

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso



**EDIÇÃO GENÔMICA MEDIADA POR CRISPR/Cas NA ERA DO MELHORAMENTO
GENÉTICO VEGETAL DE PRECISÃO**

Igor Poletti

Pelotas, 2021

Igor Poletti

Edição genômica mediada por CRISPR/Cas na era do melhoramento genético vegetal de precisão

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof^a Dr^a Ana Lucia Soares Chaves

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P763e Poletti, Igor

Edição genômica mediada por CRISPR/Cas na era do
melhoramento genético vegetal de precisão / Igor Poletti ;
Ana Lúcia Soares Chaves, orientadora. — Pelotas, 2021.

48 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em
Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico,
Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Biotecnologia vegetal. 2. CRISPR. 3. DNA. 4. Edição de
genoma. 5. Agricultura. I. Chaves, Ana Lúcia Soares, orient.
II. Título.

CDD : 581.8732

Igor Poletti

Edição genômica mediada por CRISPR/Cas na era do melhoramento genético vegetal de precisão

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 11 de Junho de 2021

Banca examinadora:

**Prof^a Dr^a Ana Lúcia Soares Chaves (Orientador).
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.
Doutora em Biologie Moléculaire et Cellulaire Végétale pelo Institut National Polytechnique de Toulouse.**

**Prof^a Dr^a Márcia Soares Chaves.
Doutora em Fitotecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.**

**Prof^a Dr^a Vanessa Galli.
Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.**

**Dr^a Vívian Ebeling Viana
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.**

**Dedico este trabalho à minha família,
principalmente ao meu avô, que investiu tudo que
podia para que meu sonho se realizasse. Onde quer
que esteja, que continue olhando por mim e feliz
por este momento.**

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, à Deus e aos Orixás, pela minha existência, pelo privilégio de ter uma família que me apoie e pela resiliência para ultrapassar todos os obstáculos até aqui.

À minha família por todo amor e apoio prestado durante meus anos de graduação.

Aos meus amigos por serem excelentes companhias durante todo o percurso, sempre me motivando.

À minha família religiosa pelo incentivo, carinho, amor e equilíbrio nos momentos difíceis e de tensão.

Aos meus professores, por todo o ensinamento que me permitiram aprimorar habilidades e apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação acadêmica e profissional.

Às pessoas com quem convivi durante esses anos de graduação, que certamente tiveram impacto na minha caminhada acadêmica.

À minha orientadora, por ser uma pessoa ímpar em vários aspectos, se tornando uma pessoa essencial na minha vida.

Resumo

POLETTI, Igor. **Edição genômica mediada por CRISPR/Cas na era do melhoramento genético vegetal de precisão**. Orientadora: Ana Lúcia Soares Chaves. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) – Curso de Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

O setor agrícola é um dos maiores pilares da sociedade em geral e é de suma importância o seu desenvolvimento, pois influencia diretamente na alimentação das pessoas ao redor do mundo. A inserção de novas tecnologias para o melhoramento genético de cultivares está em constante crescimento em conjunto com a necessidade de aprimoramento e atualização dos protocolos utilizados na engenharia de genomas. Um dos mais promissores investimentos em laboratórios de pesquisa de biotecnologia vegetal é o sistema CRISPR/Cas como meio de manipular regiões específicas do DNA através de deleções, inserções, integração de sequência específica de DNA em um locus desejado e substituições dirigidas ao local alvo. O objetivo deste Trabalho de Conclusão de Curso foi revisar os mecanismos e técnicas utilizadas na engenharia de genomas através do sistema CRISPR/Cas, discutir as suas principais aplicações e vantagens no melhoramento vegetal, e fomentar a discussão e a reflexão sobre os aspectos éticos envolvidos na utilização do sistema CRISPR. O setor agrícola está em constante e pleno movimento, pois é o setor que alimenta o mundo. Boa parte da economia do Brasil depende do setor agrícola. Segundo dados de 2020, o agronegócio corresponde a 24,3%, respondendo por mais de um quarto do Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil. Visando a atualização de técnicas mais baratas, menos laboriosas e subsequentes protocolos otimizados, a descoberta, ascensão e otimização do sistema CRISPR/Cas torna-se uma técnica-chave no melhoramento vegetal. A inserção da tecnologia CRISPR/Cas na agricultura surgiu como estratégia para a manipulação do genoma vegetal e pode ser utilizado como técnica alternativa à transgenia, que gera diversos questionamentos éticos e demanda uma burocracia maior para liberação comercial. Portanto, essa revisão traz informações que destacam o potencial genético, e consequentemente, produtivo e comercial da utilização do sistema CRISPR/Cas no melhoramento vegetal, demonstrando que, apesar do grande sucesso da técnica, maiores estudos e testes deverão ser aplicados para a otimização das técnicas e melhores resultados.

Palavras-chave: Biotecnologia vegetal. CRISPR. DNA. Edição de genoma. Agricultura.

Abstract

POLETTI, Igor. **CRISPR/Cas-mediated genome editing in the era of precision plant breeding**. Advisor: Ana Lúcia Soares Chaves. 2021. (Bachelor's degree in Biotechnology) – Technological Development Center, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

The agricultural sector is one of the main pillars of society in general and its development is of paramount importance, since it directly influences the food of people around the world. The insertion of new technologies for the genetic improvement of cultivars is constantly growing together with the need to improve and update the protocols used in genome engineering. One of the most promising investments in plant biotechnology research laboratories is the CRISPR/Cas system as a means of manipulating specific regions of DNA through deletions, insertions, integration of specific DNA sequence at a desired locus and targeted substitutions. The objective of this Final Course Paper was to review the mechanisms and techniques used in genome engineering through the CRISPR/Cas system, discuss its main applications and advantages in plant breeding, and encourage discussion and reflection on the ethical aspects involved in use of the CRISPR system. The agricultural sector is in constant and full movement, as it is the sector that feeds the world. Much of Brazil's economy depends on the agricultural sector. According to data from 2020, agribusiness corresponds to 24.3%, accounting for more than a quarter of Brazil's Gross Domestic Product (GDP). Aiming at updating cheaper, less laborious techniques and subsequent optimized protocols, the discovery, rise and optimization of the CRISPR/Cas system becomes a key technique in plant breeding. The insertion of CRISPR/Cas technology in agriculture emerged as a strategy for the manipulation of the plant genome and can be used as an alternative technique to transgenics, which generates several ethical questions and demands greater bureaucracy for commercial release. Therefore, this review brings information that highlights the genetic, and consequently, productive and commercial potential of using the CRISPR/Cas system in plant breeding, demonstrating that, despite the great success of the technique, further studies and tests should be applied to optimize techniques and get better results.

Keywords: Plant biotechnology. CRISPR. DNA. Genome editing. Agriculture.

Lista de Figuras

Figura 1	Representação da estrutura e o mecanismo de ação das nucleases de dedo de zinco.....	16
Figura 2	Representação da estrutura e o mecanismo de ação das enzimas TALENs.....	17
Figura 3	Representação do sistema de imunidade CRISPR/Cas em procariotos.....	18
Figura 4	Representação das vias de reparo após a clivagem pela Cas9.....	22

Lista de Tabelas

Tabela 1	Comparativo das técnicas de primeira geração com a técnica de CRISPR/Cas.....	21
Tabela 2	sgRNA desenhados através de ferramentas de bioinformática.....	23
Tabela 3	Aplicações CRISPR/Cas9 nas principais culturas para aumento de produtividade e qualidade vegetal.....	30

Sumário

1	Introdução	11
1.1	Objetivos	13
2	Revisão Bibliográfica	13
2.1	Técnicas moleculares de primeira geração e CRISPR/Cas	13
2.2	A descoberta do CRISPR “selvagem”	17
2.3	Funções e adaptações do sistema CRISPR/Cas9 na engenharia de genoma	20
2.3.1	Ribonucleoproteínas e o sistema CRISPR/Cas	26
2.3.2	dCas9	27
2.4	Aplicações do sistema CRISPR/Cas em biotecnologia vegetal	28
2.5.1	Produtividade vegetal e qualidade dos alimentos	29
2.5.2	Resistência à fatores bióticos	31
2.5.3	Resistência à fatores abióticos	33
2.6	Biossegurança e CRISPR	34
	Considerações Finais	36
	Conclusões e perspectivas futuras	38
	Referências Bibliográficas	38

1 Introdução

O setor agrícola está em constante e pleno movimento, pois é o setor que alimenta o mundo. Boa parte da economia do Brasil depende do setor agrícola. Segundo dados de 2020, o agronegócio corresponde a 24,3%, respondendo por mais de um quarto do Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil (CNA, 2021).

No momento, um dos maiores desafios do agronegócio é alcançar um crescimento sustentável da produtividade, aplicando melhores práticas agrícolas e desenvolvendo variedades que possam produzir alimentos nutritivos e de qualidade e mais tolerantes a diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos (DAMATTA et al., 2010; LOBELL; GOURDJI, 2012; MCCOUCH et al., 2013; EISENSTEIN, 2013).

Portanto, devido ao rápido crescimento da população global, a segurança alimentar torna-se, dentre tantos outros, o desafio mais crucial. De acordo com estimativas cautelosas, até o final de 2050, a população global aumentará para 10 bilhões e a produção global de alimentos precisa aumentar em 60-100%. Segundo Razzaq et al (2019, p.1): “Além do clima extremo, o aumento dos estressores bióticos e abióticos, o crescimento da população e a redução da disponibilidade de terras agrícolas e recursos hídricos são restrições importantes para a produção de alimentos e a agricultura.”

A humanidade vem buscando melhorias na produção de alimentos. Como exemplo podemos citar a espiga de milho, vigorosa e cheia de grãos amarelos homogêneos que conhecemos hoje, a qual surgiu a partir de outra gramínea: o teosinto. “Há muito tempo se percebeu que as melhores espigas deveriam ser usadas como matrizes para o replantio. Durante milênios, a domesticação do milho foi realizada pela seleção artificial” (QUADROS, et al., 2018). A análise recente do transcriptoma de milho e teosinto revelaram os resultados desta seleção: foram alteradas a expressão de mais de 1.000 genes, o que certamente contribuiu para a evolução do milho (SWANSON-WAGNER et al., 2012).

Com o surgimento e o avanço da biologia molecular, a agricultura se beneficia de uma gama de técnicas moleculares que acabam por culminar no auxílio ao melhoramento vegetal, com destaque para a transgenia e a seleção genômica (LOPES FILHO et al., 2020).

As técnicas de transgenia utilizadas em biotecnologia vegetal por pesquisadores da área possibilitam a edição genômica de plantas diversas, possibilitando a introdução de características desejáveis. Embora alimentos transgênicos tenham papel importante no cenário da agricultura moderna, estes transgênicos sofrem grandes críticas do público, comumente sendo associados à imagem de algo nocivo e não natural, por reunir material genético de diferentes organismos (SCHMIDT et al., 2020). Transgenia é a introdução de um DNA exógeno, integrando-o ao DNA-alvo, ocasionando mudanças no genoma para se obter um Organismo Geneticamente Modificado (OGM). Sendo assim, novas estratégias têm sido desenvolvidas para reduzir o tempo e os custos do melhoramento genético. Neste contexto surgiu a edição genômica de plantas, uma ferramenta importante para o melhoramento na produtividade, qualidade e segurança alimentar. Todos os organismos transgênicos são OGMs mas, nem todos os OGMs são transgênicos. No caso de edições à nível genômico, como técnicas de edição gênica, não há a presença de materiais genéticos externos, ou seja, de outro organismo, para causar modificações no genoma, entretanto, edições realizadas com ferramentas de edição genômica, como CRISPR, são considerados OGMs.

Ano após ano, diversas empresas e pesquisadores na área de biotecnologia vegetal estudam técnicas de melhoramento. Os procedimentos de transformação genética que os pesquisadores executavam são geralmente muito caros e demorados, e muitas vezes são muito longos para responder a mudanças importantes nas condições socioeconômicas das atividades agrícolas. A consequência direta disso é que apenas algumas empresas no mundo podem executar esse modelo de maneira eficaz. Esta situação começou a mudar há aproximadamente oito anos, quando Emmanuelle Charpentier, diretora do Instituto Max Planck de Biologia da Infecção, e Jennifer A. Doudna, bioquímica da Universidade da Califórnia, Berkeley, publicaram um artigo intitulado “*A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity*”. Desde então, o campo da engenharia genética entrou em um novo estágio revolucionário no qual sistemas baseados em CRISPR/Cas com RNA programável podem ser usados, tornando possível para cientistas em quase todos os laboratórios de biologia molecular do mundo alterar ou editar uma sequência específica de um genoma de célula eucariótica. Charpentier e Doudna foram premiadas com o Prêmio Nobel de Química em 2020.

“Charpentier percebeu que o sistema CRISPR que ela descreveu na bactéria *Streptococcus pyogenes* era tão simples que poderia ser usado como uma poderosa ferramenta de engenharia genética, de maneira a achar, cortar e potencialmente alterar uma região precisa do genoma a nossa escolha, se os componentes desse sistema pudessem ser controlados” (FELISBINO, 2016).

Visando técnicas alternativas às convencionais, que sejam mais baratas, menos laboriosas e subsequentes protocolos mais otimizados, a descoberta, ascensão e otimização do sistema CRISPR/Cas torna-se uma técnica-chave no melhoramento vegetal. O sistema CRISPR/Cas tornou-se amplamente utilizado em pesquisas na área agropecuária de todo o mundo, para desenvolver plantações e cultivares com novas características desejáveis ao produtor e, conseqüentemente, ao mercado consumidor.

1.1 Objetivos

O objetivo deste Trabalho de Conclusão de Curso foi revisar os mecanismos e técnicas utilizadas na edição de genomas através do sistema CRISPR/Cas, discutir as suas principais aplicações e vantagens no melhoramento vegetal, e fomentar a discussão e a reflexão sobre os aspectos éticos envolvidos na utilização do sistema CRISPR.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Técnicas moleculares de primeira geração e CRISPR/Cas

As técnicas moleculares de primeira geração, para alteração à nível genômico ocorrem através de edição do genoma-alvo. Edição genômica, edição gênica ou engenharia genômica são nomes dados às modificações específicas feitas no DNA de organismos vivos (BALTES et al., 2017, p. 1-16). As nucleases sítio-dirigidas, ou seja, específicas para o loci desejado, são as responsáveis pela edição genômica e promoção das características desejadas no organismo que é objeto da pesquisa. O processo de reparo, que é uma etapa importante na edição genômica, é um processo natural. As quebras de dupla-fita podem ocorrer naturalmente nas células, entretanto, para se tornar técnica de edição, se faz necessário o uso de nucleases.

A edição genômica ocorre por meio da ação de nucleases sítio-dirigidas, capazes de clivar a molécula de DNA-alvo, ativando a subsequente ação de mecanismos de reparo de DNA da própria célula, que podem ser direcionados por recombinação homóloga (HDR, do inglês Homology-Directed Repair) ou por união de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês Non-Homologous End Joining) (SATHEESH et al., 2019, p. 115-123).

A descoberta de nucleases específicas de sequência programada (SSNs) facilitou a edição precisa do gene. Em sistemas de plantas e animais, a aplicação das SSNs para a edição do genoma de forma precisa foi reconhecida como um avanço na engenharia do genoma. Os SSNs possuem diversas aplicações para produzir mutações desejadas, como inserções, deleções, substituições, integração de sequência específica de DNA em um locus desejado e substituições dirigidas ao local em diversos organismos e tipos celulares (RAZZAQ; SALEEM et al., 2019). Mesmo que os SSNs possuam características exclusivas, o mecanismo para realizar as quebras de fita dupla (DSBs) no DNA é semelhante para todos. Os DSBs criados através de SSNs são regenerados por meio de união de extremidade não homóloga (NHEJ) ou reparo dirigido por homologia (HDR). A regeneração do DNA por NHEJ é um mecanismo de reparo sujeito a erros, entretanto, facilita a união de extremidade direta de DSBs sem envolver um modelo homólogo, podendo, também, gerar inserções ou deleções em locais desejados para desenvolver nocautes de genes. Por outro lado, a via de reparo HDR é um mecanismo altamente preciso que necessita de um molde homólogo para mediar o reparo e pode ser utilizado para atingir mudanças precisas como inserções e substituições de genes (FENG et al., 2013; JINEK et al., 2012; KIM et al., 2014). Se comparado com as estratégias de transgenia, que resultam em inserções inadvertidas de genes e, às vezes, características fenotípicas aleatórias, as abordagens da GE produzem mutantes bem definidos, provando que a técnica é poderosa para o melhoramento vegetal. Em contraste com as plantas transgênicas, as plantas que são editadas diretamente pelo genoma, têm o benefício adicional de especificidade de local. Em programas de melhoramento, essas plantas podem ser úteis e as linhagens subsequentes podem ser empregadas de forma estável e confiável (ZHANG et al., 2018; WALTZ, 2018).

Dentro desta lógica, a edição pode ser direcionada para cada gene. Genes específicos podem ser clivados com precisão por tais nucleases e podem ser reparados com a ajuda de HDR ou NHEJ (SHAN et al., 2013; PUCHTA et al., 1996). Uma estratégia importante para executar a edição de genoma direcionada por meio

de SSNs é gerar DSBs em locais direcionados. O sistema de reparo de DNA das vias HDR requer um modelo homólogo para reparar o DSB, enquanto as duas extremidades dos DSBs são ligadas diretamente na via NHEJ e, embora essa via de reparo seja mais comum, existem algumas falhas que o tornam indesejável em muitos estudos. Em contraste com NHEJ, o mecanismo de reparo via HDR é mais preciso e confiável (RAZZAQ; SALEEM et al., 2019).

Através de ferramentas específicas podemos introduzir, remover ou substituir um ou mais nucleotídeos específicos em um local alvo desejado no genoma do organismo. De todas as estratégias já utilizadas na edição gênica, a que tem obtido mais atenção dos pesquisadores é a capaz de provocar uma deleção em local específico do DNA. Segundo Razzaq et al. (2019, p. 2), “Entre ferramentas de edição de genoma da primeira geração, há nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição (TALENs), nucleases de dedo de zinco (ZFNs) e meganucleases (MNs), que permitiram que cientistas de plantas manipulassem genes desejados em plantas cultivadas. No entanto, essas abordagens são caras e trabalhosas, envolvendo procedimentos complexos para uma edição bem-sucedida.”

Entre as técnicas de primeira geração as que mais se destacaram foram as ZFNs e as TALENs. ZFN é uma proteína "projetada" de forma que execute DBS de forma específica. É uma proteína quimérica que consiste em um domínio de clivagem *FokI* não-específico e é constituída de uma matriz de repetição de 3-5 dedos de zinco Cys2-His2 responsável pela ligação ao DNA. Cada ZFN irá interagir com 3 nucleotídeos consecutivos, formando um dímero que vai identificar uma sequência de 18 a 24 pares de base (pb), portanto, o dedo de zinco pode sofrer alterações moleculares para reconhecer regiões específicas de interesse. A via de reparo pode ocorrer por NHEJ ou HDR, resultando na edição do gene por meio de inserções ou deleções (SATHEESH et al., 2019). A Figura 1 mostra a estrutura básica e desenho de uma nuclease de dedo de zinco (ZFN).

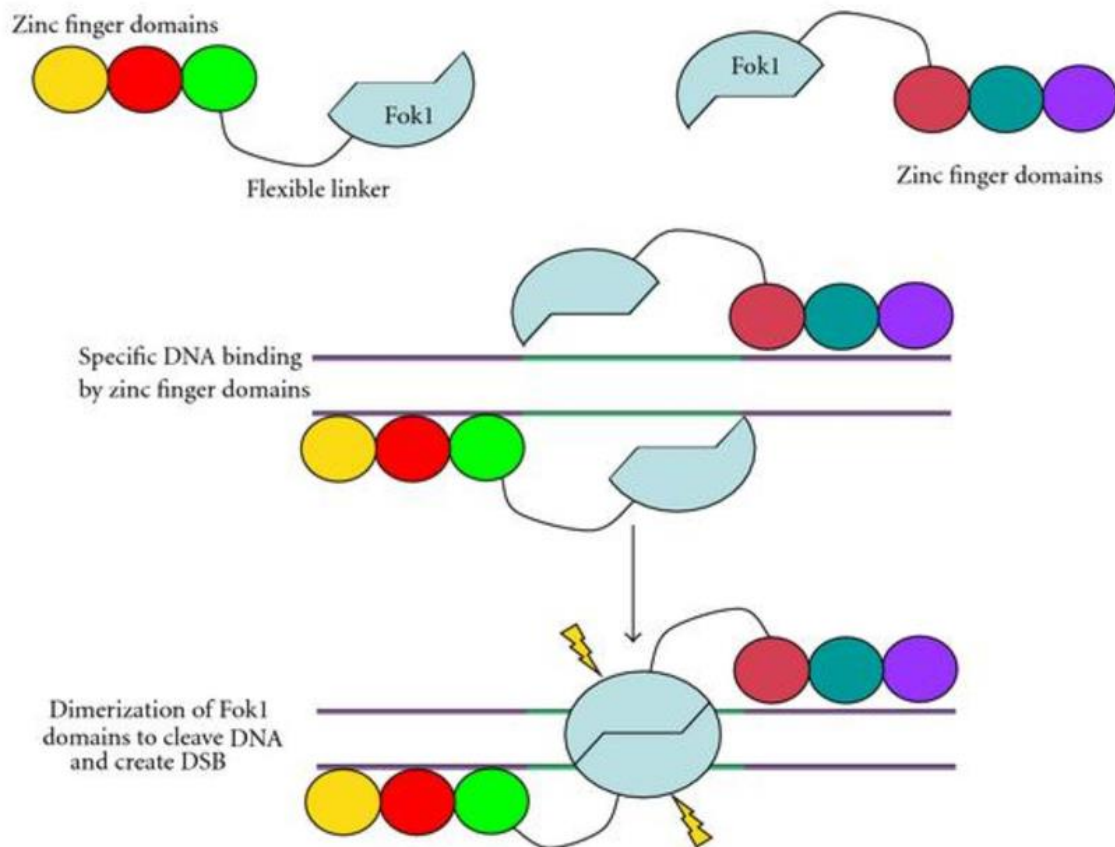


Figura 1 – Representação da estrutura e o mecanismo de ação das nucleases de dedo de zinco.

Fonte: PAPAIOANNOU; SIMONS; OWEN, 2012

TALENs são proteínas sintetizadas por fitopatógenos do gênero *Xanthomonas* (GAJ et al., 2013). Estas proteínas são compostas de domínios de ligação ao DNA, formados por arranjos repetidos de 13 a 30 resíduos de aminoácidos em tandem e reconhecem apenas um único par de bases no DNA, como demonstrado na Figura 2. De acordo com Lopes Filho et al. (2020, p. 16 *apud* SATHEESH et al., 2019, p. 115-123):

“Cada arranjo contém cerca de 34 resíduos de aminoácidos idênticos, exceto por dirresíduos na posição 12 e 13, chamados de repetições dirresíduos variáveis (RVD), os quais são responsáveis pela especificidade de ligação no nucleotídeo da sequência-alvo”.

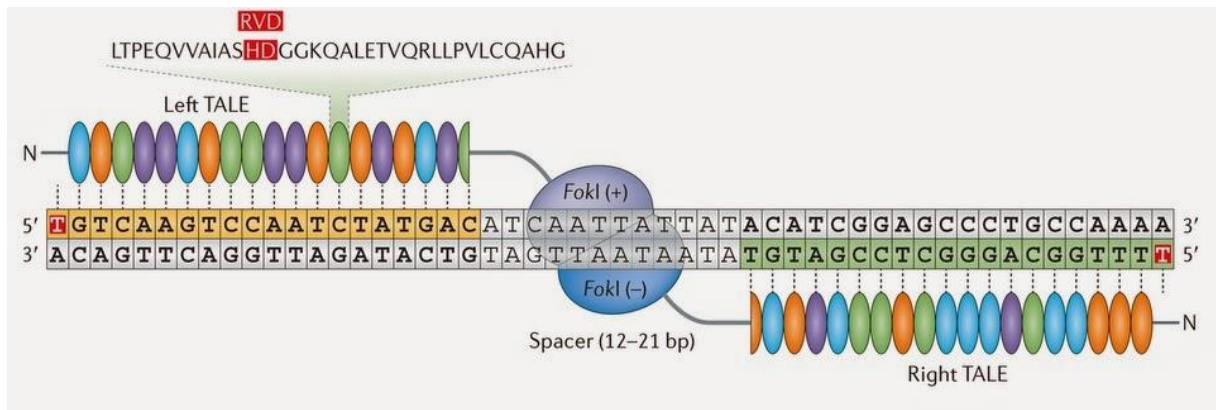


Figura 2 – Representação da estrutura e o mecanismo de ação das enzimas TALENs.

Fonte: KIM; KIM, 2014.

Tanto as ZFNs quanto TALENs apresentaram bons resultados em suas utilizações na edição do genoma, entretanto demonstraram limitações. As ZFNs necessitam de construção de sequências para cada alvo (CHEN et al., 2019). Como o número de alvos acaba se tornando limitado, havendo possibilidade de sobreposições entre o domínio catalítico e o domínio de ligação ao DNA, todas estas problemáticas podem afetar a especificidade da proteína. A ferramenta TALEN, mesmo sendo muito utilizada em laboratórios de melhoramento vegetal, mais do que ZFNs, apresenta uma grande limitação na necessidade de construir muitos números de RVDs para atuar em alvos específicos. Desta forma, ambas as ferramentas precisam de vários desenhos para cada alvo específico, caracterizando um grande desafio por serem proteínas complexas, que demandam tempo, alto custo e requerem protocolos longos para alcançar a especificidade desejada.

2.2 A descoberta do sistema CRISPR

Originalmente, o sistema CRISPR foi encontrado em procariotos, como um complexo mecanismo imunológico adaptativo mediado por RNA/proteína que bactérias e arqueas usam para se defender frente a ataques de vírus e plasmídeos, como apresentado na Figura 3.

A sigla CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats ou Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) refere-se ao arranjo gênico de pequenas regiões regulatórias repetitivas, contendo genes de RNAs pequenos e não codificantes, que conferem especificidade à defesa bacteriana: o CRISPR RNA (crRNA) e o transativador de crRNA (tracrRNA), ausente em alguns tipos de sistema CRISPR. (LOPES FILHO et al., 2020, p. 18).

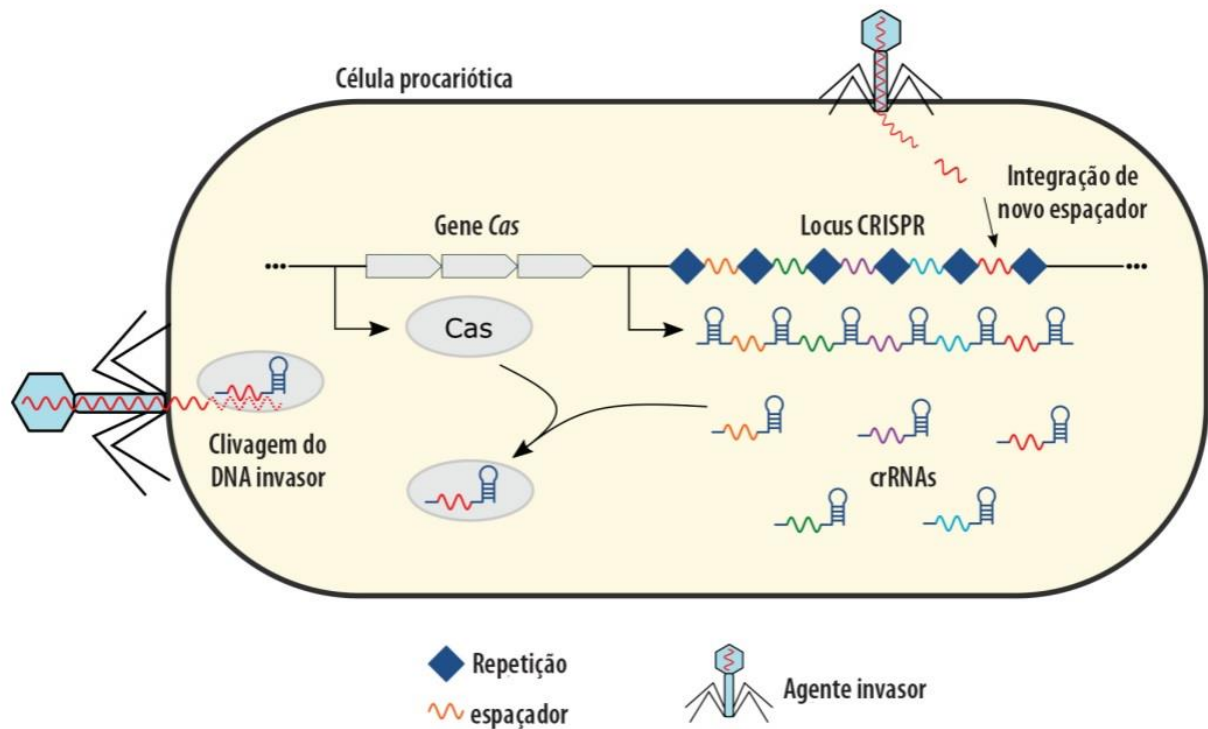


Figura 3 – Representação do sistema de imunidade CRISPR/Cas em procariotos. Uma célula procariótica, quando invadida por vírus ou plasmídeo, pode integrar parte do genoma invasor como um novo espaçador (em vermelho) em seu locus CRISPR. Em uma eventual infecção recorrente, crRNAs derivados do locus CRISPR se associam às proteínas Cas, que passam a reconhecer e clivar moléculas de DNA do invasor.

Fonte: LOPES FILHO et al., 2020.

Os diversos mecanismos CRISPR/Cas que existem em procariotos, podem ser divididos em duas classes, cada uma subdividida em três tipos, baseados nos diferentes genes Cas e na natureza do complexo efetor. Na classe 1 estão os tipos I, III, e IV, que empregam múltiplas proteínas Cas no complexo efetor, em contraste da classe 2, com os tipos II, V e VI, que possui apenas uma única proteína efetora. Como exemplo, podemos citar o sistema CRISPR/Cas9 descoberto em *Streptococcus pyogenes* (*SpCas9*), na qual pertence à classe 2, tipo II, sendo o primeiro sistema adequado para editar genomas eucarióticos usando RNA programável (GASIUNAS et al., 2012; JINEK et al., 2012).

Quatro genes (Cas1-4) foram encontrados em procariotos com sequências de DNA CRISPR, e a partir disso muitas sequências CRISPR/Cas e várias proteínas Cas foram identificadas. Em 2011, por exemplo, o sistema CRISPR/Cas de *Streptococcus thermophilus* foi explorada para conferir imunidade em *Escherichia coli* (SAPRANAUSKAS et al., 2011).

Existem no sistema CRISPR/Cas “selvagem” muitos genes Cas, endonucleases mediadas por RNA e pequenos fragmentos de RNA, chamados de “espaçadores” que são produzidos pela introdução de pequenas sequências móveis denominadas “protoespaçadores”:

Os protoespaçadores são derivados dos espaçadores únicos que se movem entre as sequências palindrômicas homólogas que se repetem quando a célula é atacada por invasores. Esses espaçadores funcionam como unidades de identificação para a célula invadida e permitem que o sistema CRISPR-Cas corte sequências de DNA estranhas (RAZZAQ; SALEEM et al., p. 9, tradução nossa).

O sistema CRISPR/Cas9 possui algumas peculiaridades. Em contraste aos tipos I e III, CRISPR/Cas9, pertencente ao tipo II, possui um diferencial importante: as moléculas de crRNA (pequeno RNA codificado; crRNA de ativação) e tracrRNA formam estruturas únicas e hibridizadas, que guiam a Cas9 para clivagem de qualquer DNA contendo sequência-alvo complementar e adjacentes ao PAM (GASIUNAS et al., 2012; JINEK et al., 2012). A diferença entre ambos é a informação da sequência que é codificada. O tracrRNA ou crRNA transativador é composto por uma sequência mais longa de bases, que são constantes e fornecem estrutura de “haste em loop”. Quando esses componentes de RNA hibridizam, eles formam um RNA guia que “programavelmente” tem como alvo nucleases CRISPR para sequências de DNA, dependendo da complementaridade do crRNA e da presença de outras características de DNA (sequência PAM reconhecida pela nuclease).

A sequência PAM (5'-NGG-3') é denominada como motivo adjacente de protoespaçador e, está conectada a cada uma dessas sequências, situada próximo à porção alvo. Esta sequência PAM foi encontrada como sendo parte altamente específica do fago estranho ou do genoma do vírus, entretanto, não está presente no locus CRISPR de bactérias e arqueas (BROUNS et al., 2008). Essa porção encontrada, consiste em dinucleotídeos conservados e é necessária nos locais de ligação do crRNA para que as proteínas Cas possam reconhecer a sequência alvo, pois, as proteínas Cas são incapazes de detectar o DNA alvo durante o reconhecimento do local PAM (RAZZAQ; SALEEM et al., 2019). A sequência PAM 5' NNNNGATT é direcionada pelas proteínas Cas em *Neisseria meningitidis*, em *S. thermophilus*, as Cas9 têm como alvo PAM 5'- NGGNG ou 5' -NNAGAA e em *S. pyogenes* PAM 5' -NGG, o que demonstra uma variabilidade em sua sequência, dependendo de cada sistema CRISPR em cada organismo procaríoto. PAM também é um mecanismo importante na distinção entre o DNA da própria bactéria e as

sequências de DNA do invasor. Características, essas, que permitem que as bactérias defendam seu próprio DNA de nucleases (MOJICA et al., 2009).

2.3 Funções e adaptações do sistema CRISPR/Cas9 na engenharia de genoma

O mais recente sistema CRISPR, não depende dessas adaptações laboriosas e caras em suas proteínas para a determinação dos alvos a serem editados. Uma simples inserção de moléculas de RNA, irão conferir a especificidade desejada do alvo (JINEK et al., 2012).

O sistema CRISPR/Cas9 foi adaptado destes procariotos e adicionado às tecnologias de edição de genoma que utilizam de nucleases projetadas. Sendo assim, há dois componentes principais no sistema CRISPR/Cas9: um único RNA guia (sgRNA) que reconhece uma sequência de DNA específica e uma proteína Cas9 que produz DSB no local alvo. Portanto, alterando o design do sgRNA, várias posições desejadas podem ser localizadas e modificadas, o que torna mais fácil de manusear do que TALEN e ZFN (JINEK et al., 2012; KIM, H.; KIM, J.S., 2014). “Esse sistema simplificado de dois componentes pode ser programado para reconhecer virtualmente qualquer sequência específica de interesse no genoma, desde que adjacente a um sítio PAM” (LOPES FILHO et al., 2020, p. 21).

Em CRISPR/Cas9, destaca-se a sua versatilidade e simplicidade de manuseio em laboratório, o que lhe conferiu várias capas de revistas científicas e jornais populares. Neste sistema não há necessidade de cortes e edição em genes exógenos para inseri-los no DNA vegetal. Aqui, as mudanças almejadas, são realizadas através de edições nos códigos genéticos das plantas em regiões específicas. Em teoria, podemos realizar modificações em qualquer gene de interesse com a técnica de CRISPR/Cas com precisão, rapidez e alta eficiência se comparado com TALENs e ZFNs (Tabela 1), e por não necessitar de genes exógenos inseridos no gene alvo, causa menos controvérsia que as técnicas convencionais de produção de transgênicos (QUADROS et al., 2018).

Tabela 1 – Comparativo das técnicas de primeira geração com a técnica de CRISPR/Cas.

PROPRIEDADES	ZFNs (2003)	TALENs (2010)	CRISPR/Cas (2012)
Proteínas (nº)	2	2	1+1 RNA
Realização	Não muito fácil	Fácil	Muito fácil
Custo de produção (€)	5.000	1.000	10
Tempo necessário	Meses	Semanas	Dias

Fonte: QUADROS et al., 2018.

A edição do genoma através de CRISPR baseia-se em uma nuclease, que é capaz de promover a quebra de dupla-fita e moléculas de sgRNA que vão direcionar a atividade da nuclease para os loci específicos do DNA (ANZALONE et al., 2020). A Cas9, com ampla utilização no sistema CRISPR é derivada de *S. pyogenes*, e estruturalmente falando, é considerada uma proteína grande (1.368 resíduos de aminoácidos) e constituída de cinco domínios (JIANG; DOUDNA, 2017).

O modo de edição do genoma é estabelecido pelo processo de reparo do DNA. A partir do reconhecimento do local alvo, o Cas9 permite que o gRNA emparelhe com a sequência alvo do DNA. De forma estrutural, a Cas9 é composta de duas enzimas: HNH, que corta as fitas complementares de DNA, e o domínio semelhante a RuvC, que cliva as não complementares ao sgRNA. Assim, a Cas9 que corta as fitas de DNA alvo de três a quatro bases a montante do motivo PAM (RAZZAQ; SALEEM et al., 2019). Os DSBs podem ser reparados pelas vias de reparo HDR e NHEJ. O método de reparo por HDR, com alta fidelidade direcionada por homologia, permite a inserção de sequências de interesse na região editada, em contraste a via NHEJ, que tende a produzir pequenas inserções e/ou deleções (indels) em torno do sítio de clivagem, como demonstrado na figura 4 (SAN FILIPPO et al., 2008; CHEN et al., 2019; ANZALONE et al., 2020). De acordo com pesquisas na área, utilizando de técnicas de edição de genoma, vários reparos de excelência foram obtidos por meio da via HDR, como por exemplo, substituição de genes, correção de DNA e *knock-in* direcionado (LI et al., 2013; SCHIML; FAUSER; PUCHTA, 2014).

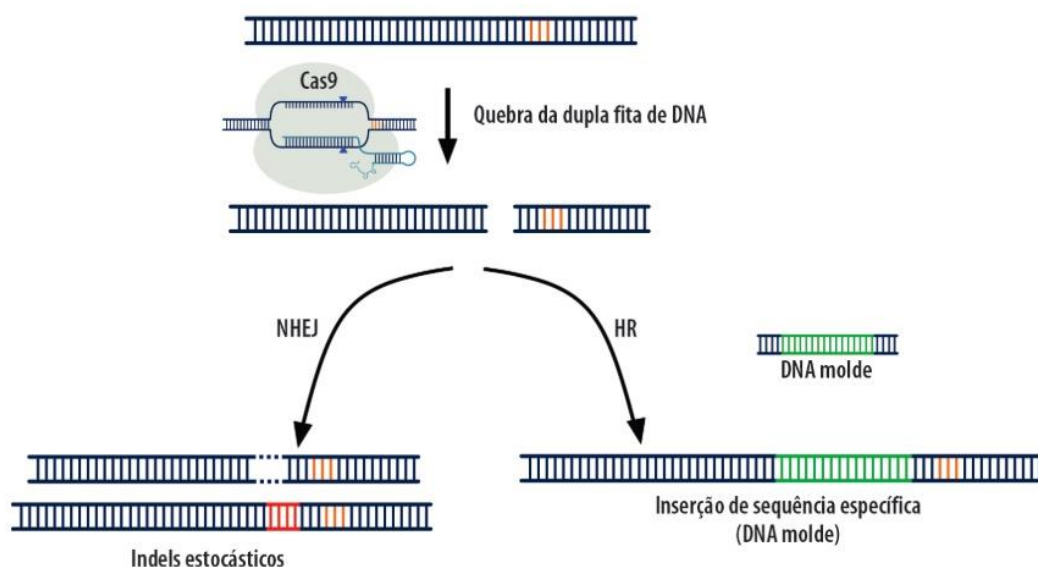


Figura 4 – Representação das vias de reparo após a clivagem pela Cas9.

Fonte: LOPES FILHO et al., 2020.

Passos simples que envolvem a execução do mecanismo CRISPR são o reconhecimento da sequência PAM; desenvolvimento de sgRNA; clonagem de sgRNA; transformação na célula hospedeira; seleção de organismos individuais transformados; e confirmação das linhagens editadas (RAZZAQ; SALEEM et al., 2019), no entanto, é importante destacar que, a especificidade de ligação da Cas9 com o DNA-alvo é determinada pela sequência PAM.

Muitos esforços são empregados com sucesso para a edição de genes direcionados por meio das ferramentas de GE de CRISPR/Cas9. Diversos fatores foram relatados que influenciam a capacidade de edição do sistema CRISPR/Cas9, incluindo DNA direcionado, conteúdo de GC, códons Cas9, estrutura de sgRNA e expressão de Cas9 e sgRNA. Todos estes fatores citados devem ser altamente otimizados para alcançarmos maior eficiência da ferramenta de edição CRISPR/Cas9. Uma das etapas mais importantes para executar a GE com alta precisão é projetar uma construção de sgRNA através de ferramentas de bioinformática (RAZZAQ; SALEEM et al., 2019). Alguns desenhos de sgRNA e suas funções estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – sgRNA desenhados através de ferramentas de bioinformática.

NOME DA FERRAMENTA	FUNÇÃO E DESCRIÇÃO	ANO
CRISPRInc	Projete sgRNA para lncRNAs Funciona para todas as espécies	2019
CRISPR-Local	Projete sgRNA para cultivares não-referência Preveja sgRNA que pode ter como alvo vários genes	2018
sgRNA Scorer 2.0	Projete sgRNA para vários sítios PAM	2017
CRISPR-P 2.0	Prever pontuações no alvo Analisar e detectar a sequência do guia	2017
CRISPRpred	Projeto eficiente de sgRNA com base na previsão do alvo <i>in silico</i>	2017
CRISPR-DO	Específico para alvos codificantes e não codificantes Fornece informações sobre locais com efeitos <i>off-target</i> e sua conservação funcional	2016
phytoCRISPR-Ex	Autônomo baseado em UNIX, previsão de alvo Cas9	2016
CRISPy	Previsão de alvo para sgRNA, representação gráfica dos resultados	2016
Cas-Designer	Endonucleases guiadas por RNA fornecem todas as informações sobre pontuações <i>off-target</i> e fora do quadro	2015
CCTop	Prevê a sequência de sgRNA alvo com base em possíveis locais <i>off-target</i>	2015
Azimuth	Projetar sgRNA para modelos <i>on-target</i> e <i>off-target</i>	2015
CRISPRdirect	Projete sgRNA com o mínimo de locais <i>off-target</i>	2014
CRISPR-PLANT	Construir sgRNAs específicos para espécies de plantas particulares	2014
CRISPRseek	Rastrear sgRNA para sequências direcionadas Produzir pontuações de clivagem para locais <i>off-target</i> previstos	2014
Cas-OFFinder	Com base em endonucleases guiadas por RNA robusto para detectar locais <i>off-targets</i>	2014
E-CRISPR	Avaliação potencial do local-alvo	2014
SSFinder	Deteção de alta taxa de transferência de locais de destino	2014
GPP Web Portal	Produzir pontuações de sgRNA potenciais	2014
CRISPR-P	Gerar sgRNA sintético, prever locais potenciais para corte de enzima	2014
CHOPCHOP	Detectar locais de destino ideais para sgRNA Produzir pontuações potenciais para locais de destino	2014
sgRNACas9	Desenho rápido de sgRNA com menos efeitos <i>off-target</i>	2014
CRISPR Design	Construção precisa de sgRNA para locais alvo, avalia locais <i>off-target</i>	2014

Fonte: RAZZAQ; SALEEM et al., 2019.

Biobalística e transformação mediada por *Agrobacterium* podem ser empregadas para transferir a proteína gRNA e cas9 em células desejadas (MIAO et al., 2013). O GE de CRISPR/Cas9 depende fortemente da escolha do promotor de sgRNA e da expressão universal da enzima Cas9. Os promotores universais de reconhecimento da RNA polimerase II, *CaMV35S*, têm sido amplamente utilizados para a expressão de Cas9 em plantas. Da mesma forma, para a expressão de sgRNA, os promotores *U3* ou *U6* reconhecido pela RNA pol III são aplicados (BELHAJ et al., 2013). Foi relatado que, o nível de expressão de sgRNAs é significativamente maior em promotores constitutivos em comparação com promotores indutíveis (SUN et al., 2015). Além disso, a expressão de sgRNA é guiada por promotores *U6*, que são derivados de variedades de monocotiledôneas ou dicotiledôneas e só podem ser usadas nas mesmas (MAO; BOTELLA; ZHU, 2017).

Dois tipos de vetores são utilizados em GE mediado por CRISPR/Cas9: um sistema de vetor único e um sistema de vetor binário. O segundo tem sido amplamente utilizado por muitos anos devido à sua capacidade de testes primários rápidos. Qualquer vetor específico com vários gRNAs e um cassete de expressão da proteína Cas9 já construído pode ser aplicado para a transformação genética de plantas. Um único vetor abrigando ambos os cassetes de expressão de gRNA e proteína Cas9 está se tornando mais promissor. Comumente, em um sistema de vetor único, os promotores acionados pela RNA polimerase III (*U6/U3*) são projetados para a expressão de gRNA, enquanto os promotores ubiquitina e *CaMV35S* baseados no reconhecimento pela RNA polimerase II são explorados para a expressão do gene *Cas9*.

Construir um cassete de expressão de sgRNA específico é etapa mais importante na edição de genes dirigida por CRISPR/Cas9 e funciona como um sistema guia para o complexo Cas9/sgRNA (NISHIMASU et al., 2014). Em plantas, a RNA polimerase III é utilizada para transcrever sgRNA, e os promotores *U3* e *U6* são quem controlam a sua expressão (LI et al., 2013). Gao e Zhao utilizaram um mecanismo de ribozima para gerar sgRNA por transcrição de pré-RNA através da RNA polimerase II, em que promotores indutíveis ou constitutivos podem ser ligados para obter a função desejada de sgRNA (GAO; ZHAO, 2014).

Dito isso, para a utilização da técnica de GE mediada por CRISPR/Cas9, o vetor contendo os cassetes de expressão de ambos (*sgRNA* e *Cas9*) deve ser transportado para locais-alvo da célula vegetal. Técnicas de biobalística e mediada

por polietilenoglicol (PEG), podem ser utilizadas para a entrega direta de cassetes de expressão do gene *Cas9*, sendo a abordagem de biolística comumente mais utilizada (RAZZAQ; SALEEM et al., 2019). Atualmente existem estudos e aplicações de um sistema de expressão transiente para transferir o vetor para o protoplasto para analisar a eficiência e a viabilidade da utilização do sistema CRISPR/Cas9 (JIANG et al., 2013). Entretanto, é difícil regenerar plantas a partir da utilização de protoplastos, devido às mutações direcionadas hereditárias, representando uma grande desvantagem desta abordagem em muitas espécies de plantas (RAZZAQ; SALEEM et al., 2019). Em contraste, a transformação mediada por *Agrobacterium*, é uma abordagem altamente eficiente para a transformação estável do sistema CRISPR/Cas9 em dicotiledôneas e monocotiledôneas (ZHANG et al., 2018).

Cas9 é uma enzima pequena, na qual possui uma relativa facilidade de entrega para a célula, juntamente com os sgRNAs, caracterizando a possibilidade de alterar simultaneamente mais de um loci em um único genoma, técnica conhecida como multiplexação ou edição de genoma multiplex. Essa característica torna a técnica mais versátil se comparada com as técnicas de primeira geração, que já são técnicas menos adequadas para a edição de genes multi-locus devido ao seu tamanho, que requer um par de proteínas que reconheçam fitas complementares de DNA para a introdução de DBSs. “Essa versatilidade é importante para o melhoramento de características determinadas por QTLs (do inglês *Quantitative Trait Loci*), ou seja, aquelas controladas por múltiplos loci do genoma” (RODRÍGUEZ-LEAL et al., 2017).

As várias características atrativas da técnica de CRISPR/Cas9 traz muitas vantagens, dentre elas, a característica de co-entrega mediada por plasmídeo de múltiplos sgRNAs e *Cas9* para a célula vegetal, tornado possível a alteração simultânea de mais de um loci-alvo, permitindo a edição do genoma multiplex (KHURSHID; JAN; SHINWARI et al., 2018).

Recentemente, métodos foram propostos para desenvolver módulos de gRNA e configurar cassetes de expressão com vários gRNAs em plantas. A aplicação desses recursos de ampla gama compostos de vetores binários e gRNA são altamente compatíveis com os requisitos de uma série de sistemas de plantas em condições complexas. Isso oferece aos pesquisadores a capacidade não apenas de personalizar seu módulo de gRNA de acordo com sistemas específicos da planta, mas também de empregar vários gRNAs em um único cassete para edição de genoma multiplex. (KHURSHID; JAN; SHINWARI et al, 2018, p. 48)

Por meio da edição multiplex do genoma, deleções cromossômicas de algumas centenas de pares de bases até dezenas de milhares foram feitas em *Nicotiana*

benthamiana (BELHAJ et al., 2013), *Arabidopsis* (MAO et al., 2013; LI et al. , 2013) e arroz (ZHOU et al., 2014). Esta ferramenta permite que pesquisadores deletem agrupamentos inteiros de genes, excluindo fragmentos cromossômicos (KHURSHID; JAN; SHINWARI et al., 2018).

Desde o seu advento como ferramenta de edição de genoma moderna, numerosos estudos de pesquisa avaliaram o possível papel do sistema CRISPR/Cas9 Tipo II na regulação da expressão gênica, *knock-in* e *knock-out* do gene, mutação específica do local e mecanismos epigenéticos em vários organismos. Além disso, sua aplicação em plantas e agricultura está gradativamente se tornando o foco de pesquisadores à medida que a ferramenta oferece maneiras novas e eficientes de manipular o genoma de uma planta para atender a um amplo conjunto de condições impostas (KHURSHID; JAN; SHINWARI et al, 2018).

Nas plantas, os processos celulares são configurados por diversos genes redundantes. Às vezes, a mutação de um único gene pode não caracterizar um fenótipo desejado devido ao efeito de compensação produzido por outros genes na mesma família de genes. Portanto, como consequência, um sistema de edição atualizado com eficiência aprimorada é necessário para a edição de genes multiplex em plantas. Em edições multiplex mediado por CRISPR/Cas9, muitos cassetes de sgRNA podem ser projetados usando promotores únicos ou múltiplos em um sistema de vetor único (LIU et al., 2017; HEIGWER; KERR; BOUTROS, 2014). A GE multiplex mediada por CRISPR/Cas9 é uma abordagem conveniente e aos poucos torna-se importante para eliminar vários genes de uma vez e ajudar a decifrar a função de uma família de genes desejada que regula vários processos biológicos. Além disso, também é benéfico para descobrir a associação epistática entre os genes em vários processos genéticos (RAZZAQ; SALEEM et al., 2019).

2.3.1 Ribonucleoproteínas no sistema CRISPR/Cas

Uma das condições impostas pela atualidade, se tornando uma demanda crescente, é a necessidade de uma abordagem em produzir plantas livres de transgenia, o que se tornou possível através da técnica de CRISPR/Cas9.

Para desenvolver plantas geneticamente editadas com genoma livre de DNA exógeno, técnicas de bombardeamento de partículas e transformação de protoplastos têm sido comumente empregadas (RAZZEQ; SALEEM et al., 2019).

Dito isso, existem algumas alternativas possíveis, e uma delas é a entrega direta de RNPs (ribonucleoproteínas). Segundo Prado et al., (2020, p. 58) “as RNPs são complexos ribonucleoproteicos compostos por uma nuclease e um ou mais gRNAs. De acordo com a literatura científica, os RNPs são comumente empregados na edição do genoma de células animais e, em contraste com os vetores plasmidiais, apresentam baixíssima citotoxicidade para o hospedeiro, pois a citotoxicidade geralmente está relacionada ao próprio processo de transfecção do plasmídeo e a alguns reagentes usados para a transfecção (PRADO et al., 2020).

RNPs sgRNA/Cas9 têm uma maior capacidade em produzir plantas editadas sem DNA exógeno e com baixa frequência dos chamados efeitos fora do alvo (*off-target*) e é mais eficiente do que um sistema de edição mediado por plasmídeo. O sistema baseado em RNP não precisa de aparatos de transcrição e tradução para a criação de quebras na fita de DNA alvo e, após a clivagem, se desintegra. Em 2015, Woo e equipe realizaram a GE sem DNA exógeno pela primeira vez em arroz, tabaco, alface e *Arabidopsis* utilizando o sistema de RNPs. A descoberta de um sistema de edição sem a presença de DNA exógeno, certamente simplificará a GE das plantas e ajudará a inserir as plantas editadas futuramente, no mercado consumidor (RAZZAQ; SALEEM et al., 2019).

2.3.2 dCas9

Diversos estudos realizados com a enzima Cas9, demonstraram que alterações específicas em domínios HNH ou RuvC podem converter a enzima em uma nicase. Nicase é uma enzima capaz de clivar um dsDNA (dupla-fita) em somente uma das fitas, sem interferir na sua capacidade de reconhecimento específico guiado por RNA, sendo denominada como *dead* Cas9 ou dCas9 (JIANG; DOUDNA, 2017; JINEK et al., 2014, 2012). Portanto, as funções e utilidades do sistema CRISPR/Cas9 vão além das modificações em sítios-alvo e ativação das vias de reparo:

A proteína dCas9 oferece uma plataforma única, multifuncional e dinâmica para o recrutamento de proteínas com funções diversas a locais específicos do genoma para promover, por exemplo, o controle da regulação da transcrição, a edição epigenômica, a edição de bases e o imageamento do genoma. (MORGANTE et al., 2020, p. 128)

Essas modificações realizadas na enzima Cas9 transforma a ferramenta em uma potência na GE em regulações transcricionais de genes codificadores e não codificadores de proteínas, tornando-se uma ferramenta versátil, podendo ser utilizada como sistema de ativação (CRISPRa, ativador) e repressão (CRISPRi, interferente) durante o processo de transcrição, entretanto, de forma reversível, já que não altera permanentemente o genoma, possuindo, ainda, capacidade de regulação em nível multigênico, com diversos genes que podem ter sua expressão modulada ao mesmo tempo em sentidos opostos (MORGANTE et al., 2020). Ainda, de acordo com a autora, o sistema dCas9 é construída e, resumidamente, funciona da seguinte forma apresentada:

A dCas9 e/ou o sgRNA são fusionados a moduladores transcricionais (ModT), que atuam tanto na ativação quanto na repressão da transcrição. São proteínas ou domínios de proteínas capazes de se ligar ao DNA e recrutar elementos transcricionais-chave para o controle da expressão de genes. Dessa forma, CRISPR/dCas9 pode ser vista como uma plataforma genérica e universal, uma vez que é capaz de promover a ativação e repressão transcricional em diferentes níveis, além de ser transponível a diferentes espécies. Nesse sentido, um mesmo repressor ou ativador transcricional pode ser usado para a regulação da transcrição em células de diferentes espécies, com eficiências variando em função da região-genômica-alvo, desenho do sgRNA, estratégia de entrega (método de transformação) e do sistema biológico estudado. (MORGANTE et al., 2020, p. 130-131).

A ferramenta CRISPR/dCas9 é uma tecnologia simples e poderosa no sistema de transformação transiente, que pode simular e visualizar rapidamente a influência da regulação da expressão do gene alvo nas vias metabólicas celulares. As diferentes estratégias disponíveis, diferentes elementos, como ModT e nucleases, permitem que a tecnologia seja adaptada e utilizada em diferentes modelos de pesquisa. Nesse caso, o aprimoramento contínuo da tecnologia visa principalmente melhorar sua especificidade e eficiência, por exemplo, a utilização de outros ortólogos Cas permitirá a expansão de seu uso, principalmente na pesquisa de plantas cultivadas, pois atualmente, a pesquisa é conduzida apenas em espécies modelo (MORGANTE et al., 2020).

2.4 Aplicações do sistema CRISPR/Cas9 em biotecnologia vegetal

O sistema CRISPR utilizado na edição de genes de plantas por CRISPR/Cas9 fez surgir uma nova revolução no trabalho de melhoramento genético e garantiu mudanças no progresso da pesquisa em biotecnologia. Em comparação com outros métodos que regulam o metabolismo das plantas e genes-alvo relacionados ao sistema imunológico, a grande vantagem desta tecnologia inovadora reside na capacidade de alterar regiões específicas do DNA, personalização do sistema, baixo custo e tolerância ao estresse necessária para edição produzindo colheitas com melhorias necessárias (QUADROS et al., 2018). Toda a tecnologia envolvida na técnica CRISPR revolucionou a pesquisa no campo das ciências da vida e desencadeou uma competição no campo da biotecnologia que é verdadeiramente aplicada ao agronegócio (REGALADO, 2016). Vários estudiosos e institutos envolvidos na área estão relatando que a tecnologia CRISPR/Cas9 é a maior descoberta biotecnológica deste século.

No que tange o agronegócio, as mudanças climáticas e o rápido aumento da população mundial são duas das principais preocupações que ameaçam a produção agrícola e a segurança alimentar em todo o mundo (SCHEBEN; EDWARDS, 2017). Diversos fatores de estresse biológico (bactérias, vírus, fungos, insetos, nematóides, etc.) e estresses abióticos (seca, salinidade, alta temperatura, frio, inundações, etc.) dificultam e prejudicam a produção agrícola global e colocam em risco a segurança alimentar. Os melhoristas agrícolas estão realizando esforços desenvolver safras resistentes ao clima e ao estresse, com melhor qualidade e rendimentos mais elevados (ZAID et al., 2016).

Portanto, o sistema CRISPR/Cas9 tem muitas aplicações na pesquisa em genômica funcional de genes de plantas, genes estes, que desempenham um papel vital no melhoramento genético de muitas características agronômicas importantes e de interesse mundial. Em particular, o nocaute de certos genes pode promover propriedades excelentes, incluindo resistência a doenças, adaptação a vários estressores não biológicos, utilização de nutrientes e melhorias na produção (RAZZAQ; SALEEM et al., 2019).

2.4.1 Produtividade vegetal e qualidade dos alimentos

Duas características agrícolas importantes são o rendimento e a qualidade das colheitas que se beneficiam do sistema CRISPR/Cas9, proporcionando alterações pontuais que conferem diversos benefícios pra agricultura moderna, como podemos conferir na Tabela 3.

Tabela 3 – Aplicações CRISPR/Cas9 nas principais culturas para aumento de produtividade e qualidade vegetal

PLANTA	GENE-ALVO	MELHORIA	EDIÇÃO	VIA DE REPARO	TÉCNICA DE ENTREGA
<i>Triticum aestivum</i>	<i>TaGW2</i>	Peso do grão	<i>Knock-out</i>	HDR	Bombardeio de partículas
<i>Oryza sativa</i>	<i>OsAAP3</i>	Rendimento do grão	<i>Knock-in</i>	NHEJ	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>
<i>Oryza sativa</i>	<i>OsCCD7</i>	Alto perfilhamento	<i>Knock-out</i>	NHEJ	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>
<i>Glycine max</i>	<i>GmFT2a</i>	Floração atrasada	<i>Knock-out</i>	NHEJ	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>
<i>Oryza sativa</i>	<i>GW5</i>	Peso do grão	<i>Knock-out</i>	NHEJ	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>
<i>Oryza sativa</i>	<i>OsSWEET11</i>	Peso do grão	<i>Knock-out</i>	NHEJ	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>
<i>Oryza sativa</i>	<i>OsGRF4</i>	Tamanho do grão	<i>Knock-in</i>	NHEJ	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>
<i>Oryza sativa</i>	<i>IPA, GS3, DEP1, Gn1a</i>	Melhor rendimento	<i>Knock-out</i>	NHEJ	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>
<i>Oryza sativa</i>	<i>GS3, GW2, GW5, TGW6</i>	Peso do grão	<i>Knock-out</i>	NHEJ	Transformação mediada por <i>Agrobacterium</i>
<i>Triticum aestivum</i>	<i>GASR7</i>	Peso do kernel	<i>Knock-out</i>	HDR	Bombardeio de partículas
<i>Triticum aestivum</i>	<i>α-gliadina</i>	baixo glúten	<i>Knock-out</i>	HDR	Bombardeio de partículas

Fonte: RAZZAQ; SALEEM et al., 2019.

A produtividade é um atributo complexo que envolve muitos fatores exclusivos de cada cultura. Alguns exemplos utilizados de características que podem afetar a produtividade incluem o número e tamanho dos frutos e grãos, estrutura da planta e

biomassa (CHEN et al., 2019). Muitos fatores relacionados à produtividade são quantitativos e controlados pelo QTL. Nesse sentido, a edição do genoma do CRISPR é em si uma ferramenta poderosa para melhorias, pois estratégias de multiplexação podem ser usadas para editar diferentes QTLs ao mesmo tempo com relativa facilidade (SEDEEK et al., 2019).

Em arroz, por exemplo, a eliminação de três genes simultaneamente através da técnica multiplex em CRISPR, que regulam negativamente o peso do grão (GW2, GW5 e TGW6) resultou em um aumento de cerca de 30% (XU et al., 2016). “O potencial da ferramenta fica evidente no estudo. Ainda que mutantes individuais para cada um desses genes já fossem conhecidos, eles estavam presentes em diferentes backgrounds genéticos” (LOPES FILHO et al., 2020, p. 28). Foi relatado que o gene OsSWEET11 tem um papel crucial no enchimento de grãos e transporte de sacarose. Assim, a técnica de CRISPR/Cas9 foi aplicado para interromper o gene OsSWEET11, o que levou à diminuição da concentração de sacarose e redução do peso do grão. Este estudo sugeriu que a superexpressão desse gene pode ser benéfica para maximizar o rendimento do arroz (MA et al., 2017).

Resultados de diversos estudos demonstraram que CRISPR/Cas9 é uma tecnologia eficiente para melhorar o rendimento da cultura (ZHANG et al., 2018; LI et al., 2016). O conteúdo nutricional é outro fator de particular interesse, pois produtos ricos em determinadas substâncias podem ser usados diretamente como fonte de nutrição ou na produção de insumos alimentares (LOPES FILHO et al., 2020). No tomate, por meio de abordagem multiplex, a via de conversão do licopeno em α -caroteno e β -caroteno é inibida. Como resultado, o licopeno se acumula na fruta (LI et al., 2018).

A tecnologia CRISPR / Cas9 também tem muitas aplicações na melhoria da qualidade da cultura, como qualidade de armazenamento, valor nutricional, aroma e teor de amido. Por exemplo, usando CRISPR / Cas9 para mutar o gene *Waxy* para melhorar a qualidade de cozimento e propriedade alimentar do arroz (ZHANG et al., 2018). Outro exemplo importante de ser citado, é o valor nutricional do arroz que foi melhorado através da deleção do gene *SBEIIb*, o que resultou em mais síntese de amilose (SUN et al., 2017).

Recentemente, alguns outros estudos para melhoria da qualidade foram realizados por meio do sistema CRISPR/Cas9, como *Brassica napus* com alta concentração de ácido oleico (OKUZAKI et al., 2018) e longa vida de prateleira de

tomates (LI et al., 2018). Resumidamente, os estudos acima mostram que técnicas modernas de melhoramento mediadas por CRISPR/Cas9 podem ser usadas para obter mutações valiosas para melhorar o rendimento e a qualidade da colheita.

2.4.2 Resistência a fatores bióticos

Pragas e doenças também entram no patamar dos maiores desafios da agricultura moderna. Melhorar a tolerância ao estresse biológico é uma das maiores demandas para aplicações de edição de genoma (RICROCH et al., 2016). Vírus, bactérias, fungos, nematóides e insetos são os principais patógenos que causam estresse biológico e redução da produtividade das culturas. Além disso, o aumento contínuo de várias novas espécies de pragas mortais torna a luta contra esses patógenos muito desafiadora (AL-SADI et al., 2012). Portanto, para proteger a agricultura dos efeitos destrutivos dos fatores de estresse biológico, é muito importante entender a interação entre plantas e patógenos.

A estratégia de GE foi aplicada com sucesso para explorar a interação entre plantas e patógenos e o mecanismo de resposta das plantas aos ataques de patógenos. A ferramenta GE mediada por CRISPR/Cas9 pode ser usado diretamente para destruir genes causadores de doenças chamados "genes S" e desenvolver colheitas resistentes a doenças (RAZZAQ; SALEEM et al., 2019). Um método possível é editar os fatores da planta hospedeira usados pelos patógenos para estabelecer a infecção e/ou replicação, promovendo assim a imunidade da planta (SEDEEK et al., 2019). Por exemplo, o gene CsLOB1 foi identificado como gene da suscetibilidade ao cancro cítrico (HU et al., 2014), doença causada pelo patógeno *Xanthomonas citri* que afeta diversas espécies cítricas. Ao editar o promotor e a região codificadora do gene CsLOB1, foram desenvolvidas cepas de laranja (*Citrus sinensis*) e toranja (*Citrus paradisi*) resistentes ao cancro cítrico (JIA et al., 2017; PENG et al., 2017). Em outro estudo, o GE multiplex mediado por CRISPR/Cas9 foi realizado para mutar três homólogos do gene EDR1 para desenvolver resistência contra o oídio em trigo (ZHANG et al., 2017).

Por meio de plataformas aprimoradas de Cas9/sgRNA, mutações bialélicas e homozigóticas foram introduzidas com uma taxa de mutação máxima de 85,4% (MA et al., 2015). "Mutações específicas foram introduzidas através da entrega de sgRNA e Cas9 em protoplasto de arroz para direcionar as regiões promotoras de

OsSWEET11 e OsSWEET14, genes de susceptibilidade à mancha bacteriana” (KHURSHID; JAN; SHINWARI et al, 2018, p. 49).

Outros exemplos a serem citados são as plantas de tomate que são infectadas pelo fungo *Oidium neolycopersici*, que é o agente causador do oídio. Deletando o gene SIMlo1 do tomateiro, foi possível caracterizar resistência ao patógeno (NEKRASOV et al., 2017). A bactéria *Xanthomonas citri* spp. *citri* é o agente causador do cancro cítrico e é extremamente destrutiva em pomares de frutas cítricas no Brasil e em outras regiões do mundo. Através da retirada de diferentes alelos do gene CsLOB1 presentes na toranja, foi possível desenvolver frutos resistentes ao cancro cítrico (PENG et al., 2017).

Além das bactérias mencionadas, existe o ataque realizado por vírus causadores de graves problemas em safras no mundo todo. Estima-se que cerca de metade das doenças das plantas são causadas por vírus virulentos, que resultam em grandes perdas de safras à nível global (ZAID et al., 2016). A eficiência de direcionamento de genes foi melhorada muitas vezes pelos amplicons do vírus de DNA. “A superexpressão estável de sgRNAs e Cas9 que visam particularmente o genoma do vírus *Gemini* para prevenir seu crescimento foi aplicada para programas de melhoramento de culturas resistentes a vírus” (JI et al., 2018; ALI et al., 2015). Além de técnicas como as supracitadas, o sistema CRISPR/Cas9 pode ser otimizado para transformar genomas virais, além de combater as patologias causadas (ZAID et al., 2016). Dito isso, a eficiência da GE viral mediada por CRISPR/Cas9 pode ser melhorada se beneficiando da utilização de promotores virais para controlar cassetes de expressão de sgRNA/Cas9 (JI et al., 2018).

Recentemente, um novo ortólogo de Cas9 foi descoberto em *Francisella novicida* (FnCas9) para editar genomas de vírus de RNA. O FnCas9 inibiu com grande eficiência a replicação do vírus do mosaico do tabaco, bem como do vírus do mosaico do pepino, fornecendo imunidade contra eles (ZHANG et al., 2018).

Sendo assim, a edição de genomas através da técnica de CRISPR/Cas9 é excepcional para aprimorar a composição genética, permitindo combater diversos patógenos de interesse agrícola.

2.4.3 Resistência a fatores abióticos

O estresse abiótico é fator que também se tornou preocupante para a produção agrícola mundial. Dado que as condições de seca e temperaturas extremas têm aumentado constantemente, o cenário atual de mudanças climáticas é particularmente preocupante (TONG; EBI, 2019; SIPPEL et al., 2020). Embora o aumento da tolerância a estresses abióticos tenha despertado grande interesse, essas ações são prejudicadas pela forma como as plantas respondem a esses fatores, que muitas vezes envolvem vias metabólicas complexas. No entanto, alguns esforços para melhorar a resistência ao estresse abiótico têm sido bem-sucedidos (LOPES FILHO et al., 2020). Ainda, de acordo com Lopes Filho et al. (2020, p. 33),

Pesquisadores da DuPont Pioneer, por exemplo, foram capazes de melhorar a tolerância à seca em milho a partir da edição do gene ARGOS8, um inibidor da resposta a etileno que normalmente é expresso em baixas quantidades. Nesse trabalho, por meio de uma abordagem HDR, o promotor de outro gene, GOS2, foi inserido na região 5'UTR de ARGOS2, aumentando assim sua expressão. Como resultado, as linhagens desenvolvidas sobrevivem mais e têm produtividade melhorada em condições de seca (LOPES FILHO et al., 2020, p. 33).

A tecnologia CRISPR/Cas9 tem sido amplamente utilizada em culturas importantes como trigo, arroz, milho, algodão, soja, tomate e batata para lidar com vários estresses abióticos (LOPES FILHO et al., 2020). Um programa de melhoramento de plantas moderno para culturas tolerantes ao estresse abiótico desenvolvido por meio de ferramentas CRISPR/Cas9 se torna possível.

O protoplasto do trigo é um exemplo passível de ser mencionado. Dois genes relacionados ao estresse abiótico, *TaDREB3* e *TaDREB2*, foram estudados usando a técnica CRISPR/Cas9. Com um ensaio de endonuclease T7, a expressão de genes mutados foi confirmada em aproximadamente 70% dos protoplastos transfetados. Em comparação com as variedades selvagens, as plantas mutantes apresentaram maior tolerância à seca. Outro exemplo é o arroz, na qual três de seus genes denominados proteína quinase ativada por mitogênio (*OsMPK2*), fitoeno dessaturase (*OsPDS*) e betaína aldeído desidrogenase (*OsBADH2*) foram editados usando a técnica CRISPR/Cas9. Para a transformação do maquinário CRISPR/Cas9, métodos de bombardeio de partículas e transformação de protoplastos foram usados e revelaram que esses genes são responsáveis por regular muitos estressores abióticos (SHAN et al., 2015).

Conseqüentemente, os estudos acima revelaram que as alterações baseadas em CRISPR / Cas9 têm enorme potencial para o desenvolvimento de culturas resistentes ao clima.

2.6 Biossegurança e CRISPR

A regulamentação do uso de produtos obtidos por meio de técnicas de edição de genomas tem sido tema de grandes debates no mundo todo. O foco da discussão está na classificação ou não em Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) dos produtos obtidos por diferentes estratégias de uso de nucleases de corte direcionado no DNA (*Site-directed Nucleases*; SDN).

Em âmbito internacional, a Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB) e o Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança (PCB) estabelecem parâmetros para nortear as atividades que envolvem OGMs e derivados.

Para usar CRISPR/Cas9 em sistemas vegetais, a metodologia padrão é inserir o gene "Cas9" e a sequência de RNA guia diretamente no DNA da célula vegetal, que juntos codificam para a "máquina de edição" CRISPR. Quando o gene Cas9 for ativado pelas vias requisitadas, ele irá localizar e reescrever partes específicas e de interesse do pesquisador, do genoma da planta para criar novas características desejáveis. Através de cruzamentos clássicos, é possível, posteriormente, obter plantas editadas sem o gene da Cas9. Um ponto importante a ser levantado por todos da área do agronegócio, o que inclui legisladores, os institutos de ensino, os empresários, os influenciadores e principalmente os consumidores, é se a técnica de GE deve ser comparada igualmente com a modificação genética por transgenia, temas de longos debates nacionais e internacionais (QUADROS et al., 2018).

Países como a China, aderiu ao conceito de "GMO-friendly polices", uma política interna que trata de forma "amigável" os organismos geneticamente modificados. Em outros países europeus, seus líderes vêm discutindo se aderem ao movimento de afrouxar as leis que regulamentam essas técnicas (QUADROS et al., 2018).

Levando em consideração todo o potencial e benefícios que as novas ferramentas biotecnológicas, como é o caso de CRISPR/Cas9, podem trazer, surge a enorme necessidade de um planejamento integrado para permitir a regulamentação com base científica (BORGES, 2018; FLAVELL, 2017). Mas com exceções, segundo Quadros et al. (2018, p. 13), devem haver menores questões a serem levadas em conta e alguns testes ainda serão de extrema importância para estabelecer a regulamentação da ferramenta de GE:

Neste contexto, os trabalhos realizados com a edição gênica por CRISPR/Cas9 em plantas causam menor impacto em questões éticas, pois se em uma planta for verificada alterações genéticas graves, esta será simplesmente descartada. Torna-se importante também a realização de testes de alergenicidade e toxicidade, no sentido de garantir o alimento seguro. (QUADROS et al., 2018, p. 13).

A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), órgão governamental vinculado ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, responsável pela formulação, atualização e implementação da Política Nacional de Biossegurança de OGMs, no estabelecimento de normas técnicas de segurança e de pareceres técnicos referentes à autorização para atividades que envolvam pesquisa e uso comercial de OGMs e seus derivados (CTNBIO, 2021), vem discutindo todas as questões legais que envolvem a engenharia do genoma através do sistema CRISPR/Cas9, no país:

“Em sua Resolução Normativa Nº 16, de 15 de janeiro de de 2018, estabelece os requisitos técnicos sobre as técnicas inovadoras de melhoramento de precisão, em que se enquadram estas novas tecnologias de edição genética, tais como: nuclease do tipo dedo de zinco (ZFNs), Nucleases com efetores do tipo ativador transcricional (TALENs) e, claro, CRISPR, entre outras. Esta normativa torna claro o conceito de que estas técnicas diferem fundamentalmente da transgenia clássica” (QUADROS et al., 2018, p. 13).

O primeiro caso relatado, em que a CTNBio foi favorável à liberação comercial de um microrganismo, ocorreu em Junho de 2018 com a levedura “Excellomol 4.0” da empresa GlobalYeast, que foi editada através do sistema CRISPR/Cas9. Segundo a CTNBio ela não se enquadrava na categoria de OGM nos termos da Legislação Brasileira de Biossegurança e Resolução Normativa Nº 16 (QUADROS et al., 2018; CTNBio).

Portanto, é importante que o Brasil, com urgência, dê um salto e comece a discutir rapidamente estas questões legais, implementando mudanças em sua legislação que regulamenta comercialização de OGMs, para assim, se tornar uma potência a nível internacional. Entretanto, os resultados de todos os trabalhos já executados com a ferramenta CRISPR/Cas9 de forma responsável, devem ser analisados levando em consideração os possíveis impactos causados por embaralhamento gênicos, e avaliados no sentido de garantir uma alimentação segura para pessoas, animais e sempre observando os eventuais impactos no meio ambiente afim de reduzi-los ou extingui-los.

Considerações Finais

Por muito tempo, a sociedade no geral, e principalmente o setor do agronegócio, buscam por alimentos mais seguros e rentáveis para o consumo humano e animal. Com o passar dos anos, a tendência da população global é crescer cada vez mais e, com isso, é necessário suprir a demanda de alimentação da população mundial, entretanto, a necessidade de se consumir alimentos seguros e saudáveis cresce na mesma proporção. Com o surgimento de novas tecnologias para se criar culturas com melhorias desejáveis, pesquisadores vêm desenvolvendo técnicas e protocolos cada vez mais otimizados para a edição do genoma de cultivos de interesse, que possam conferir uma melhor produtividade, maior qualidade da safra, longa vida de prateleira, resistência a pragas e patógenos, ao clima, condições de salinidade etc.

Com o advento de técnicas de edição do genoma, como TALENs e ZNFs, nas últimas três décadas, isso se tornou possível, entretanto, são técnicas caras, demoradas e laboriosas. Na busca por melhores métodos, o sistema CRISPR/Cas foi descoberto em bactérias e arqueas, inicialmente, como um método de imunidade destes microrganismos. Através de observações, estudos e testes, a metodologia CRISPR demonstrou melhor especificidade, eficiência, o que contribuiu em sua aplicação em diversos setores biotecnológicos. Na biotecnologia vegetal, pela sua facilidade, versatilidade e baixos custos, a técnica se disseminou rapidamente por melhoristas no mundo todo.

Como esperado, os estudos realizados em GE direcionada utilizando o sistema CRISPR na edição genômica em plantas, apontaram bons resultados, contribuindo extraordinariamente para o agronegócio, como a produção de cultivos melhores em produtividade, qualidade e resistência aos fatores bióticos e abióticos. Com protocolos cada vez mais otimizados, vários sistemas CRISPR são possíveis de serem criados para os mais diversos fins, que vão além das melhorias supracitadas, apenas editando a enzima Cas9 e RNAs guias, como por exemplo, melhor compreensão de vias metabólicas em plantas, mutagênese em loci específico, silenciamento e ativação gênica, mutações em *multiplex*, substituições. Já que a edição genômica por CRISPR não requer a inserção de um DNA exógeno para atingir uma característica desejada, não é considerado um OGM.

Entretanto, é considerado pela comunidade científica que, apesar dos grandes benefícios conduzidos pela GE com CRISPR/Cas, ainda são necessários maiores estudos e testes para melhor compreensão da técnica, possíveis aplicações futuras, protocolos otimizados na utilização da enzima Cas e suas variantes, RNAs guias, entrega do complexo Cas/sgRNA no DNA de plantas, além das contribuições com o meio ambiente, e para a regulamentação de produtos agrícolas.

A partir disso, será possível consolidar a metodologia do sistema CRISPR/Cas na edição de genomas, contribuindo para a inserção de alimentos seguros no mercado consumidor, pauta que está em constante discussão em Conselhos de Ética no mundo todo, para definir se a técnica cria organismos que se inserem na ótica de OGMs. No Brasil, esta situação ainda está amadurecendo, mas em países europeus, na China, a discussão está bem avançada e produtos editados com CRISPR/Cas já são liberados para consumo.

Conclusões e perspectivas futuras

Conclui-se que as técnicas e protocolos utilizados na edição de genomas através da técnica CRISPR/Cas9 são ótimas alternativas na edição de genes de plantas.

A técnica CRISPR/Cas9 funciona mediante utilização da enzima Cas e de RNAs guias, de maneira direcionada.

Através da edição genômica mediada por CRISPR/Cas diversas características de interesse produtivo, ambiental e econômico podem ser conferidas em plantas e safras.

Ainda são necessários mais estudos para extrair total utilização do sistema CRISPR/Cas, através de reprogramação do sistema com diversas variantes da enzima Cas.

Através de maiores discussões, será possível inserir produtos livres de transgene no mercado consumidor através do advento da técnica CRISPR/Cas9.

Novas discussões éticas são necessárias à respeito da utilização do sistema CRISPR/Cas em GE de plantas.

No Brasil, ainda é necessário elucidar e caracterizar bem a técnica de CRISPR/Cas na obtenção de características desejadas dentro da visão ética, para

que, futuramente, os órgãos competentes possam regulamentar suas normas de liberação de organismos editados geneticamente.

Referências bibliográficas

ALI, Z.; ABULFARAJ, A.; IDRIS, A.; ALI, S.; TASHKANDI, M.; MAHFOUZ, M.M. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. **Genome Biol.** 2015, v. 16, p. 238.

AL-SADI, A.M.; AL-MOQBALI, H.S.; AL-YAHYAI, R.A.; AL-SAID, F.A. AFLP data suggest a potential role for the low genetic diversity of acid lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) in Oman in the outbreak of witches' broom disease of lime. **Euphytica.** 2012, 188, p. 285–297.

ANZALONE, A. V.; KOBLAN, L. W.; LIU, D. R. Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 824–844, 2020, DOI: 10.1038/ s41587-020-0561-9.

BALTES, N. J.; GIL-HUMANES, J.; VOYTAS, D. F. Genome engineering and agriculture: opportunities and challenges. WEEKS, D. P.; YANG, B. (Ed.). Gene editing in plants. San Diego: **Elsevier**, 2017. p. 1–26. (Progress in molecular biology and translational science, 149). DOI: 10.1016/ bs.pmbts.2017.03.011.

BELHAJ, K.; CHAPARRO-GARCIA, A.; KAMOUN, S.; NEKRASOV, V. Plant genome editing made easy: Targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. **Plant Methods.** 2013, 9, 39.

BORGES, B.J.P. **Regulamentação de Biossegurança de Organismos Geneticamente Modificados: uma abordagem a partir da dinâmica da ciência.** 2018. 75f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES. 2018.

BROUNS, S.J.; JORE, M.M.; LUNDGREN, M.; WESTRA, E.R.; SLIJKHUIS, R.J.; SNIJDERS, A.P.; DICKMAN, M.J.; MAKAROVA, K.S.; KOONIN, E.V.; VAN DER

OOST, J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. **Science**. 2008, 960–964. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1159689>.

CHEN, K.; WANG, Y.; ZHANG, R.; ZHANG, H.; GAO, C. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. **Annual Review of Plant Biology**, v. 70, 667–697, 2019. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050718-100049.

Confederação da Agricultura e Pecuária no Brasil. **Agropecuária puxa crescimento do PIB no primeiro trimestre de 2021**. 02 jun. 2021. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/boletins/agropecuaria-puxa-crescimento-do-pib-no-primeiro-trimestre-de-2021>. Acesso em: 29 abr. 2021.

DAMATTA, F. M.; GRANDIS, A.; ARENQUE, B. C.; BUCKERIDGE, M. S. Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. **Food Research International**, v. 43, n. 7, p.1814–1823, 2010. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.11.001.

EISENSTEIN, M. Plant breeding: discovery in a dry spell. **Nature**, v. 501, n. 7468, p. S7–S9, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/501S7a>.

FELISBINO, M. **As mulheres que descobriram como fazer edição de genes**. *Ciência Pelos Olhos Delas*, 2016. Disponível em: <https://www.blogs.unicamp.br/cienciapelosolhosdelas/2016/06/06/as-mulheres-que-descobriram-como-editar-o-gene/>. Acesso em: 29 abr. 2021.

FENG, Z.; ZHANG, B.; DING, W.; LIU, X.; YANG, D.L.; WEI, P.; CAO, F.; ZHU, S.; ZHANG, F.; MAO, Y.; ZHU, J. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. **Cell Res**. 2013, 23, 1229–1232.

FLAVELL, R. B. Innovations continuously enhance crop breeding and demand new strategic planning. **Global Food Security**, v. 12, p.15-21, 2017.

GAJ, T.; GERSBACH, C. A.; BARBAS, C. F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 7, p. 397–405, 2013. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004.

GAO, Y.; ZHAO, Y. Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 56, p. 343–349, 2014. {HYPERLINK "<https://doi.org/10.1111/jipb.12152>"}

GASIUNAS, G.; BARRANGOU, R.; HORVATH, P.; SIKSNYS, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 39, p. E2579–E2586, 2012. DOI: 10.1073/pnas.1208507109.

HEIGWER, F.; KERR, G.; BOUTROS, M. E-CRISP: Fast CRISPR target site identification. **Nat. Methods**. 2014, 11, p. 122–123.

HU, Y.; ZHANG, J.; JIA, H.; SOSSO, D.; LI, T.; FROMMER, W. B.; YANG, B.; WHITE, F. F.; WANG, N.; JONES, J. B. Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 4, p. E521–E529, 2014. DOI: 10.1073/pnas.1313271111.

JI, X.; SI, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, H.; ZHANG, F.; GAO, C. Confering DNA virus resistance with high specificity in plants using virus-inducible genome-editing system. **Genome Biol**. 2018, v. 19, p. 197.

JIA, H.; ZHANG, Y.; ORBOVIĆ, V.; XU, J.; WHITE, F. F.; JONES, J. B.; WANG, N. Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 7, p. 817–823, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12677.

JIANG, F.; DOUDNA, J. A. CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. **Annual Review of Biophysics**, v. 46, p. 505–529, 2017. DOI: 0.1146/annurev-biophys-062215-010822.

JIANG, W.; ZHOU, H.; BI, H.; FROMM, M.; YANG, B.; WEEKS, D. P. Demonstration of CRISPR/Cas9/ sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis,

tobacco, sorghum and rice. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. e188, 2013. {HYPERLINK "<https://doi.org/10.1093/nar/gkt780>"}.}

JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J.A.; CHARPENTIER, E. A Programmable Dual-RNA —Guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science** 2012, 337, 816–821.

KIM, H.; KIM, J.S. A guide to genome engineering with programmable nucleases. **Nat. Rev. Genet.** 2014, 15, 321–334.

KURSHID, H.; JAN, S.; SHINWARI, Z.; JAMAL, M.; SHAH S. An Era of CRISPR/Cas9-mediated Plant Genome Editing. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 26, p. 47-54. 2018. DOI: 10.21775/CIMB.026.047.

LI, J.F.; NORVILLE, J.E.; AACH, J.; MCCORMACK, M.; ZHANG, D.; BUSH, J.; CHURCH, G.M.; SHEEN, J. Multiplex and homologous recombination–mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. **Nat. Biotechnol.** 2013, 31, 688–691.

LI, M.; LI, X.; ZHOU, Z.; WU, P.; FANG, M.; PAN, X.; LIN, Q.; LUO, W.; WU, G.; LI, H. Reassessment of the four yield-related genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in rice using a CRISPR/Cas9 system. **Frontier in Plant Science**. 2016, v. 7, p. 377.

LI, X.; WANG, Y.; CHEN, S.; TIAN, H.; FU, D.; ZHU, B.; LUO, Y.; ZHU, H. Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-12, 2018a. DOI: 10.3389/fpls.2018.00559.

LIU, H.; DING, Y.; ZHOU, Y.; JIN, W.; XIE, K.; CHEN, L.L. CRISPR-P 2.0: An Improved CRISPR-Cas9 Tool for Genome Editing in Plants. **Mol. Plant.** 2017, 10, p. 530–532.

LOBELL, D. B.; GOURDJI, S. M. The Influence of Climate Change on Global Crop Productivity. **Plant Physiology**, v. 160, n. 4, p. 1686–1697, 2012. DOI: 10.1104/pp.112.208298.

LOPES FILHO, J. H.; DA SILVA, V. C. H.; DOS SANTOS, J. C.; DANTE, R. A.; GERHARDT, I. R.; YASSITEPE, J. E.; FERNANDES, F. R. Introdução à edição genômica de plantas. In: **Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas: biotecnologia aplicada à agricultura**/Hugo Bruno Correa Molinari ... [et al.], editores técnicos. – Brasília, DF: Embrapa, 2020. PDF (p. 207): il. color. p. 11-48.

MA, L.; ZHANG, D.; MIAO, Q.; YANG, J.; XUAN, Y.; HU, Y. Essential role of sugar transporter OsSWEET11 during the early stage of rice grain filling. **Plant Cell Physiology**. 2017, v. 58, p.863–873.

MA, X.; ZHANG, Q.; ZHU, Q.; LIU, W.; CHEN, Y.; QIU, R.; WANG, B.; YANG, Z.; LI, H.; LIN, Y. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. **Molecular Plants**. v. 8, p. 1274–1284. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.007>.

MAO, Y.; BOTELLA, J.R.; ZHU, J.K. Heritability of targeted gene modifications induced by plant-optimized CRISPR systems. **Cell. Mol. Life Sci**. 2017, 74, 1075–1093.

MAO, Y.; ZHANG, H.; XU, N.; ZHANG, B.; GOU, F.; ZHU, J.K. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. **Mol. Plant**. v. 6, 2008–2011. 2013. {HYPERLINK "<http://dx.doi.org/10.1093/mp/sst121>"}

MCCOUCH, S.; BAUTE, G. J.; BRADEEN, J.; BRAMEL, P.; BRETTING, P. K.; BUCKLER, E.; BURKE, J. M.; CHAREST, D.; CLOUTIER, S.; COLE, G.; DEMPEWOLF, H.; DINGKUHN, M.; FEUILLET, C.; GEPTS, P.; GRATTAPAGLIA, D.; GUARINO, L.; JACKSON, S.; KNAPP, S.; LANGRIDGE, P.; LAWTON-RAUH, A.; LIJUA, Q.; LUSTY, C.; MICHAEL, T.; MYLES, S.; NAITO, K.; NELSON, R. L.; PONTAROLLO, R.; RICHARDS, C. M.; RIESEBERG, L.; ROSS-IBARRA, J.; ROUNSLEY, S.; HAMILTON, R. S.; SCHURR, U.; STEIN, N.; TOMOOKA, N.; VAN DER KNAAP, E.; VAN TASSEL, D.; TOLL, J.; VALLS, J.; VARSHNEY, R. K.; WARD, J.; WAUGH, R.; WENZL, P.; ZAMIR, D. Feeding the future. **Nature**, v. 499, n. 7456, p. 23–24, 2013. DOI: 10.1038/499023a.

MIAO, J.; GUO, D.; ZHANG, J.; HUANG, Q.; QIN, G.; ZHANG, X.; WAN, J.; GU, H.; QU, L.J. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. **Cell Res.** 2013, 23, 1233–1236.

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. **Sobre a CTNBio.** 13 abr. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/ctnbio> . Acesso em: 29 abr. 2021.

MOJICA, F.J.M.; DÍEZ-VILLASEÑOR, C.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; ALMENDROS, C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. **Microbiology.** 2009, 155, 733–740.

MORGANTE, C.; ARRAES, F.; MOREIRA-PINTO, C.; MELO, B.; GROSSI-DE-AS, M. Modulação da expressão gênica em plantas via tecnologia CRISPR/dCas9. In: **Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas: biotecnologia aplicada à agricultura**/Hugo Bruno Correa Molinari ... [et al.], editores técnicos. – Brasília, DF: Embrapa, 2020. PDF (p. 207): il. color. p. 125-177.

NEKRASOV, V.; WANG, C.; WIN, J.; LANZ, C; WEIGEL, D.; KAMOUN, S. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. **Scientific Reports.** v. 7, n. 1, p. 482, 2017.

NISHIMASU, H.; RAN, F.A.; HSU, P. D.; KONERMANN, S.; SHEHATA, S. I.; DOHMAE, N.; ISHITANI, R.; ZHANG, F.; NUREKI, O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. **Cell**, v. 156, p. 935–949, 2014. {HYPERLINK "<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>"}

OKUZAKI, A.; OGAWA, T.; KOIZUKA, C.; KANEKO, K.; INABA, M.; IMAMURA, J.; KOIZUKA, N. CRISPR/ Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in *Brassica napus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 131. p. 63–69, 2018. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.04.025.

PAPAIOANNOU, I.; SIMONS, J. P.; OWEN, J. S. Targeted In Situ Gene Correction of Dysfunctional APOE Alleles to Produce Atheroprotective Plasma ApoE3 Protein.

Hindawi Publishing Corporation. **Cardiology Research and Practice**, v. 2012, Article ID 148796, 16 pages. Doi:10.1155/2012/148796.

PENG, A.; CHEN, S.; LEI, T.; XU, L.; HE, Y.; WU, L.; YAO, L.; ZOU, X. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 12, p. 1509–1519, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12733.

PRADO, G.; PINHEIRO, T.; FARIA, J.; VIANELLO, R. Edição de genoma via *non-homologous end joining* (NHEJ) e ribonucleoproteínas (RNP). In: **Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas: biotecnologia aplicada à agricultura**/Hugo Bruno Correa Molinari ... [et al.], editores técnicos. – Brasília, DF: Embrapa, 2020. PDF (p. 207): il. color. p. 49-90.

PUCHTA, H.; DUJON, B.; HOHN, B. Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1996, 93, 5055–5060.

QUADROS, O. F.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, A. A. R.; FERNANDES, P. M. Edição dirigida do genoma por CRISPR/Cas9: uma nova tecnologia para o melhoramento de plantas. **Incaper em Revista**, Vitória, v.9, p. 6 - 15, jan/dez 2018. ISSN 2179-5304.

QUE, Q.; CHILTON, M. D. M.; DE FONTES, C. M.; HE, C.; NUCCIO, M.; ZHU, T.; WU, Y.; CHEN, J. S.; SHI, L. Trait stacking in transgenic crops: challenges and opportunities. **GM Crops**, v. 1, n. 4, p. 220–229, 2010. DOI: 10.4161/gmcr.1.4.13439.

RAZZAQ, A.; SALEEM, F.; KANWAL, M.; MUSTAFA, G.; YOUSAF, S.; ARSHAD, H. M. I.; HAMEED, M. K.; KHAN, M. S.; JOYIA, F. A. Modern Trends in Plant Genome Editing: An Inclusive Review of the CRISPR/Cas9 Toolbox. **International Journal of Molecular Sciences**. 2019. DOI: [10.3390/ijms20164045](https://doi.org/10.3390/ijms20164045).

REGALADO, A. Who Owns the Biggest Biotech Discovery of the Century? MIT Technology Review. Dec., 2014. Disponível em: <https://www.technologyreview.com/2014/12/01/354111/who-owns-the-biggest-biotech-discovery-of-the-century/>.

[com/s/532796/who-owns-the-biggest-biotech-discovery-of-the-century/](https://www.nature.com/s/532796/who-owns-the-biggest-biotech-discovery-of-the-century/). Acesso em: 29 mai 2021.

RICROCH, A.; HARWOOD, W.; SVOBODOVÁ, Z.; SÁGI, L.; HUNDLEBY, P.; BADEA, E. M.; ROSCA, I.; CRUZ, G.; SALEMA FEVEREIRO, M. P.; MARFÀ RIERA, V.; JANSSON, S.; MORANDINI, P.; BOJINOV, B.; CETINER, S.; CUSTERS, R.; SCHRADER, U.; JACOBSEN, H. J.; MARTIN-LAFFON, J.; BOISRON, A.; KUNTZ, M. Challenges facing european agriculture and possible biotechnological solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 5, p 875–883, 2016. DOI: 10.3109/07388551.2015.1055707.

RODRÍGUEZ-LEAL, D.; LEMMON, Z. H.; MAN, J.; BARTLETT, M. E.; LIPPMAN, Z. B. Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. **Cell**, v. 171, n. 2, p. 470-480, 2017. DOI: 10.1016/j.cell.2017.08.030.

SAN FILIPPO, J.; SUNG, P.; KLEIN, H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, p. 229–257, 2008. DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255.

SAPRANAUSKAS, R.; GASIUNAS, G.; FREMAUX, C.; BARRANGOU, R.; HORVATH, P.; SIKSNYS, V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.** 2011, 39, 9275–9282.

SATHEESH, V.; ZHANG, H.; WANG, X.; LEI, M. Precise editing of plant genomes – prospects and challenges. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 96, p. 115–123, 2019. DOI: 10.1016/j.semcd.2019.04.010.

SCHEBEN, A.; EDWARDS, D. Genome editors take on crops. **Science**. 2017, p. 1122–1123.

SCHIML, S.; FAUSER, F.; PUCHTA, H. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. **Plant J.** 2014, 80, 1139–1150.

SCHMIDT, S. M.; BELISLE, M.; FROMMER, W. B. The evolving landscape around genome editing in agriculture: many countries have exempted or move to exempt forms of genome editing from GMO regulation of crop plants. **EMBO Reports**, v. 21, n. 6, p. 1-4, 2020. DOI: 10.15252/embr.202050680.

SEDEEK, K. E. M.; MAHAS, A.; MAHFOUZ, M. Plant genome engineering for targeted improvement of crop traits. **Frontier in Plant Science**, v. 10, p. 1–16, 2019. DOI: 10.3389/fpls.2019.00114.

SHAN, Q.; WANG, Y.; CHEN, K.; LIANG, Z.; LI, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, K.; LIU, J.; VOYTAS, D.F.; ZHENG, X.; ZHANG, Y.; GAO, C. Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs. **Mol. Plant**. 2013, 6, 1365–1368.

SHAN, Q.; ZHANG, Y.; CHEN, K.; ZHANG, K.; GAO, C. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsBADH2* gene using TALEN technology. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 6, p. 791–800, 2015. DOI: 10.1111/pbi.12312.

SIPPEL, S.; MEINSHAUSEN, N.; FISCHER, E. M.; SZÉKELY, E.; KNUTTI, R. Climate change now detectable from any single day of weather at global scale. **Nature Climate Change**, v. 10, n. 1, p. 35–41, 2020. DOI: 10.1038/s41558-019-0666-7.

SUN, X.; HU, Z.; CHEN, R.; JIANG, Q.; SONG, G.; ZHANG, H.; XI, Y. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. **Sci. Rep.** 2015, v. 5, p. 10342.

SUN, Y.; JIAO, G.; LIU, Z.; ZHANG, X.; LI, J.; GUO, X.; DU, W.; DU, J.; FRANCIS, F.; ZHAO, Y.; XIA, L. Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–15, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.00298.

SWANSON-WAGNER, R. et al. Reshaping of the maize transcriptome by domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 29, p. 11878-11883, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1201961109>> Acesso em: 01 mai. 2021.

TONG, S.; EBI, K. Preventing and mitigating health risks of climate change. **Environmental Research**, v. 174, p. 9–13, 2019. DOI: 10.1016/j.envres.2019.04.012.

WALTZ, E. With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time. **Nat. Biotechnol.** 2018, 36, 6–7.

XU, R.; YANG, Y.; QIN, R.; LI, H.; QIU, C.; LI, L.; WEI, P.; YANG, J. Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. **Journal of Genetics And Genomics**, v. 43, n. 8, p. 529–532, 2016. DOI: 10.1016/j.jgg.2016.07.003.

ZAIDI, S.S.A.; TASHKANDI, M.; MANSOOR, S.; MAHFOUZ, M.M. Engineering plant immunity: Using crispr/cas9 to generate virus resistance. **Frontier in Plant Science** 2016, v. 7, 1673.

ZHANG, S.; ZHANG, R.; SONG, G.; GAO, J.; LI, W.; HAN, X.; CHEN, M.; LI, Y.; LI, G. Targeted mutagenesis using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas9 system in common wheat. **BMC Plant Biol.** 2018, 18, 302.

ZHANG, T.; GAO, Y.; WANG, R.; ZHAO, Y. Production of guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR using ribozymes and RNA polymerase II promoters. **Bio-Protocol**, v. 7, n. 4, e2148, Feb. 2017.

ZHANG, Z.; HUA, L.; GUPTA, A.; TRICOLI, D.; EDWARDS, K.J.; YANG, B.; LI, W. Development of an *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for wheat genome editing. **Plant Biotechnol. J.** 2019, 17, 1623–1635.

ZHOU, H.; LIU, B.; WEEKS, D.P.; SPALDING, M.H.; YANG, B. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. **Nucleic Acids Res.** V. 42, p. 10903-10914. 2014. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gku806>.