

Edição de genoma pelo sistema CRISPR-Cas9 e sua aplicação no melhoramento do milho



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

DOCUMENTOS 257

**Edição de genoma pelo sistema CRISPR-Cas9 e
sua aplicação no melhoramento do milho**

Andréa Almeida Carneiro
Newton Portilho Carneiro

Esta publicação está disponível no endereço:
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo
Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Maria Marta Pastina

Secretário-Executivo
Elena Charlotte Landau

Membros
*Cláudia Teixeira Guimarães, Mônica Matoso
Campanha, Roberto dos Santos Trindade e Maria
Cristina Dias Paes*

Revisão de texto
Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica
Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

Tratamento das ilustrações
Mônica Aparecida de Castro

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Mônica Aparecida de Castro

Foto da capa
Andrea Almeida Carneiro e Newton Portilho Carneiro

1ª edição
Publicação digital (2020).

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Milho e Sorgo

Carneiro, Andréa Almeida.

Edição de genoma pelo sistema CRISPR-Cas9 e sua aplicação no melho-
ramento do milho / Andréa Almeida Carneiro, Newton Portilho Carneiro. – Sete
Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2020.

21 p. : il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 257).

1. Zea mays. 2. Melhoramento genético vegetal. 3. Variação genética. 4. Orga-
nismo transgênico. I. Carneiro, Newton Portilho. II. Título. III. Série.

CDD (21. ed.) 633.15

Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

© Embrapa, 2020

Autores

Andrea Almeida Carneiro

Bióloga, Doutora em Ciências das Plantas, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG.

Newton Portilho Carneiro

Biólogo, Doutor em Ciências das Plantas, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG.

Apresentação

Técnicas de melhoramento genético clássico, mutações e transgenia têm sido utilizadas para aumentar a variabilidade genética em milho. A edição de genômica é um dos grandes avanços científicos dos últimos anos e pode ser utilizada para induzir alterações com bastante precisão no genoma, visando à melhoria de características agronômicas da cultura. Dentre as técnicas já desenvolvidas com este objetivo, a CRISPR/Cas9 ou Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas, associada com a proteína Cas9 (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated*), é um sistema considerado simples, preciso e robusto para criar variabilidade genética, e possui um potencial de aplicação muito grande na biotecnologia, na agricultura e na medicina. Esta publicação procura explicar, de maneira resumida, o funcionamento do sistema CRISPR/Cas9 e sua aplicação principalmente no melhoramento do milho para auxiliar os técnicos agrícolas no entendimento deste processo, que irá certamente revolucionar a produção de milho nas próximas décadas.

Frederico Ozanan Machado Durães

Chefe-geral

Sumário

| | |
|--|----|
| Introdução | 07 |
| CRISPR: sistema de defesa adaptativo de organismos procariotos | 08 |
| Utilização do sistema CRISPR-Cas9 na agricultura..... | 11 |
| Bases da produção de uma planta editada geneticamente | 13 |
| Inserção do sistema CRISPR-Cas9 no genoma do milho..... | 14 |
| Edição de genoma x transgenia..... | 17 |
| Referências..... | 18 |

Introdução

A variabilidade genética é essencial para o desenvolvimento de novas cultivares mais produtivas, nutritivas e adaptadas a diferentes estresses bióticos e abióticos. No melhoramento genético clássico, a diversidade é obtida por recombinação da variabilidade pré-existente durante o cruzamento entre plantas da mesma espécie ou de espécie sexualmente compatível. Um grande número de cruzamentos e seleções é necessário para introduzir alelos desejáveis e aumentar a variabilidade, pois a recombinação dos genes parentais é aleatória (Gepts, 2002). Marcadores moleculares são ferramentas da biotecnologia que vêm auxiliando o melhoramento genético na localização de regiões genômicas responsáveis por grande parte das características agrônômicas de relevância e no direcionamento dos cruzamentos, diminuindo o tempo gasto para geração de cultivares-elite (Das et al., 2017). Melhoristas de plantas, utilizando as técnicas de melhoramento genético clássico, disponibilizaram para a humanidade a maioria das cultivares conhecidas atualmente. Entretanto, por causa de anos de evolução e seleção direcionada, a variabilidade genética foi bastante reduzida, o que limita o potencial de melhoramento para muitas características (Chen et al., 2019).

Outro processo utilizado para criar variabilidade genética é a indução de mutações. Mutações, de maneira similar à recombinação genética, também ocorrem aleatoriamente quando uma molécula de DNA danificada por agentes mutagênicos (físicos, químicos ou biológicos) é reparada, gerando inserções ou deleções (indels) de nucleotídeos no genoma de modo hereditário. Radiação ou compostos químicos, tais como raios gamma e etil metanosulfonato já foram utilizados, por exemplo, para criar variabilidade genética em milho (Agarwal et al., 2018). Mutações induzidas, de acordo com os dados da International Atomic Energy Agency (IAEA), geraram 3.222 variedades comerciais, incluindo cereais, plantas e flores ornamentais, leguminosas, frutos, hortaliças, fibras, oleaginosas, forragem, tubérculos, ervas, plantas medicinais, dentre outras (Ulukapi; Nasircilar, 2018). Esses genótipos são isentos das limitações éticas e legais enfrentadas pelos produtos agrícolas geneticamente modificados.

Com o surgimento das técnicas do DNA recombinante e de metodologias de transformação genética de plantas, tornou-se possível a transferência de um único gene de função conhecida entre indivíduos de espécies diferentes, de modo que os organismos vivos pudessem produzir uma nova proteína, além daquelas normalmente codificadas em seus genomas. Isto se deve ao fato de o DNA ser uma molécula comum entre todos os seres vivos e ser processada praticamente do mesmo modo entre as diferentes espécies. O gene de interesse é introduzido em células vegetais, principalmente via *Agrobacterium* ou biobalística (Carneiro et al., 2009). Ao final do processo, dentre as plantas regeneradas, são selecionadas aquelas que melhor expressem a característica desejada, sem que outras funções tenham sido afetadas.

Com o advento da transgenia, as alternativas para o melhoramento vegetal aumentaram consideravelmente, já que genes originários de qualquer organismo vivo ou sintetizados *in vitro* podem ser inseridos na planta de interesse via transformação genética. Entretanto, um dos problemas do uso da transgenia é a inserção aleatória do transgene no genoma, o que pode causar modificação da expressão de genes originais e aparecimento de efeitos indesejáveis. Nesse caso, para contornar esse problema, é necessário gerar um grande número de transformantes para selecionar os indivíduos de interesse. Como a ocorrência da transgenia é um evento raro na natureza, ela é regulamentada por processos de avaliação de biossegurança longos e dispendiosos, sendo uma fonte inesgotável de controvérsia pública (Domingo; Bordonaba, 2011).

Um dos grandes avanços recentes da biotecnologia é a capacidade de induzir mutações no genoma com grande precisão. Quatro tecnologias de edição de genoma desenvolvidas nas últimas décadas

obtiveram êxito em gerar modificações genéticas direcionadas em plantas. Estas tecnologias são conhecidas como (i) meganucleases; (ii) nucleases do tipo Zinc finger / (ZFN); (iii) nucleases efetoras do tipo ativador de transcrição (do inglês **T**ranscription **A**ctivator-**L**ike **E**ffector **N**ucleases / TALEN) e (iv) as Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (do inglês **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats / CRISPR) (Shukla et al., 2009; Gao et al., 2010; Li et al., 2013; Cermák et al., 2015). As técnicas de edição gênica utilizando meganucleases, ZNFs e TALENs trouxeram um grande avanço para a manipulação direcionada de genomas. No entanto, elas são complexas e exigem uma elaborada engenharia de proteínas para estabelecer o sítio de reconhecimento da sequência-alvo no genoma (Smith et al., 2006; Maeder et al., 2008). Por outro lado, o sistema CRISPR-Cas9 revolucionou o campo da edição genômica, pois é simples, preciso, flexível e de baixo custo (Doudna; Charpentier, 2014).

Esta revisão procura explicar as bases da utilização da tecnologia CRISPR-Cas9 para a geração de variabilidade genética e sua utilização no desenvolvimento de cultivares de milho com características agrônômicas aperfeiçoadas.

CRISPR: sistema de defesa adaptativo de organismos procaríotos

A história da tecnologia CRISPR-Cas9 teve início quando Ishino e colaboradores, em 1987, identificaram uma região no genoma da bactéria *Escherichia coli* com função desconhecida contendo uma série de regiões repetidas intercaladas por regiões não repetidas ou espaçadoras. Esta região foi denominada por Jansen et al. (2002) de *CRISPR* (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas ou **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats). Junto à região CRISPR foram identificados genes que codificam para polimerases, nucleases e helicases, e estes genes ficaram conhecidos como *Cas* ou genes associados à região CRISPR (Mojica et al., 2000) (Figura 1). Em busca do entendimento da função desta região, pesquisas determinaram que os fragmentos de DNA presentes entre as regiões repetitivas eram derivados de fagos, transposons ou plasmídeos invasores. Além disso, foi verificado que bactérias que guardavam a memória de invasões anteriores nas regiões espaçadoras (DNA do organismo invasor) não eram infectadas uma segunda vez pelo mesmo fago (Bolotin et al., 2005). Surgiu então a hipótese, confirmada subsequentemente, de que o sistema CRISPR-Cas funciona como um mecanismo de defesa adaptativo da bactéria contra invasões de elementos genéticos indesejados (Mojica et al., 2005; Sampson; Weiss, 2014).

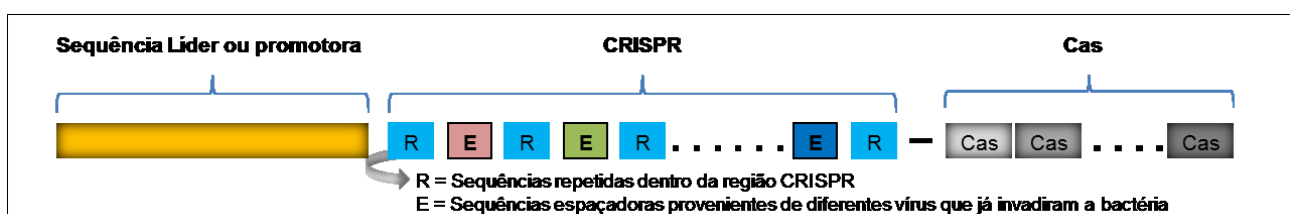


Figura 1. Locus CRISPR - Onde estão presentes genes que codificam polimerases, nucleases e helicases conhecidos como *Cas* ou genes associados à região CRISPR.

O estudo do mecanismo de funcionamento desta região mostrou que quando a bactéria é infectada por fagos ou outros elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, enzimas codificadas pelo operon *Cas* clivam o DNA invasor em pequenos fragmentos. Estes fragmentos são inseridos no genoma bacteriano entre as sequências repetitivas do loco CRISPR e como resultado a bactéria armazena a memória de infecções anteriores adquirindo proteção contra um subsequente ataque desses invasores. Isto acontece porque pequenos RNAs, conhecidos como crRNAs (RNAs derivados da região CRISPR ou **CRISPR-derived RNA**) ou moléculas de RNA-guia, correspondentes às sequências de DNA invasoras, são produzidos pela bactéria (Figura 2) (Hille et al., 2018). Para tanto, todo o loco CRISPR é transcrito a partir de uma região rica em AT (adenina, timina) conhecida como Sequência Líder (L) produzindo um pré-crRNA, que inclui todas as sequências espaçadoras e as repetidas. O pré-crRNA é clivado e dá origem aos crRNA numa etapa conhecida como maturação dos crRNAs. Este processo evoluiu de maneira distinta entre os diferentes tipos de sistemas CRISPR-Cas existentes (Deltcheva et al., 2011). Em alguns sistemas essa clivagem é realizada por endoribonucleases, tais como CasE, Cas6 e Csy4. Já em sistemas que não possuem estas enzimas, como no CRISPR/Cas II, a maturação do crRNA envolve um trans-RNA ou molécula de RNA ativadora (tracrRNA), a proteína Csn1 e uma RNase III endógena. O tracrRNA é uma molécula de RNA de 171 ou 89 nt que possui uma região de 25 nt quase que perfeitamente complementar (apenas um nucleotídeo incompatível) às regiões repetidas do locus CRISPR. Esta região complementar é utilizada para o pareamento entre tracrRNA e as regiões repetitivas do pré-crRNA. Quando ocorre o pareamento entre estes RNAs, a enzima Cas9 se liga ao duplex formado pelo tracrRNA e pelo pré-crRNA estabilizando o complexo e recrutando a RNase III que processa o pré-crRNA em vários pequenos crRNAs. Após numa segunda clivagem por uma RNase ainda desconhecida, o complexo Cas9 tracrRNA e crRNA está pronto para se associar e clivar os DNAs invasores. Embora a função da proteína Csn1 não esteja totalmente elucidada sabe-se que ela é essencial durante este processo de maturação dos crRNAs. Segundo a hipótese de Deltcheva et al. (2011), a proteína Csn1 poderia funcionar como uma molécula âncora que facilita o pareamento entre o tracrRNA e o pré-crRNA. Também poderia funcionar promovendo um segundo corte dentro da região espaçadora, aparando as sequências do crRNA, ou finalmente atuar protegendo o tracrRNA e o pré-crRNA da degradação por outras ribonucleases.

A formação da fita dupla de RNA, resultante da interação tracrRNA/crRNA, é essencial para que o crRNA reconheça o DNA-alvo e para a ativação da Cas9. A interação da nuclease Cas9 com o crRNA / tracrRNA resulta em uma alteração na conformação da proteína ativando o sítio de interação com o motivo PAM (**P**rotospacer **A**djacent **M**otif). PAMs são sequências de 2-5 nucleotídeos (5'NGG3' e 5'NNGRRT3') necessárias para a ancoragem da nuclease Cas9 ao sítio de clivagem. Uma vez que existem diferentes nucleases, os motivos PAMs podem diferir um dos outros. Por exemplo, NmCas9 de *Neisseria meningitidis* (Hou et al., 2013) reconhece a sequência PAM "NNNNGATT", enquanto St1Cas9 de *Streptococcus thermophilus* (Deveau et al., 2008), a sequência "NNAGAAW".

Para prosseguir com o processo de identificação e clivagem do DNA-alvo, o crRNA maduro deve se associar à fita complementar do DNA-alvo na região adjacente a um motivo PAM (Ran et al., 2013). Só ocorrerá clivagem da sequência-alvo se houver um motivo PAM adjacente a ela na fita complementar de DNA. Após a associação do complexo Cas9/crRNA/tracrRNA ao DNA-alvo por meio da sequência PAM ocorrem a abertura das fitas do DNA-alvo imediatamente a montante da sequência PAM e a interação da sequência guia (crRNA) com a sequência-alvo (Anders et al., 2014). Finalmente, a nuclease Cas9 está apta para clivar as duas fitas de DNA gerando extremidades abruptas (Jinek et al., 2012).

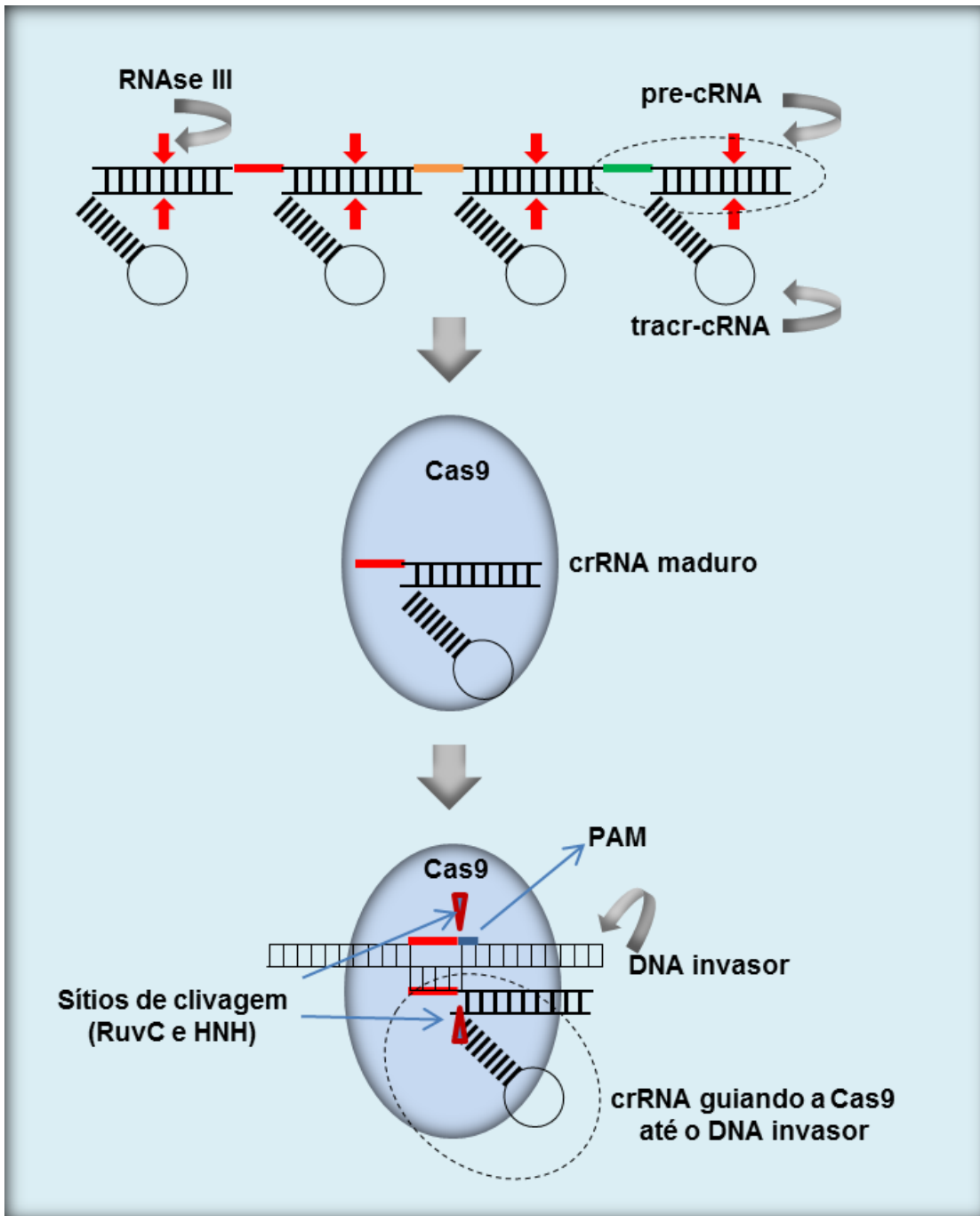


Figura 2. Sistema de imunidade adquirida CRISPR-Cas9. Inicialmente uma sequência curta do material genético invasor (sequência espaçadora) é integrada entre sequências repetidas da região CRISPR. A memória registrada pelo espaçador é usada para proteger a bactéria contra uma nova incursão do mesmo invasor. O locus CRISPR é totalmente transcrito a partir da região líder/promotora em uma sequência única. Em seguida, os pré-crRNA são processados em crRNA maduros. O crRNA é então usado como uma molécula-guia para especificar o alvo da clivagem a ser realizada pela nuclease Cas (Baseado em Jiang e Marraffini, 2015).

Quando a bactéria é atacada pelo mesmo vírus, o complexo Cas9/crRNA/tracrRNA atua no reconhecimento deste vírus e na sua destruição. Os crRNAs contendo as sequências específicas do vírus invasor anterior funcionam como uma memória e guiam as enzimas Cas até o invasor que será destruído (Figura 2). Portanto, CRISPR é um loco bacteriano que codifica pequenos RNAs-guia baseados em sequências de vírus, transposons e plasmídeos que já invadiram a bactéria anteriormente. Esta região e as proteínas Cas formam um sistema natural de imunidade antiviral adquirida presente em várias bactérias e Archaea (Mojica et al., 2000).

Utilização do sistema CRISPR-Cas9 na agricultura

A tecnologia de edição de genoma de plantas via CRISPR-Cas9 é capaz de modificar com precisão genes responsáveis por características agrônômicas importantes. Basicamente, um RNA guia com sequência do gene de interesse direciona a nuclease Cas para uma região específica onde ocorrerá a clivagem ou quebra da fita dupla de DNA. A quebra da fita dupla pode resultar em mutações por nocaute de genes, em modificações de um produto gênico ou inserção direcionada de características específicas, o que permite empilhamento de genes em programas de melhoramento (Svitashev et al., 2016).

Mas como um rompimento na fita dupla de DNA pode gerar variabilidade genética? Quando a fita de DNA é quebrada, ela precisa ser reparada para manter a integridade genética e física do genoma (Hiom, 2010). Uma quebra na fita dupla de DNA (DSB / **D**ouble **S**trand **B**reak) pode ter efeitos deletérios para um organismo. Para minimizar essa ameaça, as células desenvolveram basicamente dois mecanismos capazes de reparar as agressões sofridas pelo genoma. As extremidades da fita de DNA rompidas podem ser religadas por processos biológicos conhecidos como NHEJ (Reparo sem homologia ou do inglês **N**on **H**omologous **E**nd **J**oining) ou HDR (Reparo com homologia ou do inglês **H**omology-**D**irected **R**epair) (Figura 3). A maneira mais direta de reparar uma quebra da fita dupla é simplesmente unir as duas fitas independentemente da sequência de nucleotídeos presente na região do rompimento através do mecanismo NHEJ. Neste processo pode ocorrer a introdução ou deleção de nucleotídeos formando mutações do tipo indels (Hiom, 2010; Doudnae; Charpentier, 2014) que podem inativar o gene-alvo. O silenciamento gênico apresenta diversas aplicações na agricultura. Por exemplo, Liang et al. (2014) utilizaram o sistema CRISPR para gerar mutações do tipo indels e silenciar os genes *ZmIPK1A*, *ZmIPK* e *ZmMRP4* da via biossintética do ácido fítico em milho. O fitato representa por volta de 75% do total de fósforo na semente e é um composto antinutricional. Neste estudo, foi demonstrado que o sistema CRISPR-Cas é capaz de induzir mutagênese direcionada em *Z. mays* com alta eficiência e silenciar genes indesejáveis.

Em um segundo exemplo, o sistema CRISPR-Cas9 foi utilizado para gerar uma quebra na fita dupla de DNA do gene que codifica a enzima NDP-glicose-amido-glucosiltransferase. Este gene faz parte da via metabólica de produção de amilose. O reparo da fita dupla ocasionou mutações do tipo indel que resultaram no silenciamento da enzima NDP-glicose-amido-glucosiltransferase e na obtenção de uma cultivar de milho conhecida como “waxy” que possui apenas amilopectina na constituição do seu amido. No grão de milho normal, não editado, a proporção entre amilose e amilopectina é de aproximadamente 1:3. O milho waxy possui um alto valor agregado em razão das propriedades químicas da amilopectina, que são muito apreciadas em indústrias de alimentos, adesivos, bioplásticos, fermentação de etanol e possivelmente silagem (Cigan et al., 2017).

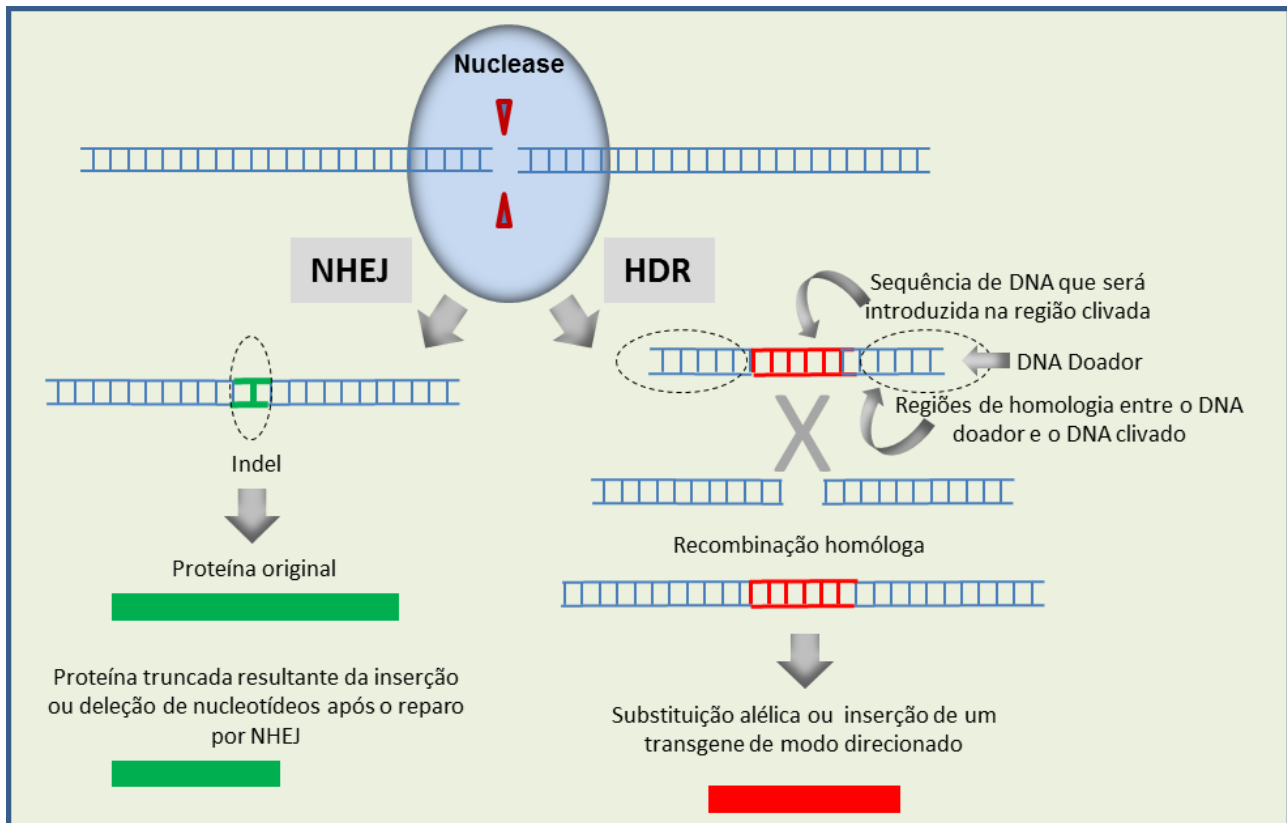


Figura 3. Reparo de um rompimento na fita dupla de DNA pelos processos de NHEJ (Reparo sem homologia ou **N**on **H**omologous **E**nd **J**oining) ou HDR (Reparo com homologia ou **H**omology-**D**irected **R**epair).

O gene *brachytic 2* (*br2*) de milho foi editado após o reparo via NHEJ, induzido pelo sistema CRISPR-Cas9. Este reparo resultou em um indel que alterou o quadro de leitura de aminoácidos da proteína e promoveu o aparecimento de um códon de parada prematuro. Mutantes de milho para o gene *br2* apresentam altura reduzida por causa do encurtamento dos entrenós, mas o restante da planta, como folhas, flores e espigas, mantiveram o tamanho normal (Bage et al., 2020).

Para a indução de mutações mais precisas, a via de reparo HDR é mais indicada. No entanto, para isto é necessário introduzir na célula vegetal, além da nucleotase Cas9 e do single guide ou RNA guia (sgRNA), uma terceira molécula, o DNA doador. O DNA doador possui a região que será modificada, por exemplo, uma sequência que codifica um ou poucos aminoácidos diferentes da sequência original - substituição alélica (Zhang et al., 2014) ou um gene inteiramente novo que será inserido no genoma – Knock-in (Fauser et al., 2012). O DNA doador é flanqueado por regiões de homologia correspondentes à região onde a edição será realizada e será inserido no genoma por recombinação homóloga. O reparo por HDR, apesar de ser mais preciso, é menos eficiente, já que ocorre apenas nas fases iniciais do ciclo celular (Hiom, 2010).

Como exemplo da utilização do mecanismo de reparo HDR podemos citar a geração de plantas de milho resistentes ao herbicida chlorsulfuron após a quebra direcionada do gene *ALS2* que codifica a enzima acetolactato sintase utilizando o sistema CRISPR-Cas9. Uma sequência editada deste gene, contendo uma substituição da prolina situada na posição 165 da proteína ALS2 nativa por uma serina, foi introduzida em plantas de milho que já continham a nucleotase Cas9 pré-integrada no genoma (Svitashev et al., 2015). O gene *ALS2* editado, ao contrário do gene nativo, não é alvo dos herbicidas do grupo das sulfonilureias que inibem a rota metabólica de formação dos aminoácidos ramificados. Diferentemente das plantas transgênicas, neste tipo de edição gênica é possível nas

gerações futuras separar por segregação a Cas9 da edição gênica e, conseqüentemente, nenhum fragmento de DNA heterólogo ficará inserido no genoma.

Outra modificação realizada em plantas de milho utilizando o sistema CRISPR-Cas9 foi o aumento da expressão do gene *ARGOS8*, um regulador negativo de resposta da planta ao etileno. O fitormônio etileno regula a resposta da planta a vários estresses abióticos e já foi demonstrado que, quando sua expressão é reduzida, plantas são mais produtivas em condições de estresse hídrico. Normalmente, a expressão do gene *ARGOS8* é baixa em milho e para modificar isto, Shi et al. (2017) utilizaram o sistema CRISPR-Cas9 para trocar o promotor nativo *ARGOS8* que confere baixo nível de expressão à proteína, pelo promotor *GOS2* que confere um nível moderado de expressão constitutiva. O resultado obtido com esta modificação genética direcionada foi um aumento da expressão do gene *ARGOS8* gerando uma diminuição da resposta do milho ao etileno e, conseqüentemente, um aumento de produtividade em condições de estresse hídrico. Neste exemplo, foi criada uma planta transgênica onde o promotor de interesse foi inserido em um local pré-determinado.

Em resumo, o princípio básico da edição genômica requer uma nuclease para causar uma quebra na fita dupla de DNA em local pré-determinado pelo sgRNA. O reparo da fita dupla de DNA é feito através de mecanismos endógenos da planta, tais como NHEJ e HDR, os quais podem ocasionar mutações e, conseqüentemente, variabilidade genética.

Bases da produção de uma planta editada geneticamente

A nuclease Cas, o crRNA e o tracrRNA juntos compõem o sistema natural de imunidade adquirida de bactérias. Para aplicar este sistema em pesquisas foi desenvolvido o “single guide RNA (sgRNA ou gRNA)” que consiste em uma fusão do crRNA (CRISPR-derived RNA) e do tracrRNA (trans-activating RNA) por meio de uma cadeia de quatro nucleotídeos (GAAA). Assim, o processo em laboratório é composto por apenas duas moléculas, a nuclease Cas9 e o sgRNA (Jinek et al., 2012; Silva et al., 2016).

Para gerar um rompimento direcionado na fita dupla de DNA de uma planta e ativar o processo de reparo, seja NHEJ ou HDR, a nuclease Cas9 deve estar presente no núcleo da célula de modo estável (inserida no genoma da planta de interesse) ou transiente. Ela pode ser inserida na forma de DNA (vetor de expressão contendo a Cas9), RNA (mRNA da Cas9), proteína (proteína sintética Cas9) ou ribonucleoproteína (complexo proteína / RNA montado). A Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) é a uma enzima rotineiramente utilizada para edição de genomas (Silva et al., 2016).

O método mais simples e de fácil manipulação em laboratório é a inserção através de vetor de expressão, onde a sequência nucleotídica da Cas9 é clonada sob o controle de promotores e terminadores da transcrição específicos para o organismo em estudo. Para uma expressão mais eficiente, é necessário otimizar a utilização preferencial de códons e a composição nucleotídica próxima ao conteúdo GC da espécie-alvo (Silva et al., 2016). Também é importante que a sequência nucleotídica da Cas9 seja flanqueada por um sinal de localização nuclear (NLS), que direcionará a proteína para o núcleo. Ela pode ser posicionada nas extremidades amino (Wu et al., 2014) e/ou carboxi (Gao et al., 2015), sendo que quando presente em ambas as extremidades tem mostrado um resultado mais eficiente (Hou et al., 2013).

O gene que codifica para o RNA guia ou gRNA também pode ser clonado em um vetor de expressão. Para construção de um vetor de expressão dos pequenos RNAs é utilizado um promotor da RNA

polimerase III (U3 ou U6), a sequência guia ou alvo (~20 nt), a sequência universal ou “scaffold” (~80 nt) e o sinal de terminação para a polimerase III (TTTTTT).

Um mesmo vetor pode conter a região para a expressão da Cas9 e a sequência universal, sendo necessária apenas a clonagem da sequência-guia para o gene de interesse. A sequência-guia deve ser localizada junto a uma sequência PAM (por exemplo, N₂₀**NGG**), ser única no genoma e conter aproximadamente 20 nucleotídeos, com um conteúdo GC próximo de 50%. Esta sequência pode ser desenhada com o auxílio de softwares online, tais como CRISPR design <http://crispr.mit.edu> e CHOPCHOP <https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/>, além de outros (Silva et al., 2016).

Inserção do sistema CRISPR-Cas9 no genoma do milho

Os métodos mais eficientes para inserção dos componentes do sistema CRISPR em células de milho são via *Agrobacterium tumefaciens* (Frame et al., 2002; Vega et al., 2008) ou biobalística (Sanford et al., 1987). No contexto da edição genômica, *Agrobacterium* pode ser usada apenas para inserir moléculas de DNA na célula, enquanto via biobalística podem ser inseridas moléculas de DNA, RNA, proteínas ou ribonucleoproteínas (RNPs).

A. tumefaciens é uma bactéria comumente encontrada no solo e capaz de causar tumores vegetais na região da infecção. A formação de tumores está associada à presença de um plasmídeo conhecido como Ti (do inglês *tumor-inducing* ou indutor de tumor) (Gelvin, 2010). A indução de tumores ocorre por meio da transferência de um segmento deste plasmídeo, denominado T-DNA, para o genoma do hospedeiro. Os genes presentes no T-DNA são responsáveis pela produção de fitormônios, que promovem a proliferação celular desordenada das células vegetais.

Utilizando técnicas de biologia molecular é possível trocar os genes nativos presentes no T-DNA por outros genes de interesse, como os que codificam a nuclease Cas9 e o sgRNA do sistema CRISPR-Cas9. Uma vez dentro do núcleo da célula vegetal, os genes presentes no T-DNA podem ser expressos de forma transiente ou estável (Janssen; Gardner, 1990). Na expressão transiente não ocorre a integração do T-DNA no genoma hospedeiro, e a expressão gênica é normalmente detectada alguns dias após a infecção do tecido vegetal e vai diminuindo com o passar do tempo (Lacroix; Citovsky, 2013). Este período é suficiente para que ocorra a quebra da fita dupla de DNA e o seu reparo com ou sem homologia. A expressão transiente tem uma menor eficiência na indução de mutações, mas, em compensação, nenhum DNA exógeno é integrado ao genoma (Andersson et al., 2017).

Já na expressão estável, o T-DNA é integrado no genoma hospedeiro produzindo uma planta transgênica que expressa os componentes de edição do genoma constitutivamente. Consequentemente, a eficiência das mutações aumenta (Jansing et al., 2018), mas poderá haver um aumento de mutações em locais não alvo (Chaparro-Garcia et al., 2015).

Na transformação via biobalística, micropartículas de metal podem ser cobertas com DNA, RNA, proteínas ou RNPs e aceleradas em direção às células-alvo, utilizando um bombardeador conhecido como “gene gun” (Sanford et al., 1987) em velocidades suficientes para penetrar a parede celular sem causar a morte da célula. Os compostos precipitados sobre as micropartículas são liberados gradualmente dentro da célula e podem ser integrados (expressão estável) ao genoma ou permanecer como uma construção extra cromossômica (expressão transiente) (Klein et al., 1987).

A vantagem da utilização da biobalística em relação à transformação via *Agrobacterium* é a independência de genótipo. Assim vários genótipos ou até mesmo diferentes espécies podem ser

utilizados no processo de transformação. No entanto, a qualidade dos eventos de integração é menor, e o processo normalmente resulta em plantas com mais de uma cópia do gene de interesse integrada no genoma.

Tanto *Agrobacterium* como a biobalística podem ser utilizadas como veículo para a inserção, na célula, dos componentes do sistema de edição gênica juntamente com um marcador de seleção. Entretanto, o local de inserção no genoma do T-DNA, contendo a nuclease Cas9 e sgRNA será ao acaso e diferente de onde ocorrerá a quebra da fita dupla de DNA e seu reparo. Isso permite que os transgenes contendo os componentes do sistema CRISPR possam ser eliminados por meio de segregação mendeliana mantendo assim apenas o gene mutado (Figura 4).

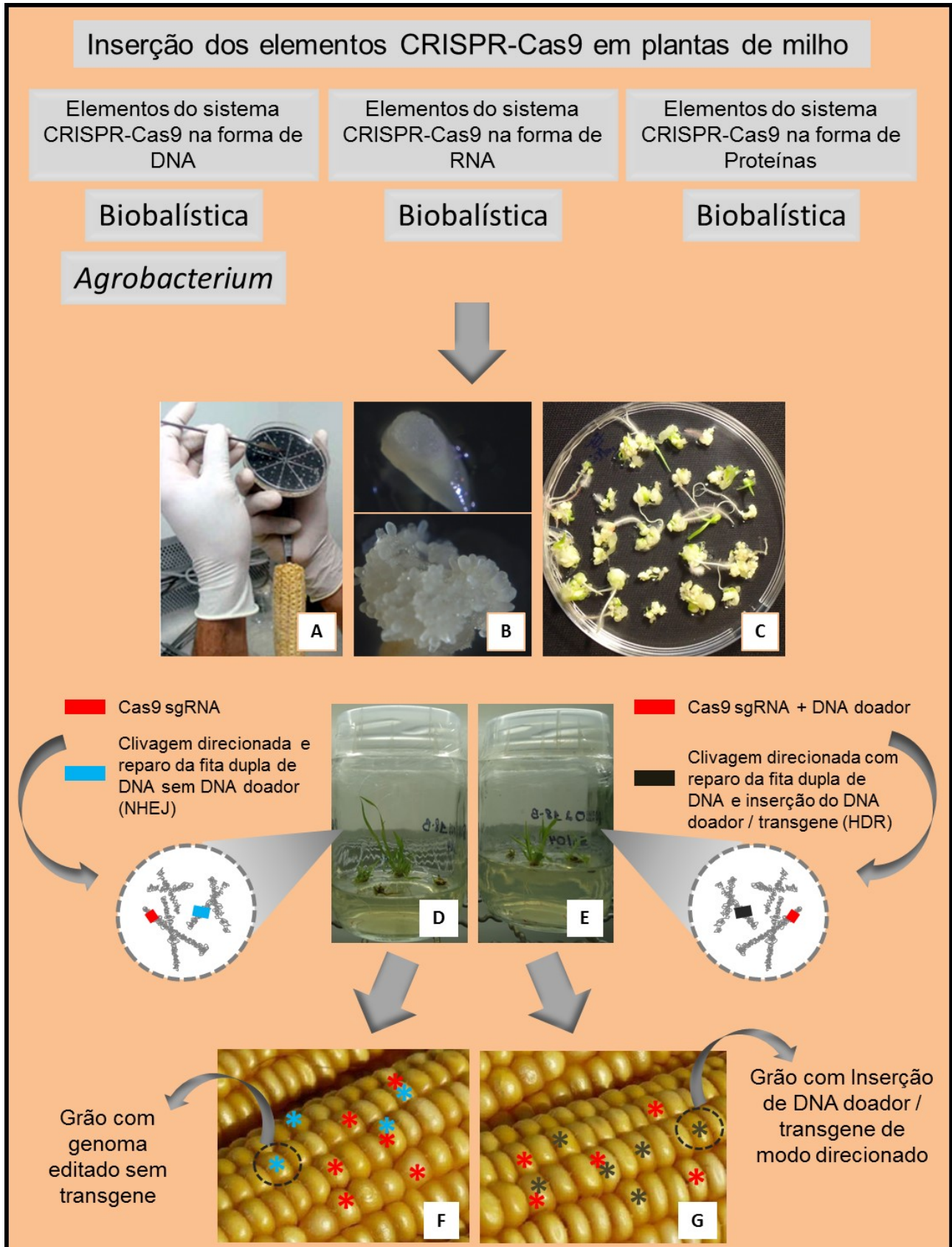


Figura 4. Edição de genoma de milho mediada por CRISPR/Cas9. Os elementos do sistema CRISPR-Cas9 são introduzidos em plantas de milho como transgenes via transformação mediada por *Agrobacterium* ou biobalística (A - E e retângulo vermelho). A clivagem do DNA ocorre em local diferente da inserção da Cas9-sgRNA (D - E e retângulos azul e marrom). Por causa da segregação de genes nas gerações seguintes (F e G), algumas sementes conterão a edição desejada e nenhum transgene (F e asterisco azul) ou a inserção de um transgene em local pré-determinado (G e asterisco marrom).

Edição de genoma x transgenia

Um organismo geneticamente modificado é aquele que possui uma combinação nova de material genético inserida em seu genoma (Protocolo de Cartagena / <http://bch.cbd.int/protocol/text/>).

Plantas editadas geneticamente podem gerar três tipos de eventos, classificados como NSD1, NSD2 ou NSD3. As NSD1 são mutações aleatórias, sítio-específicas que são geradas após a junção das extremidades do DNA que foram clivadas pelo sistema Cas9-sgRNA, pelo mecanismo de reparo NHEJ. As NSD2 são substituições alélicas induzidas após o reparo por recombinação homóloga (HRD) da fita de DNA clivada. Neste processo, um DNA homólogo é adicionado e compete com as cromátides-irmãs, levando à substituição da sequência de nucleotídeos original. E, finalmente, as NSD3 são inserções sítio-direcionadas de transgenes por recombinação homóloga (HRD) (Arpaia et al., 2012; Wolt et al., 2016).

Nas plantas editadas pelo sistema CRISPR-Cas9 e classificadas como um evento do tipo NSD1, o complexo Cas/gRNA pode ser removido utilizando diferentes estratégias moleculares (Curtin et al., 2012), o que produzirá uma planta sem material genético heterólogo (Curtin et al., 2012). Esta mutação não apresenta diferença de uma que poderia ter ocorrido naturalmente e, em geral, os órgãos reguladores não consideram estes organismos no mesmo contexto dos OGMs (Wolt et al., 2016). A classificação e regulamentação da biossegurança das plantas do tipo NSD2 dependem da extensão da edição realizada, podendo estas ser ou não regulamentadas como OGMs. Assim, cada planta editada NSD2 será analisada caso a caso (Lusser; Davies, 2013). Já as plantas classificadas como um evento do tipo NSD3 possuem transgenes inseridos no genoma e serão regulamentadas como OGMs, mas por causa da inserção sítio-direcionada do transgene, não afetando nenhum dos genes originais da planta, uma menor quantidade de dados para a caracterização dos riscos poderá ser exigida em comparação a um transgênico convencional, dependendo do quadro regulatório do país (Wolt et al., 2016).

Portanto, a técnica de edição de genomas poderá gerar tanto variedades de plantas que não são consideradas OGMs quanto plantas transgênicas. Essa classificação em parte depende do quadro regulatório do país. Brasil, Argentina e Estados Unidos, por exemplo, consideram a presença de material genético heterólogo no produto final para que este seja classificado como um transgênico. Entretanto, a União Europeia considera que um organismo transgênico é todo aquele no qual o material genético foi alterado de uma maneira que não ocorre naturalmente por cruzamento e/ou recombinação, independentemente da ausência de DNA heterólogo no produto final.

A edição de genoma é uma técnica muito poderosa que tem a capacidade de aumentar a variabilidade genética e gerar plantas mais produtivas, nutritivas e tolerantes a diferentes estresses bióticos e abióticos e, conseqüentemente, contribuir para a segurança alimentar ao redor do globo. Mas para que isto se torne uma realidade é imperativo que ocorra uma harmonização entre os diferentes países sobre os conceitos de manipulação genética e comercialização dos produtos gerados.

Referências

- AGARWAL, A.; YADAVA, P.; KUMAR, K.; SINGH, I.; KAUL, T.; PATTANAYAK, A.; AGRAWAL, P. K. Insights into maize genome editing via CRISPR/Cas9. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, n. 2, p. 175-183, 2018.
- ANDERS, C.; NIEWOEHNER, O.; DUERST, A.; JINEK, M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by Cas9 endonuclease. **Nature**, v. 513, p. 569-573, 2014.
- ANDERSSON, M.; TURESSON, H.; NICOLIA, A.; FALT, A. S.; SAMUELSSON, M.; HOFVANDER, P. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. **Plant Cell Reports**, v. 36, p. 117-128, 2017.
- ARPAIA, S.; BIRCH, A. N.; CHESSON, A.; DU JARDIN, P.; GATHMANN, A.; GROPP, J.; HERMAN, L.; HOEN-SORTEBERG, H.-G.; JONES, H.; KISS, J.; KLETER, G.; LAGIOU, P.; LOVIK, M.; MESSÉAN, A.; NAEGELI, H.; NIELSEN, K. M.; OVESNA, J.; PERRY, J.; ROSTOKS, N.; TEBBE, C. Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using zinc finger nuclease 3 and other site-directed nucleases with similar function. **EFSA Journal**, v. 10, n. 10, article 2943, 2012.
- BAGE, S. A.; BARTEN, T. J.; BROWN, A. N.; CROWLEY, J. H.; DENG, M.; FOUQUET, R.; GOMEZ, J. R.; HATTON, T. W.; LAMB, J. C.; LEDEAUX, J. R.; LEMKE, B. M.; MANJUNATH, S.; MARENCO, M. S.; MORALES, E. Y.; GARCIA, M. O.; PEEVERS, J. M.; PELLET, J.; AVENDANO, A. R.; RYMARQUIS, L. A.; SRIDHARAN, K.; VALENTINE, M. F.; YANG, D. H.; CARGILL, E. J. Genetic characterization of novel and CRISPR-Cas9 gene edited maize brachytic 2 alleles. **Plant Gene**, v. 21, 100198, 2020.
- BOLOTIN, A.; QUINQUIS, B.; SOROKIN, A.; EHRLICH, S. D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extra-chromosomal origin. **Microbiology**, v. 151, n. 8, p. 2551-2561, 2005.
- CARNEIRO, A. A.; GUIMARÃES, C. T.; VALICENTE, F. H.; WAQUIL, J. M.; VASCONCELOS, M. J. V.; CARNEIRO, N. P.; MENDES, S. M. **Milho Bt**: teoria e prática da produção de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 25 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 135).
- CERMÁK, T.; BALTES, N. J.; CEGAN, R.; ZHANG, Y.; VOYTAS, D. F. High frequency, precise modification of the tomato genome. **Genome Biology**, v. 16, article 232, 2015.
- CHAPARRO-GARCIA, A.; KAMOUN, S.; NEKRASOV, V. Boosting plant immunity with CRISPR/Cas. **Genome Biology**, v. 16, article 254, 2015.
- 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, p. 667-697, 2019.
- CIGAN, A. M.; GADLAGE, M. J.; GAO, H.; MEELEY, R. B.; YOUNG, J. K. **Waxy corn**. WO2017132239A1, 3 August 2017. Patente. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/WO2017132239A1/en>>. Acesso em: 13 out. 2020.
- CURTIN, S. J.; VOYTAS, D. F.; STUPAR, R. M. Genome engineering of crops with designer nucleases. **Plant Genome**, v. 5, n. 2, p. 42-50, 2012.

DAS, G.; PRATA, J. K.; BAEK, K. H. Insight into MAS: a molecular tool for development of stress resistant and quality of rice through gene stacking. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, article 985, 2017.

DELTCHEVA, E.; CHYLINSKI, K.; SHARMA, C. M.; GONZALES, K.; CHAO, Y.; PIRZADA, Z. A.; ECKERT, M. R.; VOGEL, J.; CHARPENTIER, E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, v. 471, n. 7340, p. 602-607, 2011.

DEVEAU, H.; BARRANGOU, R.; GARNEAU, J. E.; LABONTÉ, J.; FREMAUX, C.; BOYAVAL, P.; ROMERO, D. A.; HORVATH, P.; MOINEAU, S. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 4, p. 1390-1400, 2008.

DOMINGO, J. L.; BORDONABA, J. G. A literature review on the safety assessment of genetically modified plants. **Environmental International**, v. 37, n. 4, p. 734-742, 2011.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, 1258096, 2014.

FAUSER, F.; ROTH, N.; PACHER, M.; ILG, G.; SÁNCHEZ-FERNANDEZ, R.; BIESGEN, C.; PUCHTA, H. In planta gene targeting. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 19, p. 7535-7540, 2012.

FRAME, B. R.; SHOU, H.; CHIKWAMBA, R. K.; ZHANG, Z.; XIANG, C.; FONGER, T. M.; PEGG, E. K.; LI, B.; NETTLETON, D. S.; PEI, D.; WANG, K. *Agrobacterium tumefaciens*: mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. **Plant Physiology**, v. 129, n. 1, p. 13-22, 2002.

GAO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, D.; DAI, X.; ESTELLE, M.; ZHAO, Y. Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or *Arabidopsis* development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 7, p. 2275-2280, 2015.

GAO, H.; SMITH, J.; YANG, M.; JONES, S.; DJUKANOVIC, V.; NICHOLSON, M. G.; WEST, A.; BIDNEY, D.; FALCO, S. C.; JANTZ, D.; LYZNIK, L. A. Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. **Plant Journal**, v. 61, n. 1, p. 176-187, 2010.

GELVIN, S. B. Plant proteins involved in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 45-68, 2010.

GEPTS, P. A comparison between crop domestication, classical plant breeding, and genetic engineering. **Crop Science**, v. 42, p. 1780-1790, 2002.

HILLE, F.; RICHTER, H.; WONG, S. P.; BRATOVIC, M.; RESSEL, S.; CHARPENTIER, E. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1239-1259, 2018.

HIOM, K. Coping with DNA double strand breaks. **DNA Repair**, v. 9, n. 12, p. 1256-1263, 2010.

HOU, Z.; ZHANG, Y.; PROPSON, N. E.; HOWDEN, S. E.; CHU, L. F.; SONTHEIMER, E. J.; THOMSON, J. A. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 39, p. 15644-15649, 2013.

ISHINO, Y.; SHINAGAWA, H.; MAKINO, K.; AMEMURA, M.; NAKATA, A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5429-5433, 1987.

JANSEN, R.; VAN EMBDEN, J.; GAASTRA, W.; SCHOOLS, L. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1565-1575, 2002.

JANSING, J.; SACK, M.; AUGUSTINE, S. M.; FISCHER, R.; BORTESI, L. CRISPR/Cas9-mediated knockout of six glycosyltransferase genes in *Nicotiana benthamiana* for the production of recombinant proteins lacking beta-1,2-xylose and core alpha-1,3-fucose. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, n. 2, p. 350-361, 2018.

JANSSEN, B. J.; GARDNER, R. C. Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. **Plant Molecular Biology**, v. 14, p. 61-72, 1990.

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**, v. 337, n. 6096, p. 816-821, 2012.

KLEIN, T. M.; ARENTZEN, R.; LEWIS, P.; MECCELLIGOT, S. F. Transformation of microbes, plants, and animals by particle bombardment. **Nature Biotechnology**, v.10, p. 286-291, 1992.

LACROIX, B.; CITOVSKY, V. The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium* mediated genetic transformation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 57, n. 6/8, p. 467-481, 2013.

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. **Nature Biotechnology**, v. 31, p. 688-691, 2013.

LIANG, Z.; ZHANG, K.; CHEN, K.; GAO, C. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 41, n. 2, p. 63-68, 2014.

LUSSER, M.; DAVIES, H. V. Comparative regulatory approaches for groups of new plant breeding techniques. **New Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 437-446, 2013.

MAEDER, M. L.; THIBODEAU-BEGANNY, S.; OSIAK, A.; WRIGHT, D. A.; ANTHONY, R. M.; EICHTINGER, M.; JIANG, T.; FOLEY, J. E.; WINFREY, R. J.; TOWNSEND, J. A. et al. Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. **Molecular Cell**, v. 31, p. 294-301, 2008.

MOJICA, F. J. M.; DIEZ-VILLASENOR, C.; GARCIA-MARTINEZ, J.; SORIA, E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. **Journal of Molecular Evolution**, v. 60, n. 2, p. 174-182, 2005.

MOJICA, F. J.; DÍEZ-VILLASEÑOR, C.; SORIA, E.; JUEZ, G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 244-246, 2000.

RAN, F. A.; HSU, P. D.; LIN, C. Y.; GOOTENBERG, J. S.; KONERMANN, S.; TREVINO, A. E.; SCOTT, D. A.; INOUE, A.; MATOBA, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. **Cell**, v. 154, n. 6, p. 1380-1389, 2013.

SAMPSON, T. R.; WEISS, D. S. CRISPR-Cas systems: new players in gene regulation and bacterial physiology. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, article 37, 2014.

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissue using a particle bombardment process. **Particulate Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 27-37, 1987.

SHUKLA, V. K.; DOYON, Y.; JEFFREY, C.; MILLER, J. C.; DEKELVER, R. C.; MOEHLE, E. A.; WORDEN, S. E.; MITCHELL, J. C.; ARNOLD, N. L.; GOPALAN, S.; MENG, X.; CHOI, V. M.; ROCK, J. M.; WU, Y. Y.; KATIBAH, G. E.; ZHIFANG, G.; MCCASKILL, D.; SIMPSON, M. A.; BLAKESLEE, B.; GREENWALT, S. A.; BUTLER, H. J.; HINKLEY, S. J.; ZHANG, L.; REBAR, E. J.; GREGORY, P. D.; URNOV, F. D. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. **Nature**, v. 459, p. 437-441, 2009.

SVITASHEV, S.; SCHWARTZ, C.; LENDERS, B.; YOUNG, J. K.; CIGAN, A. M. Genome editing in maize directed by CRISPR–Cas9 ribonucleoprotein complexes. **Nature Communications**, v. 7, article 13274, 2016.

SVITASHEV, S.; YOUNG, J. K.; SCHWARTZ, C.; GAO, H.; FALCO, S. C.; CIGAN, A. M. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. **Plant Physiology**, v. 169, n. 2, p. 931-945, 2015.

SMITH, J.; GRIZOT, S.; ARNOULD, S.; DUCLERT, A.; EPINAT, J. C.; CHAMES, P.; PRIETO, J.; REDONDO, P.; BLANCO, F. J.; BRAVO, J.; MONTOYA, G.; PÂQUES, F.; DUCHATEAU, P. A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 22, e149, 2006.

SILVA, R. S.; KAGUE, E.; PEREIRA, T. C.; GONÇALVES, N. N.; AMBRÓSIO, C. E. Obtenção de Cas9 e gRNAs. In: PEREIRA, T. C. (Org.). **Introdução à técnica de CRISPR**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2016. p. 109-133.

SHI, J.; GAO, H.; WANG, H.; LAFITTE, H. R.; ARCHIBALD, R. L.; YANG, M.; HAKIMI, S. M.; MO, H.; HABBEN, J. E. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 2, p. 207-216, 2017.

ULUKAPI, K.; NASIRCILR, A. G. **Induced mutation: creating genetic diversity in plants**. London: IntechOpen, 2018.

VEGA, J. M.; YU, W.; KENNON, A. R.; CHEN, X.; ZHANG, Z. J. Improvement of Agrobacterium-mediated transformation in Hi-II maize (*Zea mays*) using standard binary vectors. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 297-305, 2008.

WOLT, J. D.; WANG, K.; YANG, B. The regulatory status of genome-edited crops. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 2, p. 510-518, 2016.

WU, X.; SCOTT, D. A.; KRIZ, A. J.; CHIU, A. C.; HSU, P. D.; DADON, D. B.; CHENG, A. W.; TREVINO, A. E.; KPNERMANN, S.; CHEN, S.; JAENISCH, R.; ZHANG, F.; SHARP, P. A. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 670-676, 2014.

ZHANG, H.; ZHANG, J.; WEI, P.; ZHANG, B.; GOU, F.; FENG, Z.; MAO, Y.; YANG, L.; ZHANG, H.; XU, N.; ZHU, J. K. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 6, p. 797-807, 2014.

Embrapa

Milho e Sorgo



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

