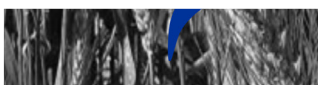
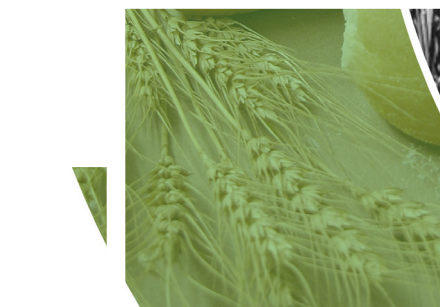
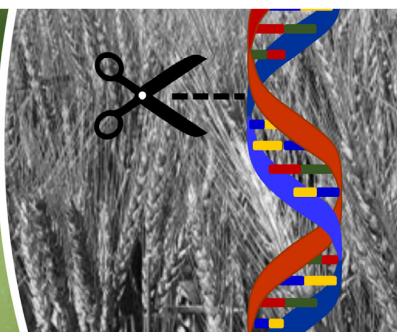


Edição genômica em trigo: potencialidades, desafios e conquistas



OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL

2 FOME ZERO
E AGRICULTURA
SUSTENTÁVEL



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

DOCUMENTOS 202

Edição genômica em trigo: potencialidades, desafios e conquistas

Elene Yamazaki Lau

Embrapa Trigo
Passo Fundo, RS
2022

Embrapa Trigo
Rodovia BR-285, Km 294
Caixa Postal 3081
Telefone: (54) 3316-5800
Fax: (54) 3316-5802
99050-970 Passo Fundo, RS
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Trigo

Presidente
Leila Maria Costamilan

Vice-Presidente
Ana Lídia Variani Bonato

Secretária
Marialba Osorski dos Santos

Membros
*Elene Yamazaki Lau, Fabiano Daniel De Bona,
João Leodato Nunes Maciel, Luiz Eichelberger,
Maria Imaculada Pontes Moreira Lima, Martha
Zavariz de Miranda, Sirio Wiethölter*

Normalização bibliográfica
Graciela Olivella Oliveira (CRB 10/1434)

Tratamento das ilustrações e editoração
eletrônica
Márcia Barrocas Moreira Pimentel

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Capa
Elene Yamazaki Lau

Fotos da capa
Joseani Mesquita Antunes

1ª edição
Publicação digital (2022): PDF

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 Trigo

Lau, Elene Yamazaki
Edição genômica em trigo : potencialidades, desafios e conquistas / Elene
Yamazaki Lau. — Passo Fundo : Embrapa Trigo, 2022.
PDF (27 p.).— (Documentos / Embrapa Trigo, ISSN 1518-6512 ; 202)

1. *Triticum aestivum*. 2. Biotecnologia. I. Embrapa Trigo. II. Série.

CDD (21. ed.) 633.11

Graciela Olivella Oliveira (CRB 10/1434)

© Embrapa, 2022

Autores

Elene Yamazaki Lau

Engenheira florestal, doutora em Genética e Melhoramento,
pesquisadora da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS.

Apresentação

O trigo é um dos alimentos mais relevantes da humanidade. Para garantir a produção do trigo, é estratégico enfrentar as necessidades atuais e vindouras. A ocorrência de estresses bióticos e abióticos é empecilho para obter o potencial máximo da produtividade da cultura. Apesar dos esforços e conquistas dos programas de melhoramento genético e de manejo, ainda há desafios, a exemplo das doenças fúngicas da giberela e da brusone. As ferramentas da biotecnologia, como a edição genômica, podem contribuir para a solução do problema de controle dessas doenças fúngicas.

Há cerca de uma década, foi desenvolvida uma nova e revolucionária tecnologia de edição genômica, denominada de CRISPR/Cas9. Esta tecnologia utiliza-se de uma estratégia do sistema imunológico de bactérias, e permite modificar o genoma de seres vivos de forma direcionada com facilidade de aplicação sem precedentes.

O potencial de aplicação desta tecnologia vem ao encontro à necessidade de acelerar a elucidação da função de potenciais genes, que estão sendo inferidos pelos estudos e que se utilizam de genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica. No caso de culturas agrícolas, além de auxiliar no estudo funcional, a aplicação de CRISPR/Cas9 para realizar modificações direcionadas em genes ou locais específicos do genoma pode gerar novos produtos com características diferenciadas.

Considerando que o trigo pode ser beneficiado com o uso de CRISPR/Cas9, esta obra de revisão traz uma introdução à tecnologia, sua relação com a transgenia, destaca a aplicação em trigo, métodos de melhoria da eficiência para obter plantas de trigo editadas, legislação e uso comercial. A Embrapa espera

que esta obra contribua para o melhor entendimento dessa tecnologia e a potencial aplicação em benefício da cultura do trigo, com reflexo positivo na segurança alimentar dos povos.

Jorge Lemainski
Chefe-Geral da Embrapa Trigo

Sumário

Introdução	9
Edição genômica	10
Aplicações da edição genômica em trigo	13
A edição genômica e a transgenia	13
Estratégias alternativas de edição genômica aplicadas ao trigo.....	16
Evolução da legislação relativa à edição genômica	18
Uso comercial de culturas editadas.....	19
Considerações finais	21
Referências	21

Introdução

O trigo (*Triticum aestivum*) é uma das culturas anuais mais utilizadas no mundo, contribuindo com cerca de 20% das calorias que os seres humanos consomem, além de ser importante fonte proteica (FAO, 2021a). No entanto, com a população mundial crescente e a desnutrição presente em quase 10% da população humana (FAO, 2021b), aumentar a produção de alimentos é uma necessidade prioritária. Dentre os desafios impostos ao cultivo do trigo, estão os diversos estresses bióticos e abióticos, tanto diminuindo a produtividade quanto impedindo a ocupação de espaço em novos sistemas de produção, além do risco do potencial agravamento dos estresses devido às mudanças climáticas. Além da resistência aos estresses, é importante obter alimentos mais saudáveis, com maiores quantidades de componentes nutricionais e com características para públicos específicos, tal como os celíacos. Apesar de todos os avanços obtidos até o momento, o melhoramento genético convencional possui suas limitações quanto ao tempo necessário para o desenvolvimento de novas cultivares, devido à natureza aleatória da recombinação do DNA e à ocorrência de mutações de maneira não direcionada (Wolter et al., 2019), além de depender da variabilidade genética disponível no *pool* gênico. Portanto, garantir o domínio de tecnologias de última geração, que possam produzir variabilidade direcionada, é de importância estratégica dentro dos esforços para assegurar a segurança alimentar, podendo auxiliar em situações específicas do processo de melhoramento. Uma destas tecnologias é a edição genômica, tendo grande destaque o método conhecido por repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente interespaçadas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, ou CRISPR) associadas à nuclease 9 (CRISPR-associated nuclease 9, ou CRISPR/Cas9), que permite fazer alterações nos genomas com precisão sem precedentes. Nesta revisão, serão apresentados os diversos aspectos que envolvem o trigo e a aplicação dessa tecnologia, sem a pretensão de abranger a sua totalidade. Devido a edição genômica ter grande potencialidade de auxiliar na geração de produtos e de insumos agrícolas para a alimentação humana e animal, este trabalho está em consonância com o Objetivo do Desenvolvimento Sustentável 2 (ODS 2), que é Erradicar a Fome.

Edição genômica

A edição genômica é baseada na quebra da dupla fita de DNA, na qual, de maneira genérica, uma endonuclease engenheirada, acoplada a um módulo de reconhecimento, identifica a sequência do DNA alvo e induz a quebra neste local ou nas proximidades (Wada et al., 2020) (Figura 1). O reparo dessa quebra ocorre, na grande maioria das vezes, pela junção de extremidades não homólogas da fita do DNA (*non-homologous end-joining*, NHEJ), que é sujeito a erros, como deleções e inserções de sequências genômicas copiadas de outro lugar (Puchta, 2005), gerando variabilidade direcionada. Caso um DNA molde contendo sequência homóloga às extremidades do DNA quebrado seja fornecido juntamente com os componentes necessários para a edição genômica, pode ocorrer inserção de DNA de interesse por meio de reparo direcionado por homologia (*homology-directed repair*, HDR) (Arnout et al., 2017; Tang et al., 2019).

Uma das primeiras tecnologias desenvolvidas de edição genômica foi a meganuclease (Jacquier; Dujon, 1985; Rouet et al., 1994), seguida da nuclease dedo de zinco (*zinc finger nuclease*, ZFN) (Miller et al., 1985; Kim et al., 1996; Bibikova et al., 2001), da nuclease efetora do tipo ativador de transcrição (*transcription activator-like effector nuclease*, TALEN) (Christian et al., 2010; Miller et al., 2010) e, por último, da CRISPR/Cas9 (Jinek et al., 2012). É conhecida também por CRISPR somente. As três últimas tecnologias estão ilustradas na Figura 1. O reconhecimento do sítio-alvo por meganuclease, ZFN e TALEN é feito por meio da interação proteína-DNA, enquanto que, no caso de CRISPR/Cas9, é feito pela interação RNA-DNA. Os níveis de facilidade de aplicação são crescentes no sentido da mais antiga (meganuclease) para a mais recente (CRISPR/Cas9). São conhecidas também como tecnologias SDN (do termo *site directed nuclease*, em inglês) (Menz et al., 2020). Este trabalho tratará principalmente sobre CRISPR/Cas9 e seu uso em trigo. Outros detalhes e comparações entre estas tecnologias podem ser encontrados em revisões, tais como as publicadas por Iqbal et al. (2020), Gonzáles Castro et al. (2021) e Akram et al. (2022).

A Cas9 é uma nuclease guiada por RNA programável (desenhado conforme a sequência do alvo) até o local alvo do genoma, onde faz quebras específicas no DNA de fita dupla (Barrangou; Marraffini, 2014). Este RNA é denominado de gRNA (de *guide RNA*) ou sgRNA (*single guide RNA*) e tem duas regiões,

sendo uma a CRISPR RNA (crRNA), com cerca de 20 nucleotídeos complementares ao DNA alvo, e a outra o tracrRNA, que se liga à nuclease Cas9 (Deltcheva et al., 2011; Jinek et al., 2012). Na natureza, essas regiões são encontradas separadas, mas foram engenheiradas para ser um RNA único, facilitando a aplicação. A tecnologia CRISPR/Cas9 é extremamente simples, econômica e versátil em comparação às outras anteriormente desenvolvidas.

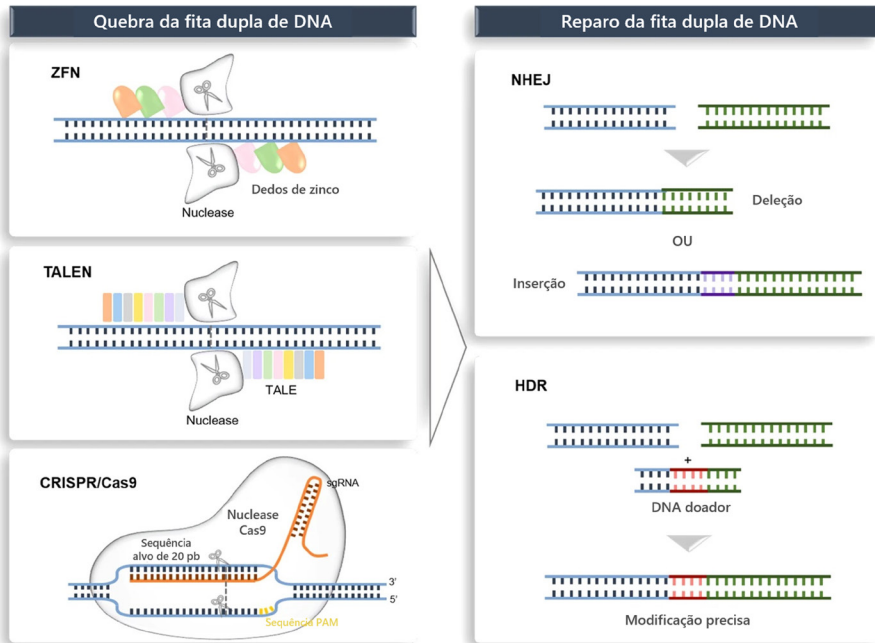


Figura 1. Principais tecnologias de edição genômica e mecanismo de reparo de quebra de fita dupla de DNA. As nucleases de edição genômica (ZFN, TALEN e CRISPR/Cas9) induzem quebra de fita dupla de DNA em locais de forma direcionada. As quebras podem ser reparadas por NHEJ ou, na presença de DNA doador, por HDR. Por NHEJ ocorre a formação de InDels, o que pode alterar o quadro de leitura dos nucleotídeos. Já por HDR, uma sequência de DNA de interesse pode ser inserida ou uma não favorável pode ser substituída.

Siglas: nuclease dedo de zinco (*zinc finger nuclease*, ZFN), nuclease efetora do tipo ativador de transcrição (*transcription activator-like effector nuclease*, TALEN), repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente espaçadas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, ou CRISPR) associadas à nuclease 9 (*CRISPR-associated nuclease 9*, ou CRISPR/Cas9), junção de extremidades não homólogas (*nonhomologous end-joining*, NHEJ), reparo direcionado por homologia (*homology-directed repair*, HDR), sgRNA (*single guide RNA*).

Ilustração: tradução de original de Li et al. (2020) / uso licenciado por Creative Commons (CC BY 4.0) / <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

O sistema CRISPR/Cas9 permite oportunidades novas e promissoras, por criar diversidade genética direcionada de uma forma sem precedentes. Devido à possibilidade de concatenar sequências de DNA em um único RNA guia (gRNA), vários alvos no genoma podem ser modificados de maneira simultânea, permitindo a piramidação de várias características em material elite em apenas uma geração (Shen et al., 2017; Wang et al., 2019; Zhou et al., 2019). Em adição a isso, no caso de espécies poliploides, como o trigo, possibilita modificar simultaneamente todos os alelos homoeólogos contendo a sequência alvo, localizados nos diferentes subgenomas que compõem o seu conteúdo genético (Zhang et al., 2017, 2019a, 2019b; Abe et al., 2019; Brauer et al., 2020). O fato de o genoma do trigo estar sequenciado (Appels et al., 2018) e anotado (Zhu et al., 2021) é de essencial importância para o planejamento da estratégia de aplicação desta tecnologia, pois permite analisar a estrutura global das sequências destes genes e do seu entorno, e de eventuais sequências repetidas em outros locais do genoma. É importante conhecer a sequência do genoma para desenhar um gRNA adequado conforme o objetivo, quer seja um alvo único ou múltiplo, assim como para conhecer os locais com similaridade que podem ser um alvo não desejado (off-target).

CRISPR/Cas9 pode também auxiliar no melhoramento genético por meio da engenharia cromossômica. Rearranjos controlados nos cromossomos, como deleções, inversões ou translocações, podem ser obtidos pela indução de DBS em dois ou mais locais no genoma e por posterior NHEJ (Rönspies et al., 2021). Com isso, grandes regiões com características não desejáveis podem ser deletadas, regiões invertidas ao longo da evolução (impedidas de recombinar durante a meiose) podem ser restauradas ou o contrário, assim como duas características em diferentes cromossomos podem ser ligadas ou separadas geneticamente.

Apesar de ser o mais usado, o sistema CRISPR/Cas9 possui limitações por necessitar do *Protospacer Adjacent Motif* (PAM), que é uma sequência definida de três nucleotídeos, para reconhecer a sequência alvo; pela capacidade de reconhecer sequências PAM alternativas, aumentando as chances de mutagênese off-target; e pelo tamanho grande, que dificulta a entrega dos componentes do sistema no interior das células (Hernandes-Lopes et al., 2020). Como consequência, várias estratégias foram desenvolvidas para aprimorar a precisão, a eficiência e a versatilidade da tecnologia, tal como modificar a

Cas9 e encontrar proteínas Cas alternativas. Uma revisão detalhada sobre o assunto encontra-se em Hernandez-Lopes et al. (2020).

Aplicações da edição genômica em trigo

Em trigo, o primeiro loco editado usando CRISPR/Cas9 e TALEN foi o *Mlo*, conferindo resistência ao oídio (Wang et al., 2014). A inativação dos genes *TaHCR-R* (Su et al., 2019) e *TaNLFX1* (Brauer et al., 2020) por edição genômica aumentou a resistência a *Fusarium graminearum*, que é um dos principais fungos do complexo causador da giberela. Uma das dificuldades da estratégia de inativação de genes de suscetibilidade são os efeitos pleiotrópicos relacionados ao crescimento e ao valor adaptativo da planta (Ding et al., 2018; Tyagi et al., 2021). No entanto, recentemente, utilizando TALEN, foi demonstrado que a ativação ectópica do gene que codifica para o transportador de monossacarídeos de tonoplasto 3 (*TaTMT3B*), causada por uma deleção de 304 kb do loco *Mlo-B1*, atenua as reduções do desenvolvimento e do rendimento associadas à mutação de *Mlo*, mantendo a resistência ao oídio (Li et al., 2022).

Considerando características de interesse agrônomo, outras modificações no genoma do trigo utilizando CRISPR/Cas9 foram realizadas em genes que codificam α -gliadina, buscando diminuir a quantidade de glúten (Sánchez-León et al., 2018), em *TaGW2*, para aumentar o peso dos grãos (Wang et al., 2018; Zhang et al., 2018), em *TaQsd1*, visando à redução da germinação da espiga (Abe et al., 2019), e em *TaMTL* e *CENH3*, para induzir a formação de plantas haploides (Liu et al., 2020; Lv et al., 2020). Plantas de trigo tolerantes a herbicidas foram obtidas com a edição de bases do gene *TaALS* (Zhang et al., 2019a).

A edição genômica e a transgenia

A tecnologia de transformação genética tem auxiliado no procedimento de edição genômica, explicitando seu uso para além da geração de produtos transgênicos.

A transgenia é uma ferramenta biotecnológica que também permite aumentar a variabilidade, por inserir informações disponíveis fora do *pool* gênico da espécie, e tem auxiliado o melhoramento genético vegetal neste sentido nos últimos 26 anos. Há muitos produtos agrícolas que foram gerados com o uso desta tecnologia, e algumas das características inseridas beneficiam os produtores, tais como tolerância a herbicidas e resistência a pragas e doenças. Já outras beneficiam o comércio e os consumidores, como a batata com menor oxidação, e conseqüente menor escurecimento e maior durabilidade, a batata com menor quantidade de compostos antinutricionais e o óleo de soja com ômega 3. Atualmente, há dois eventos transgênicos em trigo liberados comercialmente no mundo, e outros sendo testados em campo. O primeiro evento liberado, contendo o gene *bar* de *Streptomyces hygrosopicus*, que confere tolerância ao glufosinato de amônio, foi desistido pela empresa desenvolvedora em 2004 (Stokstad, 2004). Já o outro, contendo os genes *HaHB4* de girassol, conferindo maior tolerância ao déficit hídrico, e *bar* (González et al., 2019) foi aprovado para uso comercial pelo governo da Argentina em 2020, com a condição de ser efetivado somente após a autorização no Brasil para uso comercial. Em 2021, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) aprovou a farinha de trigo, contendo este evento, para alimentação animal e humana, e é possível que, em breve, chegue às prateleiras do mercado brasileiro. Em 2022, as agências regulatórias da Colômbia, Estados Unidos, Nigéria, Nova Zelândia e Austrália também aprovaram a importação de produtos alimentícios contendo este evento¹.

O trigo é considerado uma cultura sensível ao uso comercial de eventos transgênicos, visto que é a base da alimentação humana em muitos países, inclusive no Brasil, e há grande preocupação quanto à aceitação pela cadeia produtiva, desde a desistência da comercialização de trigo geneticamente modificado para tolerância ao herbicida glufosinato de amônio. A Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães & Bolos Industrializados (Abimapi) não foi favorável à aprovação do uso e comercialização da farinha deste trigo transgênico no Brasil, assim como a Associação Brasileira da Indústria do Trigo (Abitrigo) e a Associação Brasileira da Indústria

¹ Disponível em: <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=574&Event=HB4%20Wheat>.

da Panificação e Confeitaria (Abip)². Entretanto, o posicionamento destes setores da indústria modificou-se após pesquisa realizada pela Abimapi, no qual 72% dos consumidores declararam que não teriam restrição em consumir este trigo e seus derivados. A necessidade de rotulagem com símbolo do triângulo amarelo com o T, indicando a presença de produto transgênico, nas embalagens, é uma preocupação que permanece devido ao custo necessário para realizar a troca.

A Embrapa é um exemplo de empresa pública que conseguiu liberar eventos transgênicos comercialmente, sendo um em soja, com resistência ao herbicida imidazolinona, juntamente com a Basf; e recentemente outro em feijão, com resistência ao vírus do mosaico dourado. No entanto, a obtenção de um produto transgênico não é um processo trivial, pois, em adição aos investimentos para a sua geração, as exigências regulatórias encarecem e dificultam o processo de obtenção às empresas públicas e às empresas de menor porte. Estima-se que a aprovação de uma cultura transgênica custe entre 11 milhões e 17 milhões de euros na União Europeia, e o processo demore cerca de seis anos (Menz et al., 2020). A inexistência destas exigências favorece a geração e o desenvolvimento de produtos editados.

Na maioria das vezes, a transgenia tem sido utilizada em uma etapa da obtenção de plantas com o genoma editado, com a inserção das construções gênicas de DNA que codificam os elementos necessários para a edição, nas células vegetais, por meio de bombardeamento de partículas (Wang et al., 2014; Zhang et al., 2017, 2019a) ou de *Agrobacterium tumefaciens* (Liu et al., 2020; Abe et al., 2019; Zhang et al., 2019b). Estas construções normalmente possuem também genes marcadores que permitem selecionar as plantas transgênicas e, dentre estas, as que possuem o genoma editado são identificadas por meio de sequenciamento (Yin et al., 2017), precedido de amplificação por PCR.

A sequência transgênica pode ser posteriormente retirada ou evitada, sendo as principais estratégias: (1) eliminação por segregação nas gerações subsequentes de autofecundação; (2) expressão transiente dos componentes necessários para a edição genômica a partir de vetor de DNA; e (3) inserção

² Disponível em: <https://www.abimapi.com.br/noticias-detalle.php?i=NDk1MA==#:~:text=Agora%2C%20a%20Abimapi%20se%20diz,e%20derivados%20do%20cereal%20transg%C3%AAnico.>

desses componentes independente de DNA, por intermédio de RNA que codifica para Cas9 ou na própria proteína Cas9, pré-montada com gRNA (ribonucleoproteína, RNPs) (Gu et al., 2021). Esta última estratégia, desenvolvida inicialmente para trigo, apesar da eficiência ser menor que as demais, é a que melhor previne a inserção de sequências transgênicas, visto que é improvável que moléculas de RNA integrem o DNA nuclear de células vegetais em condições normais (Zhang et al., 2016).

Estratégias alternativas de edição genômica aplicadas ao trigo

Apesar do que já foi obtido e do potencial futuro da edição genômica, um dos principais gargalos para a aplicação em maior escala em qualquer cultura, mas especialmente em trigo, é internalizar nas células os componentes necessários para a edição e obtenção de plantas editadas (Liu et al., 2021a). Assim como para a transgenia, as principais limitações para a aplicação de edição genômica em material elite de trigo são a dependência da capacidade de regeneração e a eficiência da inserção do transgene no genoma. Buscando driblar estas limitações, os procedimentos clássicos de transformação genética, usando bombardeamento de partículas e *Agrobacterium tumefaciens*, têm sido melhorados ou substituídos. Dentre os métodos alternativos relatados, estão:

(1) Obtenção de plantas editadas de trigo comum e duro pelo uso de pólen de linhas de milho transgênico contendo Cas9/gRNA no procedimento de geração de haploides (Budhagatapalli et al., 2020). No cruzamento de trigo com milho, normalmente utilizado para a produção de duplo-haploides de trigo (Laurie; Bennett, 1988; Dwivedi et al., 2015), ocorre a fertilização de óvulos de trigo com pólen de milho, gerando um embrião haploide contendo o genoma materno, que é resgatado ainda imaturo, cultivado in vitro, com posterior duplicação do genoma pela aplicação de colchicina. A mutação no genoma materno ocorre devido à presença do Cas9/gRNA produzido pelo pólen do milho, após a fertilização. O transgene é eliminado juntamente com os cromossomos do milho, pela assincronia da replicação de DNA, da condensação e da formação de centrômero (Laurie; Bennett, 1988). As vantagens são a não dependência de genótipo por parte do trigo, a ausência de inserção do

transgene e a geração de plantas inteiramente homozigotas. A desvantagem é a necessidade de cultivar e transformar outra espécie (milho) além da espécie alvo, impactando em mão de obra e estrutura, em adição à necessidade do uso de colchicina, que é um produto tóxico;

(2) Uso de construção gênica contendo os genes que codificam para reguladores morfogênicos, como *Growth-regulating factor 4 (GRF4)* e seu cofator *GRF-interacting factor 1 (GIF1)*, que aumentam a eficiência de regeneração de 5 a 25 vezes e dispensam o uso de citocinina nesta etapa (Debernardi et al., 2020), impactando em menor tempo *in vitro* e em aumento da eficiência de transformação genética. Outros reguladores morfogênicos que se destacam são *Baby boom* e *Wuschel (BBM-WUS)* (Gordon-Kamm et al., 2019). Estas estratégias diminuem a dependência do genótipo e ampliam os tipos de tecidos iniciais que podem ser utilizados para a transformação genética. A necessidade de eliminação dos transgenes, do ajuste dos níveis e período da expressão gênica, para evitar os efeitos pleiotrópicos, e a necessidade da cultura *in vitro* são dificuldades a serem solucionadas;

(3) Bombardeamento de partículas em meristema apical de embriões de sementes embebidas em água (Hamada et al., 2018; Imai et al., 2020; Liu et al., 2021b; Nasti; Voytas, 2021). O princípio deste método é ligar os componentes necessários para a edição genômica às partículas de ouro e bombardeá-los na camada de células subepidérmicas, denominadas de L2, as quais se desenvolvem posteriormente em pólen e saco embrionário e poderão gerar uma nova planta editada. Utilizando este método, a eficiência de obtenção de plantas editadas de cultivares elite japonesas, recalcitrantes à regeneração *in vitro*, com transferência da mutação para a próxima geração, variou de 0,3% a 1,7% (Liu et al., 2021b). Apresenta como vantagem a independência da capacidade de regeneração *in vitro*. Por outro lado, parte das plantas obtidas poderá ser quimérica e é necessário verificar a transmissão da mutação para a próxima geração. Além disto, caso seja usado DNA, as plantas serão transgênicas;

(4) Infecção de plantas transgênicas expressando Cas9 ou outros editores com vetor viral contendo gRNA (Ali et al., 2015; Ellison et al., 2020; Kim, 2020; Li et al., 2021; Nasti; Voytas, 2021). Em trigo, foi utilizado o vetor viral baseado em *Barley stripe mosaic virus (BSMV)* (Hu et al., 2019; Li et al., 2021; Chen et al., 2022), que é um vírus de RNA de fita positiva com genoma tripartido

capaz de infectar células meristemáticas, desenvolvido anteriormente para estudos de silenciamento gênico induzido por vírus em plantas (Holzberg et al., 2002; Yuan et al., 2011). O gRNA é inserido na construção gênica que irá gerar o RNA Y do vírus, que é inoculado juntamente com os RNAs α e β em trigo expressando Cas5, infectando inclusive células que dão origem a gametas, produzindo mutações que serão transmitidas para as próximas gerações (Li et al., 2021). O pólen desta planta infectada é também capaz de induzir mutação na célula germinativa feminina da planta não transgênica, ao ser efetuado o cruzamento. Este método tem como vantagens a alta frequência de indução de mutação (13% a 100% na progênie), a possibilidade de realizar mutações em grande escala e não depender da cultura in vitro na maior parte do processo. As desvantagens são a necessidade de utilizar uma planta transgênica contendo Cas9, ou seja, neste quesito é genótipo dependente, e o BSMV ser uma praga quarentenária no Brasil, requerendo estrutura com maior nível de biossegurança até a eliminação do vírus.

Evolução da legislação relativa à edição genômica

Além das questões técnicas, é importante considerar a legislação dos países onde se pretende pesquisar e desenvolver os produtos editados. Atualmente, alguns países possuem legislação ajustada ou específica para o uso da edição genômica, incluindo Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Paraguai, Honduras, Estados Unidos, Austrália, Japão e Canadá, entre outros (Menz et al., 2020), como Nigéria³ e Kenia⁴.

As modificações no genoma utilizando SDNs (*Site-directed Nucleases*) são classificadas com base na extensão da edição genômica resultante, sendo: (1) indução de uma única mutação pontual, ou InDels (SDN-1); (2) inserções curtas ou edição de poucos pares de bases por uma sequência de DNA molde externo (SDN-2); e (3) inserção de longas fitas de sequências de DNA (SDN-3), que podem ainda ser de origem alóctone (transgenes) ou autóctone (cisgenes) (Menz et al., 2020).

³ Disponível em: <https://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/article/default.asp?ID=19269>.

⁴ Disponível em: <https://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/article/default.asp?ID=19336>.

A classificação SDN, assim como a decisão caso a caso, são utilizadas nessas legislações, incluindo a do Brasil, para definir se o organismo é geneticamente modificado (OGM) ou não. Se o produto resultante é SDN-1 ou SDN-2, é considerado não transgênico em muitos países onde existe legislação para o uso da edição genômica. Em 2022, a China alterou a sua legislação para tornar o uso desta tecnologia mais acessível⁵, assim como o Reino Unido⁶ e a Índia⁷. Já na União Europeia e na Nova Zelândia, todos os organismos editados são considerados OGMs, independentemente da extensão da edição. Há outros países nos quais as discussões acerca deste assunto foram iniciadas, mas ainda sem definição.

Uso comercial de culturas editadas

China, EUA e Japão lideram o desenvolvimento, para o mercado, de novos produtos utilizando edição genômica para culturas vegetais, e a busca de melhorias de características agrônômicas, de qualidade para alimentação humana e animal e de tolerância a estresses bióticos representa mais de 70% das aplicações (Menz et al., 2020). Conforme este levantamento, as culturas que se destacam são arroz, tomate, milho, trigo, batata e soja. Dentro dos critérios adotados no trabalho, foi citado um único caso em que o autor é do Brasil (Zsögön et al., 2018), com a edição de loci importantes para o rendimento e produtividade, alterando a morfologia, tamanho, número e valor nutricional de frutos de tomate selvagem (*Solanum pimpinellifolium*). Esta abordagem pode auxiliar no desenvolvimento de novos materiais pela domesticação de novo de tomateiro selvagem. Estratégia similar foi proposta para arroz selvagem diploide (Lacchini et al., 2020) e alotetraploide (Yu et al., 2021).

Nos Estados Unidos, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, na sigla em inglês) considerou não OGMs o cogumelo com menor escurecimento, o milho ceroso com maior quantidade de amilopectina, a setaria com florescimento atrasado, a camelina com maior quantidade de óleo e

⁵ Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/china-mara-issues-first-ever-gene-editing-guidelines>.

⁶ Disponível em: <https://www.gov.uk/government/news/new-powers-granted-to-research-gene-editing-in-plants>.

⁷ Disponível em: https://www.business-standard.com/article/economy-policy/central-govt-exempts-genome-edited-crops-from-stringent-gm-regulations-122033001454_1.html.

a soja com maiores tolerâncias ao déficit hídrico e ao estresse salino, além de maior quantidade de ácido oleico, todos contendo o genoma editado (Waltz, 2018). Estes produtos não precisaram cumprir os requisitos necessários para a liberação comercial como um transgênico, tornando o seu desenvolvimento mais rápido e com menor custo.

No Japão, o primeiro alimento editado por CRISPR/Cas9 e comercializado foi um tomate contendo maior quantidade de ácido γ -aminobutírico (GABA) (Waltz, 2022). GABA é um aminoácido natural que atua com um neurotransmissor no cérebro e é considerado uma substância calmante; acredita-se que pode auxiliar no tratamento de pressão arterial alta, ansiedade, insônia, estresse e fadiga. Destaca-se por ser um alimento que pode ser consumido *in natura* e pela estratégia utilizada para favorecer a aceitação pelo consumidor, que foi a existência de GABA como aditivo em outros 400 alimentos, no mercado japonês.

Em 2021, no Brasil, a Embrapa desenvolveu as primeiras duas cultivares de cana-de-açúcar editadas do mundo, a Cana Flex I e a Cana Flex II, que apresentam, respectivamente, maior digestibilidade da parede celular e maior concentração de sacarose nos tecidos vegetais⁸. Da mesma maneira, em 2022, a CTNBio considerou três materiais vegetais editados como não OGMs, sendo um deles a soja⁹ produzida pela Embrapa, com o gene silenciado da lectina (LE1), que é uma substância antinutricional. Os outros materiais foram soja com menores quantidades de rafinose e de estaquiose¹⁰, que também são substâncias antinutricionais, e soja com tolerância à seca¹¹. Em breve, estes produtos poderão estar no mercado brasileiro. Estes exemplos demonstram a rapidez na geração de materiais editados, considerando que CRISPR/Cas9 surgiu em 2012, e que a legislação brasileira é um fator favorável neste processo.

⁸ Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/66969890/brazilian-science-develops-first-non-gm-gene-edited-sugarcane-of-the-world>.

⁹ <http://ctnbio.mctic.gov.br/documents/566529/2294456/Delibera%C3%A7%C3%B5es+254+PLEN%C3%81RIA-SETEMBRO+-+2022/4c2a956e-e950-4ca5-9ac1-506890dc17b3?version=1.0>.

¹⁰ Disponível em: <http://ctnbio.mctic.gov.br/documents/566529/2294456/Delibera%C3%A7%C3%B5es+254+PLEN%C3%81RIA-SETEMBRO+-+2022/4c2a956e-e950-4ca5-9ac1-506890dc17b3?version=1.0>.

¹¹ Disponível em: <http://ctnbio.mctic.gov.br/documents/566529/2294456/Delibera%C3%A7%C3%B5es+251+PLEN%C3%81RIA-MAIO+-+2022/56d75976-e112-45b8-8c3d-3b8defd056e1?version=1.0>.

Considerações finais

Com base no que foi apresentado, constata-se que a edição genômica vem sendo aplicada em trigo para diferentes finalidades, mesmo sendo uma espécie recalcitrante para obtenção de plantas transgênicas, e para usufruir das potencialidades desta tecnologia.

Esta tecnologia tem sido aplicada principalmente em modificação para a perda de função gênica, mas é possível inserir moléculas de DNA por meio de recombinação homóloga, em local selecionado, assim como promover o aumento de expressão gênica, modificando ou tornando próxima uma região promotora.

Ainda há muitos obstáculos com relação às diferenças regulatórias para os produtos oriundos da edição genômica, mas, aos poucos, vários países do mundo estão adaptando suas legislações para acomodar o seu uso. Dentro e entre países que considerarem estes produtos como não OGMs, serão requeridos menos investimentos do que a transgenia requer, pois os produtos editados são isentos dos custos para a desregulamentação e, portanto, mais acessíveis.

Referências

- ABE, F.; HAQUE, E.; HISANO, H.; TANAKA, T.; KAMIYA, Y.; MIKAMI, M.; KAWAURA, K.; ENDO, M.; ONISHI, K.; HAYASHI, T.; SATO, K. Genome-edited triple-recessive mutation alters seed dormancy in wheat. **Cell Reports**, v. 28, n. 5, p. 1362-1369.e4, July 2019.
- AKRAM, F.; SAHREEN, S.; AAMIR, F.; HAQ, I. U.; MALIK, K.; IMTIAZ, M.; NASEEM, W.; NASIR, N.; WAHEED, H. M. An insight into modern targeted genome-editing technologies with a special focus on CRISPR/Cas9 and its applications. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 1-16, Apr. 2022.
- ALI, Z.; ABUL-FARAJ, A.; LI, L.; GHOSH, N.; PIATEK, M.; MAHJOUB, A.; AOUIDA, M.; PIATEK, A.; BALTES, N. J.; VOYTAS, D. F.; DINESH-KUMAR, S.; MAHFOUZ, M. M. Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system. **Molecular Plant**, v. 8, n. 8, p. 1288-1291, Aug. 2015.
- APPELS, R.; EVERSOLE, K.; FEUILLET, C.; KELLER, B.; ROGERS, J.; STEIN, N.; POZNIAK, C. J.; CHOLET, F.; DISTELFELD, A.; POLAND, J.; RONEN, G.; SHARPE, A. G.; POZNIAK, C.; BARAD, O.; BARUCH, K.; KEEBLE-GAGNERE, G.; MASCHER, M.; BEN-ZVI, G.; JOSSELIN, A. A.; HIMMELBACH, A.; BALFOURIER, F.; GUTIERREZ-GONZALEZ, J.; HAYDEN, M.; KOH, C.; MUEHLBAUER, G.; PASAM, R. K.; PAUX, E.; RIGALT, P.; TIBBITS, J.; TIWARI, V.; SPANNAGL, M.; LANG, D.; GUNDLACH, H.; HABERER, G.; MAYER, K. F. X.;

ORMANBEKOVA, D.; PRADE, V.; SIMKOVA, H.; WICKER, T.; SWARBRECK, D.; RIMBERT, H.; FELDER, M.; GUILHOT, N.; KAITHAKOTTIL, G.; KEILWAGEN, J.; LEROY, P.; LUX, T.; TWARDZIOK, S.; VENTURINI, L.; JUHASZ, A.; ABROUK, M.; FISCHER, I.; UAUY, C.; BORRILL, P.; RAMIREZ-GONZALEZ, R. H.; ARNAUD, D.; CHALABI, S.; CHALHOUB, B.; CORY, A.; DATLA, R.; DAVEY, M. W.; JACOBS, J.; ROBINSON, S. J.; STEUERNAGEL, B.; VAN EX, F.; WULFF, B. B. H.; BENHAMED, M.; BENDAHMANE, A.; CONCIA, L.; LATRASSE, D.; ALAUX, M.; BARTOS, J.; BELLEC, A.; BERGES, H.; DOLEZEL, J.; FRENKEL, Z.; GILL, B.; KOROL, A.; LETELLIER, T.; OLSEN, O. A.; SINGH, K.; VALARIK, M.; VAN DER VOSSEN, E.; VAUTRIN, S.; WEINING, S.; FAHIMA, T.; GLIKSON, V.; RAATS, D.; CIHALIKOVA, J.; TOEGELOVA, H.; VRANA, J.; SOURDILLE, P.; DARRIER, B.; BARABASCHI, D.; CATTIVELLI, L.; HERNANDEZ, P.; GALVEZ, S.; BUDAK, H.; JONES, J. D. G.; WITEK, K.; YU, G. T.; SMALL, I.; MELONEK, J.; ZHOU, R. N.; BELOVA, T.; KANYUKA, K.; KING, R.; NILSEN, K.; WALKOWIAK, S.; CUTHBERT, R.; KNOX, R.; WIEBE, K.; XIANG, D. Q.; ROHDE, A.; GOLDS, T.; CIZKOVA, J.; AKPINAR, B. A.; BIYIKLIOGLU, S.; GAO, L. L.; N'DAIYE, A.; KUBALAKOVA, M.; SAFAR, J.; ALFAMA, F.; ADAM-BLONDON, A. F.; FLORES, R.; GUERCHE, C.; LOAEC, M.; QUESNEVILLE, H.; CONDIE, J.; ENS, J.; MACLACHLAN, R.; TAN, Y. F.; ALBERTI, A.; AURY, J. M.; BARBE, V.; COULOUX, A.; CRUAUD, C.; LABADIE, K.; MANGENOT, S.; WINCKER, P.; KAUR, G.; LUO, M. C.; SEHGAL, S.; SINGH, K.; CHHUNEJA, P.; GUPTA, O. P.; JINDAL, S.; KAUR, P.; MALIK, P.; SHARMA, P.; YADAV, B.; SINGH, N. K.; KHURANA, J.; CHAUDHARY, C.; KHURANA, P.; KUMAR, V.; MAHATO, A.; MATHUR, S.; SEVANTHI, A.; SHARMA, N.; TOMAR, R. S.; ROGERS, J.; JACOBS, J.; ALAUX, M.; BELLEC, A.; BERGES, H.; DOLEZEL, J.; FEUILLET, C.; FRENKEL, Z.; GILL, B.; KOROL, A.; VAN DER VOSSEN, E.; VAUTRIN, S.; GILL, B.; KAUR, G.; LUO, M. C.; SEHGAL, S.; BARTOS, J.; HOLUSOVA, K.; PLIHAL, O.; CLARK, M. D.; HEAVENS, D.; KETTLEBOROUGH, G.; WRIGHT, J.; VALARIK, M.; ABROUK, M.; BALCARKOVA, B.; HOLUSOVA, K.; HU, Y. Q.; LUO, M. C.; SALINA, E.; RAVIN, N.; SKRYABIN, K.; BELETSKY, A.; KADNIKOV, V.; MARDANOV, A.; NESTEROV, M.; RAKITIN, A.; SERGEEVA, E.; HANDA, H.; KANAMORI, H.; KATAGIRI, S.; KOBAYASHI, F.; NASUDA, S.; TANAKA, T.; WU, J. Z.; APPELS, R.; HAYDEN, M.; KEEBLE-GAGNERE, G.; RIGAULT, P.; TIBBITS, J.; OLSEN, O. A.; BELOVA, T.; CATTONARO, F.; JIUMENG, M.; KUGLER, K.; MAYER, K. F. X.; PFEIFER, M.; SANDVE, S.; XUN, X.; ZHAN, B. J.; SIMKOVA, H.; ABROUK, M.; BATLEY, J.; BAYER, P. E.; EDWARDS, D.; HAYASHI, S.; TOEGELOVA, H.; TULPOVA, Z.; VISENDI, P.; SONG, W. N.; CUI, L. C.; DU, X. H.; FENG, K. W.; NIE, X. J.; TONG, W.; WANG, L.; BORRILL, P.; GUNDLACH, H.; GALVEZ, S.; KAITHAKOTTIL, G.; LANG, D.; LUX, T.; MASCHER, M.; ORMANBEKOVA, D.; PRADE, V.; RAMIREZ-GONZALEZ, R. H.; SPANNAGL, M.; STEIN, N.; UAUY, C.; VENTURINI, L.; STEIN, N.; APPELS, R.; EVERSOLE, K.; ROGERS, J.; BORRILL, P.; CATTIVELLI, L.; CHOLET, F.; HERNANDEZ, P.; KANYUKA, K.; LANG, D.; MASCHER, M.; NILSEN, K.; PAUX, E.; POZNIAK, C. J.; RAMIREZ-GONZALEZ, R. H.; SIMKOVA, H.; SMALL, I.; SPANNAGL, M.; SWARBRECK, D.; UAUY, C. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*, v. 361, n. 6403, p. 661, Aug. 2018. Article eaar7191.

ARNOULT, N.; CORREIA, A.; MA, J.; MERLO, A.; GARCIA-GOMEZ, S.; MARIC, M.; TOGNETTI, M.; BENNER, C. W.; BOULTON, S. J.; SAGHATELIAN, A.; KARLSEDER, J. Regulation of DNA repair pathway choice in S and G2 phases by the NHEJ inhibitor CYREN. *Nature*, v. 549, n. 7673, p. 548-552, Sept. 2017.

BARRANGOU, R.; MARRAFFINI, L. A. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular cell*, v. 54, n. 2, p. 234-244, Apr. 2014.

BIBIKOVA, M.; CARROLL, D.; SEGAL, D. J.; TRAUTMAN, J. K.; SMITH, J.; KIM, Y. G.; CHANDRASEGARAN, S. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Molecular and Cellular Biology*, v. 21, n. 1, p. 289-297, Jan. 2001.

BRAUER, E. K.; BALCERZAK, M.; ROCHELEAU, H.; LEUNG, W.; SCHERNTHANER, J.; SUBRAMANIAM, R.; OUELLET, T. Genome editing of a deoxynivalenol-induced transcription factor confers resistance to *Fusarium graminearum* in wheat. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 33, n. 3, p. 553-560, Mar. 2020.

BUDHAGATAPALLI, N.; HALBACH, T.; HIEKEL, S.; BÜCHNER, H.; MÜLLER, A. E.; KUMLEHN, J. Site-directed mutagenesis in bread and durum wheat via pollination by cas9/guide RNA-transgenic maize used as haploidy inducer. **Plant Biotechnology Journal**, v. 18, n. 12, p. 2376-2378, Dec. 2020.

CHEN, H.; SU, Z.; TIAN, B.; LIU, Y.; PANG, Y.; KAVETSKYI, V.; TRICK, H. N.; BAI, G. Development and optimization of a *Barley stripe mosaic virus*-mediated gene editing system to improve Fusarium head blight resistance in wheat. **Plant Biotechnology Journal**, v. 20, p. 1018-1020, 2022.

CHRISTIAN, M.; CERMAK, T.; DOYLE, E. L.; SCHMIDT, C.; ZHANG, F.; HUMMEL, A.; BOGDANOVA, A. J.; VOYTAS, D. F. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. **Genetics**, v. 186, n. 2, p. 757-761, Oct. 2010.

DEBERNARDI, J. M.; TRICOLI, D. M.; ERCOLI, M. F.; HAYTA, S.; RONALD, P.; PALATNIK, J. F.; DUBCOVSKY, J. A GRF-GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 11, p. 1274-1279, Nov. 2020.

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, Mar. 2011.

DING, Y.; SUN, T.; AO, K.; PENG, Y.; ZHANG, Y.; LI, X.; ZHANG, Y. Opposite roles of salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in transcriptional regulation of plant immunity. **Cell**, v. 173, n. 6, p. 1454-1467.e15, May 2018.

DWIVEDI, S. L.; BRITT, A. B.; TRIPATHI, L.; SHARMA, S.; UPADHYAYA, H. D.; ORTIZ, R. Haploids: constraints and opportunities in plant breeding. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, pt. 1, p. 812-829, Nov. 2015.

ELLISON, E. E.; NAGALAKSHMI, U.; GAMO, M. E.; HUANG, P. J.; DINESH-KUMAR, S.; VOYTAS, D. F. Multiplexed heritable gene editing using RNA viruses and mobile single guide RNAs. **Nature Plants**, v. 6, n. 6, p. 620-624, June 2020.

FAO. **Faostat**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> Acesso em: 1º out. 2021a.

FAO. **World Food and Agriculture**: statistical yearbook 2021. Rome, 2021b. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/cb4477en>. Acesso em: 1º out. 2021.

GONZÁLEZ CASTRO, N.; BJELIC, J.; MALHOTRA, G.; HUANG, C.; ALSAFFAR, S. H. Comparison of the feasibility, efficiency, and safety of genome editing technologies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, p. 10355, Sept. 2021.

GONZÁLEZ, F. G.; CAPELLA, M.; RIBICHICH, K. F.; CURÍN, F.; GIACOMELLI, J. I.; AYALA, F.; WATSON, G.; OTEGUI, M. E.; CHAN, R. L. Field-grown transgenic wheat expressing the sunflower gene *HaHB4* significantly outyields the wild type. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 5, p. 1669-1681, Mar. 2019.

GORDON-KAMM, B.; SARDESAI, N.; ARLING, M.; LOWE, K.; HOERSTER, G.; BETTS, S.; JONES, A. T. Using morphogenic genes to improve recovery and regeneration of transgenic plants. **Plants**, v. 8, n. 2, p. 38, Feb. 2019.

GU, X.; LIU, L.; ZHANG, H. Transgene-free genome editing in plants. **Frontiers in Genome Editing**, v. 3, p. 805317, Dec. 2021.

HAMADA, H.; LIU, Y.; NAGIRA, Y.; MIKI, R.; TAOKA, N.; IMAI, R. Biolistic-delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables *in planta* genome editing in wheat. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14422, Sept. 2018.

HERNANDES-LOPES, J.; SILVA, V. C. H.; SANTOS, J. C.; DANTE, R. A.; GERHARDT, I. R.; YASSITEPE, J. E. C.; FERNANDES, F. R. **Introdução à edição genômica em plantas**. In: MOLINARI, H. B. C.; VIEIRA, L. R.; SILVA, N. V.; PRADO, G. S.; HERNANDES-LOPES, J. H. (ed.). *Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas: biotecnologia aplicada à agricultura*. Brasília, DF: Embrapa, 2020. p. 11-48. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/217568/1/Tecnologia-CRISPR-2020.pdf>. Acesso em: 24 maio 2022.

HOLZBERG, S.; BROSIO, P.; GROSS, C.; POGUE, G. P. *Barley stripe mosaic virus*-induced gene silencing in a monocot plant. **The Plant Journal**, v. 30, n. 3, p. 315-327, May 2002.

HU, J.; LI, S.; LI, Z.; LI, H.; SONG, W.; ZHAO, H.; LAI, J.; XIA, L.; LI, D.; ZHANG, Y. A *Barley stripe mosaic virus*-based guide RNA delivery system for targeted mutagenesis in wheat and maize. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 10, p. 1463-1474, Oct. 2019.

IQBAL, Z.; IQBAL, M. S.; AHMAD, A.; MEMON, A. G.; ANSARI, M. I. New prospects on the horizon: genome editing to engineer plants for desirable traits. **Current Plant Biology**, v. 24, p. 100171, Dec. 2020.

IMAI, R.; HAMADA, H.; LIU, Y.; LINGHU, Q.; KUMAGAI, Y.; NAGIRA, Y.; MIKI, R.; TAOKA, N. *In planta* particle bombardment (iPB): a new method for plant transformation and genome editing. **Plant Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 171-176, June 2020.

JACQUIER, A.; DUJON, B. An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. **Cell**, v. 41, n. 2, p. 383-394, June 1985.

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, Aug. 2012.

KIM, S. G. The way to true plant genome editing. **Nature Plants**, v. 6, n. 7, p. 736-737, July 2020.

KIM, Y. G.; CHA, J.; CHANDRASEGARAN, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 3, p. 1156-1160, Feb. 1996.

LACCHINI, E.; KIEGLE, E.; CASTELLANI, M.; ADAM, H.; JOUANNIC, S.; GREGIS, V.; KATER, M. M. CRISPR-mediated accelerated domestication of African rice landraces. **PLoS One**, v. 15, n. 3, p. e0229782, Mar. 2020.

LAURIE, D. A.; BENNETT, M. D. The production of haploid wheat plants from wheat x maize crosses. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 76, n. 3, p. 393-397, Sept. 1998.

- LI, H.; YANG, Y.; HONG, W.; HUANG, M.; WU, M.; ZHAO, X. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. **Signal Transduction and Targeting Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1, Jan. 2020.
- LI, S.; LIN, D.; ZHANG, Y.; DENG, M.; CHEN, Y.; LV, B.; LI, B.; LEI, Y.; WANG, Y.; ZHAO, L.; LIANG, Y.; LIU, J.; CHEN, K.; LIU, Z.; XIAO, J.; QIU, J. L.; GAO, C. Genome-edited powdery mildew resistance in wheat without growth penalties. **Nature**, v. 602, n. 7897, p. 455-460, Feb. 2022.
- LI, T.; HU, J.; SUN, Y.; LI, B.; ZHANG, D.; LI, W.; LIU, J.; LI, D.; GAO, C.; ZHANG, Y.; WANG, Y. Highly efficient heritable genome editing in wheat using an RNA virus and bypassing tissue culture. **Molecular Plant**, v. 14, n. 11, p. 1787-1798, Nov. 2021.
- LIU, H.; WANG, K.; JIA, Z.; GONG, Q.; LIN, Z.; DU, L.; PEI, X.; YE, X. Efficient induction of haploid plants in wheat by editing of *TaMTL* using an optimized *Agrobacterium*-mediated CRISPR system. **Journal of Experimental Botany**, v. 71, n. 4, p. 1337-1349, Feb. 2020.
- LIU, Q.; YANG, F.; ZHANG, J.; LIU, H.; RAHMAN, S.; ISLAM, S.; MA, W.; SHE, M. Application of CRISPR/Cas9 in crop quality improvement. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 4206, Apr. 2021a.
- LIU, Y.; LUO, W.; LINGHU, Q.; ABE, F.; HISANO, H.; SATO, K.; KAMIYA, Y.; KAWAURA, K.; ONISHI, K.; ENDO, M.; TOKI, S.; HAMADA, H.; NAGIRA, Y.; TAOKA, N.; IMAI R. *In planta* genome editing in commercial wheat varieties. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 648841, Mar. 2021b.
- LV, J.; YU, K.; WEI, J.; GUI, H.; LIU, C.; LIANG, D.; WANG, Y.; ZHOU, H.; CARLIN, R.; RICH, R.; LU, T.; QUE, Q.; WANG, W. C.; ZHANG, X.; KELLIHER, T. Generation of paternal haploids in wheat by genome editing of the centromeric histone CENH3. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 12, p. 1397-1401, Dec. 2020.
- MENZ, J.; MODRZEJEWSKI, D.; HARTUNG, F.; WILHELM, R.; SPRINK, T. Genome edited crops touch the market: a view on the global development and regulatory environment. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 586027, Oct. 2020.
- MILLER, J. C.; TAN, S.; QIAO, G.; BARLOW, K. A.; WANG, J.; XIA, D. F.; MENG, X.; PASCHON, D. E.; LEUNG, E.; HINKLEY, S. J.; DULAY, G. P.; HUA, K. L.; ANKOUDINOVA, I.; COST, G. J.; URNOV, F. D.; ZHANG, H. S.; HOLMES, M. C.; ZHANG, L.; GREGORY, P. D.; REBAR, E. J. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 143-149, Feb. 2011.
- MILLER, J.; MCLACHLAN, A. D.; KLUG, A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. **The EMBO Journal**, v. 4, n. 6, p. 1609-1614, June 1985.
- NASTI, R. A.; VOYTAS, D. F. Attaining the promise of plant gene editing at scale. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 118, n. 22, p. e2004846117, June 2021.
- PUCHTA, H. The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 409, p. 1-14, Jan. 2005.
- ROUET, P.; SMIH, F.; JASIN, M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 12, p. 8096-8106, Dec. 1994.

RÖNSPIES, M.; DORN, A.; SCHINDELE, P.; PUCHTA, H. CRISPR-Cas-mediated chromosome engineering for crop improvement and synthetic biology. **Nature Plants**, v. 7, n. 5, p. 566-573, May 2021.

SÁNCHEZ-LEÓN, S.; GIL-HUMANES, J.; OZUNA, C. V.; GIMÉNEZ, M. J.; SOUSA, C.; VOYTAS, D. F.; BARRO, F. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 4, p. 902-910, Apr. 2018.

SHEN, L.; HUA, Y.; FU, Y.; LI, J.; LIU, Q.; JIAO, X.; XIN, G.; WANG, J.; WANG, X.; YAN, C.; WANG, K. Rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice. **Science China Life Sciences**, v. 60, n. 5, p. 506-515, May 2017.

STOKSTAD, E. Monsanto beats a retreat on fielding GM wheat. **Science**, v. 304, n. 5673, p. 939, May 2004.

SU, Z.; BERNARDO, A.; TIAN, B.; CHEN, H.; WANG, S.; MA, H.; CAI, S.; LIU, D.; ZHANG, D.; LI, T.; TRICK, H.; ST AMAND, P.; YU, J.; ZHANG, Z.; BAI, G. A deletion mutation in *TaHRC* confers *Fhb1* resistance to Fusarium head blight in wheat. **Nature Genetics**, v. 51, n. 7, p. 1099-1105, July 2019.

TANG, X. D.; GAO, F.; LIU, M. J.; FAN, Q. L.; CHEN, D. K.; MA, W. T. Methods for enhancing clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-mediated homology-directed repair efficiency. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. 551, June 2019.

TYAGI, S.; KUMAR, R.; KUMAR, V.; WON, S. Y.; SHUKLA, P. Engineering disease resistant plants through CRISPR-Cas9 technology. **GM Crops & Food**, v. 12, n. 1, p. 125-144, Jan. 2021.

WADA, N.; UETA, R.; OSAKABE, Y.; OSAKABE, K. Precision genome editing in plants: state-of-the-art in CRISPR/Cas9-based genome engineering. **BMC Plant Biology**, v. 20, n. 1, p. 234, May 2020.

WALTZ, E. GABA-enriched tomato is first CRISPR-edited food to enter market. **Nature Biotechnology**, v. 40, n. 1, p. 9-11, Jan. 2022.

WALTZ, E. With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time. **Nature Biotechnology**, v. 36, p. 6-7, Jan. 2018.

WANG, C.; LIU, Q.; SHEN, Y.; HUA, Y.; WANG, J.; LIN, J.; WU, M.; SUN, T.; CHENG, Z.; MERCIER, R.; WANG, K. Clonal seeds from hybrid rice by simultaneous genome engineering of meiosis and fertilization genes. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 283-286, Mar. 2019.

WANG, W.; SIMMONDS, J.; PAN, Q.; DAVIDSON, D.; HE, F.; BATTAL, A.; AKHUNOVA, A.; TRICK, H. N.; UAUY, C.; AKHUNOV, E. Gene editing and mutagenesis reveal inter-cultivar differences and additivity in the contribution of *TaGW2* homoeologues to grain size and weight in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 131, n. 11, p. 2463-2475, Nov. 2018.

WANG, Y.; CHENG, X.; SHAN, Q.; ZHANG, Y.; LIU, J.; GAO, C.; QIU, J. L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 9, p. 947-951, Sept. 2014.

WOLTER, F.; SCHINDELE, P.; PUCHTA, H. Plant breeding at the speed of light: the power of CRISPR/Cas to generate directed genetic diversity at multiple sites. **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 176, May 2019.

YIN, K.; GAO, C.; QIU, J. L. Progress and prospects in plant genome editing. **Nature Plants**, v. 3, p. 17107, July 2017.

YU, H.; LIN, T.; MENG, X.; DU, H.; ZHANG, J.; LIU, G.; CHEN, M.; JING, Y.; KOU, L.; LI, X.; GAO, Q.; LIANG, Y.; LIU, X.; FAN, Z.; LIANG, Y.; CHENG, Z.; CHEN, M.; TIAN, Z.; WANG, Y.; CHU, C.; ZUO, J.; WAN, J.; QIAN, Q.; HAN, B.; ZUCCOLO, A.; WING, R. A.; GAO, C.; LIANG, C.; LI, J. A route to *de novo* domestication of wild allotetraploid rice. **Cell**, v. 184, n. 5, p. 1156-1170.e14, Mar. 2021.

YUAN, C.; LI, C.; YAN, L.; JACKSON, A. O.; LIU, Z.; HAN, C.; YU, J.; LI, D. A high throughput *Barley stripe mosaic virus* vector for virus induced gene silencing in monocots and dicots. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26468, Oct. 2011.

ZHANG, R.; LIU, J.; CHAI, Z.; CHEN, S.; BAI, Y.; ZONG, Y.; CHEN, K.; LI, J.; JIANG, L.; GAO, C. Generation of herbicide tolerance traits and a new selectable marker in wheat using base editing. **Nature Plants**, v. 5, n. 5, p. 480-485, May 2019a.

ZHANG, Y.; BAI, Y.; WU, G.; ZOU, S.; CHEN, Y.; GAO, C.; TANG, D. Simultaneous modification of three homoeologs of *TaEDR1* by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. **Plant Journal**, v. 91, n. 4, p. 714-724, Aug. 2017.

ZHANG, Y.; LIANG, Z.; ZONG, Y.; WANG, Y.; LIU, J.; CHEN, K.; QIU, J. L.; GAO, C. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. **Nature Communications**, v. 7, p. 12617, Aug. 2016.

ZHANG, Y.; LI, D.; ZHANG, D.; ZHAO, X.; CAO, X.; DONG, L.; LIU, J.; CHEN, K.; ZHANG, H.; GAO, C.; WANG, D. Analysis of the functions of *TaGW2* homoeologs in wheat grain weight and protein content traits. **Plant Journal**, v. 94, n. 5, p. 857-866, June 2018.

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 Biotechnology Journal**, v. 17, n. 8, p. 1623-1635, Aug. 2019b.

ZHOU, J.; XIN, X.; HE, Y.; CHEN, H.; LI, Q.; TANG, X.; ZHONG, Z.; DENG, K.; ZHENG, X.; AKHER, S. A.; CAI, G.; QI, Y.; ZHANG, Y. Multiplex QTL editing of grain-related genes improves yield in elite rice varieties. **Plant Cell Reports**, v. 38, n. 4, p. 475-485, Apr. 2019.

ZHU, T.; WANG, L.; RIMBERT, H.; RODRIGUEZ, J. C.; DEAL, K. R.; OLIVEIRA, R.; CHOULET, F.; KEEBLE-GAGNÈRE, G.; TIBBITS, J.; ROGERS, J.; EVERSOLE, K.; APPELS, R.; GU, Y. Q.; MASCHER, M.; DVORAK, J.; LUO, M. C. Optical maps refine the bread wheat *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring genome assembly. **Plant Journal**, v. 107, n. 1, p. 303-314, July 2021.

ZSÖGÖN, A.; ČERMÁK, T.; NAVES, E. R.; NOTINI, M. M.; EDEL, K. H.; WEINL, S.; FRESCHI, L.; VOYTAS, D. F.; KUDLA, J.; PERES, L. E. P. *De novo* domestication of wild tomato using genome editing. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1211-1216, Oct. 2018.



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

CGPE 017832