	Alteração mínima / estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**228**	20	**360**	1.	rv
zma-MIR171f	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**229**	62	**361**	3	rv
zma-MIR166a	Alteração máxima/ estrutura perfeita/inespecífica siRNA	**230**	106	**362**	3	fw
NM_001039403.1/ Northern e wertern larvas de milho						
zma-MIR166a	Alteração máxima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**231**	107	**363**	0	fw

zma-MIR172d	Alteração mínima/ estrutura perfeita/siRNA de característica específica	**232**	20	**364**	3	rv
zma-MIR166a	Alteração máxima/ estrutura alterada/siRNA de característica específica	**233**	73	**365**	1.	fw
zma-MIR166a	Alteração máxima/ estrutura perfeita/inespecífica siRNA	**234**	105	**366**	3	fw

[523] A Tabela 1B fornece exemplos de oligos GeiGS projetados contra uma variedade de alvos em vários organismos hospedeiros. Para cada combinação hospedeiro-alvo, quatro oligos são fornecidos: mudanças mínimas na sequência com estrutura correspondente e siRNA eficiente; mudanças máximas de sequência com estrutura correspondente e siRNA eficiente; mudanças máximas de sequência e estrutura não compatível e siRNA eficiente; e mudanças máximas de sequência com estrutura correspondente e siRNA ineficiente.

[524] De acordo com uma modalidade, as plantas geradas pelo presente método são mais resistentes ou tolerantes a patógenos em pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 100% em comparação com plantas não geradas pelos métodos atuais (isto é, em comparação com plantas do tipo selvagem).

[525] Qualquer método conhecido na técnica para avaliar a tolerância ou resistência a um patógeno de uma planta pode ser utilizado de acordo com a presente invenção. Métodos de exemplo incluem, entre outros, a redução da expressão de MYB46 em Arabidopsis, o que resulta em maior resistência a Botrytis cinereal, como descrito em Ramírez V1, García-Andrade J, Vera P., Plant Signal Behav. Junho de 2011; 6 (6): 911-3. Epub 2011 1 de junho; ou a infrarregulação do *HCT* na alfafa promove a ativação da resposta

de defesa na planta, conforme descrito em Gallego-Giraldo L. *et al*. New Phytologist (2011) 190: 627–639 doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03621.x), ambos aqui incorporados por referência.

[526] De acordo com uma modalidade, é fornecido um método para gerar uma planta resistente a herbicidas, o método compreendendo a modificação de um gene que codifica ou processado em uma molécula de RNA não codificante ou uma molécula de silenciamento de RNA em um célula vegetal de acordo com os métodos de algumas modalidades da invenção, em que o RNA alvo de interesse é de um gene da planta que confere sensibilidade ao herbicida, gerando desse modo a planta resistente a herbicidas.

[527] De acordo com uma modalidade, os herbicidas têm como alvo vias que residem dentro de plastídeos (por exemplo, dentro do cloroplasto).

[528] Assim, para gerar plantas resistentes a herbicidas, a molécula de RNA não codificante é projetada para atingir um RNA de interesse, incluindo, mas não se limitando ao gene psbA do cloroplasto (que codifica a proteína fotossintética QB da membrana de ligação à quinona, alvo do herbicida atrazina) e o gene da EPSP sintase (uma proteína nuclear, no entanto, sua superexpressão ou acúmulo no cloroplasto permite resistência das plantas ao herbicida glifosato, pois aumenta a taxa de transcrição de EPSPs, bem como por uma redução na renovação da enzima).

[529] De acordo com uma modalidade, as plantas geradas pelo presente método são mais resistentes a herbicidas em pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou 100% em comparação com plantas não geradas pelos presentes métodos.

[530] De acordo com uma modalidade, é fornecida uma planta gerada de acordo com o método de algumas modalidades da invenção.

[531] De acordo com uma modalidade, a planta não é geneticamente modificada (não GMO).

[532] De acordo com uma modalidade, é fornecida uma semente da planta gerada de acordo com o método de algumas modalidades da invenção.

[533] O projeto de GEiGS com modificações/edições nucleotídicas mínimas no RNA não codificante endógeno pode ser alcançado usando métodos in silico, que são baseados em ferramentas de bioinformática que são bem conhecidas pelos especialistas na técnica.

[534] De acordo com uma modalidade, esse método é efetuado da seguinte forma:

[535] As seguintes informações devem estar disponíveis: a) Sequência alvo a ser silenciada pelo silenciamento de gene induzido pela Edição Genética (GEiGS) (“alvo”); b) Escolher se o GEiGS (ou seja, o RNA não codificante com atividade de silenciamento modificada e/ou especificidade) seria expresso totalmente (por exemplo, constitutivamente) ou especificamente (por exemplo, expressão específica para um determinado tecido, estágio de desenvolvimento, estresse, choque térmico/frio etc.).

[536] Submeter essas informações a conjuntos de dados de miRNA disponíveis publicamente ou internamente (por exemplo, sequenciamentos de pequeno RNA, sequências genômicas, microarranjos etc.) para filtrar (por exemplo, eleger) apenas miRNAs relevantes que atendam aos critérios de entrada: miRNAs que são expressos de acordo com o(s) requisito(s) descritos acima, como miRbase (Kozommara e Griffiths-Jones (2014)), tasRNAdb (Zhang Changqing, *et al.* (2013)) e mirEx 2.0 (Zielezinski, Andrzej *et al*. “mirEX 2.0 - um ambiente integrado para criação de perfis de expressão de microRNAs de plantas.” BMC Plant Biology 15 (2015): 144. PMC. Web. 15 de setembro 2018).

[537] Utilizando ferramentas publicamente disponíveis, pode ser gerada uma lista de sequências potentes de siRNA específicas de um alvo. Os miRNAs podem ser alinhados contra as sequências potentes de siRNA e os miRNAs mais homólogos podem ser eleitos. Os miRNAs filtrados podem ter uma sequência semelhante na mesma orientação que os siRNAs potentes.

[538] Modificar as sequências de miRNAs naturalmente maduras, que são pontuadas para ter alta homologia com siRNAs potentes específicos do alvo, para corresponder perfeitamente com a sequência do alvo. Esta modificação pode ocorrer em uma fita de miRNA madura com a homologia alvo mais alta (por exemplo, pode ser o guia de miRNA original ou a fita passageira). Tal complementaridade de 100% ao alvo pode potencialmente transformar a sequência de miRNA em um siRNA.

[539] O GE mínimo pode ser alcançado filtrando sequências de miRNA com alta homologia de ocorrência natural (complemento reverso) ao alvo.

[540] Usando os genes principais de miRNA modificado para gerar oligos de ssDNA (por exemplo, ssDNA de 200-500 nt de comprimento) e fragmentos de dsDNA (por exemplo, fragmentos de dsDNA de 250-5000 nt apenas ou clonados nos plasmídeos) com base nas sequências de DNA genômico que flanqueiam a sequência de precursor de miRNA modificado (pré-miRNA). A sequência da fita (fita de silenciamento) de guia do miRNA modificado pode ser projetada para ser 100% complementar ao alvo.

[541] Modificando a sequência da outra região do gene do miRNA para preservar o precursor de miRNA original (não modificado) e a estrutura madura, mantendo o mesmo perfil de emparelhamento de base.

[542] Projetar sgRNAs para atingir especificamente o gene de miRNA original não modificado (específico para os locais genômicos do miRNA), e não a versão modificada (ou seja, as sequências oligo/fragmento).

[543] Analisando o local da enzima de restrição comparativa entre o gene miRNA modificado e original e resumindo os locais de restrição diferenciais. Tal sistema de detecção é baseado em PCR que é seguido pela digestão com enzimas de restrição e eletroforese em gel.

[544] Validando conforme discutido em detalhes acima.

[545] Examinar o direcionamento do RNA não codificante para outros alvos (por exemplo, “efeito fora do alvo”), usando métodos in silico, quando o RNA não codificante endógeno (por exemplo, miRNA) compreende alta homologia de ocorrência natural com o alvo (por exemplo, 60-90%), de modo a obter um silenciamento específico do alvo de interesse.

[546] Modificar minimamente o RNA não codificante endógeno (por exemplo, miRNA) para aumentar sua potência para silenciar o alvo de interesse.

[547] Validar o resultado GEiGS dos principais genes de miRNA minimamente editados para gerar candidatos a miRNAs minimamente editados. Um resultado GEiGS primário experimentalmente eficaz (os genes primários de miRNA minimamente editados) é considerado um miRNA (s) com um fita guia ou passageira modificada para corresponder ao alvo em 100%.

[548] Gerar várias sequências guia ou passageiras que são gradualmente revertidas de volta para a sequência original (conforme ilustrado na Figura 11).

[549] Manter a sequência da semente de uma maneira que exista pelo menos 5 correspondências dos sete nucleotídeos de semente (nucleotídeos 2-8 do terminal 5').

[550] Testar os vários candidatos 'genes de miRNA minimamente editados refinados' para a eficiência do silenciamento alvo. Escolhendo o knock-in mediado por GE que fornece o maior silenciamento com a modificação mínima da sequência de miRNA.

[551] Testar potenciais “efeitos fora do alvo” de candidatos de miRNA refinados minimamente editados. Uma previsão significativa para “efeitos fora do alvo” afeta a avaliação final dos genes de miRNA minimamente editados refinados.

[552] Testando os candidatos ao gene miRNA minimamente editados, menos refinados, com base na validação experimental.

[553] Como usado aqui, o termo “cerca de” refere-se a ± 10%.

[554] Os termos “compreende”, “compreendendo”, “inclui”, “incluindo”, “tendo” e seus conjugados significam “incluindo, mas não se limitando a”.

[555] O termo “consistindo em” significa “incluindo e limitado a”.

[556] O termo “consistindo essencialmente de” significa que a composição, método ou estrutura pode incluir ingredientes, etapas e/ou partes adicionais, mas somente se os ingredientes, etapas e/ou partes adicionais não alterarem materialmente as características básicas e novas da composição, método ou estrutura reivindicados.

[557] Como usado neste documento, as formas singulares “um”, “uma” e “a/o” incluem os plurais, a menos que o contexto claramente indique o contrário. Por exemplo, o termo “um composto” ou “pelo menos um composto” pode incluir uma pluralidade de compostos, incluindo suas misturas.

[558] Ao longo deste pedido, várias modalidades desta invenção podem ser apresentadas em um formato de faixa. Deve ser entendido que a descrição em formato de faixa é meramente para conveniência e brevidade e não deve ser interpretada como uma limitação inflexível no escopo da invenção. Consequentemente, a descrição de uma faixa deve ser considerada como tendo divulgado especificamente todas as possíveis subfaixas, bem como valores

numéricos individuais nessa faixa. Por exemplo, a descrição de uma faixa, tal como de 1 a 6, deve ser considerada como tendo divulgado especificamente 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., bem como números individuais dentro dessa faixa, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Isto se aplica independentemente da amplitude da faixa.

[559] Sempre que uma faixa numérica for aqui indicada, ela deve incluir qualquer número citado (fracionário ou integral) dentro da faixa indicada. As frases “variando/varia entre” um primeiro número indicado e um segundo número indicado e “variando/varia de” um primeiro número indicado “a” um segundo número indicado são usadas aqui de forma intercambiável e devem incluir o primeiro e o segundo números indicados e todos os numerais fracionários e integrais entre eles.

[560] Conforme usado neste documento, o termo “método” refere-se a modos, meios, técnicas e procedimentos para realizar uma determinada tarefa, incluindo, entre outros, modos, meios, técnicas e procedimentos conhecidos, ou facilmente desenvolvidos a partir de modos, meios, técnicas e procedimentos conhecidos por praticantes das técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas e médicas.

[561] Como utilizado neste documento, o termo “tratamento” inclui anular, inibir substancialmente, retardar ou reverter a progressão de uma condição, melhorar substancialmente os sintomas clínicos ou estéticos de uma condição ou impedir substancialmente o aparecimento de sintomas clínicos ou estéticos de uma condição.

[562] É entendido que certas características da invenção, que são, para maior clareza, descritas no contexto de modalidades separadas, também podem ser fornecidas em combinação em uma única modalidade. Por outro lado, várias características da invenção, que são, por questões de brevidade, descritas no contexto de uma única modalidade, também podem ser fornecidas separadamente ou em qualquer subcombinação adequada ou

conforme adequado em qualquer outra modalidade descrita da invenção. Certas características descritas no contexto das várias modalidades não devem ser características consideradas essenciais destas modalidades, a menos que a modalidade seja inoperante sem esses elementos.

[563] Várias modalidades e aspectos da presente invenção como representado acima e como reivindicado na seção de reivindicações abaixo, encontra suporte experimental nos exemplos a seguir.

[564] 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, as SEQ ID NOs: 1-4 são expressas em um formato de sequência de DNA (*por exemplo*, recitando T para timina), mas podem se referir a uma sequência de DNA que corresponde a uma sequência de ácido nucleico de gRNA ou a sequência de RNA de uma sequência de ácido nucleico da molécula de RNA. Da mesma forma, embora algumas sequências sejam expressas em um formato de sequência de RNA (*por exemplo*, recitando U para uracila), dependendo do tipo real de molécula que está sendo descrita, 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.

Exemplos

[565] Agora é feita referência aos exemplos a seguir, os quais, juntamente com as descrições acima, ilustram a invenção de maneira não limitativa.

[566] Em geral, a nomenclatura usada neste documento e os procedimentos de laboratório utilizados na presente invenção incluem

técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas e de DNA recombinante. Tais técnicas são exaustivamente explicadas na literatura. Ver, por exemplo, “Molecular Cloning: A laboratory Manual” Sambrook *et al*., (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al*., “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson *et al*., “Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York; Birren *et al*. (eds) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologias como estabelecidas na Pat. U.S. Nos. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 and 5,272,057; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”, Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); “Current Protocols in Immunology” Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al*. (eds), “Basic and Clinical Immunology” (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W. H. Freeman and Co., New York (1980); imunoensaios são extensivamente descritos na literatura científica e patentária, ver, por exemplo, as Pat. U.S. Nos. 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, BD, e Higgins SJ, eds. (1985); “Transcription and Translation” Hames, BD, e Higgins SJ, Eds. (1984); “Animal Cell Culture” Freshney, RI, ed. (1986); “Immobilized Cells and Enzymes” IRL Press, (1986); “A Practical Guide to Molecular Cloning” Perbal, B., (1984) e “Methods in Enzymology” Vol. 1-317, 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 dos quais são incorporados por referência como se estivessem completamente estabelecidos no presente. Outras referências gerais são fornecidas ao longo deste

documento. Acredita-se que os procedimentos nele contidos sejam bem conhecidos na técnica e são fornecidos para a conveniência do leitor. Todas as informações aqui contidas são incorporadas aqui por referência.

MATERIAIS GERAIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Cultura de células de Arabidopsis

[567] As culturas celulares de Arabidopsis thaliana (ecótipo Landsberg erecta) foram mantidas em 100 mL de meio de crescimento líquido (4,4 g/L de sais Murashige e Skoog (MS) com vitaminas [Duchefa, Haarlem, Países Baixos], 30 g/L de sacarose, 0,5 mg/L 1-ácido naftalenacético (NAA) e 0,5 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP) a 25 °C, fotoperíodo de 16 horas e agitação suave (100 rpm). Todas as semanas 6 ml de cultura foram transferidos para um meio fresco.

Crescimento da planta

[568] Mudas de Arabidopsis thaliana (ecótipo Colômbia-0) foram esterilizadas em superfície e cultivadas em placas contendo meio MS suplementado com 0,8 g/L de ágar a 20 °C em fotoperíodo de 16 horas.

Transformação estável da cultura celular de Arabidopsis

[569] Agrobacterium transportando o plasmídeo pK7WGF2 foi cultivado em meio LB suplementado com 100 mg/L de espectinomicina a 28 °C até uma OD de 0,8. As bactérias foram coletadas por centrifugação e ressuspensas na mesma quantidade de meio de cultura de células vegetais. Quatro dias após a transferência para o meio fresco, 4 ml de células de Arabidopsis foram incubadas com 0,1 mL da suspensão de Agrobacterium em uma placa de Petri a 25 °C no escuro com agitação suave (130 rpm). Após 48 horas, as células foram coletadas por centrifugação e lavadas cinco vezes com meio de cultura de células para remover a maioria das bactérias. Finalmente, as células foram ressuspensas em 2 ml de meio de

cultura de células e placas em uma placa de Petri contendo meio de cultura de células suplementado com 0,4% de Phytagel, 500 mg/L de timenteno e 50 mg/L de canamicina. Os pratos foram armazenados a 25 °C no escuro até a formação de calos, geralmente após 2 ou 3 semanas

Calos embriogênicos de banana

[570] O calo embriogênico da banana é desenvolvido a partir de um explante inicial, como flores masculinas imaturas ou ponta de broto, conforme descrito por Ma [Ma SS, *Proceedings of Symposium on Tissue Culture of Cultivities Horticultural*, Taipei, Taiwan, 8-9 de março de 1988, pp. 181-188] e Schoofs [Schoofs H., *The origin of embryogenic cells in Musa*. Tese de doutorado, KULeuven, Bélgica (1997)]. As suspensões de células embriogênicas são iniciadas a partir de calos altamente embriogênicos recentemente desenvolvidos em meio líquido. 80% do meio é atualizado a cada 12-14 dias até que a suspensão celular iniciada seja totalmente estabelecida (6-9 meses).

Calli embrionário de café

[571] Os calos embrionários de café são obtidos como descrito anteriormente [Etienne, H., *Protocol for somatic embryogenesis in woody plants* (2005) Springer. p. 167-1795]. Resumidamente, as folhas jovens são esterilizadas na superfície, cortadas em pedaços de 1 cm^2 e colocadas em meio MS semi-sólido meia força suplementado com 2,26 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 4,92 µM de ácido indol-3-butírico (IBA) e 9,84 µM de isopenteniladenina (iP) por um mês. Os explantes são então transferidos para meio MS semi-sólido meia força contendo 4,52 µM de 2,4-D e 17,76 µM de 6-benzilaminopurina (6-BAP) por 6 a 8 meses até a regeneração dos calos embriogênicos. Os calos embriogênicos são mantidos em meio MS suplementado com 5 µM de 6-BAP.

[572] As culturas de suspensão de células são geradas a partir de calos embriogênicos, como descrito anteriormente [Acuna, JR e M. de

Pena, *Plant Cell Reports* (1991) 10 (6): p. 345-348]. Calos embriogênicos (30 g/l) são colocados em meio MS líquido suplementado com 13,32 µM de 6-BAP. Os frascos são colocados em uma incubadora com agitação (110 rpm) a 28 °C. A suspensão de células é subcultivada/passada a cada duas a quatro semanas até estar completamente estabelecida. As culturas de suspensão celular são mantidas em meio MS líquido com 4,44 µM de 6-BAP.

Segmentação de instruções computacional para gerar modelos GEiGS

[573] A segmentação de instruções GEiGS computacional aplica metadados biológicos e permite a geração automática de modelos de doadores de DNA GEiGS que são usados para editar minimamente genes de RNA não codificantes (por exemplo, genes miRNA), levando a um novo ganho de função, ou seja, redirecionando sua capacidade de silenciamento para expressão do gene alvo de interesse.

[574] Conforme ilustrado na Figura 9, a segmentação de instruções começa com o preenchimento e envio de entradas: a) sequência alvo a ser silenciada pelo GEiGS; b) o organismo hospedeiro a ser editado geneticamente e a expressar o GEiGS; c) pode-se escolher se o GEiGS seria expresso completamente ou não. Se for necessária uma expressão GEiGS específica, é possível escolher entre algumas opções (expressão específica para um determinado tecido, estágio de desenvolvimento, estresse, choque de calor/frio, etc.).

[575] Quando todas as entradas necessárias são enviadas, o processo computacional começa com a pesquisa entre os conjuntos de dados de miRNA (por exemplo, sequenciamento de pequeno RNA, microarray etc.) e filtrando apenas os miRNAs relevantes que atendem aos critérios de entrada. Em seguida, as sequências de miRNA maduras selecionadas são alinhadas contra a sequência alvo e o miRNA com os níveis complementares mais altos são filtradas. Estas sequências de miRNA maduro

naturalmente complementares ao alvo são então modificadas para corresponder perfeitamente com a sequência do alvo. Em seguida, as sequências de miRNA maduras modificadas são executadas através de um algoritmo que prevê a potência do siRNA e os 20 primeiros com a maior pontuação de silenciamento são filtrados. Esses genes finais de miRNA modificados são então usados para gerar sequências de 200-500 nt ssDNA ou 250-5000 nt dsDNA da seguinte maneira:

[576] Os fragmentos de oligos dessDNA de 200-500 nt e os fragmentos de dsDNA de 250-5000 nt são projetados com base na sequência de DNA genômico que flanqueia o miRNA modificado. A sequência pré-miRNA está localizada no centro do oligo. A sequência da fita guia (de silenciamento) do miRNA modificado é 100% complementar ao alvo. No entanto, a sequência da fita de miRNA passageira modificada é ainda modificada para preservar a estrutura original de miRNA (não modificada), mantendo o mesmo perfil de emparelhamento de base.

[577] Em seguida, os sgRNAs diferenciais são projetados para atingir especificamente o gene miRNA original não modificado, e não a versão de troca modificada. Finalmente, é realizada uma análise comparativa do local da enzima de restrição entre o gene miRNA modificado e original, e os locais de restrição diferencial são resumidos.

[578] Portanto, a saída da segmentação de instruções inclui:

a) Sequência de fragmentos de oligo de ssDNA de 200-500 nt ou de dsDNA de 250-5000 nt com miRNA minimamente modificado

b) 2-3 sgRNAs diferenciais que são direcionados especificamente ao gene miRNA original e não o gene modificado

c) Lista de locais de enzimas de restrição diferencial entre o gene miRNA modificado e original

Genes Alvo

Gene de phytoene desaturase (PDS

Rationale

[579] PDS é um gene essencial na via de biossíntese da clorofila e a perda da função de PDS em plantas resulta em fenótipo albino [Fan *et al*., *Sci Rep* (2015) 5: 12217]. Quando usadas como gene alvo na estratégia de edição do genoma (GE) ou RNAi, as plantas editadas positivamente são facilmente identificadas pela perda parcial ou completa de clorofila nas folhas e em outros órgãos (branqueamento).

Métodos

[580] Os miRNAs com perfil de expressão completa são escolhidos (dependendo da aplicação, pode-se escolher miRNAs com perfil de expressão que é específico para um determinado tecido, estágio de desenvolvimento, temperatura, estresse etc.).

[581] Os miRNAs são modificados para siRNA direcionados ao gene PDS de Arabidopsis (ver a Tabela 1A, abaixo). Após a transfecção e a classificação FACS (RFP/GFP são usadas para identificar eventos positivos de transfecção Cas9/sgRNA), protocolônias (ou calos) são transferidos para o meio de regeneração sólido (MS meia força + vitaminas B5, 20 g/l de sacarose, 0,8% de ágar) até que os brotos sejam regenerados. A perda de pigmentação nesses brotos indica perda de função do gene PDS e GE correto. Não é observado fenótipo albino nas plântulas de controle transfectadas com um oligo carregando uma sequência aleatória.

Gene de Proteína Fluorescente Verde (GFP)

Rationale

[582] GFP é uma proteína composta por 238 resíduos de aminoácidos (26,9 kDa) que exibe fluorescência verde brilhante quando exposta à luz na faixa de azul a ultravioleta. Embora muitos outros organismos marinhos possuam proteínas fluorescentes verdes semelhantes, a GFP se

refere tradicionalmente à proteína primeiramente isolada da água-viva Aequorea victoria. A GFP de *A. victoria* tem um pico de excitação maior no comprimento de onda de 395 nm e menor em 475 nm. Seu pico de emissão é de 509 nm, que fica na parte verde inferior do espectro visível. O rendimento quântico de fluorescência (QY) do GFP é 0,79. O GFP do sea pansy (Renilla reniformis) tem um único pico de excitação principal a 498 nm. O GFP é uma excelente ferramenta em muitas áreas da biologia, devido à sua capacidade de formar cromóforos internos sem a necessidade de cofatores acessórios, produtos genéticos ou enzimas/substratos que não sejam oxigênio molecular.

Métodos

[583] Os miRNAs com perfil de expressão completa são escolhidos (dependendo da aplicação, pode-se escolher miRNAs com perfil de expressão que é específico para um determinado tecido, estágio de desenvolvimento, temperatura, estresse etc.).

[584] Os miRNAs são modificados em siRNA direcionados ao gene GFP (consulte a Tabela 1A, abaixo). Após a transfecção, é realizada a classificação FACS, isolando os protoplastos que expressam mCherry (mCherry é usado para identificar eventos positivos de transfecção de Cas9/sgRNA) com nenhum ou baixo sinal de GFP. No controle (oligo com sequência de siRNA não alvo), todos os protoplastos expressam mCherry e GFP. A seguir, os protoplastos GE bem-sucedidos candidatos (mCherry positivo e GFP negativo) são regenerados em plantas para análises posteriores. Os protoplastos também são documentados qualitativamente sob o microscópio. Para análise de quantificação e razões, foi utilizada a análise FACS.

Tabela 1A: IDs dos genes de destino

Nome do gene	***ID da sequência de consulta***	***Organismo de sequência de consulta***
PDS	NM_001340908.1 (SEQ ID NO: 25) NM_117498 (SEQ ID NO: 26)	Arabidopsis

ADH1	NC_003070.9	Arabidopsis
eGFP	AFA52654 (SEQ ID NO: 27)	*Aequorea victoria*

Projetar siRNA

[585] Os siRNAs específicos do alvo são projetados por designers de siRNA disponíveis publicamente, como o “BLOCK-iT ™ RNAi Designer” da ThermoFisher Scientific e o “Find siRNA sequences” da Invivogen.

Projetar sgRNAs

[586] Os sgRNAs são projetados para direcionar os genes de miRNA endógenos usando o designer de sgRNA disponível publicamente, conforme descrito anteriormente em Park *et al*., *Bioinformatics* (2015) 31 (24): 4014-4016. Dois sgRNAs são projetados para cada cassete, mas um único sgRNA é expresso por célula para iniciar a troca de genes. Os sgRNAs correspondem à sequência pré-miRNA que é modificada após a troca.

[587] Para maximizar a chance de escolha eficiente do sgRNA, dois algoritmos diferentes publicamente disponíveis (CRISPER Design: www(ponto)crispr(ponto)mit(ponto)edu:8079/ e CHOPCHOP: www(ponto)chopchop(ponto)cbu(ponto)uib (ponto)no/) são usados e o sgRNA de maior pontuação de cada algoritmo é selecionado.

Trocar o design do oligo ssDNA

[588] O oligo ssDNA 400 b é projetado com base na sequência de DNA genômico do gene miRNA. A sequência pré-miRNA está localizada no centro do oligo. Em seguida, as sequências de siRNA de fita dupla são trocadas com as sequências maduras de miRNA de uma maneira que a fita de siRNA guia (silenciamento) seja mantida 100% complementar ao alvo. A sequência da fita de siRNA passageiro é modificada para preservar a estrutura original do miRNA, mantendo o mesmo perfil de emparelhamento de base.

Trocar o projeto do DNA do plasmídeo

[589] O fragmento dsDNA 4000 pb é projetado com base na sequência de DNA genômico do gene miRNA. A sequência pré-miRNA está localizada no centro do fragmento dsDNA. Em seguida, as sequências de siRNA de fita dupla são trocadas com as sequências maduras de miRNA de uma maneira que a fita de siRNA guia (silenciamento) seja mantida 100% complementar ao alvo. A sequência da fita de siRNA passageiro é modificada para preservar a estrutura original do miRNA, mantendo o mesmo perfil de emparelhamento de base. Finalmente, o fragmento é clonado em um vetor padrão (por exemplo, pBluescript).

Plasmídeos longos para troca

[590] **Plasmídeo-1**: GEiGS_ mir173_si-GFP_1 (SEQ ID NO: 31)

[591] **Plasmídeo-2**: GEiGS_ mir173_si-GFP_2 (SEQ ID NO: 32)

[592] **Plasmídeo-3**: GEiGS_ mir173_si-PDS_1 (SEQ ID NO: 33)

[593] **Plasmídeo-4**: GEiGS_ mir173_si-PDS_2 (SEQ ID NO: 34)

[594] **Plasmídeo-5**: GEiGS_ mir390a _si-GFP_1 (SEQ ID NO: 35)

[595] **Plasmídeo-6**: GEiGS_ mir390a _si-GFP_2 (SEQ ID NO: 36)

[596] **Plasmídeo-7**: GEiGS_ mir390a _si-PDS_1 (SEQ ID NO: 37)

[597] **Plasmídeo-8**: GEiGS_ mir390a _si-PDS_2 (SEQ ID NO: 38)

sequências de sgRNAs

[598] ***Arabidopsis mir-390A***:

1. CTATCCATCCTGAGTTTCATTGG (SEQ ID NO: 1);

2. AAGAATCTGTAAAGCTCAGGAGG (SEQ ID NO: 2);

[599] ***Arabidopsis mir-173***:

3. CTTGCAGAGAGAAATCACAGTGG (SEQ ID NO: 3);

4. GCTTACACAGAGAATCACAGAGG (SEQ ID NO: 4);

[600] ***Lista de miRNA endógeno que são trocados:***

5. Arabidopsis mir-390A

6. Arabidopsis mir-173

[601] ***Oligos de ssDNA usados para troca de genes:***

Oligo-1: GEiGS_ mir173_si-GFP_1 (5’ → 3’) (SEQ ID NO: 5)

Oligo-2: GEiGS_ mir173_si-GFP_2 (5’ → 3’) (SEQ ID NO: 6)

Oligo-3: GEiGS_ mir173_si-PDS_1 (5’ → 3’) (SEQ ID NO: 7)

Oligo-4: GEiGS_ mir173_si-PDS_2 (5’ → 3’) (SEQ ID NO: 8)

Oligo-5: GEiGS_ mir390a_si-GFP_1 (5’ → 3’) (SEQ ID NO: 9)

Oligo-6: GEiGS_ mir390a_si-GFP_2 (5’ → 3’) (SEQ ID NO: 10)

Oligo-7: GEiGS_ mir390a_si-PDS_1 (5’ → 3’) (SEQ ID NO: 11)

Oligo-8: GEiGS_ mir390a_si-PDS_2 (5’ → 3’) (SEQ ID NO: 12)

Clonagem de sgRNA

[602] O plasmídeo de transfecção utilizado foi composto por 4 módulos compreendendo:

1) mCherry conduzido pelo promotor CsVMV terminado por uma sequência de terminação G7;

2) 2 x 35S:: hCas9-35S-ter, isto é, hCas9 acionado pelo promotor 35S terminado pela sequência de terminação AtuNos;

3) Promotor sintético AtU6-26 e/ou U6 dirigindo sgRNA para o guia 1;

Projeto do plasmídeo

[603] Para expressão transitória, é utilizado um plasmídeo contendo três unidades de transcrição. A primeira unidade de transcrição contém a expressão de atuação do promotor CsVMV do mCherry e do terminador G7. A próxima unidade transcricional consiste na expressão 2x2SS de atuação de promotor de Cas9 e no terminador 35S. O terceiro contém o promotor Arabidopsis U6 que expressa sgRNA para direcionar genes de miRNA (cada vetor compreende um único sgRNAs).

Projeto e clonagem de CRISPR/CAS9 para direcionar a miR-173 e miR-390 e introduzir SWAPs para direcionar a GFP, AtPDS3 e AtADH1

[604] Os presentes inventores projetaram alterações nas sequências de miR-173 maduro e miR-390, em seu contexto genômico, para direcionar a *GFP*, *AtPDS3* ou *AtADH1*, produzindo pequeno RNA que complementa inversamente os genes alvo, visualizados nas Figuras 12A-G e 13A-G. Além disso, para manter a estrutura secundária do transcrito precursor do miRNA, outras alterações no pri-miRNA foram realizadas, conforme especificado nas Figuras 12A-G, 13A-G, 14A-D e 15A-D e Tabela 2 (abaixo). Estes fragmentos foram clonados em plasmídeos PUC e denominados DONORs e os fragmentos de DNA são referidos como SWAPs. Para seqUências para modificar miR-173 - SWAP1 e SWAP2 para atingir *GFP*, SWAP3 e SWAP4 para atingir *AtPDS3* e SWAP9 e SWAP10 para atingir

AtADH1 (ver a Tabela 2 abaixo). Para sequências para modificar o miR-390 - SWAP5 e SWAP6 para atingir *GFP*, SWAP7 e SWAP8 para atingir *AtPDS3* e SWAP11 e SWAP12 para atingir *AtADH1* (consulte a Tabela 2 abaixo).

[605] Os RNAs guia direcionados ao miR-173 e miR-390 foram introduzidos no sistema vetorial CRISPR/CAS9 para gerar uma clivagem de DNA nos locais desejados do miRNA. Estes foram co-introduzidos nas plantas com os vetores DONOR através do protocolo de bombardeio genético, para introduzir as modificações desejadas através do Reparo Homólogo de DNA (HDR). Esses RNAs guia são especificados na Tabela 2 abaixo e ilustrados nas Figuras 12A e 13A.

Tabela 2: Sequências e oligos utilizados nas experiências

SEQ ID NO:	**Objetivo**
39	miR173
40	miR390
41	sequência de sgRNA usada para o direcionamento de miR173 no sistema CRISPR/CAS9 GEiGS # 4
42	sequência de sgRNA usada para o direcionamento de miR173 no sistema CRISPR/CAS9 GEiGS#5
43	sequência de sgRNA usada para o direcionamento de miR390 no sistema CRISPR/CAS9 GEiGS#1
44	sequência de sgRNA usada para o direcionamento de miR390 no sistema CRISPR/CAS9 GEiGS#3
45	GEiGS-siRNA maduro direcionando GFP- usado em SWAP5 (com base no miR390) e no SWAP1 (com base no miR173)
46	Fita complementar de GEiGS-siRNA maduro direcionado a GFP- usado em SWAP5 (com base no miR390) e no SWAP1 (com base no miR173)
47	GEiGS-siRNA maduro direcionando GFP- usado em SWAP6 (com base no miR390) e em SWAP2 (com base no miR173)
48	Fita complementar de GEiGS-siRNA maduro direcionado a GFP- usado em SWAP6 (com base no miR390) e no SWAP2 (com base no miR173)
49	GEiGS-siRNA maduro visando AtPDS3- usado em SWAP7 (com base no miR390) e em SWAP3 (com base em miR173)
50	Fita complementar de GEiGS-siRNA maduro direcionada a AtPDS3- usado em SWAP7 (baseado em miR390) e em SWAP3 (baseado em miR173)

51	GEiGS-siRNA maduro visando AtPDS3- usado em SWAP8 (com base no miR390) e em SWAP4 (com base em miR173)
52	Fita complementar de GEiGS-siRNA maduro direcionada a AtPDS3- usado em SWAP8 (baseado em miR390) e em SWAP4 (baseado em miR173)
53	GEiGS-siRNA maduro direcionado a AtADH1- usado no SWAP11 (baseado em miR390) e no SWAP9 (com base no miR173)
54	Fita complementar de GEiGS-siRNA maduro direcionado a AtADH1- usado em SWAP11 (com base no miR390) e em SWAP9 (com base em miR173)
55	GEiGS-siRNA maduro direcionado a AtADH1- usado no SWAP12 (baseado em miR390) e no SWAP10 (com base no miR173)
56	Fita complementar de GEiGS-siRNA maduro direcionado a AtADH1- usado em SWAP12 (com base no miR390) e em SWAP10 (com base em miR173)
57	Transcrição primária do miR173 (pri-miR173)
58	Transcrição primária de SWAP1 (usada no vetor doador para direcionar a GFP)
59	Transcrição primária de SWAP2 (usada no vetor doador para direcionar a GFP)
60	Transcrição primária de SWAP3 (usada no vetor doador para direcionar o PDS3)
61	Transcrição primária de SWAP4 (usada no vetor doador para direcionar o PDS3)
62	Transcrição primária do SWAP9 (usada no vetor doador para atingir o ADH1)
63	Transcrição primária do SWAP10 (usada no vetor doador para atingir o ADH1)
64	Transcrição primária do miR390 (pri-miR390)
65	Transcrição primária de SWAP5 (usada no vetor doador para direcionar a GFP)
66	Transcrição primária de SWAP6 (usada no vetor doador para direcionar a GFP)
67	Transcrição primária de SWAP7 (usada no vetor doador para direcionar o PDS3)
68	Transcrição primária de SWAP8 (usada no vetor doador para direcionar o PDS3)
69	Transcrição primária do SWAP11 (usada no vetor doador para atingir o ADH1)
70	Transcrição primária do SWAP12 (usada no vetor doador para atingir o ADH1)
71	Sequência de locais miR173
72	Sequência oligo de SWAP1 (usada no vetor doador para modificação do miR173 para direcionar a GFP)
73	Sequência oligo de SWAP2 (usada no vetor doador para modificação do miR173 para direcionar a GFP)
74	Sequência oligo de SWAP3 (usada no vetor doador para modificação do miR173 para direcionar a PDS3)
75	Sequência oligo de SWAP4 (usada no vetor doador para modificação do miR173 para direcionar a PDS3)
76	Sequência oligo de SWAP9 (usada no vetor doador para modificação do miR173 para

	direcionar a ADH1)
77	Sequência oligo de SWAP10 (usada no vetor doador para modificação do miR173 para direcionar a ADH1)
78	Sequência oligo dos locais miR390
79	Sequência oligo de SWAP5 (usada no vetor doador para modificação do miR390 para direcionar a GFP)
80	Sequência oligo de SWAP6 (usada no vetor doador para modificação do miR390 para direcionar a GFP)
81	Sequência oligo de SWAP7 (usada no vetor doador para modificação do miR390 para direcionar a PDS3)
82	Sequência oligo de SWAP8 (usada no vetor doador para modificação do miR390 para direcionar a PDS3)
83	Sequência oligo de SWAP11 (usada no vetor doador para modificação do miR390 para direcionar a ADH1)
84	Sequência oligo de SWAP12 (usada no vetor doador para modificação do miR390 para direcionar a ADH1)
85	qRT para expressão do gene de housekeeping 18S (NC_037304) - iniciador direto
86	qRT para expressão do gene de housekeeping 18S (NC_037304) - iniciador reverso
87	qRT para análise da expressão de PDS3 (AT4G14210) - iniciador direto
88	qRT para análise da expressão de PDS3 (AT4G14210) - iniciador reverso
89	qRT para análise da expressão de ADH1 (AT1G77120) - iniciador direto
90	qRT para análise da expressão de ADH1 (AT1G77120) - iniciador reverso
91	Iniciador direto para amplificação interna do miR390 e seus modificados versões
92	Iniciador reverso para amplificação interna do miR390 e seus modificados versões
93	Iniciador direto para amplificação externa do miR390 e seus modificados versões- reação primária
94	Reverso para amplificação externa do miR390 e suas versões modificadas- reação primária
95	Iniciador direto para amplificação externa do miR390 e seus modificados versões- reação aninhada
96	Reverso para amplificação externa do miR390 e suas versões modificadas- reação aninhada
97	Iniciador direto para amplificação interna do miR173 e seus modificados versões
98	Iniciador reverso para amplificação interna do miR173 e seus modificados versões
99	Iniciador direto para amplificação externa do miR173 e seus modificados versões- reação primária
100	Reverso para amplificação externa do miR173 e suas versões modificadas- reação

	primária
101	Iniciador direto para amplificação externa do miR173 e seus modificados versões- reação aninhada
102	Reverso para amplificação externa do miR173 e suas versões modificadas- reação aninhada

Isolamento de protoplastos

[606] Os protoplastos foram isolados por incubação de material vegetal (por exemplo, folhas, calos, suspensões celulares) em uma solução de digestão (1% celulase, 0,5% macerozima, 0,5% driselase, 0,5% driselase, 0,4 M manitol, 154 mM NaCl, 20 mM KCl, 20 mM MES pH 5,6 CaCl2 10 mM) durante 4-24 horas à temperatura ambiente e com 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 a suspensão de protoplastos foi filtrada através de um filtro de 40 µm. Após centrifugação a 80 g por 3 minutos à temperatura ambiente, os protoplastos foram ressuspensos em 2 ml de tampão W5 e precipitados por gravidade em gelo. O sedimento final de protoplastos foi ressuspenso 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 usando um hemocitômetro. A viabilidade dos protoplastos foi estimada usando coloração com Trypan Blue.

Transfecção de plasmídeo mediada por polietileno glicol (PEG)

[607] A transfecção de PEG de protoplastos foi realizada usando uma versão modificada da estratégia relatada por Wang [Wang *et al*., *Scientia Horticulturae* (2015) 191: p. 82-89]. Os protoplastos foram ressuspensos em uma densidade de 2-5 x 10^6 protoplastos/ml em solução de MMg. Foram adicionados 100-200 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, 5-300 µg/µl, foi testada. Adicionou-se uma solução de PEG (100-200 µl) à mistura e incubou-se a 23 °C por vários períodos variando de 10 a 60 minutos. A concentração de PEG4000 foi otimizada, uma faixa de 20-80% de PEG4000 em manitol 200-400 mM, solução de CaCl2100-500 mM foi testada. Os protoplastos foram então lavados em W5 e centrifugados a 80 g por 3 minutos, ressuspensão prévia em 1 ml de W5 e incubados no escuro a 23 °C. Após incubação por 24-72 horas, a fluorescência foi detectada por microscopia.

Classificação FACS de células que expressam proteínas fluorescentes

[608] 24-72 horas após a entrega do plasmídeo/RNA, as células foram coletadas e classificadas para expressão de proteína fluorescente usando um citômetro de fluxo para enriquecer as células que expressam mCherry/agente de edição, conforme descrito anteriormente [Chiang *et al*., *Sci Rep* (2016) 6: 24356]. Esta etapa de enriquecimento permite ignorar a seleção de antibióticos e coletar apenas células que expressam transitoriamente a proteína fluorescente, Cas9 e o sgRNA. Estas células podem ser ainda testadas quanto à edição do gene alvo por HR produzindo eventos de troca bem-sucedidos e perda da expressão do gene correspondente.

Bombardeio e regeneração de plantas

Preparação da raiz de Arabidopsis

[609] Arabidopsis esterilizada a gás cloro (cv. *Col-0*) sementes foram semeadas em placas de MS menos sacarose e vernalizadas por três dias no escuro a 4 °C, seguidas de germinação vertical a 25 °C sob luz constante. Após duas semanas, as raízes foram excisadas em segmentos de raiz de 1 cm e colocadas em placas de meio de indução de calos (CIM: 1/2 MS com vitaminas B5, 2% de glucose, pH 5,7, 0,8% de ágar, 2 mg/l IAA, 0,5 mg/l 2,4-D, 0,05 mg/l de kinetin). Após seis dias de incubação no escuro, a 25 °C,

os segmentos de raíz foram transferidos para discos de papel de filtro e colocados em placas CIMM (1/2 MS sem vitaminas, glicose a 2%, manitol 0,4 M, pH 5,7 e ágar 0,8%) por 4-6 horas, em preparação para o bombardeio.

Bombardeamento

[610] Construtos de plasmídeo foram introduzidos no tecido da raiz por meio da Entrega de Partículas PDS-1000/He (Bio-Rad; PDS-1000/He Sistema # 1652257), várias etapas preparatórias, descritas abaixo, foram necessárias para que este procedimento fosse realizado.

Preparação de estoque de ouro

[611] 40 mg de 0,6 µm de ouro (Bio-Rad; Cat: 1652262) foram misturados com 1 ml de etanol a 100%, centrifugados por impulsão para sedimentar e o etanol foi removido. Este procedimento de lavagem foi repetido mais duas vezes.

[612] Depois de lavado, o sedimento foi ressuspenso em 1 ml de água destilada estéril e dispensado em tubos de 1,5 ml com 50 µl de volumes de alíquota de trabalho.

Preparação de contas

[613] Em resumo, o seguinte foi realizado:

- Um único tubo era ouro suficiente para bombardear 2 placas de raízes de Arabidopsis (2 tiros por placa), portanto, cada tubo foi distribuído entre 4 (1.100 psi) discos de ruptura biolística (Bio-Rad; Cat: 1652329).

- Os bombardeamentos que requerem múltiplas placas da mesma amostra, os tubos foram combinados e volumes da mistura de DNA e CaCl2/espermidina foram ajustados em conformidade, a fim de manter a consistência da amostra e minimizar as preparações gerais.

- O protocolo a seguir resume o processo de preparação de um tubo de ouro, que deve ser ajustado de acordo com o número de tubos

de ouro utilizados.

- Todos os processos subsequentes foram realizados a 4 °C em um termomisturador Eppendorf.

- Foram preparadas amostras de DNA plasmídico, cada tubo compreendendo 11 µg de DNA adicionado a uma concentração de 1000 ng/µl

1) 493 µl de ddH2O foram adicionados a 1 alíquota (7 µl) de espermidina (Sigma-Aldrich; S0266), dando uma concentração final de 0,1 M de espermidina. 1250 µl de CaCl2 a 2,5M foram adicionados à mistura de espermidina, agitados em vórtex e colocados em gelo.

2) Um tubo de ouro pré-preparado foi colocado no termomisturador e girado a uma velocidade de 1400 rpm.

3) 11 µl de DNA foram adicionados ao tubo, agitados em vórtex e recolocados no termomisturador rotativo.

4) Para ligar partículas de DNA/ouro, 70 µl de mistura de espermidina $CaCl_2$ foram adicionados a cada tubo (no termomisturador).

5) Os tubos foram vigorosamente agitados em vórtice por 15 a 30 segundos e colocados no gelo por cerca de 70 a 80 segundos.

6) A mistura foi centrifugada durante 1 minuto a 7000 rpm, o sobrenadante foi removido e colocado em gelo.

7) 500 µl de etanol a 100% foram adicionados a cada tubo e o sedimento foi ressuspenso por pipetagem e submetido a vórtice.

8) Os tubos foram centrifugados a 7000 rpm por 1 minuto.

9) O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspenso em 50 µl de etanol a 100% e armazenado em gelo.

Preparação de macro carreador

[614] O seguinte foi realizado em uma cabine de fluxo laminar:

10) Macro carreadores (Bio-Rad; 1652335), telas de parada (Bio-Rad; 1652336) e suportes de disco macro carreadores foram esterilizados e secos.

11) Os macro carreadores foram colocados de maneira plana nos suportes de disco de macro carreadores.

12) A mistura de ouro revestida com DNA foi agitada no vórtex e espalhada (5 µl) no centro de cada disco de Ruptura Biolística.

[615] O etanol foi deixado evaporar.

PDS-1000 (Sistema de fornecimento de partículas de hélio)

[616] Em resumo, o seguinte foi realizado:

- A válvula reguladora da garrafa de hélio foi ajustada para pelo menos 1300 psi de pressão de entrada. O vácuo foi criado pressionando o botão vac/vent/hold e mantendo o botão de incêndio pressionado por 3 segundos. Este hélio garantido foi enviado para a tubulação.

- Discos de ruptura de 1100 psi foram colocados em isopropanol e misturados para remover a estática.

13) Um disco de ruptura foi colocado na tampa de retenção do disco.

14) O conjunto de lançamento do microcarreador foi construído (com uma tela de parada e um microcarreador contendo ouro).

15) O calo da raiz de Arabidopsis da placa de Petri foi colocado 6 cm abaixo do conjunto de lançamento.

16) A pressão de vácuo foi ajustada para 27 polegadas de Hg (mercúrio) e a válvula de hélio foi aberta (a aproximadamente 1100 psi).

17) O vácuo foi liberado; o conjunto de lançamento do microcarreador e a tampa de retenção do disco de ruptura foram removidos.

18) Bombardeio no mesmo tecido (ou seja, cada placa foi bombardeada 2 vezes).

19) As raízes bombardeadas foram posteriormente colocadas em placas CIM, no escuro, a 25 °C, por mais 24 horas.

Co-bombardeios

[617] Ao bombardear combinações de plasmídeos GEiGS, 5 µg (1000 ng/µl) do plasmídeo sgRNA foram misturados com 8,5 µg (1000 ng/µl) de plasmídeo de troca e 11 µl desta mistura foram adicionados à amostra. Se o bombardeamento com mais plasmídeos GEiGS ao mesmo tempo, a razão de concentração dos plasmídeos sgRNA para trocar os plasmídeos utilizados foi de 1:1,7 e foram adicionados à amostra 11 µg (1000 ng/µl) desta mistura. Se o co-bombardeamento com plasmídeos não associados à troca de GEiGS, proporções iguais foram misturadas e 11 µg (1000 ng/µl) da mistura foram adicionados a cada amostra.

Regeneração de plantas

[618] Para regeneração de brotos, protocolo modificado de Valvekens *et al.* [Valvekens, D. *et al*., *Proc Natl Acad Sci USA* (1988) 85 (15): 5536-5540] foi realizado. As raízes bombardeadas foram colocadas em placas de Meio de Indução de Brotos (SIM), que incluíam 1/2 MS com vitaminas B5, glicose a 2%, pH 5,7, ágar 0,8%, 5 mg/l 2 iP, 0,15 mg/l de IAA. As placas foram deixadas em ciclos de 16 horas de luz a 25 °C - 8 horas no escuro a 23 °C. Após 10 dias, as placas foram transferidas para placas MS com sacarose a 3%, ágar a 0,8% durante uma semana e depois transferidas para placas semelhantes novas. Após a regeneração das plantas, elas foram retiradas das raízes e colocadas em placas MS com sacarose a 3%, ágar a 0,8%, até serem analisadas.

Formação de colônias e regeneração de plantas

[619] As células positivas para proteínas fluorescentes

foram parcialmente amostradas e usadas para testes de extração de DNA e edição de genoma (GE) e parcialmente plaqueadas em alta diluição em meio líquido para permitir a formação de colônias por 28-35 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 (veja abaixo), enquanto as outras foram mantidas em cultura até que seu status fosse verificado. Somente os que mostraram claramente estar livres de DNA de GE e CRISPR foram selecionados adiante. As colônias foram cultivadas em meio de cultura durante cerca de 6 a 10 semanas. Protocolônias (ou calli) foram subcultivadas em meio de regeneração (por exemplo, meia força MS + vitaminas B5, 20 g/l de sacarose). Plântulas regeneradas foram colocadas em meio solidificado (agar a 0,8%) a baixa intensidade de luz a 28 °C. Após 2 meses, as plântulas foram transferidas para o solo e colocadas em estufa a 80-100% de umidade.

Inoculação de vírus e entrega de DNA a mudas de Arabidopsis

[620] A seiva de folhas de Arabidopsis infectadas com o clone infeccioso TuMV p35S:TuMV-GFP (0,1 mg/ml) é usada para inoculações mecânicas.

Propagação de plantas

[621] Os clones que foram sequenciados e previram ter perdido a expressão dos genes alvo e considerados isentos do sistema CRISPR DNA/RNA foram propagados para geração em grandes quantidades e em paralelo foram diferenciados para gerar mudas a partir das quais o ensaio funcional é realizado para testar a característica desejada.

Análise fenotípica

[622] Como descrito acima, tal como olhando a pigmentação, florescência ou morfologia dependente do gene alvo.

Seleção de Álcool Alílico

[623] Para a seleção de plantas com álcool alílico, 10 dias após o bombardeio, as raízes foram colocadas no meio SIM. As raízes foram imersas em álcool alílico 30 mM (Sigma-Aldrich, EUA) por 2 horas. Em seguida, as raízes foram lavadas três vezes com meio MS e colocadas em placas MS com sacarose a 3% e ágar a 0,8%. O processo de regeneração foi realizado como descrito anteriormente.

Genotipagem

[624] As amostras de tecido foram tratadas e os amplicons amplificados de acordo com as recomendações do fabricante. Kit MyTaq Plant-PCR (BioLine BIO 25056) para amplificação interna curta e Kit Phire Plant Direct PCR (Thermo Scientific; F-130WH) para amplificações externas mais longas. Os oligos utilizados para essas amplificações estão especificados na Tabela 2 acima. Diferentes modificações nos locais de miRNA foram identificadas através de diferentes padrões de digestão dos amplicons, como segue:

[625] Para modificações do miR-390 - amplicon interno tinha 978 pares de bases e, para amplificação externa, 2629 pares de bases. Para a identificação da troca 7, a digestão com NlaIII resultou em um tamanho de fragmento de 636 pares de bases, enquanto na versão em peso foi clivada em fragmentos de comprimento 420 e 216. Para a identificação da troca 8, a digestão com Hpy188I resultou no tamanho dos fragmentos de 293 e 339 pares de bases, enquanto na versão do tipo selvagem este local estava ausente e resultou em um fragmento de comprimento 632. Para a identificação das trocas 11 e 12, a digestão com BccI resultou em um tamanho de fragmento de 662 pares de bases, enquanto na versão do tipo selvagem foi clivada em um fragmento de comprimento 147 e 417.

[626] Para modificações do miR-173- amplicon interno tinha 574 pares de bases e, para amplificação externa aninhada, 466 pares de bases. Para a identificação da troca 3, a digestão com BslI resultou no

tamanho dos fragmentos de 217 e 249 pares de bases no amplicon externo e 317 e 149 no interno. Na versão do tipo selvagem, este local estava ausente e resultou em um fragmento de comprimento de 466 no amplicon externo e 574 na reação interna. Para a identificação da troca 4, a digestão com BtsαI resultou no tamanho dos fragmentos de 212 e 254 pares de bases no amplicon externo e 212 e 362 no interno. Na versão do tipo selvagem, este local estava ausente e resultou em um fragmento de comprimento 466 no amplicon externo e 574 na reação interna. Para a identificação da troca 9, a digestão com NlaIII resultou no tamanho dos fragmentos de 317 e 149 pares de bases no amplicon externo e 317 e 244 no interno. Na versão do tipo selvagem, este local estava ausente e resultou em um fragmento de comprimento de 466 no amplicon externo e 561 na reação interna. Para a identificação da troca 10, a digestão com NlaIII resultou no tamanho dos fragmentos de 375 e 91 pares de bases no amplicon externo e 375 e 186 no interno. Na versão do tipo selvagem, este local estava ausente e resultou em um fragmento de comprimento de 466 no amplicon externo e 561 na reação interna.

Isolamento de DNA e RNA

[627] As amostras foram colhidas em nitrogênio líquido e armazenadas em -80 °C até serem processadas. A trituração do tecido foi realizada em tubos colocados em gelo seco, utilizando Pilões de Trituração de Tecido de plástico (Axygen, EUA). O isolamento do DNA e do RNA total do tecido moído foi realizado usando o kit de purificação de RNA/DNA (cat. 48700; Norgen Biotek Corp., Canadá), de acordo com as instruções do fabricante. No caso da baixa razão 260/230 (<1,6), da fração de RNA, o RNA isolado foi precipitado durante a noite em -20 °C, com 1 µl de glicogênio (cat. 10814010; Invitrogen, US) 10% V/V de acetato de sódio, 3 M pH 5,5 (cat. AM9740, Invitrogen, EUA) e 3 vezes o volume de etanol. A solução foi centrifugada por 30 minutos em velocidade máxima, a 4 °C. Isto foi seguido por duas lavagens com etanol a 70%, secando ao ar por 15 minutos e ressuspenso em água isenta de Nuclease (cat. 10977035; Invitrogen, EUA).

Transcrição reversa (RT) e PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

[628] Um micrograma de RNA total isolado foi tratado com DNase I de acordo com o manual do fabricante (AMPD1; Sigma-Aldrich, EUA). A amostra foi transcrita de forma reversa, seguindo o manual do instrutor do Kit de Transcrição Reversa de cDNA de Alta Capacidade (cat 4368814; Applied Biosystems, EUA).

[629] Para expressão gênica, a análise Quantitativa em Tempo Real por PCR (qRT-PCR) foi realizada no Sistema de Detecção em Tempo Real CFX96 Touch ™ (BioRad, EUA) e SYBR® Green JumpStart ™ Taq ReadyMix ™ (S4438, Sigma-Aldrich, EUA), de acordo com os protocolos do fabricante e analisados com o programa gerenciador Bio-RadCFX (versão 3.1). Para a análise de *AtADH1* (*AT1G77120*), foi utilizado o seguinte conjunto de iniciadores: Direto GTTGAGAGTGTTGGAGAAGGAG SEQ ID NO: 367 e reverso CTCGGTGTTGATCCTGAGAAG SEQ ID NO: 368; Para a análise de *AtPDS3* (*AT4G14210*), foi utilizado o seguinte conjunto de iniciadores: Direto GTACTGCTGGTCCTTTGCAG SEQ ID NO: 369 e reverso AGGAGCACTACGGAAGGATG SEQ ID NO: 370; Para o gene de calibração endógeno, foi utilizado o gene do RNA ribossômico 18S (*NC_037304*) - Direto ACACCCTGGGAATTGGTTT SEQ ID NO: 371 e reverso GTATGCGCCAATAAGACCAC SEQ ID NO: 372.

EXEMPLO 1A: *Silenciamento Genético Induzido por Edição de Gene (GEiGS)*

[630] Para projetar oligos GEiGS, são necessárias moléculas de RNA não codificante modelo (precursores) que são processadas e dão origem a derivadas de pequenas moléculas de RNA de silenciamento (maduras). Duas fontes de precursores e suas sequências maduras correspondentes foram usadas para gerar oligos GEiGS. Para os miRNAs, as sequências foram obtidas do banco de dados do miRBase [Kozomara, A. e

Griffiths-Jones, S., *Nucleic Acids Res* (2014) 42: D68 'D73]. Os precursores e amadurecimentos do tasiRNA foram obtidos do banco de dados do tasiRNAdb [Zhang, C. *et al*., *Bioinformatics* (2014) 30: 1045-1046].

[631] Os alvos de silenciamento foram escolhidos em uma variedade de organismos hospedeiros (ver Tabela 1B, acima). Os siRNAs foram projetados contra esses alvos usando o software siRNArules [Holen, T., *RNA* (2006) 12: 1620–1625.]. Cada uma dessas moléculas de siRNA foi usada para substituir as sequências maduras presentes em cada precursor, gerando oligos GEiGS “não tratados”. A estrutura dessas sequências não tratadas foi ajustada para se aproximar da estrutura do precursor do tipo selvagem, tanto quanto possível, usando o ViennaRNA Package v2.6 [Lorenz, R. *et al*., ViennaRNA Package 2.0. Algorithms for Molecular Biology (2011) 6: 26]. Após o ajuste da estrutura, calculou-se o número de sequências e mudanças na estrutura secundária entre o tipo selvagem e o oligo modificado. Esses cálculos são essenciais para identificar oligos GEiGS potencialmente funcionais que requerem alterações mínimas na sequência em relação ao tipo selvagem.

[632] Os pequenos RNAs guia CRISPR/cas9 (sgRNAs) contra os precursores do tipo selvagem foram gerados usando o software CasOT [Xiao, A. *et al*., *Bioinformatics* (2014) 30: 1180-Äì1182] (ver Tabela 1B, acima). Os sgRNAs foram selecionados onde as modificações aplicadas para gerar o oligo GEiGS afetam a região PAM do sgRNA, tornando-o ineficaz contra o oligo modificado.

EXEMPLO 1B: Silenciamento de genes de genes de plantas endógenas - PDS

[633] A fim de estabelecer uma triagem de alto rendimento para avaliação quantitativa do silenciamento de genes endógenos usando o Silenciamento Genético Induzido por Edição de Genoma (GEiGS), os presentes inventores consideraram vários marcadores visuais em potencial. Os presentes inventores optaram por se concentrar nos genes envolvidos na

acumulação de pigmentos, como os que codificam para a fitoeno dessaturase (PDS). O silenciamento do PDS causa fotobranqueamento (Figura 2B), que permite usá-lo como uma triagem robusta de mudas após a edição do gene como prova de conceito (POC). As Figuras 2A-C mostram uma experiência representativa com plantas de *N. benthamiana* e Arabidopsis silenciadas por PDS. As plantas mostram o fenótipo característico de fotobranqueamento observado em plantas com quantidades diminuídas de carotenóides.

[634] No experimento POC, a escolha de siRNAs foi realizada da seguinte forma:

[635] Para iniciar o mecanismo de RNAi em Arabidopsis ou *Nicotiana benthamiana* contra o gene PDS usando a aplicação de GEiGS, é necessário identificar um siRNA de 21-24 bp eficaz visando o PDS. Duas abordagens são usadas para encontrar sequências ativas de siRNA: 1) triagem da literatura - como o silenciamento de PDS é um ensaio bem conhecido em muitas plantas, os presentes inventores estão identificando sequências curtas de siRNA bem caracterizadas em diferentes plantas que podem ser 100% compatíveis ao gene em *Arabidopsis ou Nicotiana benthamiana.* 2) Existem muitos algoritmos públicos que estão sendo usados para prever qual siRNA será eficaz no início do silenciamento de um dado gene. Como as previsões desses algoritmos não são 100%, os presentes inventores estão usando apenas sequências que resultam de pelo menos dois algoritmos diferentes.

[636] Para usar sequências de siRNA que silenciam o gene PDS, os presentes inventores estão trocando-os por uma sequência de genes de RNA não codificante endógena conhecida usando o sistema CRISPR/Cas9 (por exemplo, alteração de uma sequência de miRNA, alteração de uma longa sequência de dsRNA, criação de RNA antissentido, alterando o tRNA etc.). Existem muitos bancos de dados de RNAs não codificantes caracterizados, por exemplo, miRNAs; os presentes inventores estão escolhendo vários RNAs não codificantes endógenos conhecidos de

Arabidopsis ou *Nicotiana benthamiana* , por exemplo, miRNAs com diferentes perfis de expressão (por exemplo, expressão constitutiva baixa, altamente expressa, induzida por estresse etc.). Por exemplo, para trocar a sequência de miRNA endógena pelo siRNA direcionado ao gene PDS, os presentes inventores estão usando a abordagem de HR (Recombinação Homóloga). Usando HR, duas opções são contempladas: usar uma sequência oligo ssDNA doador de cerca de 250-500 nt, que inclui, por exemplo, a sequência de miRNA modificada no meio ou usando plasmídeos com inserção de 1 Kb - 4 Kb, quase 100% idêntica à o miRNA circundante no genoma da planta, exceto os 2 x 21 bp do miRNA e o *miRNA que é alterado para o siRNA do PDS (500-2000 bp a montante e a jusante do siRNA, conforme ilustrado na Figura 1). A transfecção inclui os seguintes construtos: CRISPR: sensor Cas9/GFP para rastrear e enriquecer para células transformadas positivas, gRNAs que orientam o Cas9 a produzir uma quebra de fita dupla (DSB) que é reparada pelo HR, dependendo do vetor de inserção/oligo. O vetor de inserção/oligo contém duas regiões contínuas de homologia ao redor do local alvo que são substituídas (isto é, miRNA) e são modificadas para transportar a mutação de interesse (isto é, siRNA). Se for utilizado plasmídeo, o construto de direcionamento compreende ou está livre de locais de reconhecimento de enzimas de restrição e é usado como um modelo para recombinação homóloga que termina com a substituição do miRNA pelo siRNA de sua escolha. Após a transfecção para protoplastos, o FACS é usado para enriquecer os eventos transfectados com Cas9/sgRNA, os protoplastos são regenerados para as plantas e as mudas branqueadas são triadas e pontuadas (ver Figura 1). Como controle, os protoplastos são transfectados com um oligo carregando uma sequência de direcionamento aleatória não PDS. Espera-se que as plantas editadas positivas produzam sequências de siRNA direcionadas a PDS e, portanto, o gene PDS é silenciado e as mudas são vistas como brancas em comparação com o controle sem gRNA. É importante observar que após a troca, o miRNA editado ainda será processado como miRNA porque o perfil de emparelhamento de base original é

mantido. No entanto, o miRNA processado recém-editado é altamente complementar ao alvo (por exemplo, 100%) e, portanto, na prática, o pequeno RNA recém-editado atuará como siRNA.

EXEMPLO 2: Silenciamento de gene de transgene "endógeno" - GFP

[637] Outra abordagem rápida e robusta para verificar a eficiência do GEiGS é silenciar um transgene, que também é um gene marcador como GFP (proteína fluorescente verde). Existem poucas opções fáceis para avaliar a eficácia do silenciamento de GFP na célula, por exemplo, análise FACS, PCR e microscopia. Para mostrar o POC do silenciamento de GFP usando GEiGS, os presentes inventores estão usando uma Arabidopsis transgênica ou linhas de tabaco que expressam estavelmente GFP. Protoplastos de plantas que expressam GFP são usados com a metodologia GEiGS para modificar RNA endógeno não codificante, por exemplo, miRNA para atuar como siRNA potente para iniciar o mecanismo de silenciamento de RNA direcionado ao gene GFP. Espera-se que as plantas editadas positivas sejam silenciadas para a expressão de GFP, como ilustrado na Figura 3. Além disso, o silenciamento de GFP em plantas é bem caracterizado e existem muitas sequências curtas de RNA disponíveis (siRNA) que podem ser utilizadas para iniciar o silenciamento de GFP. Portanto, para troca de genes, os presentes inventores estão usando ferramentas publicamente disponíveis para gerar siRNA específico para GFP ou estão usando moléculas conhecidas de siRNA disponíveis na literatura.

[638] Para usar sequências de siRNA que silenciam o gene GFP, os presentes inventores estão trocando-os por uma sequência de genes de RNA, por exemplo miRNA, não codificante endógena conhecida usando o sistema CRISPR/Cas9 (por exemplo, alteração de uma sequência de miRNA, alteração de uma longa sequência de dsRNA, criação de RNA antissentido, alterando o tRNA etc.). Existem muitos bancos de dados de RNAs

não codificantes caracterizados, por exemplo, miRNAs, os presentes inventores estão escolhendo vários RNAs não codificantes conhecidos de Arabidopsis ou *Nicotiana benthamiana*, por exemplo, miRNAs com diferentes perfis de expressão (por exemplo, expressão constitutiva baixa, altamente expressa, induzida por estresse etc.). Por exemplo, para trocar a sequência do miRNA endógeno pelo siRNA, os presentes inventores estão usando a abordagem de HR. Usando HR, duas opções são contempladas: usar uma sequência oligo ssDNA doador de cerca de 250-500 nt, que inclui, por exemplo, a sequência de miRNA modificada no meio ou usando plasmídeos com inserção de 1 Kb - 4 Kb, quase 100% idêntica à o miRNA circundante no genoma da planta, exceto os 2 x 21 bp do miRNA e o *miRNA que é alterado para o siRNA do PDS (500-2000 bp a montante e a jusante do siRNA, conforme ilustrado na Figura 1). A transfecção inclui os seguintes construtos: sensor CRISPR:Cas9/RFP para rastrear e enriquecer para células transformadas positivas usando, por exemplo, análise FACS, gRNAs que orientam o Cas9 para produzir um DSB que é reparado por HR, dependendo do vetor de inserção/oligo. O vetor de inserção contém duas regiões contínuas de homologia ao redor do local alvo que são substituídas (isto é, miRNA) e são modificadas para transportar a mutação de interesse (isto é, siRNA). O construto de direcionamento compreende ou está livre de locais de reconhecimento de enzimas de restrição e é usado como um modelo para recombinação homóloga que termina com a substituição do miRNA pelo siRNA de sua escolha. Após a transfecção para protoplastos, o FACS é usado para enriquecer para eventos transfectados positivos (usando o marcador de proteína fluorescente vermelha (RFP)), protoplastos enriquecidos são classificados para silenciar GFP sob um microscópio (Figura 4). Espera-se que os protoplastos editados positivos produzam sequências de siRNA visando GFP e, portanto, espera-se que a expressão de GFP do transgene seja silenciada em comparação com protoplastos de controle. A GFP é um método mais rápido que o PDS, pois as duas últimas etapas de recuperação e

regeneração não são necessárias; a pontuação pode ser feita no nível de protoplastos/células.

EXEMPLO 3: Silenciamento de gene de transgene-GFP exógeno em Arabidopsis

[639] Além do exemplo anterior do silenciamento de GFP, outra maneira de demonstrar a eficiência do GEiGS é silenciar um gene marcador como GFP (proteína verde fluorescente) em um ensaio de transformação de GFP transitório. Neste exemplo, as primeiras células vegetais (por exemplo, Arabidopsis) são tratadas usando GEiGS para expressar pequenas moléculas de siRNA direcionadas à GFP (o método para a utilização de siGFP é discutido no Exemplo 2 acima). Os protoplastos de controle (por exemplo, GEiGS-PDS) e os protoplastos editados usando GEiGS (expressando siGFP) são então transfectados com um plasmídeo que expressa separadamente dois marcadores (sensor) GFP + RFP. Os protoplastos que expressam apenas RFP, mas não GFP no tratamento GEiGS, são os resultados do silenciamento de GFP devido à expressão de siGFP (conforme ilustrado na Figura 5).

EXEMPLO 4: Plantas imunizadas contra infecção por vírus, silenciamento do gene do vírus exógeno (usando GFP como marcador)

[640] Para provar que o GEiGS é um método robusto para imunização de plantas com a capacidade de derrubar genes exógenos, os presentes inventores estão fornecendo um exemplo de silenciamento de um gene de vírus. Existem vários vírus que infectam diferentes espécies de plantas e que podem ser usados no presente POC: TuMV, CMV, TMV etc.

[641] O vírus do mosaico do nabo (TuMV) é transmitido de forma não persistente por afídios e causa doenças prevalentes nas culturas crucíferas em muitas partes do mundo. O genoma de TuMV, que é de fita simples, é uma molécula de RNA de sentido positivo de aproximadamente

10.000 nt (número de acesso NC_002509). O TuMV tem a mesma organização genética típica do potyvírus discutida anteriormente por Urcuqui-Inchima *et al*. [Urcuqui-Inchima *et al*., *Virus Res.* (2001) 74: 157-175]. Os sintomas do TuMV estão manchados em áreas amplas, amarelas, circulares e irregulares. As folhas mais antigas geralmente ficam amarelo brilhante. A lâmina frequentemente se torna necrótica. Foi feito uso extensivo de TuMV-GFP e TuMV-AS9-GFP deficiente em supressor para expor atividades de silenciamento antiviral em Arabidopsis. As plantas do tipo selvagem eram imunes ao TuMV-AS9-GFP, mas a imunidade foi efetivamente suprimida pela perda de DCL2 e DCL4, indicando que o TuMV normalmente mascara os efeitos de uma resposta antiviral dependente de siRNA [Hernan Garcia-Ruiz *et al*., *The Plant Cell* (2010) 22: 481–496].

[642] O vírus do mosaico do pepino (CMV) é um vírus patogênico da planta da família Bromoviridae. É o membro do gênero do vírus da planta, Cucumovirus. Este vírus tem uma distribuição mundial e uma gama de hospedeiros muito ampla. De fato, ele tem a reputação de ter a maior variedade de hospedeiros de qualquer vírus vegetal conhecido. Pode ser transmitido de planta em planta, mecanicamente por seiva e por afídios, de uma maneira transportada por estiletes. Este vírus foi encontrado pela primeira vez em pepinos (Cucumis sativus), apresentando sintomas de mosaico em 1934, daí o nome mosaico de pepino. Um vetor de expressão baseado em CMV de expressão que utiliza o 3a MP mutante para o movimento de célula a célula independente de CP foi desenvolvido. Este novo vetor [Fujiki *et al*., *Virology* (2008) 381 (1): 136-142] foi incorporado a um vetor binário de agrobacterium e entregue às plantas via agroinfiltração. Os resultados demonstram que este novo vetor de expressão baseado em CMV é uma grande promessa para a produção de proteínas recombinantes.

[643] Vírus do mosaico do tabaco (TMV), um vírus de RNA de fita simples que infecta plantas solanáceas, uma família de plantas que inclui muitas espécies como petúnias, tomates e tabaco. O vírus causa um

padrão em mosaico de manchas marrons na superfície das folhas. O vírus geralmente não causa a morte da planta, mas pode prejudicar seriamente o seu crescimento. As folhas inferiores podem sofrer “queimaduras de mosaico” em clima quente e seco, onde grandes áreas da folha morrem. Este vírus não pode entrar nas plantas por conta própria. As plantas são geralmente infectadas através de feridas após o manuseio humano ou através de equipamento contaminado. Uma vez dentro da planta, o vírus libera seu código genético (RNA). A planta fica confusa com esse código, confundindo-o com o seu, e começa a produzir proteínas virais. Os sistemas de expressão baseados em vírus nas plantas são particularmente atraentes em relação aos sistemas de expressão transitória alternativos devido ao alto nível de multiplicação de genes e níveis elevados concomitantes de expressão alcançáveis dentro de um curto período de tempo, minimizando o comprometimento das atividades do hospedeiro. O TMV é um dos vírus de plantas mais estudados e, portanto, tornou-se uma escolha natural para o desenvolvimento de vetores. Os vetores baseados em TMV levaram a um rendimento proteico recombinante de até 80% da proteína solúvel total. A agroinfecção é barata e reproduzível, tornando-o um método preferido de distribuição de vetores de expressão viral em tecidos vegetais como parte do DNA-T de um vetor binário transportado por *Agrobacterium tumefaciens*.

[644] Os presentes inventores estão usando TuMV-GFP para infecção de Arabidopsis ou TMV-GFP para plantas de tabaco. Para criar plantas resistentes à infecção por vírus, os presentes inventores estão usando um vírus modificado que expressa GFP após infecção por plantas. O uso desse vírus permitirá usar os mesmos construtos descritos no Exemplo 3 acima. A diferença é que agora o GFP é expresso a partir da infecção pelo vírus. Plantas de controle infectadas com vírus-GFP (CMV ou TMV) mostram expressão de GFP sob o microscópio (Figura 6), no entanto, espera-se que as plantas GEiGS projetadas para expressar siRNA GFP mostrem níveis reduzidos de GFP (Figura 6). Consequentemente, a geração de plantas GEiGS sem

expressão de GFP após a infecção pelo Virus-GFP demonstrará que o silenciamento de RNAi do gene exógeno foi alcançado e que o GEiGS é um método eficaz para imunizar as plantas contra vírus e potencialmente outros patógenos. Existem poucas opções fáceis para avaliar a eficácia do silenciamento de GFP na célula, tais como o uso de análise FACS, PCR e microscopia. O silenciamento de GFP em plantas é bem caracterizado e existem muitas sequências curtas de RNA disponíveis (siRNA) que são ativas no início do silenciamento de GFP. Portanto, para troca de genes, os presentes inventores estão usando algumas moléculas conhecidas de siRNA disponíveis na literatura.

[645] Para usar sequências de siRNA que silenciarão o gene GFP, os presentes inventores estão trocando-os por um RNA não codificante endógeno conhecido, por exemplo, sequência do gene miRNA usando o sistema CRISPR/Cas9 (como discutido acima, existem muitas outras opções para introduzir estes sequências de siRNA, como alterar sequências longas de dsRNA, criar RNA antissentido, alterar tRNA etc.). Existem muitos bancos de dados de RNA não codificantes endógenos caracterizados, por exemplo, miRNAs, os presentes inventores estão escolhendo vários RNA não codificantes conhecidos de Arabidopsis ou *Nicotiana benthamiana*, por exemplo, miRNAs com diferentes perfis de expressão (por exemplo, expressão constitutiva baixa, altamente expressa, induzida por estresse etc.). Por exemplo, para trocar a sequência do miRNA endógeno pelo siRNA, os presentes inventores estão usando a abordagem de HR. Usando HR, duas opções são contempladas: usar uma sequência oligo ssDNA doador de cerca de 250-500 nt, que inclui, por exemplo, a sequência de miRNA modificada no meio ou usando plasmídeos com inserção de 1 Kb - 4 Kb, quase 100% idêntica à o miRNA circundante no genoma da planta, exceto os 2 x 21 bp do miRNA e o *miRNA que é alterado para o siRNA do PDS (500-2000 bp a montante e a jusante do siRNA, conforme ilustrado na Figura 1). A transfecção inclui as seguintes construções: sensor CRISPR:Cas9/RFP para rastrear e enriquecer

para células transformadas positivas usando, por exemplo, análise FACS, gRNAs que orientam o Cas9 para produzir um DSB que é reparado por HR, dependendo do vetor de inserção/oligo. O vetor de inserção contém duas regiões contínuas de homologia ao redor do local alvo que são substituídas (isto é, miRNA) e são modificadas para transportar a mutação de interesse (isto é, siRNA). O construto de direcionamento compreende ou está livre de locais de reconhecimento de enzimas de restrição e é usado como um modelo para recombinação homóloga que termina com a substituição do miRNA pelo siRNA de sua escolha. Após a transfecção para protoplastos, o FACS é usado para enriquecer para eventos transfectados positivos, os protoplastos são regenerados para plantas e as plantas são infectadas com o vírus por inoculações mecânicas. As plantas são pontuadas quanto ao silenciamento de GFP ao microscópio (como descrito na Figura 6). Espera-se que os protoplastos editados positivos com GEiGS produzam sequências de siRNA direcionadas à GFP e, portanto, a expressão do gene da GFP do vírus deve ser silenciada em comparação com as plantas de controle não editadas.

EXEMPLO 5: Bananeira resistente ao nematóide

[646] Os danos à produtividade da banana devido aos nematóides são enormes, atingindo até 50% da perda de rendimento em solos não tratados. O problema é acentuado nas plantações de banana tradicionais, onde a monocultura é uma prática comum. A proibição de nematicidas como o brometo de metila em várias partes do mundo exacerbou o problema e deixa os agricultores com alternativas inadequadas e não confiáveis. *Radopholus similis*, o nematóide escavador, é o nematóide parasita da banana economicamente mais importante do mundo. A infecção pelo nematóide escavador causa a doença de derrubada da banana (toppling disease), a doença de amarelamento da pimenta e o declínio de disseminação dos citros. Essas doenças são o resultado da infecção por nematóides que destroem o tecido da raiz, deixando as plantas com pouco ou nenhum apoio ou capacidade de absorver água e translocar nutrientes. Devido aos danos que causa aos

citros, plantas ornamentais e outras indústrias agrícolas, em todo o mundo, o nematóide escavador é uma das pragas de plantas de nematóides mais regulamentadas (Figura 7).

[647] O RNA de interferência (RNAi) emergiu como uma ferramenta inestimável de silenciamento de genes para análise funcional em uma ampla variedade de organismos, particularmente o nematóide modelo de vida livre *Caenorhabditis elegans*. Um número crescente de estudos descreveu sua aplicação para plantar nematóides parasitas. Os genes expressos em uma variedade de tipos de células são silenciados quando os nematóides absorvem RNA de fita dupla (dsRNA) ou RNAs interferentes curtos (siRNAs) que provocam uma resposta sistêmica de RNAi. Estudos extensos de siRNA com *C. elegans* sugerem que a prevenção bem sucedida de que nematóides concluam seu ciclo de vida é atribuída a genes de silenciamento que são expressos no início do desenvolvimento embrionário. Em *R. similis* , esses genes candidatos podem ser Calreticulin13 (CRT) ou o gene colágeno 5 (col-5). A CRT é uma proteína multifuncional de ligação a $Ca2^{+}$que desempenha papéis importantes no parasitismo, evasão imunológica, reprodução e patogênese de muitos parasitas de animais e nematóides de plantas. Portanto, a TRC é um alvo promissor para o controle de *R. similis*. Col-5 pertence aos genes de colágeno dos nematóides que codificam proteínas que possuem uma gama diversificada de funções. Entre seus produtos mais abundantes estão os colágenos cuticulares, que incluem cerca de 80% das proteínas presentes na cutícula do nematóide. Verificou-se que as estruturas desses colágenos são notavelmente semelhantes nas espécies de nematóides parasitas e de vida livre estudadas até agora, e os genes que os codificam parecem constituir uma grande família multigênica cuja expressão está sujeita a regulação do desenvolvimento.

[648] Utilizando GEiGS, os presentes inventores estão criando bananeiras que expressam moléculas de siRNA que são transmitidas de suas raízes para nematóides mediante a alimentação e, subsequentemente,

indução do silenciamento de genes de nematóides. O silenciamento de genes essenciais para a sucessão no ciclo de vida inibe a propagação de nematóides e abole os danos causados por nematóides. Os presentes inventores estão alterando alguns RNAs não codificantes endógenos da banana, por exemplo, sequências de miRNA com sequências curtas dos genes CRT ou col-5. O GEiGS é usado em protoplastos de banana que são regenerados para plântulas e depois triados com diferentes nematóides para resistência.

EXEMPLO 6: Bananeira resistente a Fusarium oxysporum

[649] O gênero Fusarium inclui várias espécies de fungos que são amplamente espalhadas no solo e substratos orgânicos em todo o mundo. *Fusarium oxysporum* é uma das espécies mais relevantes desse gênero e é o agente causal de podridões de raízes, doenças de amortecimento (damping-off) e murcha (wilt) em mais de 100 espécies de plantas, incluindo uma ampla variedade de culturas hortícolas, flores, árvores e número de colheitas de campo, como repolho, banana e algodão. *Fusarium oxysporum* é um patógeno devastador que causa extensas perdas de rendimento em uma variedade de culturas e o desenvolvimento de métodos sustentáveis e ecológicos para melhorar a resistência das culturas é crucial. *F. oxysporum* consiste em mais de 120 formas especiais de cepas patogênicas determinadas por suas plantas hospedeiras primárias. Todas as cepas de *F. oxysporum* são saprófitas, podendo crescer e sobreviver por longos períodos com matéria orgânica no solo, dificultando o controle. Seu ciclo de vida patogênico começa com a germinação de esporos após o reconhecimento de um hospedeiro adequado. Uma vez formada a hifa, o patógeno entra no hospedeiro penetrando diretamente nas raízes e o coloniza dentro do xilema, produzindo microconídios que levam à formação de micélio. A colonização e a produção de toxinas pelo patógeno resultam em bloqueio do sistema vascular do hospedeiro, causando sintomas característicos da doença, incluindo amarelecimento da vasculatura, remoção de veias, clorose e necrose nas veias

e folhas das folhas, descolamento e folhas murchas. Depois que a planta morre, o fungo esporula nas superfícies das folhas deterioradas. *F. oxysporum* é mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais e espera-se que sua abrangência geográfica se estenda devido às mudanças climáticas. Os métodos de controle atuais para a murcha de Fusarium são muito limitados, pois as rotações das culturas são ineficazes devido à grande variedade de hospedeiros e sua persistência no solo. O manejo da murcha de Fusarium é feito principalmente através de práticas culturais e de higiene da fazenda, que apenas reduzem a transmissão do inóculo, enquanto a esterilização do solo só pode ser realizada em estufas. A fumigação do solo usando biocidas de amplo espectro, como o brometo de metila, é cara e tem muitos efeitos perigosos para o meio ambiente.

[650] Hu z. utilizaram a tecnologia de interferência de RNA entregue pelo hospedeiro para silenciar parcialmente três genes diferentes (FOW2, FRP1 e OPR) no fungo hemi-biotrófico *F. oxysporum f. sp. Conglutinanos* [Hu *et al*., *Front Chem*. (2015) 20 (3):1]. A expressão de moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA) direcionadas a genes patógenos fúngicos foi alcançada em várias linhas transgênicas de Arabidopsis. A *F. oxysporum* que infectou as linhas transgênicas exibiu níveis de mRNA substancialmente reduzidos nos três genes alvo, com uma média de 75, 83 e 72% de redução para FOW2, FRP1 e OPR, respectivamente. O silenciamento de genes de patógenos teve um claro efeito positivo na capacidade das linhas transgênicas de combater infecções. Todas as linhagens transgênicas exibiram maior resistência a *F. oxysporum* com atraso no desenvolvimento dos sintomas da doença, especialmente as linhagens FRP1 e OPR. As taxas de sobrevivência após a infecção fúngica foram maiores nas linhagens transgênicas em comparação com as plantas de controle do tipo selvagem, que mostraram taxas de sobrevivência consistentemente de 10%, com as linhas FOW2 mostrando 25% de sobrevivência; linhas de FRP1 sobrevivência de 30-50% e OPR entre 45 e 70% de sobrevivência. O efeito de infrarregulação

foi específico para os genes alvo sem efeitos indesejados em genes relacionados (Hu Z. (2015) supra). Foi demonstrado que, nos fungos, os dsRNAs longos e curtos são igualmente internalizados e induzem o RNAi a silenciar os genes alvo.

[651] Os presentes inventores estão utilizando GEiGS para criar bananeiras resistentes *a F. oxysporum* alterando poucos RNAs não codificantes endógenos, por exemplo, sequências de miRNAs para atingir especificamente os genes de fungos como FOW2, FRP1 e OPR. Os protoplastos editados são regenerados para plântulas e desafiados com *F. oxysporum* em um ambiente controlado; plantas resistentes são verificadas para expressar o siRNA relevante.

EXEMPLO 7: Árvore de café resistente ao nematóide

[652] Coffea é um gênero de plantas com flores, cujas sementes, chamadas grãos de café, são usadas para fazer várias bebidas e produtos de café. É um membro da família Rubiaceae. São arbustos ou pequenas árvores nativas da África tropical e do sul e da Ásia tropical. O café é classificado como uma das culturas de commodities mais valiosas e amplamente comercializadas no mundo e é um importante produto de exportação de vários países, incluindo os da América Central e do Sul, Caribe e África. Um declínio constante na produção de café tem sido atribuído a restrições bióticas e socioeconômicas. Entre as restrições bióticas menos estudadas estão os nematóides.

[653] Os nematóides parasitas de plantas são considerados uma restrição severa à produção de café no mundo e especialmente no Vietnã (Figura 8). As espécies dominantes e mais importantes são *Radopholus arabocoffeae* e *Pratylenchus coffeae*. Ambas as espécies são responsáveis pela morte de plantas com menos de 5 anos de idade. Tradicionalmente, o principal método para controlar *P. coffeae* é por meios químicos, não existe uma estratégia de controle específica contra *R.*

arabocoffeae.

[654] Os presentes inventores estão utilizando a estratégia GEiGS (como descrito no Exemplo 5 acima) para criar árvores de *Coffea canephora* (Robusta) que expressam moléculas de siRNA que são transmitidas de suas raízes para nematóides após a alimentação e subsequentemente induzindo o silenciamento de genes de nematóides. O silenciamento de genes essenciais para a sucessão no ciclo de vida inibe a propagação de nematóides e abole os danos causados por nematóides. Os presentes inventores estão, portanto, alterando alguns RNAs não codificantes endógenos, por exemplo, sequências de miRNA com sequências curtas dos genes de nematóides. O GEiGS é usado em protoplastos de café que são regenerados para plântulas e depois triados com diferentes nematóides para resistência.

EXEMPLO 8: Geração de plantas com miRNA endógeno modificado para direcionar a diferentes genes

[655] Modificações mínimas nos locais genômicos de um miRNA, em sua sequência de reconhecimento (que amadurecerão para um miRNA), podem levar a um novo sistema para regular novos genes, de maneira não transgênica. Portanto, foi utilizado um método de expressão transiente livre de *agrobactérias* para introduzir essas modificações por bombardeio de raízes de Arabidopsis e sua regeneração para análises posteriores. Os presentes inventores optaram por atingir dois genes, *PDS3* e *ADH1* em plantas de Arabidopsis.

[656] Os carotenóides desempenham um papel importante em muitos processos fisiológicos nas plantas e o gene da fitoeno dessaturase (*PDS3*) codifica uma das enzimas importantes na via da biossíntese dos carotenóides, seu silenciamento produz um fenótipo albino/branqueado. Assim, plantas com expressão reduzida de *PDS3* exibem níveis reduzidos de clorofila, até o completo albinismo e nanismo.

[657] A desidrogenase de álcool (ADH1) compreende um

grupo de enzimas desidrogenase que catalisam a interconversão entre álcoois e aldeídos ou cetonas com a redução concomitante de NAD + ou NADP +. O principal objetivo metabólico desta enzima é a decomposição de substâncias tóxicas alcoólicas nos tecidos. As plantas com expressão reduzida de ADH1 exibem aumento da tolerância ao álcool alílico. Consequentemente, plantas com *ADH1* reduzido são resistentes ao efeito tóxico do álcool alílico, portanto sua regeneração foi realizada com a seleção do álcool alílico.

[658] Dois miRNAs bem estabelecidos foram escolhidos para serem modificados, miR-173 e miR-390, que anteriormente demonstravam ser expressos ao longo do desenvolvimento da planta [Zielezinski A *et al*., *BMC Plant Biology* (2015) 15: 144]. Para introduzir a modificação, um sistema de 2 componentes foi usado. Primeiro, o sistema CRISPR/CAS9 foi usado para gerar uma clivagem nos locais miR-173 e miR-390, por meio de RNAs guia específicos projetados (Figuras 12A e 13A; e Tabela 2 acima), para promover o reparo homólogo de DNA (HDR) no local. Segundo, uma sequência DONOR, com a modificação desejada da sequência miRNA, para atingir os genes recém-atribuídos, foi introduzida como modelo para o HDR (Figuras 12A-G, 13A-G, 14A-D e 15A-D; Tabela 2, acima). Além disso, como a estrutura secundária do transcrito primário do miRNA (pri-miRNA) é importante para a biogênese e a atividade corretas do miRNA maduro, outras modificações foram introduzidas na fita complementar do pri-miRNA e analisadas no mFOLD (www(ponto)unafold(ponto)rna(ponto)Albany(ponto)edu) para conservação da estrutura (Figuras 12A-G e 13A-G). No total, duas guias foram projetadas para cada local de miRNA e duas sequências DONOR diferentes (sequências de miRNA modificadas) foram projetadas para cada gene (Figuras 14A-D e 15A-D e Tabela 2 acima).

EXEMPLO 9: *Bombardeio e regeneração de plantas*

[659] Os construtos GEiGS foram bombardeados em raízes pré-preparadas (como discutido em detalhes na seção de materiais e

procedimentos experimentais, acima) e regeneradas. As plântulas foram selecionadas via fenótipo branqueado para transformantes PDS3 e sobrevivência no tratamento com álcool alílico para transformantes ADH1. A fim de validar o Swap comparado a sem Swap, isto é, o tipo selvagem retido, essas plantas foram subsequentemente triadas quanto à inserção através de iniciadores específicos que abrangem a região modificada, seguida de digestão por restrição (Figura 16).

EXEMPLO 10: Validação de genótipo da seleção de fenótipo

[660] Como discutido acima, a Prova de Conceito (POC) para o sistema de edição de genes foi estabelecida usando características fenotípicas bem conhecidas, Phytoene desaturase (PDS3) e Alcohol dessaturase (ADH1) como alvos.

[661] Conforme mencionado acima, as plantas com expressão reduzida de ADH1 exibem aumento da tolerância ao álcool alílico. Portanto, plantas bombardeadas para o miRNA modificado para atingir o ADH1 foram regeneradas em meios contendo álcool alílico 30 mM e comparados com a taxa de regeneração das plantas de controle. 118 GEiGS # 3 + SWAP11 plantas selecionadas com álcool alílico sobreviveram, em comparação com 51 plantas de controle em meio de álcool alílico (dados não mostrados). Dos GEiGS # 3 + SWAP11 selecionados, 5 mostraram abrigar o DONOR (dados não mostrados). A grande quantidade de plantas que se regenera nas plantas tratadas com DONOR também pode ser devido à expressão transitória, também durante o processo de bombardeio.

[662] Assim, a seleção de PDS3 e ADH1 através do fenótipo branqueado (Figura 16) e seleção de álcool alílico (Figura 17), respectivamente, fornece um meio ideal para a seleção de plântulas transformadas para genotipagem.

[663] A região de troca de 4 kb foi avaliada principalmente

através de iniciadores internos e diferenciação específica de amplicons do tipo selvagem original para inserção via variação da digestão da enzima de restrição.

[664] O ADH1 (Figura 17) mostrou um genótipo comparativo de plantas selecionadas com álcool alílico com o padrão de restrição de presença DONOR esperado quando comparado ao plasmídeo DONOR restrito e não restrito. PDS3 (Figura 16) mostrou uma comparação de fenótipos de amostras bombardeadas com e sem DONOR e seus respectivos padrões de digestão com enzimas de restrição diferencial em comparação com o plasmídeo DONOR restrito e não restrito. Esses resultados forneceram uma associação clara do fenótipo PDS3 albino/branqueado ao padrão de restrição esperado. Realizou-se PCR externo subsequente combinando interno específico, dentro da região de troca, em conjunto com o iniciador externo, externo e específico da região genômica para a troca (dados não mostrados). A validação adicional da troca foi obtida através do sequenciamento Sanger dos amplicons de PCR, a fim de avaliar heterozigotos, homozigotos ou presença de troca de DONOR (dados não mostrados).

EXEMPLO 11: ***O miRNA modificado reduz a expressão de seu novo gene alvo***

[665] A fim de verificar o potencial dos miRNAs modificados no sistema GEiGS para infrarregular a expressão de seus alvos recém-designados, a análise da expressão gênica foi realizada usando qRT-PCR (quantitativa em tempo real PCR). O RNA foi extraído e transcrito reversamente, a partir de plantas regeneradas identificadas positivamente e comparado com plantas regeneradas, tratadas em paralelo, mas que não foram introduzidas com os construtos modificadores relevantes. No caso, onde o miR-173 foi modificado para direcionar ao *PDS3* (GEiGS # 4 + SWAP4), foi observada uma redução de 83% no nível de expressão gênica, em média, (Figura 18). Em plantas com miR-390 modificado para direcionar ao *ADH1* (GEiGS # 3 + SWAP11), foi observada uma mudança semelhante na

expressão gênica, 82% dos níveis nas plantas de controle (Figura 19). Tomados em conjunto, esses resultados substanciam os métodos de edição de genes de modificação de miRNAs endógenos para direcionar com sucesso a novos genes e reduzir sua expressão, substituindo a sequência de reconhecimento de alvo na transcrição de miRNA no local endógeno.

[666] Embora a invenção tenha sido descrita em conjunto com modalidades específicas, é evidente que várias alternativas, modificações e variações tornar-se-ão evidentes àqueles versados na técnica. Por conseguinte, deseja-se abranger todas tais alternativas, modificações e variações que se enquadram no espírito e amplo escopo das reivindicações em anexo.

[667] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente mencionados neste relatório são aqui incorporados na sua totalidade no relatório, na mesma extensão como se cada publicação, patente ou pedido de patente individual fosse específica e individualmente indicado para ser incorporado aqui por referência. Adicionalmente, a citação ou a identificação de qualquer referência neste pedido não deve ser interpretada como uma admissão de que tal referência está disponível conforme a técnica anterior à invenção. Na medida em que os títulos das seções são usados, eles não devem ser interpretados como necessariamente limitativos.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE MODIFICAÇÃO DE UM GENE QUE CODIFICA OU É PROCESSADO EM UMA MOLÉCULA DE RNA NÃO CODIFICANTE que não possui atividade de silenciamento de RNA em uma célula vegetal, ***caracterizado pelo fato de*** introduzir na célula vegetal um agente de edição de DNA que confere uma especificidade de silenciamento da referida molécula de RNA não codificante para um RNA alvo de interesse, modificando, assim, o gene que codifica ou é processado na molécula de RNA não codificante.

2. MÉTODO DE MODIFICAÇÃO DE UM GENE QUE CODIFICA OU É PROCESSADO EM UMA MOLÉCULA DE SILENCIAMENTO DE RNA PARA UM RNA ALVO EM UMA CÉLULA VEGETAL, ***caracterizado pelo fato de*** introduzir na célula vegetal um agente de edição de DNA que redireciona uma especificidade de silenciamento da referida molécula de silenciamento de RNA para um segundo RNA alvo, o referido RNA alvo e o referido segundo RNA alvo sendo distintos, modificando, assim, o gene que codifica a molécula de silenciamento de RNA.

3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, ***caracterizado pelo fato de*** o gene que codifica ou é processado na molécula de RNA não codificante ser endógeno para a célula vegetal.

4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, ***caracterizado pelo fato de*** o gene que codifica a molécula de silenciamento de RNA ser endógeno para a célula vegetal.

5. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 3, ***caracterizado pelo fato de*** a referida modificação do referido gene que codifica ou é processado na referida molécula de RNA não codificante transmitir a referida molécula de RNA não codificante com pelo menos 45% de complementaridade em relação ao referido RNA alvo de interesse.

6. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 2 ou 4, ***caracterizado pelo fato de*** a referida modificação do referido gene que codifica a referida molécula de silenciamento de RNA transmitir a referida molécula de silenciamento de RNA com pelo menos 45% de complementaridade em relação ao referido segundo RNA alvo.

7. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3 ou 5, ***caracterizado pelo fato de*** a referida especificidade de silenciamento da referida molécula de RNA não codificante ser determinada pela medição de um nível de RNA ou proteína do referido RNA alvo de interesse.

8. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2, 4 ou 6, ***caracterizado pelo fato de*** a referida especificidade de silenciamento da referida molécula de silenciamento de RNA ser determinada pela medição de um nível de RNA do referido segundo RNA alvo.

9. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, ***caracterizado pelo fato de*** a referida especificidade de silenciamento da molécula de RNA não codificante ou da molécula de silenciamento de RNA ser determinada fenotipicamente.

10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 9, ***caracterizado pelo fato de*** a referida determinação fenotípica ser efetuada pela determinação de pelo menos um fenótipo de planta selecionado do grupo que consiste em planta de uma coloração de folhas, uma coloração de flores, uma taxa de crescimento, um tamanho de planta, um rendimento de colheita, um característica do fruto, uma resistência ao estresse biótico, e uma resistência ao estresse abiótico.

11. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, ***caracterizado pelo fato de*** a referida especificidade de silenciamento da molécula de RNA não codificante ser determinada genotipicamente.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, ***caracterizado pelo fato de*** um fenótipo de planta ser determinado antes de um

genótipo de planta.

13. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, ***caracterizado pelo fato de*** um genótipo de planta ser determinado antes de um fenótipo de planta.

14. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 13, ***caracterizado pelo fato de*** a referida molécula de RNA não codificante ou a referida molécula de silenciamento de RNA ser processada a partir de um precursor.

15. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 14, ***caracterizado pelo fato de*** a referida molécula de RNA não codificante ou a referida molécula de silenciamento de RNA ser uma molécula de RNA de interferência (RNAi) selecionada do grupo que consiste em um pequeno RNA de interferência (siRNA), um curto RNA em formato de grampo (shRNA), um microRNA (miRNA), um RNA que interage com Piwi (piRNA) e siRNA de ação trans (tasiRNA).

16. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 3, 5, 7 ou de 9 a 14, ***caracterizado pelo fato de*** a referida molécula de RNA não codificante ser selecionada do grupo que consiste em um pequeno RNA nuclear (snRNA), um pequeno RNA nucleolar (snoRNA), um RNA longo não codificante (lncRNA), um RNA ribossômico (rRNA), RNA transportador (tRNA), um RNA derivado de repetição, e um RNA de elemento transponível.

17. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 15, ***caracterizado pelo fato de*** a referida molécula de RNAi ser projetada de modo que uma sequência da referida molécula de RNAi seja modificada para preservar a originalidade da estrutura e para ser reconhecida por fatores de RNAi celulares.

18. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 17, ***caracterizado pelo fato de*** a referida modificação do referido gene ser efetuada por uma modificação selecionada do grupo que

consiste em uma deleção, uma inserção, uma mutação pontual e uma combinação das mesmas.

19. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 18, ***caracterizado pelo fato de*** a referida modificação ser em uma região-tronco da referida molécula de RNA não codificante ou da referida molécula de silenciamento de RNA.

20. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 18, ***caracterizado pelo fato de*** a referida modificação ser em uma região de laço da referida molécula de RNA não codificante ou da referida molécula de silenciamento de RNA.

21. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 18, ***caracterizado pelo fato de*** a referida modificação ser em uma região não estruturada da referida molécula de RNA não codificante ou da referida molécula de silenciamento de RNA.

22. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 18, ***caracterizado pelo fato de*** a referida modificação ser em uma região-tronco e em uma região de laço da referida molécula de RNA não codificante ou da referida molécula de silenciamento de RNA.

23. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 18, ***caracterizado pelo fato de*** a referida modificação ser em uma região-tronco, uma região de laço e em uma região não estruturada da referida molécula de RNA não codificante ou da referida molécula de silenciamento de RNA.

24. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 18 a 23, ***caracterizado pelo fato de*** a referida modificação compreender uma modificação de no máximo 200 nucleotídeos.

25. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 18 a 24, ***caracterizado pelo fato de*** o referido método compreender ainda a introdução nas células vegetais de oligonucleotídeos dadores.

26. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 25, ***caracterizado pelo fato de*** o referido agente de edição de DNA compreender pelo menos um gRNA operacionalmente ligado a um promotor expressável de planta.

27. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 26, ***caracterizado pelo fato de*** o referido agente de edição de DNA não compreender uma endonuclease.

28. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 26, ***caracterizado pelo fato de*** o referido agente de edição de DNA compreender uma endonuclease.

29. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 28, ***caracterizado pelo fato de*** o referido agente de edição de DNA ser de um sistema de edição de DNA selecionado do grupo que consiste em uma meganuclease, uma nuclease de dedo de zinco (ZFN), uma nuclease efetora tipo ativadora de transcrição (TALEN) e CRISPR.

30. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 ou 29, ***caracterizado pelo fato de*** a referida endonuclease compreender Cas9.

31. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 30, ***caracterizado pelo fato de*** o referido agente de edição de DNA ser aplicado à célula como DNA, RNA ou RNP.

32. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 31, ***caracterizado pelo fato de*** o referido agente de edição de DNA estar ligado a um repórter para monitorar a expressão em uma célula vegetal.

33. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 32, ***caracterizado pelo fato de*** o referido repórter ser uma proteína fluorescente.

34. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das

reivindicações de 1 a 33, ***caracterizado pelo fato de*** o referido RNA alvo de interesse ou o referido segundo RNA alvo ser endógeno à célula vegetal.

35. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 33, ***caracterizado pelo fato de*** o referido RNA alvo de interesse ou o referido segundo RNA alvo ser exógeno à célula vegetal.

36. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 35, ***caracterizado pelo fato de*** a referida célula vegetal ser um protoplasto.

37. CÉLULA VEGETAL *caracterizada pelo fato de* ser gerada de acordo com o método conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 36.

38. PLANTA *caracterizada pelo fato de* compreender a célula vegetal conforme definida na reivindicação 37.

39. MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UMA PLANTA COM EXPRESSÃO REDUZIDA DE UM GENE ALVO, ***caracterizado pelo fato de*** compreender:

(a) reproduzir a planta conforme definida na reivindicação 38; e

(b) selecionar plantas descendentes que tenham expressão reduzida do referido RNA alvo de interesse ou do referido segundo RNA alvo, ou descendentes que compreendam uma especificidade de silenciamento na referida molécula de RNA não codificante em relação a um RNA alvo de interesse, e que não compreendam o referido agente de edição de DNA,

produzindo, assim, a referida planta com expressão reduzida de um gene alvo.

40. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 39, ***caracterizado pelo fato de*** a referida reprodução compreender cruzamento ou autofecundação.

41. MÉTODO DE GERAÇÃO DE UMA PLANTA COM TOLERÂNCIA AO ESTRESSE AUMENTADA, RENDIMENTO AUMENTADO, TAXA DE CRESCIMENTO AUMENTADA OU QUALIDADE DO RENDIMENTO AUMENTADA, ***caracterizado pelo fato de*** modificar um gene que codifica ou é processado em uma molécula de RNA não codificante ou em uma molécula de silenciamento de RNA em uma célula vegetal conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 40, em que o referido RNA alvo de interesse é de um gene da planta que confere sensibilidade ao estresse, rendimento reduzido, taxa de crescimento reduzida ou qualidade de rendimento reduzida, gerando, assim, a planta.

42. MÉTODO DE GERAÇÃO DE UMA PLANTA RESISTENTE OU TOLERANTE A PATÓGENOS, ***caracterizado pelo fato de*** modificar um gene que codifica ou é processado em uma molécula de RNA não codificante ou uma molécula de silenciamento de RNA em uma célula vegetal conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 40, em que o referido RNA alvo de interesse é de um gene da planta que confere sensibilidade ao referido patógeno, gerando, assim, a planta resistente ou tolerante ao patógeno.

43. MÉTODO DE GERAÇÃO DE UMA PLANTA RESISTENTE OU TOLERANTE A PATÓGENOS, ***caracterizado pelo fato de*** modificar um gene que codifica ou é processado em uma molécula de RNA não codificante ou uma molécula de silenciamento de RNA em uma célula vegetal conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 40, em que o referido RNA alvo de interesse é de um gene do patógeno, gerando, assim, a planta resistente ou tolerante ao patógeno.

44. MÉTODO DE GERAÇÃO DE UMA PLANTA RESISTENTE OU TOLERANTE A PRAGAS, ***caracterizado pelo fato de*** modificar um gene que codifica ou é processado em uma molécula de RNA não codificante ou uma molécula de silenciamento de RNA em uma célula vegetal

conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 40, em que o referido RNA alvo de interesse é de um gene da praga, gerando, assim, a planta resistente ou tolerante a pragas.

45. MÉTODO DE GERAÇÃO DE UMA PLANTA RESISTENTE OU TOLERANTE A PRAGAS, ***caracterizado pelo fato de*** modificar um gene que codifica ou é processado em uma molécula de RNA não codificante ou uma molécula de silenciamento de RNA em uma célula vegetal conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 40, em que o referido RNA alvo de interesse é de um gene da planta que confere sensibilidade à referida praga, gerando, assim, a planta resistente ou tolerante a pragas.

46. MÉTODO DE GERAÇÃO DE UMA PLANTA RESISTENTE A HERBICIDA, ***caracterizado pelo fato de*** modificar um gene que codifica ou processa uma molécula de RNA não codificante ou uma molécula de silenciamento de RNA em uma célula vegetal conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 40, em que o referido RNA alvo de interesse é de um gene da planta que confere sensibilidade ao referido herbicida, gerando, assim, a planta resistente a herbicida.

47. PLANTA *caracterizada pelo fato de* ser gerada de acordo com o método conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 39 a 46.

48. PLANTA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 38 ou 47, ou **MÉTODO**, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 39 a 46, ***caracterizado(a) pelo fato de*** a referida planta ser não geneticamente modificada (não GMO).

49. SEMENTE *caracterizada pelo fato de* ser da planta conforme definida em qualquer uma das reivindicações 38 ou de 47 a 48.

50. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 36, de 39 a 46 ou 48, **CÉLULA VEGETAL**, de acordo com a reivindicação 37, **PLANTA**, de acordo com qualquer uma das reivindicações

38 ou de 47 a 48, ou **SEMENTE**, de acordo com a reivindicação 49, ***caracterizados pelo fato de*** a referida planta ser selecionada do grupo que consiste em um cultivo, uma flor e uma árvore.

FIGURA 1

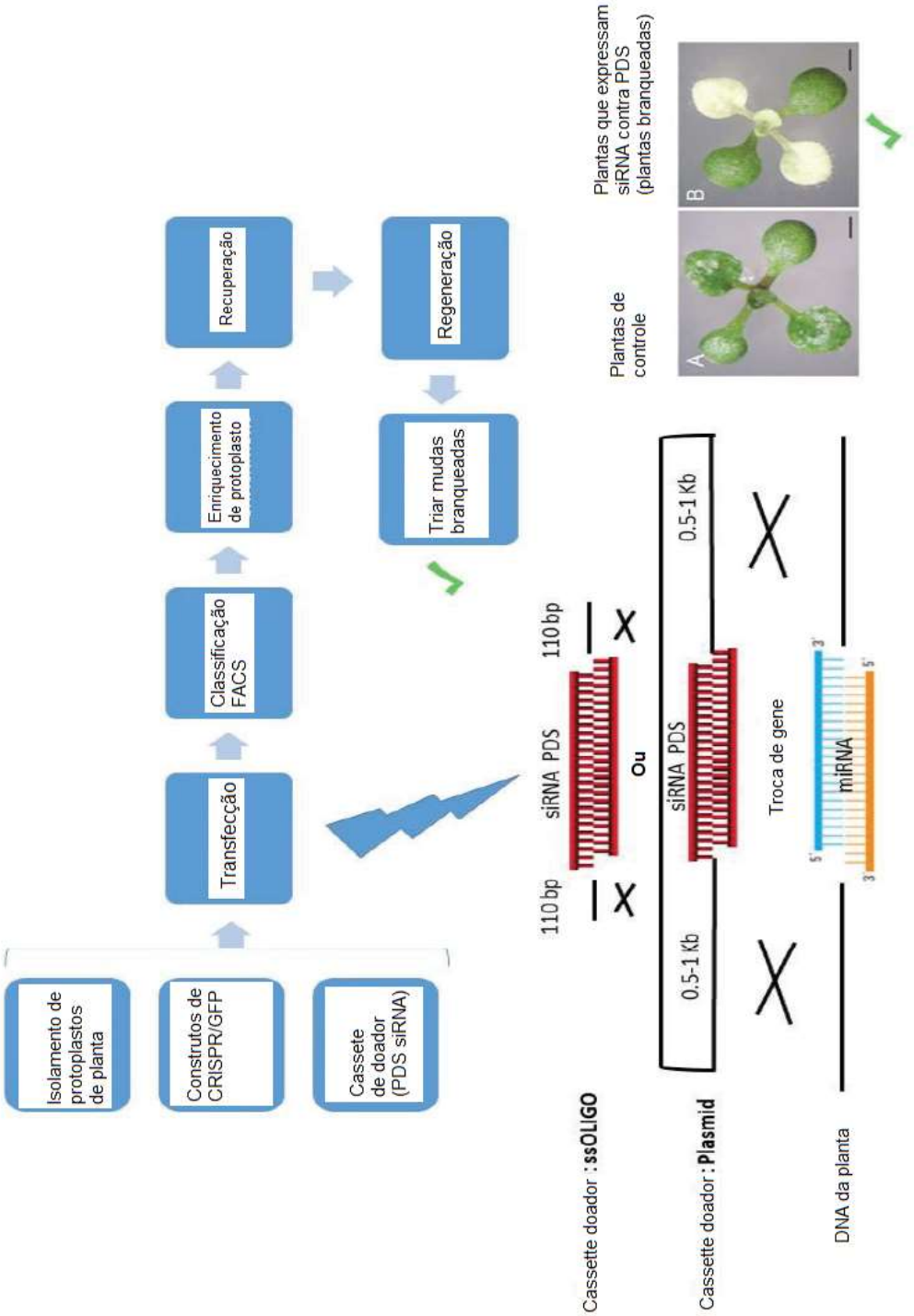

Isolamento de protoplastos de planta
Construtos de CRISPR/GFP
Cassete de doador (PDS siRNA)
Transfecção
Classificação FACS
Enriquecimento de protoplasto
Recuperação
Regeneração
Triar mudas branqueadas
Plantas de controle
Plantas que expressam siRNA contra PDS (plantas branqueadas)
A
B
110 bp
siRNA PDS
110 bp
Ou
0.5-1 Kb
siRNA PDS
0.5-1 Kb
Troca de gene
miRNA
Cassette doador : ssOLIGO
Cassette doador : Plasmid
DNA da planta



FIGURA 2B



FIGURA 2A

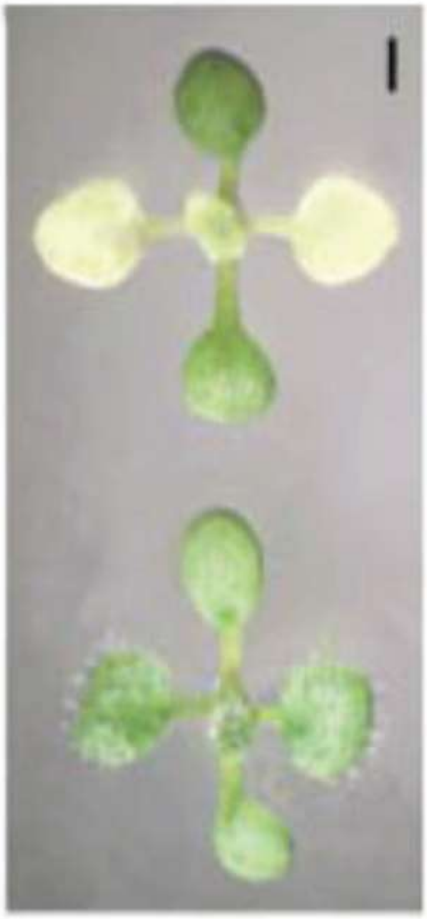


FIGURA 2C

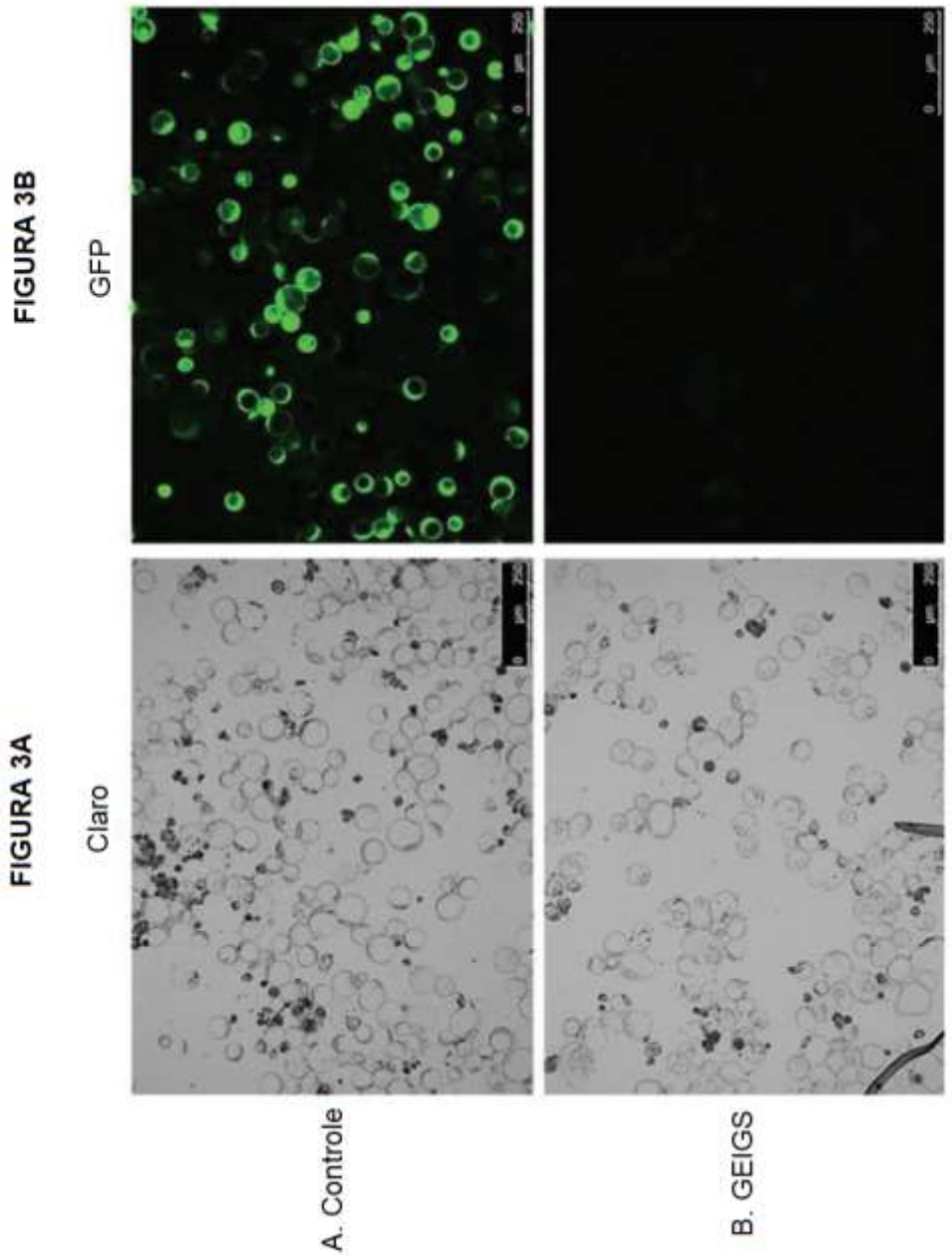

FIGURA 3A
Claro
FIGURA 3B
GFP
A. Controle
FIGURA 3C
FIGURA 3D
B. GEIGS

FIGURA 4

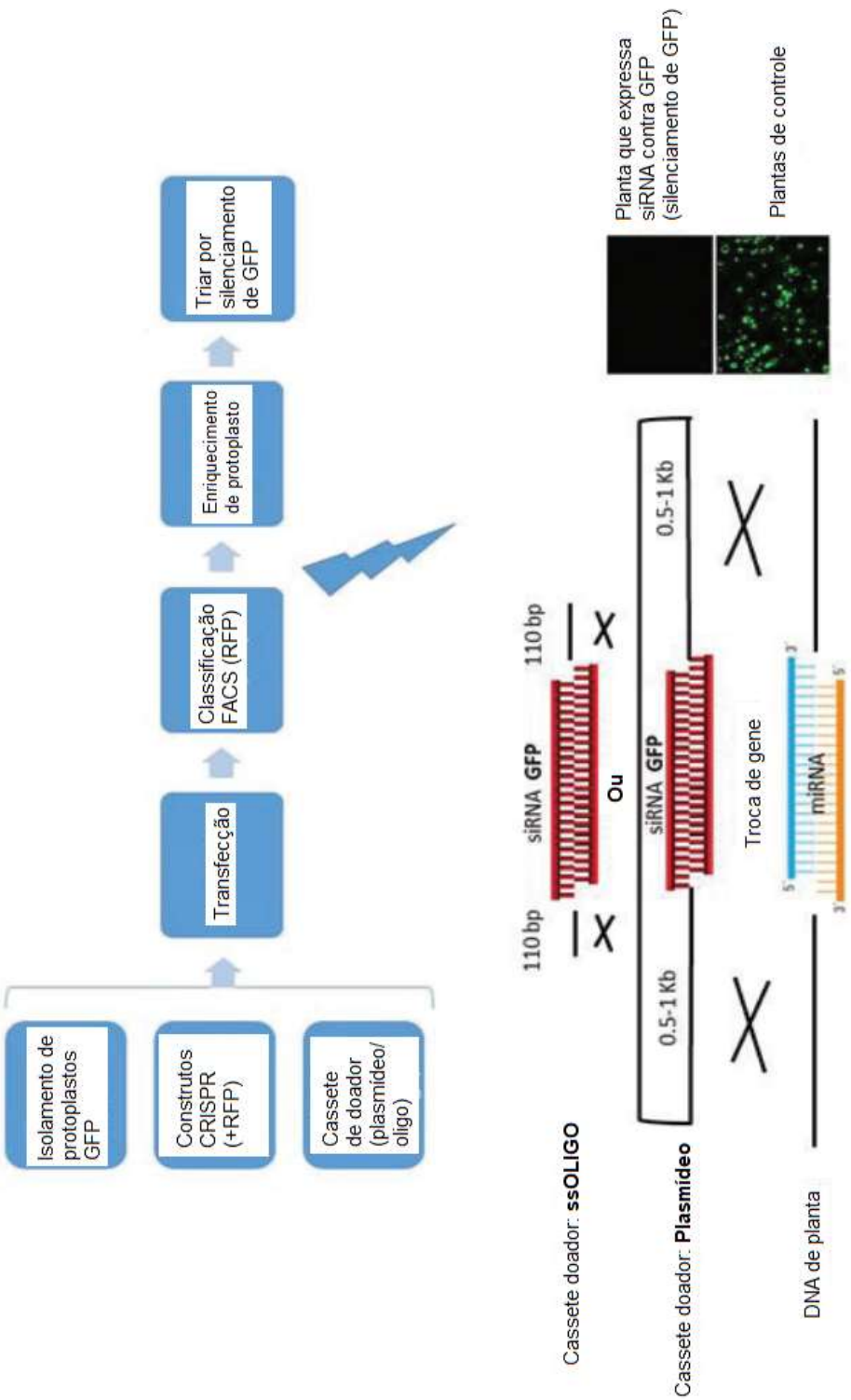

Isolamento de protoplastos GFP
Construtos CRISPR (+RFP)
Cassete de doador (plasmideo/ oligo)
Transfecção
Classificação FACS (RFP)
Enriquecimento de protoplasto
Triar por silenciamento de GFP
Planta que expressa siRNA contra GFP (silenciamento de GFP)
Plantas de controle
110 bp
siRNA GFP
110 bp
Ou
0.5-1 Kb
siRNA GFP
0.5-1 Kb
Troca de gene
miRNA
Cassete doador: ssOLIGO
Cassete doador: Plasmideo
DNA de planta

FIGURA 5

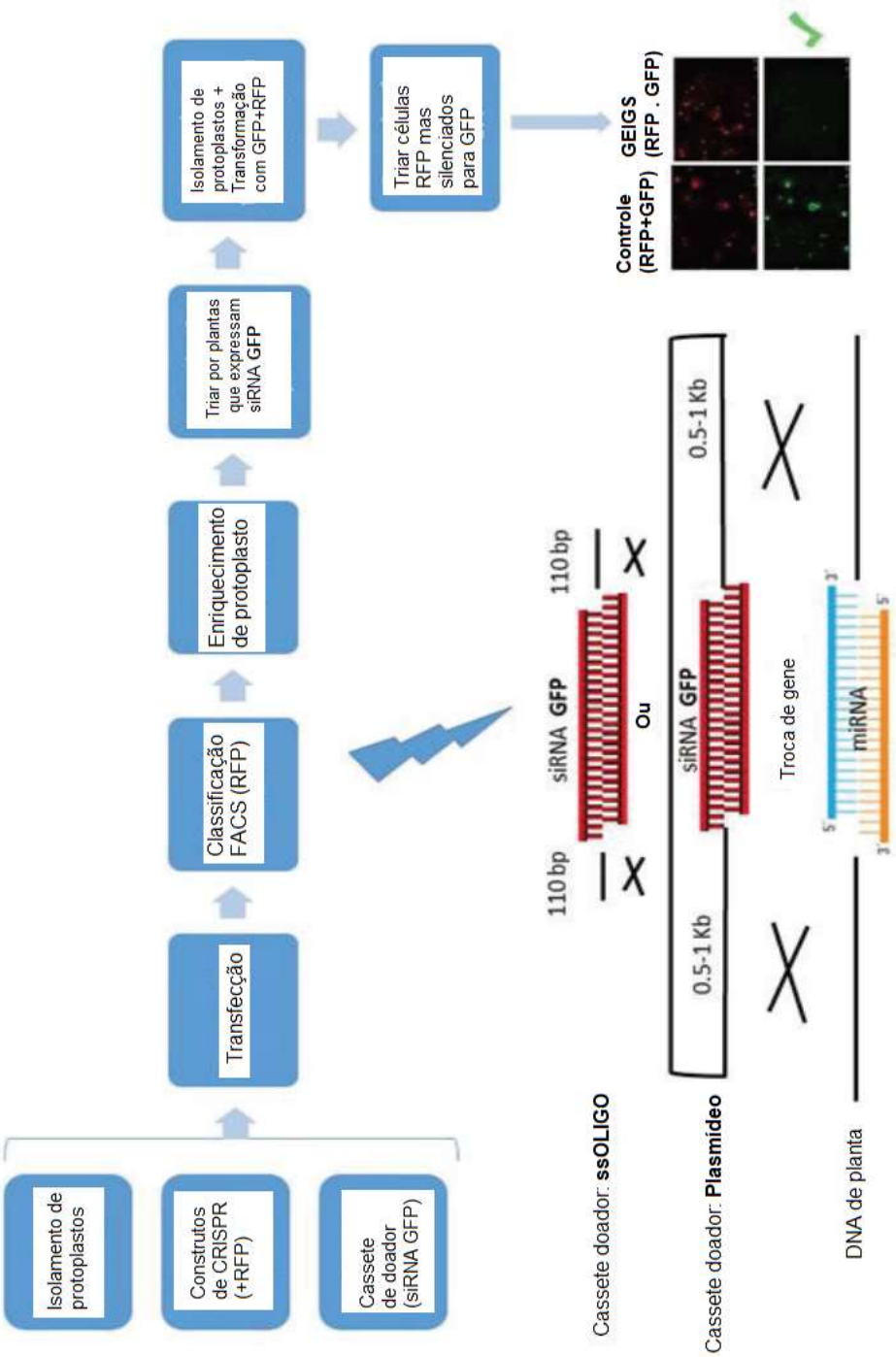

Isolamento de protoplastos
Construtos de CRISPR (+RFP)
Cassete de doador (siRNA GFP)
Transfecção
Classificação FACS (RFP)
Enriquecimento de protoplasto
Triar por plantas que expressam siRNA GFP
Isolamento de protoplastos + Transformação com GFP+RFP
Triar células RFP mas silenciados para GFP
GEIGS (RFP . GFP)
Controle (RFP+GFP)
110 bp
siRNA GFP
Ou
110 bp
Cassete doador: ssOLIGO
0.5-1 Kb
siRNA GFP
0.5-1 Kb
Cassete doador: Plasmideo
Troca de gene
miRNA
DNA de planta

FIGURA 6

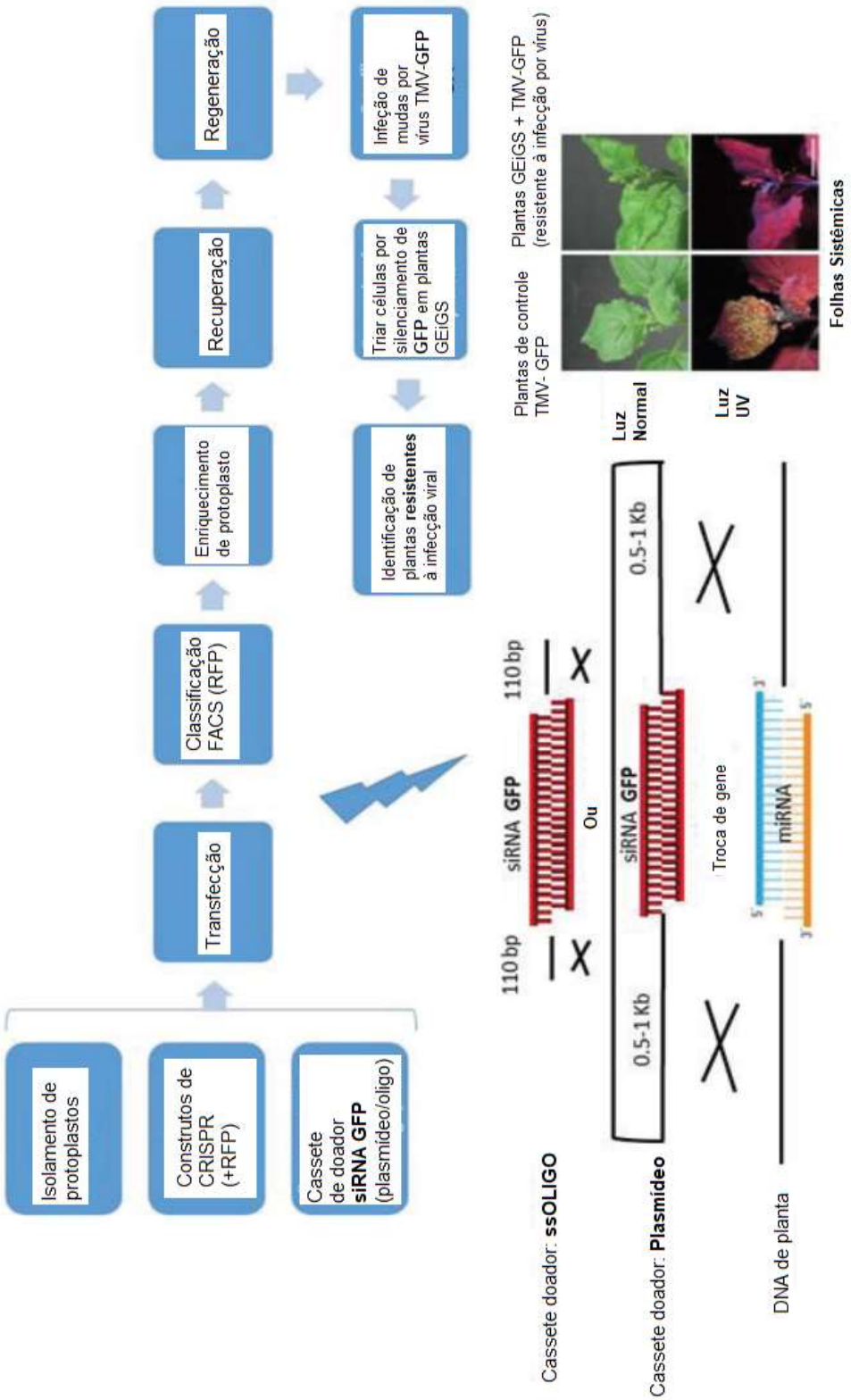

Isolamento de protoplastos
Construtos de CRISPR (+RFP)
Cassete de doador siRNA GFP (plasmideo/oligo)
Transfecção
Classificação FACS (RFP)
Enriquecimento de protoplasto
Recuperação
Regeneração
Identificação de plantas resistentes à infecção viral
Triar células por silenciamento de GFP em plantas GEiGS
Infeção de mudas por vírus TMV-GFP
Plantas de controle TMV- GFP
Plantas GEiGS + TMV-GFP (resistente à infecção por vírus)
Luz Normal
Luz UV
Folhas Sistêmicas
110 bp
siRNA GFP
110 bp
Ou
Cassete doador: ssOLIGO
0.5-1 Kb
siRNA GFP
0.5-1 Kb
Cassete doador: Plasmideo
Troca de gene
miRNA
DNA de planta

FIGURA 7



FIGURA 8

Culturas	Dak Lak		Gia Lai		Kon Tum	
	R. similis	*P. coffeae*	*R. similis*	*P. coffeae*	*R. similis*	*P. coffeae*
Banana	0	+	0	+	0	+
Café	+	+	+	+	0	0
Pimenta	0	0	0	0	0	0
Durian	0	0	0	0	0	+
Citro	0	0	0	0	0	+
Abacaxi	0	0	0	+	0	0
Gengibre	0	0	0	-	0	0
Longan	0	+	0	-	0	0
Manga	0	0	0	0	0	0

+: Foram encontrados nematóides 0: Não foram encontrados nematóides -: Nenhuma amostra foi coletada

FIGURA 9

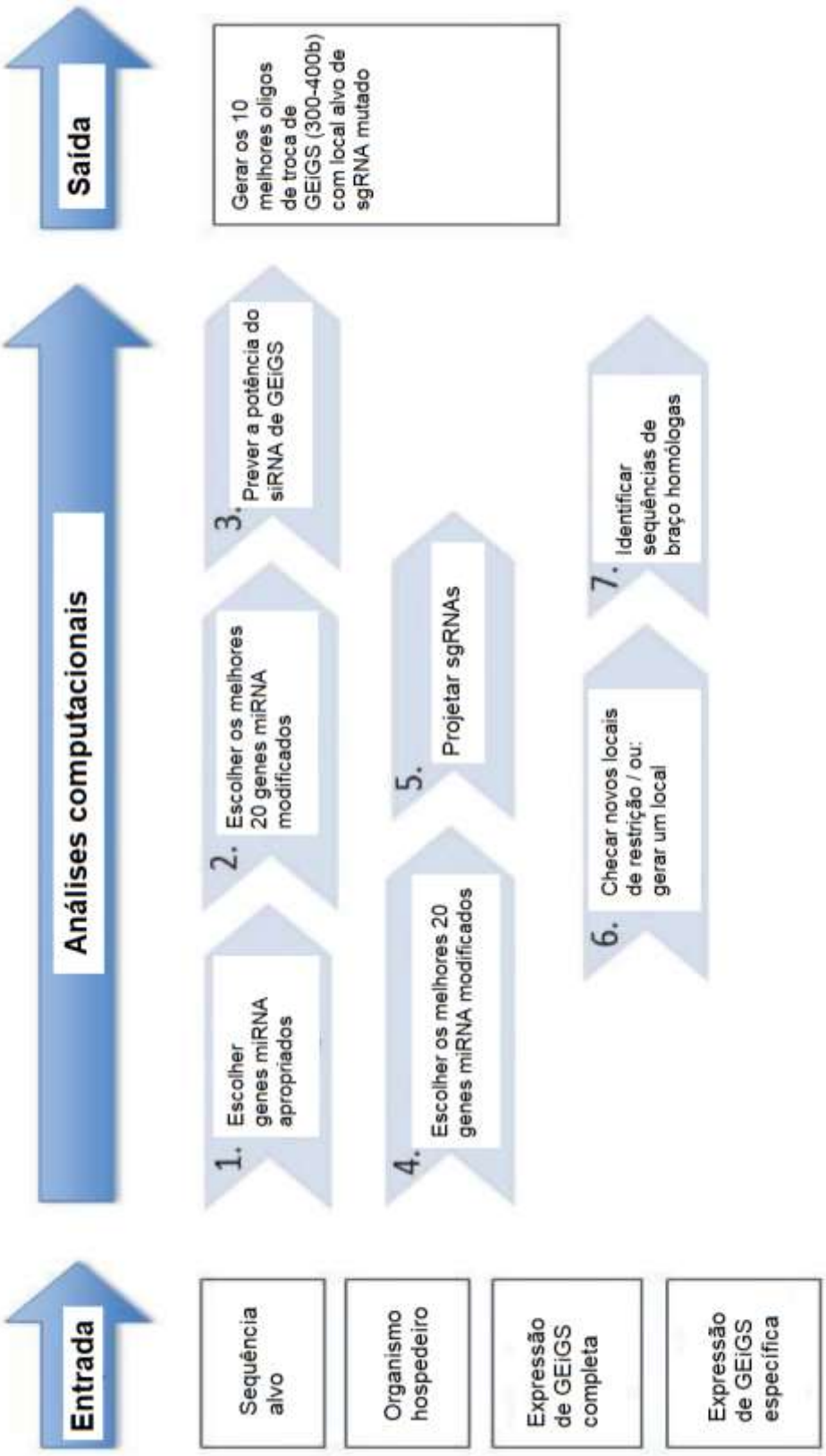

Entrada
Análises computacionais
Saída
Sequência alvo
Organismo hospedeiro
Expressão de GEiGS completa
Expressão de GEiGS específica
1. Escolher genes miRNA apropriados
2. Escolher os melhores 20 genes miRNA modificados
3. Prever a potência do siRNA de GEiGS
Gerar os 10 melhores oligos de troca de GEiGS (300-400b) com local alvo de sgRNA mutado
4. Escolher os melhores 20 genes miRNA modificados
5. Projetar sgRNAs
6. Checar novos locais de restrição / ou: gerar um local
7. Identificar sequências de braço homólogas

FIGURA 10

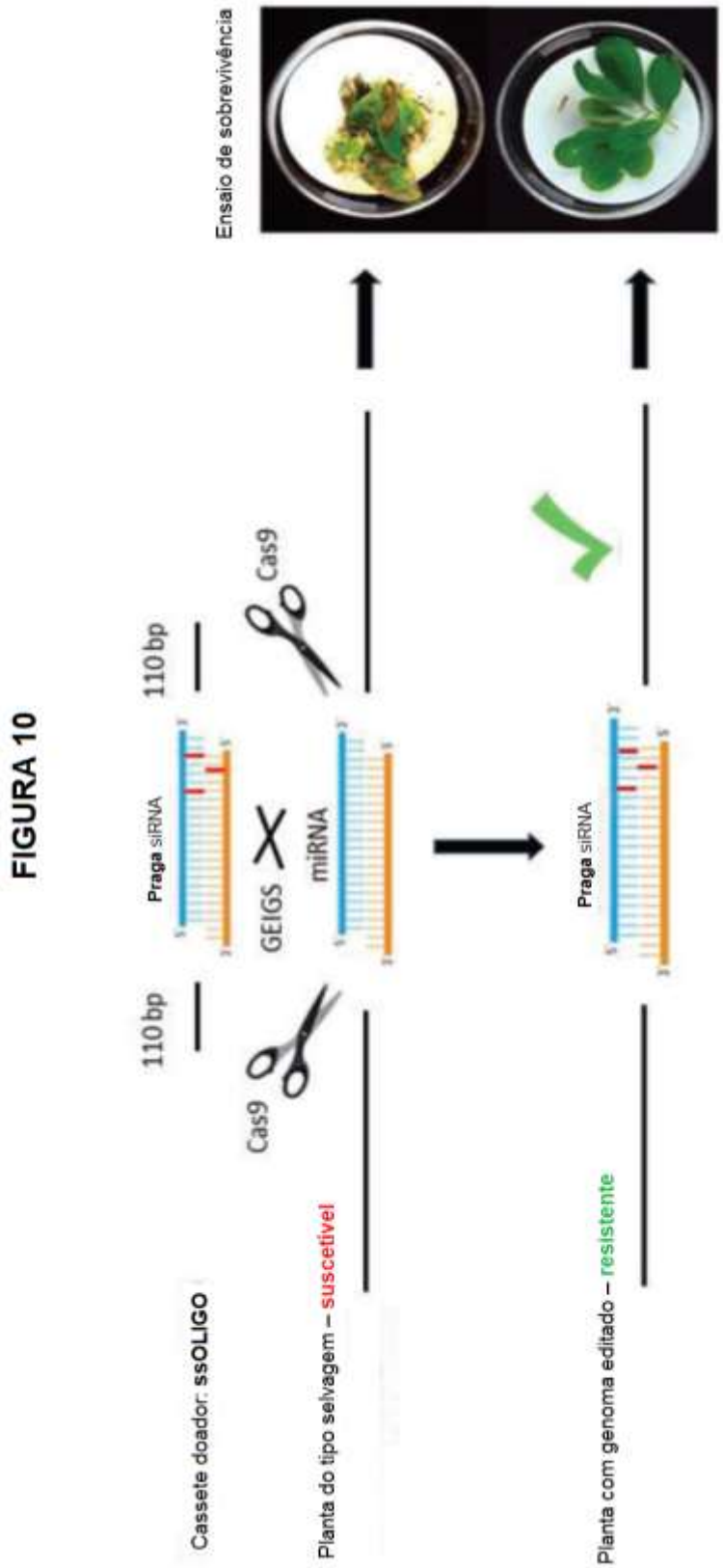
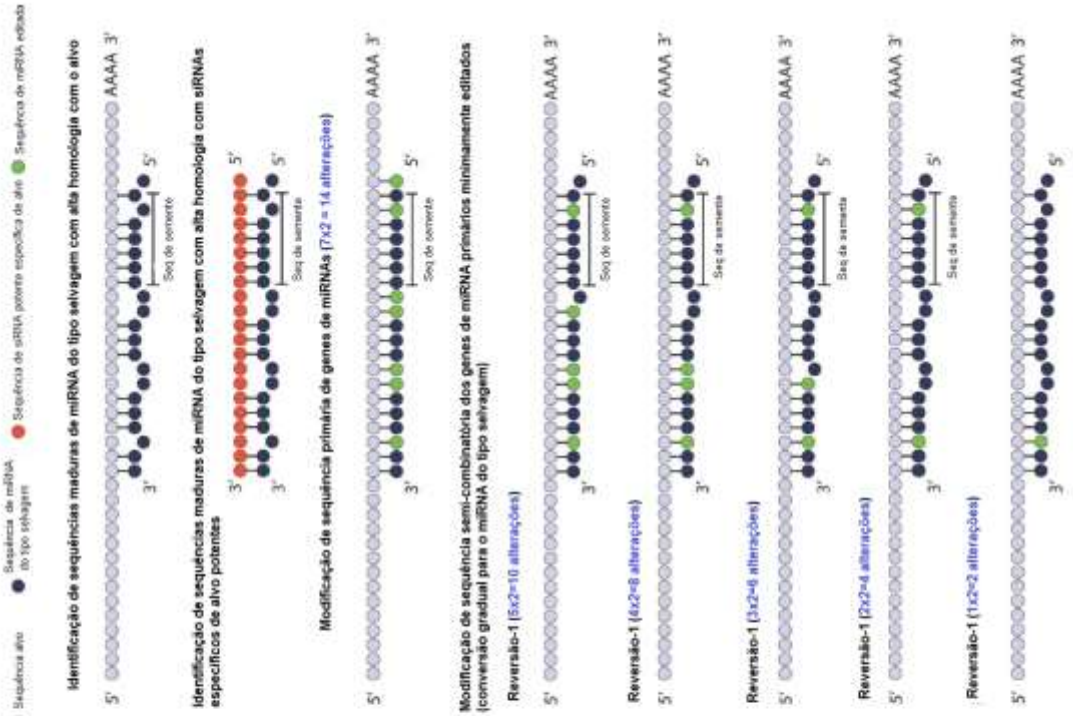

Ensaio de sobrevivência
110 bp
Praga siRNA
Cas9
GEIGS
miRNA
110 bp
Cas9
Cassete doador: ssOLIGO
Planta do tipo selvagem – suscetível
Praga siRNA
Planta com genoma editado – resistente

FIGURA 11


Sequência alvo
Sequência de miRNA do tipo selvagem
Sequência de siRNA potente específica de alvo
Sequência de miRNA editada
Identificação de sequências maduras de miRNA do tipo selvagem com alta homologia com o alvo
Identificação de sequências maduras de miRNA do tipo selvagem com alta homologia com siRNAs específicos de alvo potentes
Modificação de sequência primária de genes de miRNAs (7X2 = 14 alterações)
Modificação de sequência semi-combinatória dos genes de miRNA primários minimamente editados (conversão gradual para o miRNA do tipo selvagem)
Reversão-1 (5x2=10 alterações)
Reversão-1 (4x2=8 alterações)
Reversão-1 (3x2=6 alterações)
Reversão-1 (2x2=4 alterações)
Reversão-1 (1x2=2 alterações)
Seq de semente
Seq da semente
AAAA 3'
5'
3'

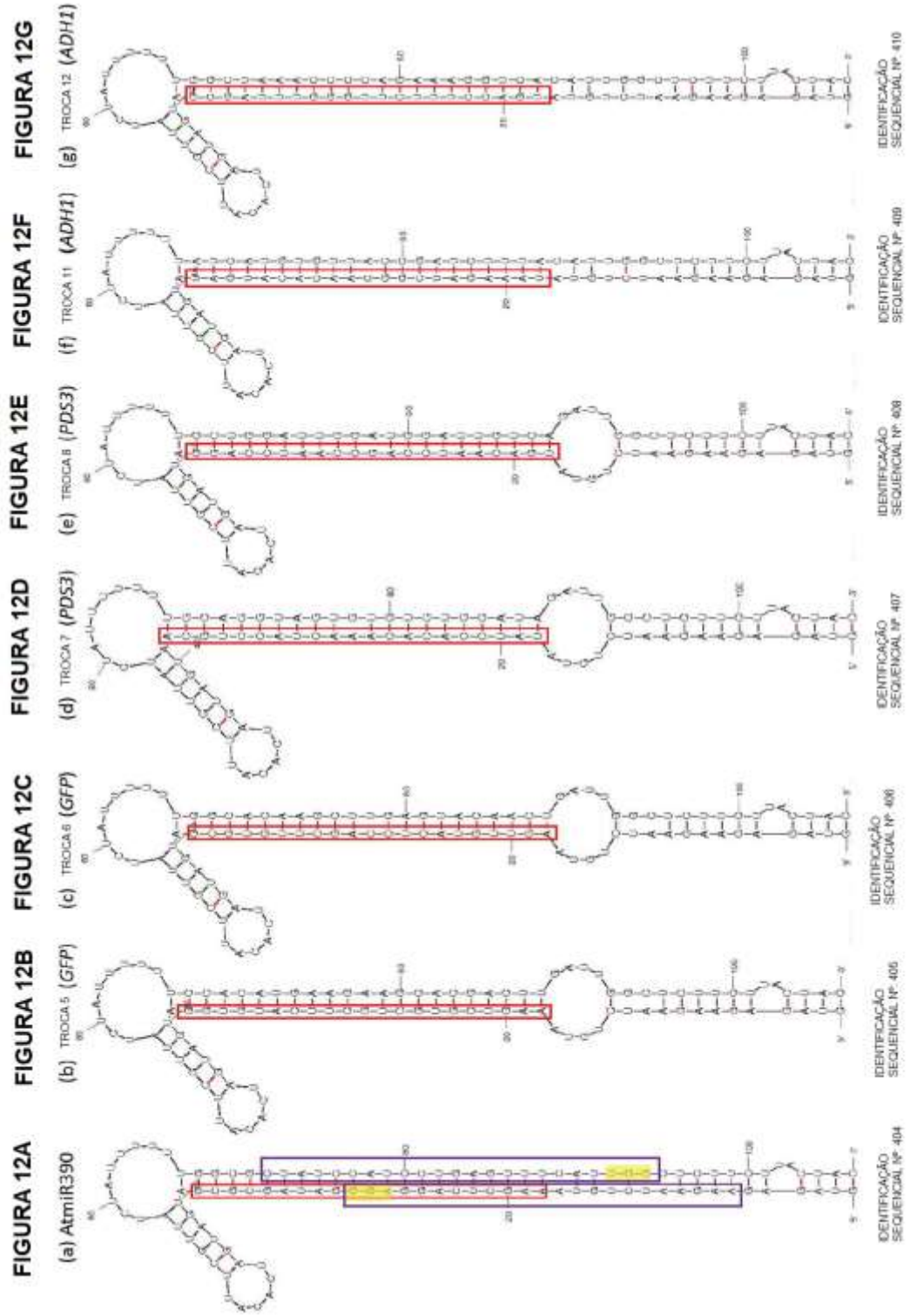

FIGURA 12A
(a) AtmiR390
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 404
FIGURA 12B
(b) TROCA 5 (GFP)
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 405
FIGURA 12C
(c) TROCA 6 (GFP)
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 406
FIGURA 12D
(d) TROCA 7 (PDS3)
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 407
FIGURA 12E
(e) TROCA 8 (PDS3)
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 408
FIGURA 12F
(f) TROCA 11 (ADH1)
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 409
FIGURA 12G
(g) TROCA 12 (ADH1)
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 410

FIGURA 13A

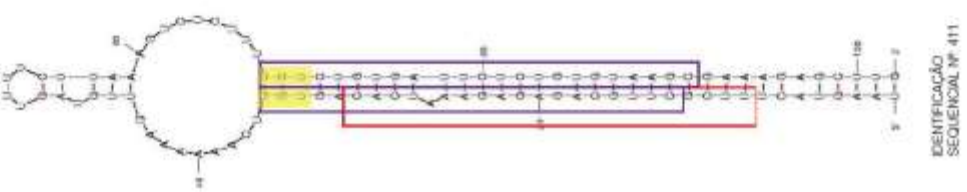


FIGURA 13B



FIGURA 13C

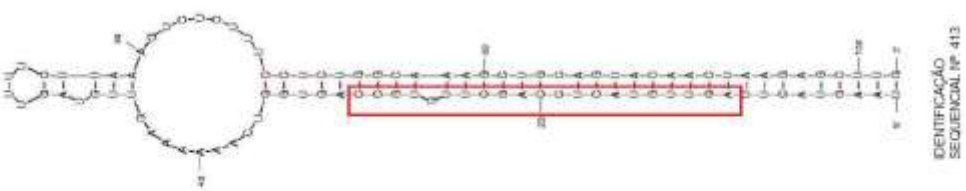


FIGURA 13D

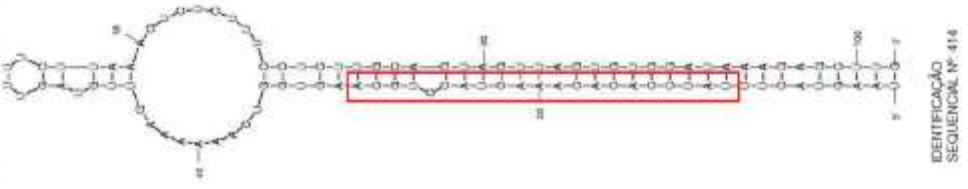


FIGURA 13E

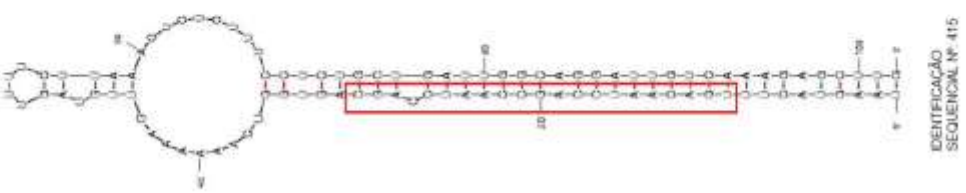


FIGURA 13F

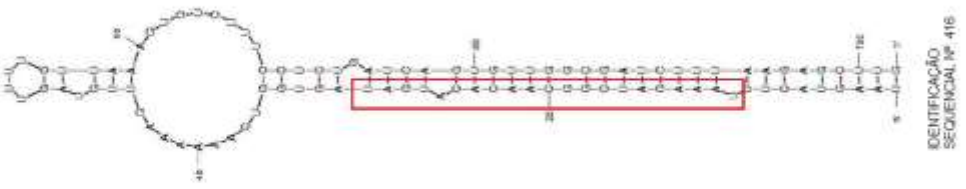


FIGURA 13G

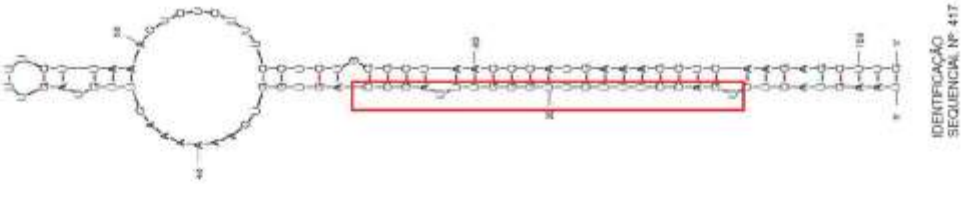


FIGURA 13H

Precursor tasiRNA do tipo selvagem



IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº: 403

GEiGS-com base em precursor de tasiRNA (pequena mudança de nt)



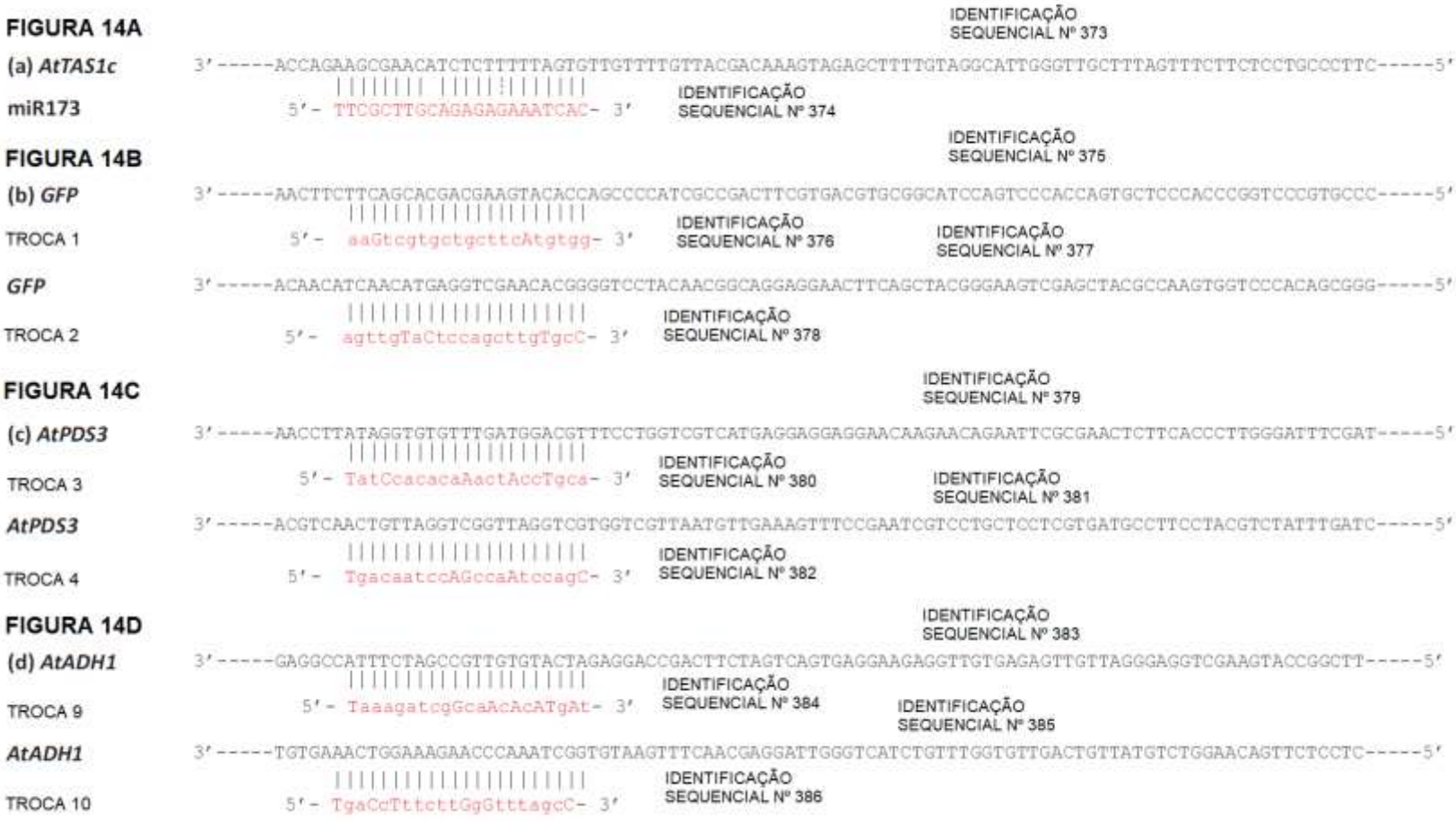
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº: 401

GEiGS-com base em precursor de tasiRNA (grande mudança de nt)



IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº: 402

FIGURA 14A


(a) AtTAS1c
3'-----ACCAGAAGCGAACATCTCTTTTTAGTGTTGTTTTGTTACGACAAAGTAGAGCTTTTGTAGGCATTGGGTTGCTTTAGTTTCTTCTCCTGCCCTTC-----5'
miR173
5'- TTCGCTTGCAGAGAGAAATCAC- 3'
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 373
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 374
FIGURA 14B
(b) GFP
3'-----AACTTCTTCAGCACGACGAAGTACACCAGCCCCATCGCCGACTTCGTGACGTGCGGCATCCAGTCCCACCAGTGCTCCCACCCGGTCCCGTGCCC-----5'
TROCA 1
5'- aaGtcgtgctgcttcAtgtgg- 3'
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 375
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 376
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 377
GFP
3'-----ACAACATCAACATGAGGTCGAACACGGGGTCCTACAACGGCAGGAGGAACTTCAGCTACGGGAAGTCGAGCTACGCCAAGTGGTCCCACAGCGGG-----5'
TROCA 2
5'- agttgTaCtccagcttgTgcC- 3'
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 378
FIGURA 14C
(c) AtPDS3
3'-----AACCTTATAGGTGTGTTTGATGGACGTTTCCTGGTCGTCATGAGGAGGAGGAACAAGAACAGAATTCGCGAACTCTTCACCCTTGGGATTTCGAT-----5'
TROCA 3
5'- TatCcacacaAactAccTgca- 3'
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 379
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 380
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 381
AtPDS3
3'-----ACGTCAACTGTTAGGTCGGTTAGGTCGTGGTCGTTAATGTTGAAAGTTTCCGAATCGTCCTGCTCCTCGTGATGCCTTCCTACGTCTATTTGATC-----5'
TROCA 4
5'- TgacaatccAGccaAtccagC- 3'
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 382
FIGURA 14D
(d) AtADH1
3'-----GAGGCCATTTCTAGCCGTTGTGTACTAGAGGACCGACTTCTAGTCAGTGAGGAAGAGGTTGTGAGAGTTGTTAGGGAGGTCGAAGTACCGGCTT-----5'
TROCA 9
5'- TaaagatcgGcaAcAcATgAt- 3'
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 383
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 384
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 385
AtADH1
3'-----TGTGAAACTGGAAAGAACCCAAATCGGTGTAAGTTTCAACGAGGATTGGGTCATCTGTTTGGTGTTGACTGTTATGTCTGGAACAGTTCTCCTC-----5'
TROCA 10
5'- TgaCcTttcttGgGtttagcC- 3'
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 386

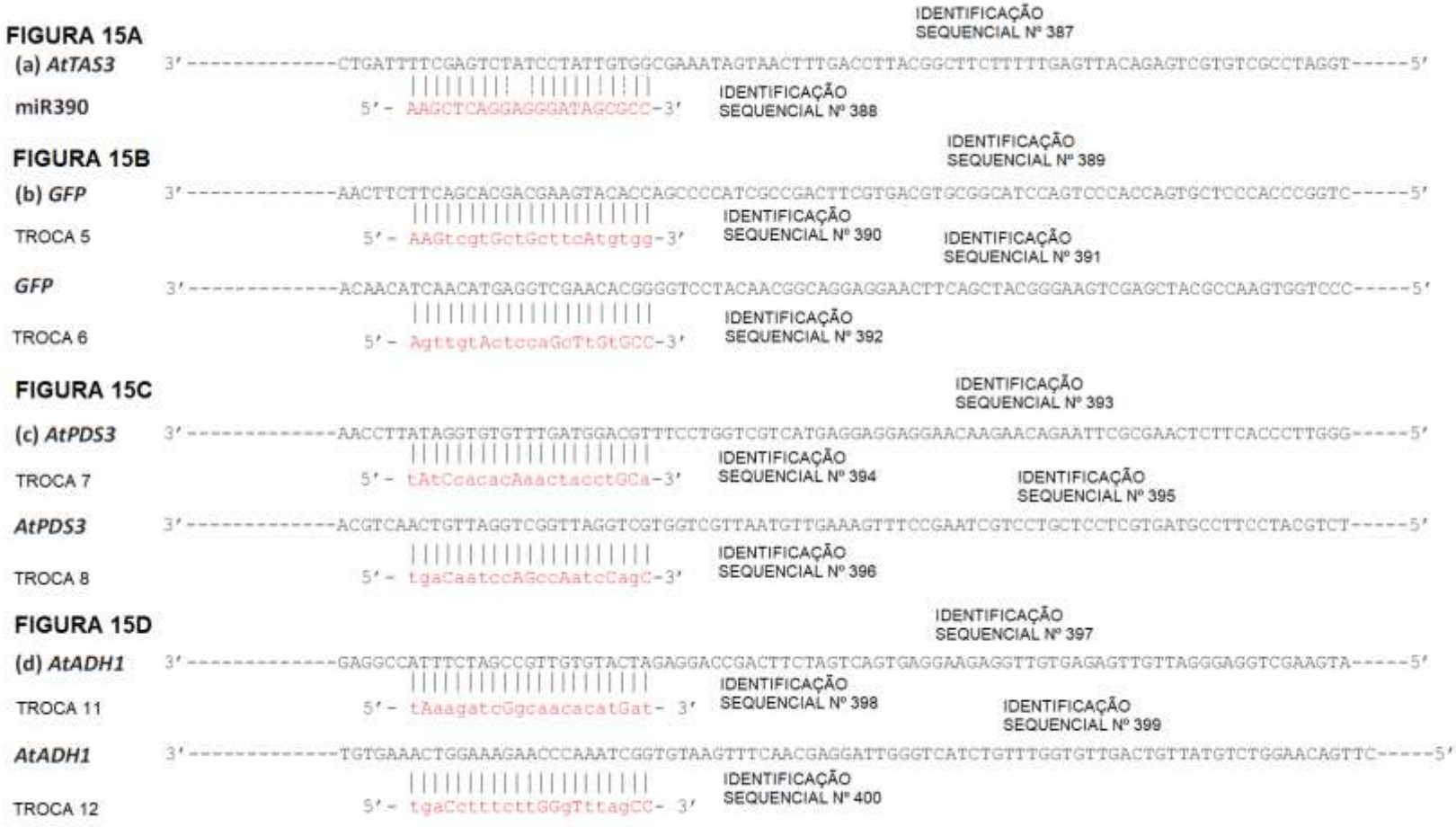

FIGURA 15A
(a) AtTAS3
miR390
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 387
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 388
FIGURA 15B
(b) GFP
TROCA 5
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 389
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 390
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 391
GFP
TROCA 6
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 392
FIGURA 15C
(c) AtPDS3
TROCA 7
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 393
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 394
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 395
AtPDS3
TROCA 8
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 396
FIGURA 15D
(d) AtADH1
TROCA 11
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 397
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 398
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 399
AtADH1
TROCA 12
IDENTIFICAÇÃO SEQUENCIAL Nº 400

FIGURA 16

SELEÇÃO PDS3 GEiGS

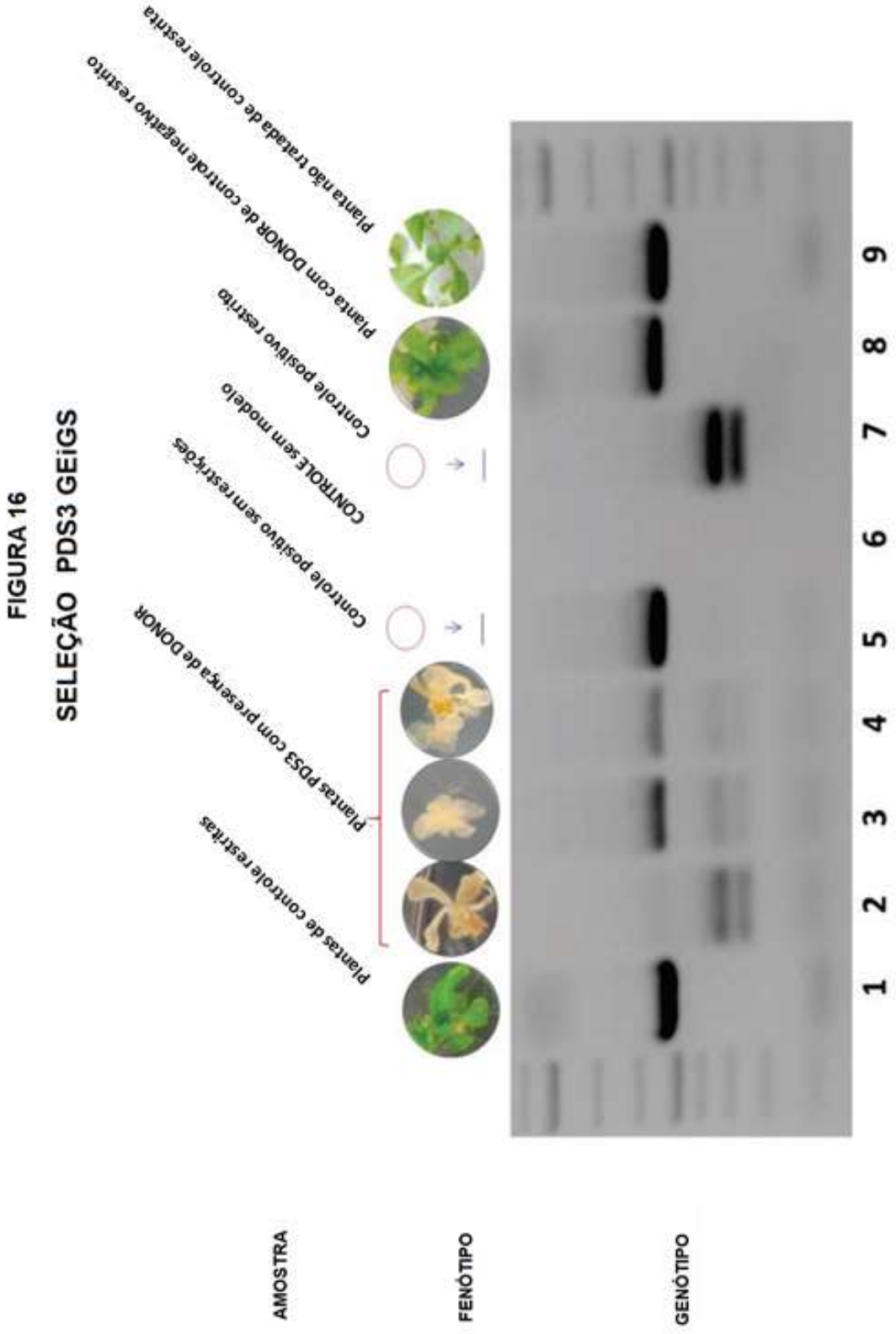


FIGURA 17

SELEÇÃO ADH1 GEiGS

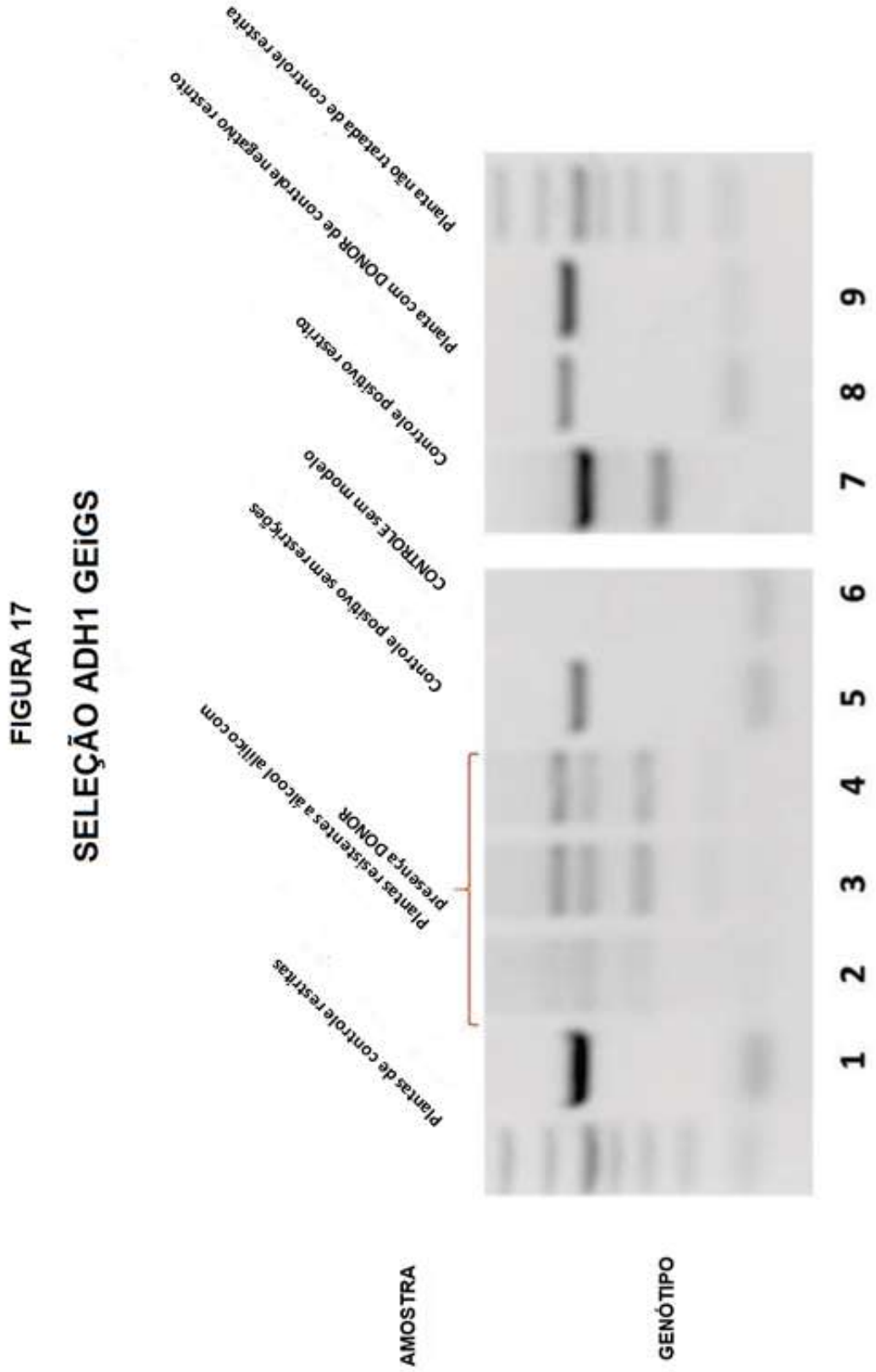


FIGURA 18

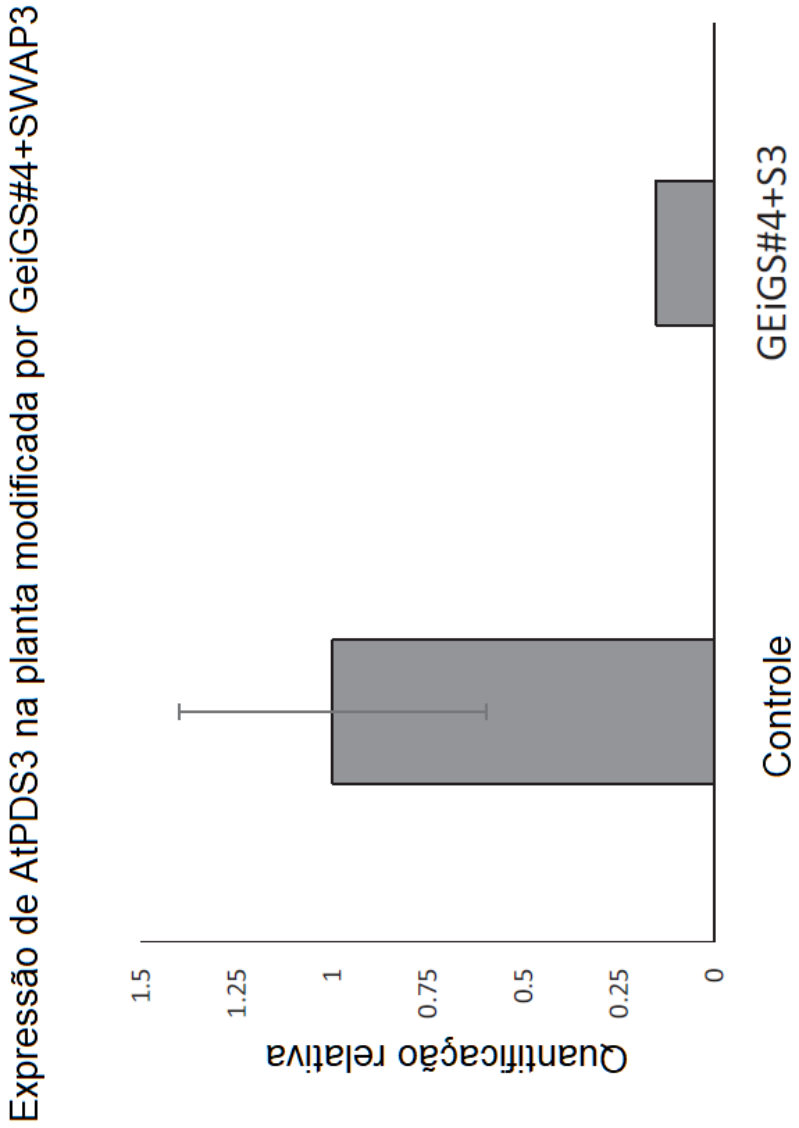
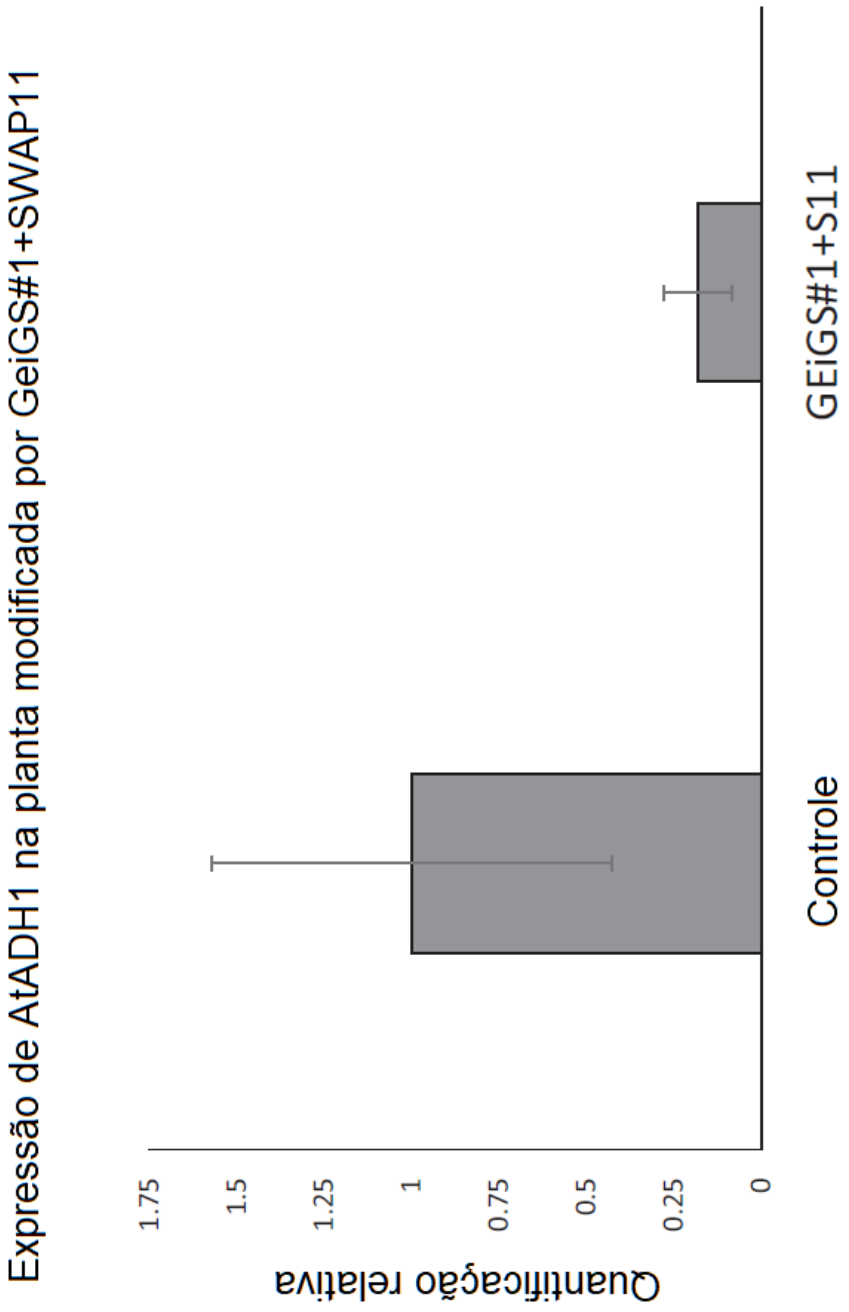

Expressão de AtPDS3 na planta modificada por GeiGS#4+SWAP3
Quantificação relativa
1.5
1.25
1
0.75
0.5
0.25
0
Controle
GEiGS#4+S3

FIGURA 19


Expressão de AtADH1 na planta modificada por GeiGS#1+SWAP11
Quantificação relativa
1.75
1.5
1.25
1
0.75
0.5
0.25
0
Controle
GEiGS#1+S11

RESUMO

“MODIFICAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE MOLÉCULAS DE RNA NÃO CODIFICANTE DE PLANTAS PARA SILENCIAR EXPRESSÃO GÊNICA”, por meio de método aplicado a um gene que codifica ou é processado em uma molécula de RNA não codificante que não possui atividade de silenciamento de RNA em uma célula vegetal. O método compreende a introdução na célula vegetal de um agente de edição de DNA que confere uma especificidade de silenciamento da molécula de RNA não codificante em relação a um RNA alvo de interesse. Também é divulgado um método de modificação de um gene que codifica ou é processado uma molécula de silenciamento de RNA em uma célula vegetal. O método compreende a introdução na célula da planta de um agente de edição de DNA que redireciona a especificidade de silenciamento da molécula de RNA não codificante em direção a um RNA alvo de interesse. Células vegetais, sementes vegetais, plantas e métodos de geração de plantas também são divulgados.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: DOC ListaSequencia 057160.txt
- Data de Geração do Código: 18/03/2020
- Hora de Geração do Código: 18:39:02
- Código de Controle:
  - Campo 1: 5B94AA300D5DB9DD
  - Campo 2: 6779D06CF82BE422