

# Introdução à edição genômica em plantas

José Hernandes Lopes Filho  
Viviane Cristina Heinzen da Silva  
Josenilda Carlos dos Santos  
Ricardo Augusto Dante  
Isabel Rodrigues Gerhardt  
Juliana Erika de Carvalho Teixeira Yassitepe  
Fernanda Rausch Fernandes

## Desafios da agricultura moderna para o presente e o futuro

Os desafios da agricultura moderna, destinada tanto para abastecimento de alimentos quanto para obtenção de bioenergia, são de escala mundial e incluem aumento da demanda alimentícia devido ao crescimento populacional, mudanças de hábitos alimentares e mudanças climáticas. Um dos maiores desafios é aumento sustentável da produção, com a aplicação de melhores práticas agrícolas e o desenvolvimento de variedades capazes de produzir alimentos com teor e qualidade nutricional, bem como mais tolerantes aos diversos tipos de estresses bióticos e abióticos (DaMatta et al., 2010; Lobell; Gourджи, 2012; McCouch et al., 2013; Eisenstein, 2013; FAO, 2019). Além disso, o contínuo aumento da utilização de áreas cultiváveis tem causado grande impacto de desmatamento florestal (Campbell et al., 2008).

Historicamente, o desenvolvimento de cultivares com características desejáveis (*traits*), tais como maior produtividade, resistência a pragas ou maior valor nutricional, baseou-se principalmente em métodos de seleção de alelos favoráveis de ocorrência natural ou induzidos por mutagênese não específica. Apesar de sua enorme contribuição, esses métodos apresentam limitações, tais como a seleção fenotípica sem conhecimento das bases moleculares e fisiológicas envolvidas (Purugganan; Fuller, 2009).

Com o advento da biologia molecular, a agricultura moderna se beneficiou de diversas técnicas que auxiliam o melhoramento genético vegetal, com destaque para a transgenia, a seleção assistida por marcadores moleculares e a seleção genômica. Contudo, embora tenham papel importante no cenário da agricultura atual, alimentos transgênicos sofrem forte crítica do público, normalmente sendo associados à imagem de algo “não natural” por reunir material genético de diferentes organismos (Schmidt et al., 2020). Além disso, ainda há muita limitação técnica para o desenvolvimento de produtos comerciais, como, por exemplo, a restrição à manipulação de características controladas por poucos genes, ou a impossibilidade de escolha da posição genômica onde o DNA exógeno é integrado (Que et al., 2010).

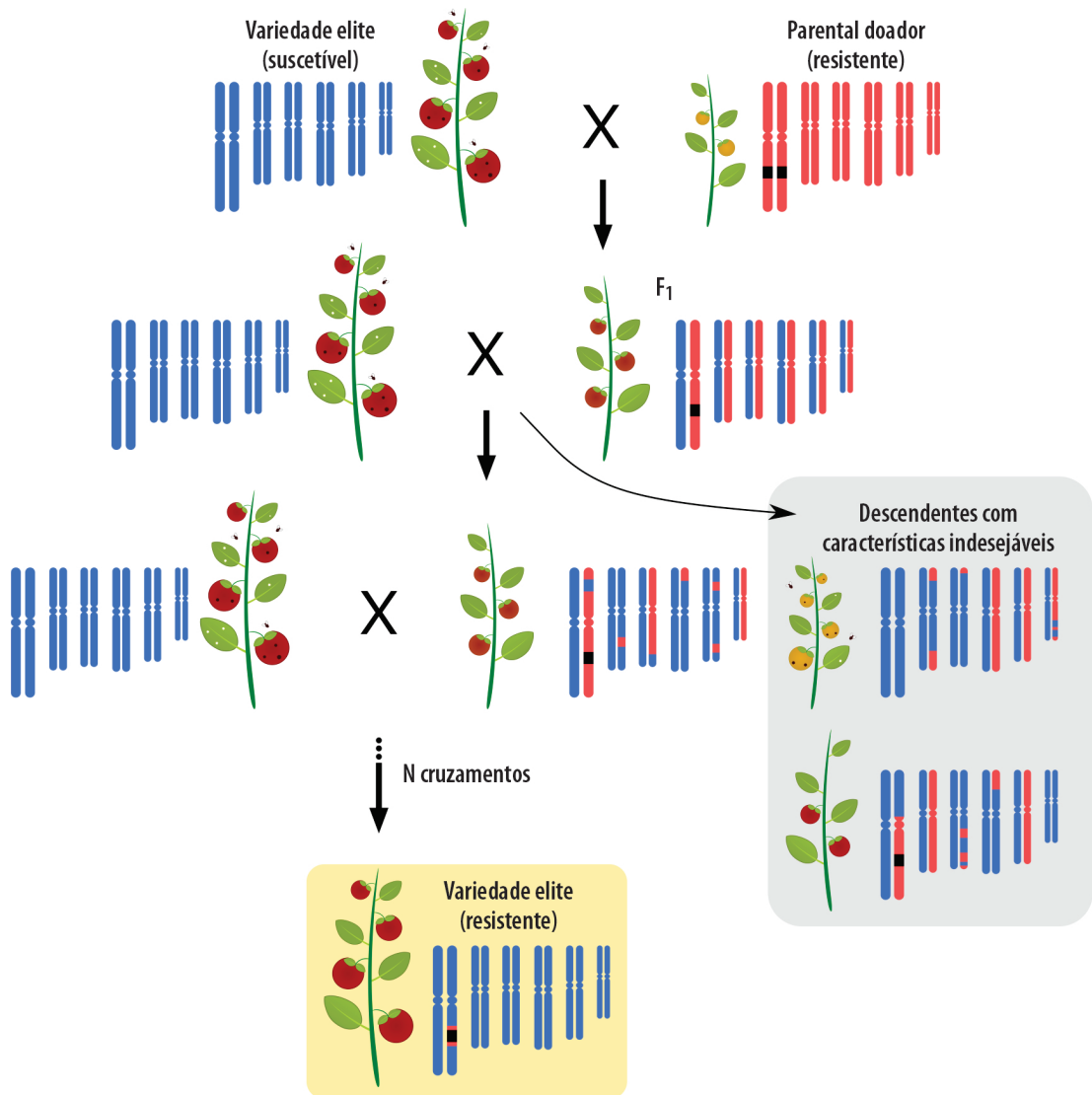
Outros métodos de introgressão de genes (transferência ou introdução permanente de genes de interesse de uma linhagem para outra) envolvem várias etapas de cruzamentos entre as linhagens selecionadas e a elite, o que demanda longos períodos de tempo (Mazur; Tingey, 1995; Jacobsen; Schouten, 2007; Harrison; Larson, 2014). Por exemplo, uma cultivar elite apresenta características de interesse agrônômico, mas pode ser suscetível a uma determinada praga. Para adquirir resistência, tal cultivar é cruzada com uma variedade doadora, resistente à praga, mas com demais características não desejadas. A geração F1 (híbrida) é resistente à praga graças ao alelo dominante proveniente do parental doador, mas apresenta características intermediárias. Diversas etapas de retrocruzamento e seleção são necessárias para recobrar as características da variedade elite, mantendo a resistência. Muitas vezes, mesmo após múltiplos ciclos de retrocruzamento, não é possível recuperar as sequências da variedade elite adjacentes ao locus de interesse (Figura 1). Esses métodos são ainda restritos a espécies aparentadas, uma vez que o cruzamento entre espécies distantes não é viável, ou, quando ocorre, tende a produzir descendentes inférteis (Moyle; Nakazato, 2008).

Assim, o desenvolvimento de híbridos ou cultivares agrícolas com múltiplos *traits* é um processo extremamente complexo, de alto custo e longo. Mesmo os programas de melhoramento assistido por marcadores moleculares, que identificam e garantem a presença do alelo introduzido, bem como selecionam o genoma do doador com características não desejadas, têm suas limitações (Xu; Crouch, 2008). Por exemplo, o extenso “arraste de ligação” (*linkage drag*), associado à segmentação de genoma, limita os programas de melhoramento na etapa de recombinação genética (Lin et al., 2014), exigindo tentativas para quebra da ligação do gene-alvo (Brown, 2002). Tais processos são muitas vezes desafiadores e exigem grandes populações de cruzamento e seleção trabalhosa, uma vez que a taxa de recombinação entre um dado marcador próximo ao locus de interesse e esse próprio locus é baixa, sendo diretamente relacionada à distância entre ambos (Li et al., 2015).

É, portanto, urgente que novas estratégias e tecnologias sejam utilizadas para reduzir o tempo e os custos do melhoramento genético. Nesse sentido, a edição genômica em plantas emergiu como uma importante ferramenta para o aumento da produtividade, qualidade e segurança dos alimentos produzidos.

## Ferramentas de edição de genomas para o melhoramento de precisão

Tecnologias eficientes de edição de genomas têm promovido grandes oportunidades para a agricultura, permitindo a manipulação de genomas de plantas de



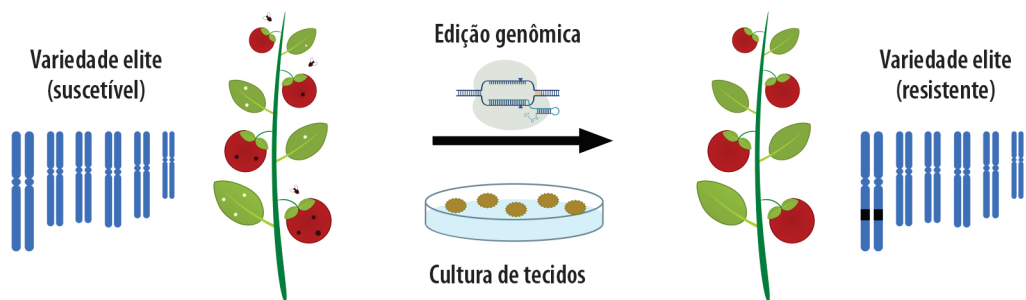
**Figura 1.** Representação do processo de introgressão no qual uma variedade elite suscetível a uma praga é cruzada com um parental doador resistente. Cromossomos azuis e vermelhos representam genoma da cultivar elite e doadora, respectivamente. Região em preto indica o locus que confere resistência à praga.

maneira altamente específica (não aleatória) em seu contexto cromossômico natural (Chen et al., 2019). Como veremos em detalhe mais adiante, diferentes técnicas de edição foram utilizadas nos últimos anos, destacando-se as baseadas em ZFNs (*Zinc Finger Nucleases*), TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) e CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR associated protein*).

Uma das maiores contribuições das técnicas de edição de genomas na área agrícola talvez seja a possibilidade de melhoramento de múltiplos *traits* simultaneamente – diretamente em linhagens elite, agilizando o desenvolvimento de produtos comerciais, o que geralmente é impraticável por meio de técnicas convencionais de melhoramento genético (Gao et al., 2020b). Tais estratégias, denominadas *multiplex*, envolvem a edição de diversos loci concomitantemente. Essa versatilidade é importante para o melhoramento de características determinadas por QTLs (do inglês *Quantitative Trait Loci*), ou seja, aquelas controladas por múltiplos loci do genoma (Rodríguez-Leal et al., 2017).

Estratégias alternativas, como *“in vivo desired-target mutator”* (DTM) (Li et al., 2017), são baseadas no cruzamento de eventos transgênicos (carregando a maquinaria de edição) com genótipos elite, nos quais a edição pode ocorrer diretamente nos seus alelos. Consequentemente, essas estratégias minimizam o efeito de *“arraste de ligação”* associado aos loci editados e aceleram a recuperação do genoma dos parentais recorrentes por possibilitar tanto número menor de gerações de retrocruzamento quanto uso menos intensivo de marcadores moleculares.

Além disso, recentes avanços da tecnologia permitem a obtenção de plantas modificadas sem a inserção cromossômica de DNA exógeno, abrindo assim a possibilidade de serem consideradas como livres de transgenia (Figura 2) (Jansing et al., 2019). Diferentes classificações vêm sendo adotadas, baseadas no tipo e extensão das modificações genômicas realizadas. Diversos países já optaram por não tratar como Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) aqueles obtidos por meio de edição genômica (a depender da abordagem utilizada). No Brasil, as técnicas de edição de genomas podem entrar na categoria de Técnicas Inovadoras do Melhoramento de Precisão (TIMPs), do inglês *Precision Breeding Innovation* (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, 2018). As TIMPs foram definidas pela Resolução Normativa Nº 16, de 15 de janeiro de 2018 (Comissão Técnica Nacional



**Figura 2.** Processo de melhoramento de resistência a uma determinada praga, por edição genômica, sem a necessidade de integração de DNA exógeno no genoma da variedade elite.

de Biossegurança, 2018), pela CTNBio, e têm por característica a ausência de DNA recombinante em seus produtos finais. Com isso, a técnica pode permitir que empresas de pequeno e médio porte, assim como institutos de pesquisa, tenham maiores condições de superar obstáculos regulatórios (Schmidt et al., 2020). O atual panorama da regulamentação de organismos com genoma editado é abordado no Capítulo 5 – Regulamentação da edição genômica em plantas no Brasil e no mundo.

## Histórico das metodologias de edição genômica

Edição genômica, edição gênica ou engenharia genômica são nomes dados às modificações específicas feitas no DNA de organismos vivos (Baltés et al., 2017). A edição genômica ocorre por meio da ação de nucleases sítio-dirigidas, capazes de clivar a molécula de DNA-alvo, ativando a subsequente ação de mecanismos de reparo de DNA da própria célula, que podem ser direcionados por recombinação homóloga (HR, do inglês *Homologous Recombination*) ou por união de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês *Non-Homologous End Joining*) (Satheesh et al., 2019). Isso se tornou possível após o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, a qual teve início em 1972, quando o laboratório de Paul Berg publicou a criação da primeira molécula de DNA recombinada (Jackson et al., 1972). Desde então, técnicas de biologia molecular e engenharia genética têm evoluído, permitindo aos cientistas desenvolverem diversas metodologias de edição de genomas, incluindo a construção de sistemas de vetores, métodos de entrega de material genético e aplicação de proteínas “engenheiradas” (Jansing et al., 2019; Anzalone et al., 2020). Entre as proteínas da primeira geração de ferramentas de edição de genomas em plantas, estão as enzimas ZFNs e TALENs.

### ZFNs (*Zinc Finger Nucleases*)

As ZFNs são proteínas quiméricas “engenheiradas”, compostas de um domínio de clivagem inespecífico de FokI, que promove a quebra da dupla fita de DNA, e de um arranjo de repetições de 3-5 dedos de zinco Cys2-His2, responsável pela ligação ao DNA (Shah et al., 2018). Cada dedo de zinco interage com 3 nucleotídeos em sucessão no DNA, formando um dímero. Esse dímero identifica uma sequência-alvo de 18 a 24 pares de base (pb) no genoma. Dessa forma, o dedo de zinco pode ser modificado para reconhecer genes ou regiões de interesse no DNA. A quebra na dupla fita de DNA pode ser reparada por NHEJ ou HR, resultando na edição do gene, por meio de inserções ou deleções (Satheesh et al., 2019).

ZFNs foram as primeiras enzimas utilizadas na edição de genoma de plantas, utilizando *Arabidopsis thaliana* como modelo e, desde então, diversos estudos foram

conduzidos utilizando essa técnica em outras espécies (Davies et al., 2017). Em milho, ZFN foi empregada para gerar cortes no gene *ipk1*, o que resultou em plantas tolerantes a herbicida (bialafos e quizalofop) (Shukla et al., 2009). Essa técnica também foi utilizada para gerar plantas de tabaco resistentes a imidazolinona e sulfonilureia (Townsend et al., 2009). Outro estudo mostrou a eficiência de ZFN associada ao mecanismo HR em tabaco, ao ser utilizada para a substituição de uma sequência genômica de 7 kb por um cassete de 4 kb codificando múltiplos marcadores (Schneider et al., 2016). Em soja, o papel funcional de genes que codificam uma família de proteínas DICER-LIKE1, envolvidos na via de maturação de pequenos RNAs, foi confirmado por meio de mutações geradas por ZFN (Curtin et al., 2016).

### TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*)

Os efetores do tipo ativador transcricional são proteínas sintetizadas por bactérias fitopatogênicas, do gênero *Xanthomonas* (Gaj et al., 2013). Essas proteínas são compostas por domínios de ligação ao DNA, os quais são formados por 13 a 30 arranjos de repetições de resíduo de aminoácidos em série. Cada arranjo contém cerca de 34 resíduos de aminoácidos idênticos, exceto por dirresíduos na posição 12 e 13, chamados de repetições dirresíduos variáveis (RVD), os quais são responsáveis pela especificidade de ligação no nucleotídeo da sequência-alvo (Satheesh et al., 2019). Cada RVD é capaz de reconhecer um único par de bases e permite modificações para alvos específicos no genoma em estudo (Shah et al., 2018). Os domínios repetidos são artificialmente fundidos à nuclease FokI, como acontece com as ZFNs, adicionando a função de clivagem aos efetores do tipo ativador transcricional. Diversos alvos potenciais podem ser “engenheirados” em TALEN, resultando em quebra na dupla fita de DNA, o que permite a edição de genomas de interesse (Satheesh et al., 2019).

TALENs têm sido usadas para edição gênica em várias culturas com o objetivo de melhorar características específicas. Com foco na produção de etanol lignocelulósico, TALEN foi empregada para induzir mutações em uma região altamente conservada de ácido cafeico-o-metil transferase de cana-de-açúcar (Sedeek et al., 2019). As linhagens mutantes apresentaram redução no conteúdo de lignina, comprovando a eficiência da técnica para editar genomas complexos como o de cana-de-açúcar (Jung; Altpeter, 2016). Em arroz, TALEN foi utilizada para causar mutações no gene *OsSWEET* e *OsBAHD2*, gerando plantas resistentes à ferrugem e com melhoramento de fragrância, respectivamente (Li et al., 2012; Shan et al., 2015). Dois genes, *FucT* e *XylIT*, foram nocauteados em tabaco por meio de TALEN, para melhorar a capacidade da planta em produzir glicoproteínas (Li et al., 2016).

## Limitações das técnicas clássicas e vantagens do Sistema CRISPR/Cas.

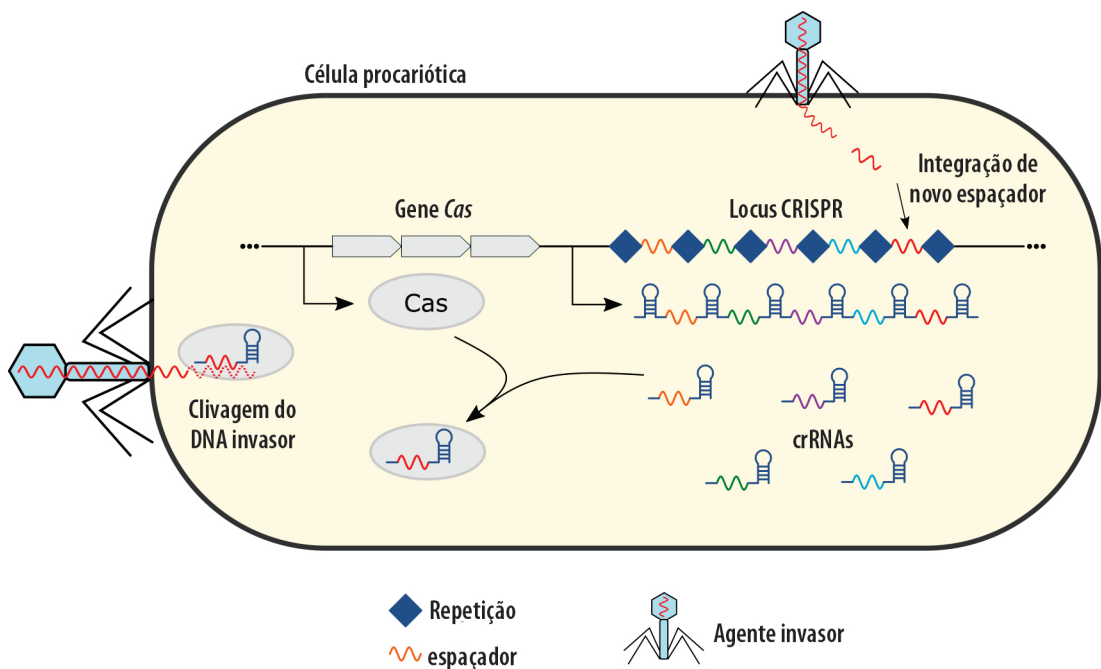
A utilização de ZFNs para edição genômica em plantas mostrou resultados bem-sucedidos, em diferentes espécies e com diferentes objetivos. No entanto, existem algumas limitações. Por exemplo, é necessário construir um arranjo de dedo de zinco para cada alvo selecionado (Chen et al., 2019). Além disso, o número de alvos é limitado e há possibilidade de ocorrer sobreposição entre o domínio catalítico e o domínio de ligação ao DNA, o que pode afetar a especificidade da proteína. Já a ferramenta TALEN, embora mais utilizada e mais precisa do que as ZFNs, tem a principal limitação na necessidade de construir grandes números de RVDs para atuar em um alvo pré-determinado (Satheesh et al., 2019). Assim, tanto ZFNs quanto TALENs necessitam ser redesenhadas para seus alvos específicos, o que caracteriza um grande desafio, visto que são proteínas complexas. Além disso, construir proteínas quiméricas como essas demanda tempo, é um processo complicado e tem um custo alto. Nesse cenário, surgiu o sistema CRISPR, o qual não depende da modificação de proteínas para a determinação dos alvos a serem editados, mas sim da simples inclusão de moléculas de RNA que conferem a especificidade do alvo (Jinek et al., 2012).

De maneira resumida, a edição genômica pelo sistema CRISPR se baseia em dois componentes básicos: uma nuclease (enzima capaz de promover a quebra da dupla fita de DNA) e moléculas de “RNA guia” (sgRNAs), que direcionam a atividade da nuclease para sítios específicos da molécula de DNA (Anzalone et al., 2020). Assim, com a simples troca das moléculas de sgRNA utilizadas, é possível editar diferentes regiões genômicas de interesse. Além do mais, a edição de múltiplos loci não depende necessariamente do uso de um grande número de sgRNAs. Por exemplo, diversos genes podem ser editados simultaneamente a partir do uso de sgRNAs que tenham como alvo um domínio conservado de uma família multigênica. Essa abordagem facilita a engenharia de vias metabólicas abundantes em enzimas redundantes. Essa mesma lógica pode ser utilizada para edição de múltiplas cópias de um mesmo gene, especialmente interessante para plantas com genomas poliploides.

## Origem da tecnologia CRISPR

O sistema CRISPR é um sofisticado mecanismo de imunidade adaptativa mediada por RNA/proteína usado por procariotos (bactérias e arqueas) na defesa contra ataque de vírus e plasmídeos (Figura 3). Esse sistema permite que o microrganismo clive ácidos nucleicos do invasor, interrompendo o seu ciclo (Wiedenheft et al., 2012; Koonin; Makarova, 2013). A sigla CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short*

*Palindromic Repeats* ou Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) refere-se ao arranjo gênico de pequenas regiões regulatórias repetitivas, contendo genes de RNAs pequenos e não codificantes, que conferem especificidade à defesa bacteriana: o CRISPR RNA (crRNA) e o transativador de crRNA (tracrRNA), ausente em alguns tipos de sistema CRISPR. Cas (do inglês *CRISPR associated protein*) é a nuclease capaz de clivar e destruir o DNA invasor (Wiedenheft et al., 2012; Marraffini, 2015).



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

Fonte: adaptado de Doudna Lab (2020).

Em procariotos, durante o processo de imunização, pequenos fragmentos de DNA exógeno (do invasor) são integrados na região CRISPR do cromossomo hospedeiro. Essa integração ocorre na forma de novos espaçadores (*spacers*) das regiões repetitivas (Amitai; Sorek, 2016), promovendo a adaptação do hospedeiro contra uma nova infecção pelo mesmo invasor (Barrangou et al., 2007). Caso ocorra uma subsequente invasão pelo mesmo vírus ou plasmídeo, a transcrição da região regulatória CRISPR (agora contendo novos espaçadores) e seu processamento para



formação de crRNAs maduros (algumas vezes dependente de tracrRNA) resultam no reconhecimento do invasor: a região 5' do crRNA contendo o *spacer* parecia com a sequência do DNA exógeno na região do espaçador-precursor (*protospacer*), que é então destruído pela nuclease Cas (Figura 3) (Marraffini; Sontheimer, 2008; Hale et al., 2009; Garneau et al., 2010). A especificidade e a degradação do elemento invasor na maioria dos sistemas CRISPR/Cas também são determinadas por uma pequena sequência de 2-5 pb, localizada próxima à sequência-alvo (*protospacer*) no DNA invasor, conhecida como motivo PAM (do inglês *protospacer adjacent motif*) (Mojica et al., 2009; Anders et al., 2014; Jiang; Doudna, 2017).

Da descoberta do sistema CRISPR até a sua adaptação como ferramenta de edição de genomas em organismos vivos, foram longos anos de pesquisas. Em 1987, ao analisar a sequência de DNA do gene *iap* de *Escherichia coli* k12, Ishino et al. (1987) observaram a presença de uma região incomum na extremidade 3' do gene. Essa região era constituída por sequências repetidas e sequências espaçadoras intercaladas (Ishino et al., 1987). Alguns anos depois, essas mesmas regiões foram encontradas na arquea *Haloferax mediterraneii* (Mojica et al., 1993). Em 2000, esses elementos genéticos foram identificados em 20 microrganismos diferentes, incluindo *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium difficile* e *Yersinia pestis*. Finalmente, foram caracterizados e denominados como repetições curtas regularmente espaçadas (SRSRs) (Mojica et al., 2000). Pouco tempo depois, o nome desse elemento foi trocado para CRISPR, porém sua função biológica permanecia desconhecida (Jansen et al., 2002).

A descoberta de quatro genes da família *Cas*, localizados adjacentes ao locus em procariotos, foi importante para desvendar a função biológica do locus CRISPR. Esses genes codificam proteínas com motivos característicos de nuclease e helicase, indicando que eles poderiam estar envolvidos no metabolismo do DNA ou na expressão de genes e teriam uma possível relação funcional com o locus CRISPR (Jansen et al., 2002). A partir dessas informações, várias hipóteses surgiram para o papel funcional de CRISPR: poderia participar na regulação gênica, no particionamento de replicons, reparo de DNA e outras funções.

Nos anos seguintes, com o auxílio de ferramentas de bioinformática, surgiu o primeiro indício de que o locus CRISPR estaria envolvido com o sistema imune de procariotos. Pesquisadores buscaram por sequências similares ao locus CRISPR de *E. coli* e verificaram que ela combinava com a sequência do fago P1, que infectava muitas linhagens de *E. coli*. A partir dessa informação, 4.500 espaçadores CRISPR foram identificados em 67 cepas bacterianas, dos quais muitos eram similares a sequências conhecidas de vírus ou plasmídeos conjugativos (Mojica et al., 2005). Paralelamente a esses estudos, foi observado que 61 linhagens de *Y. pestis* eram

idênticas em seus loci de repetições em sucessão, exceto pelos espaçadores do locus CRISPR, e que muitos desses espaçadores correspondiam a profagos, presentes no genoma de *Y. pestis*. Os autores então sugeriram que o locus CRISPR funcionaria como um mecanismo de defesa e que poderia representar a memória de infecções anteriores (Pourcel et al., 2005).

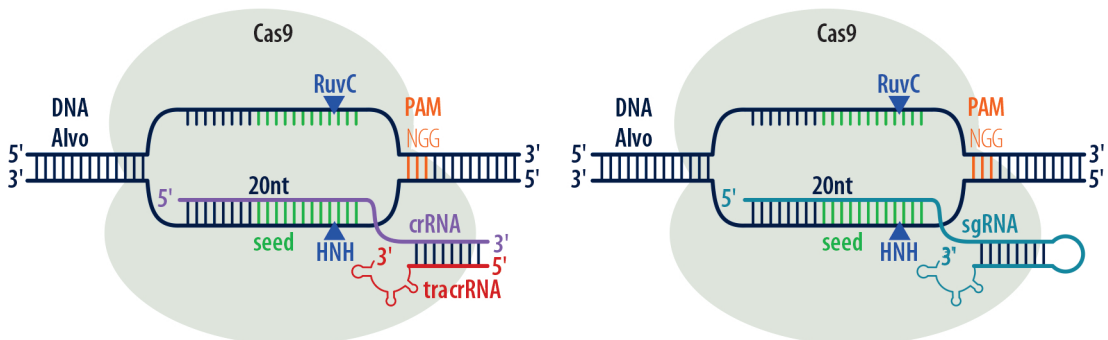
A hipótese de que CRISPR estaria envolvido com o sistema imune de procarionotos ganhou reforço após a publicação do trabalho de Rodolphe Barrangou e colaboradores (Barrangou, 2007). Eles analisaram a sequência CRISPR de várias linhagens de *Streptococcus thermophilus*, incluindo linhagem próxima à industrial e linhagens resistentes a fagos, encontrando variação genômica na região dos espaçadores no locus CRISPR. Posteriormente, foi observado que após confrontar bactérias e fagos, novos espaçadores correspondentes às sequências gênicas do fago eram integrados ao genoma da bactéria. As bactérias que integravam a sequência de DNA do fago tornavam-se resistentes a ele, demonstrando que CRISPR desempenha funções relacionadas ao sistema imune bacteriano (Barrangou et al., 2007). Nos anos seguintes, com base em ferramentas de bioinformática, genética e biologia molecular, a função de cada componente e o mecanismo de ação do sistema CRISPR/Cas foram elucidados. Em 2012, a eficácia do sistema CRISPR/Cas in vitro foi comprovada, abrindo as portas para a edição genômica de eucariotos baseada em endonucleases guiadas por RNAs programáveis (Gasiunas et al., 2012).

Assim, o sistema CRISPR representou um grande salto na tecnologia de edição genômica, especialmente por não depender do longo e custoso processo de modificação de proteínas para conferir especificidade ao alvo. Uma vez que a reprogramação do sistema para edição de diferentes alvos depende, em linhas gerais, apenas da troca de moléculas de RNA guia, a tecnologia foi rapidamente difundida entre os laboratórios do mundo todo. A partir de então, a tecnologia de edição de genomas por CRISPR/Cas vem se tornando cada vez mais eficiente e sendo aplicada a uma vasta gama de organismos (Chen et al., 2019; Anzalone et al.; 2020, Li et al., 2020c).

### Visão geral dos mecanismos e tipos de enzimas

Existem distintos mecanismos CRISPR/Cas em procarionotos, que podem ser divididos em duas classes, cada qual subdividida em três tipos, com base nos diferentes genes Cas e na natureza do complexo efetor. A Classe 1 (tipos I, III e IV) emprega múltiplas proteínas Cas no complexo efetor, enquanto a classe 2 (tipos II, V e VI), possui apenas uma única proteína efetora. O Sistema CRISPR/Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) pertence à classe 2, tipo II, e foi o primeiro sistema adaptado para edição de genomas eucariotos por meio de RNA programável. Diferentemente dos

tipos I e III, em CRISPR/Cas9 as moléculas de crRNA e tracrRNA formam estruturas únicas e hibridizadas, que guiam a Cas9 para clivagem de qualquer DNA contendo sequência-alvo complementar e adjacentes ao PAM (Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012). A plataforma de edição de genomas de eucariotos é simplificada pela síntese de uma única molécula quimérica contendo o crRNA e tracrRNA, referida como sgRNA (do inglês *single guide RNA*) ou gRNA (do inglês *guide RNA*) (Jinek et al., 2012; Koonin et al., 2017). Assim, a molécula sgRNA (a partir de sua região 5') contém a sequência de crRNA, com seu *spacer* complementar à sequência do DNA-alvo (*protospacer*), fusionado ao tracrRNA, que contém uma estrutura secundária em forma de três grampos necessária para o reconhecimento da enzima Cas, além de uma estrutura em grampo adicional para finalização da transcrição (Figura 4) (Jinek et al., 2012). Esse sistema simplificado de dois componentes pode ser programado para reconhecer virtualmente qualquer sequência específica de interesse no genoma, desde que adjacente a um sítio PAM.

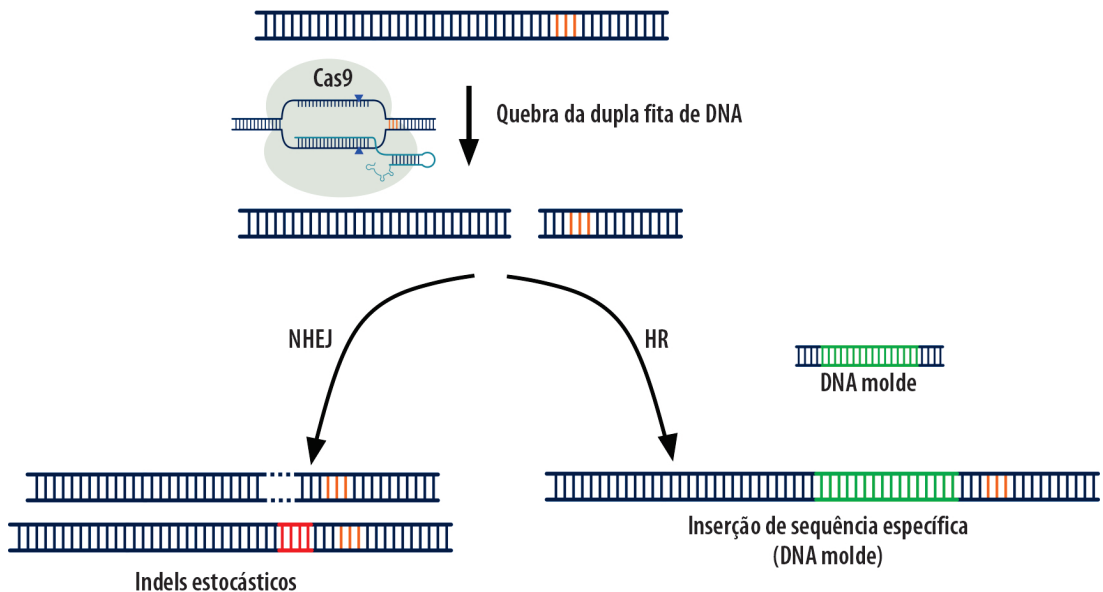


**Figura 4.** Comparação entre o complexo CRISPR/Cas9 nativo de *Streptococcus pyogenes* (esquerda), contendo crRNA e tracrRNA, e o complexo otimizado para edição genômica em eucariotos (direita) com uma única molécula guia (sgRNA, direita). Triângulos azuis indicam as posições de clivagem na molécula-alvo, realizadas pelos sítios ativos RuvC e HNH.

Fonte: adaptado de Doudna e Charpentier (2014).

Inicialmente, a enzima Cas9 reconhece o sgRNA por meio do seu lobo de reconhecimento (Rec). Uma vez formado, o complexo Cas9-sgRNA percorre a dupla fita do DNA-alvo até encontrar um sítio PAM, que é também reconhecido pelo lobo Rec da Cas9. Em seguida, a atividade helicase da Cas9 promove a abertura da dupla fita de DNA na posição imediatamente a montante de PAM, permitindo o pareamento de 20-24 nucleotídeos entre o DNA-alvo complementar e o sgRNA. Na maioria dos casos, o complexo Cas9-sgRNA é incapaz de reconhecer sítios de DNA apresentando mais do que três nucleotídeos não complementares, além de não poder reconhecer

e editar o DNA-alvo que contenha qualquer nucleotídeo não complementar nos 10-12 nucleotídeos próximos do sítio PAM (região também conhecida como *seed*). Somente após o pareamento completo, os domínios de atividade nuclease HNH e RuvC da Cas9 clivam a fita complementar e não complementar de DNA, respectivamente, e especificamente no terceiro nucleotídeo a montante do sítio PAM (Figura 4) (Cong et al., 2013; Hsu et al., 2013; Jiang et al., 2015). Assim, a especificidade de ligação de Cas9 com o DNA-alvo é determinada pela sequência conservada PAM no DNA-alvo e pelo pareamento de sua região *protospacer* com a região *spacer* (principalmente a região *seed*) do sgRNA. Por fim, a clivagem da dupla fita leva ao recrutamento dos mecanismos de reparo do DNA pelo organismo que está sendo editado. Em linhas gerais, o sistema de reparo pode seguir por duas vias distintas: (1) junção de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*), ou (2) recombinação homóloga (HR, do inglês *homologous recombination*). Enquanto o reparo por NHEJ tende a produzir pequenas inserções e/ou deleções (*indels*) em torno do sítio de clivagem, o reparo por HR, com alta fidelidade direcionado por homologia, permite a inserção de sequências de interesse na região editada (Figura 5) (San Filippo et al., 2008; Chen et al., 2019; Anzalone et al., 2020).



**Figura 5.** Representação esquemática dos mecanismos de reparo de DNA por NHEJ ou HR. Regiões tracejadas e em vermelho indicam deleções e inserções, respectivamente. Região em verde representa uma sequência de interesse a ser integrada no DNA-alvo.

## Modificações e alternativas à SpCas9

Embora CRISPR/Cas9 seja o sistema mais usado para edição de genomas (Doudna; Charpentier, 2014; Sander; Joung, 2014), a quantidade de sequências que Cas9 pode reconhecer é limitada pela necessidade de o motivo PAM ser, geralmente, 5'-NGG-3' (Mojica et al., 2009; Jinek et al., 2012; Shah et al., 2013; Sternberg et al., 2014). Contudo, tem sido reportado que o complexo SpCas9-sgRNA também é capaz de reconhecer sequências alternativas PAM (3' NAG e NGA), potencialmente aumentando a probabilidade de mutagênese fora do alvo (*off-target*) (Zhang et al., 2014; Kleinstiver et al., 2015). Além do requerimento de sítios específicos PAM e da probabilidade de cortes *off-target*, outras características da Cas9, como seu tamanho e modo de ação, podem limitar seu uso em edição de genomas eucariotos. Tais restrições levaram à busca de proteínas Cas alternativas, bem como ao desenvolvimento de uma série de estratégias e modificações da Cas9, visando o aprimoramento de sua acurácia, eficiência e versatilidade de aplicações.

Enzimas ortólogas de SpCas9, como as de *Staphylococcus aureus* (SaCas9), *Streptococcus thermophilus* (StCas9) e *Neisseria meningitides* (NmCas9), entre outras (Gasiunas et al., 2020), reconhecem diferentes tamanhos e sequências PAM e também têm sido utilizadas como ferramenta em edição de genomas (Ran et al., 2015; Cebrian-Serrano; Davies, 2017). Além do estudo de enzimas ortólogas, Cas9 tem sido modificada para o reconhecimento de diferentes sítios PAMs, tais como VQR-Cas9 (NGA PAM), EQR-Cas9 (NGAG PAM), VRERCas9, (NGCG PAM), SaKKH-Cas9 (NNRRRT PAM) (Kleinstiver et al., 2015), xCas9 (NG, GAA e GTA PAM) (Hu et al., 2018) e SpCas9-NG (NG PAM) (Nishimasu et al., 2018). Outras modificações, como a fusão de Cas9 a domínios de ligação ao DNA de outras proteínas, também resultaram em clivagem de sequências com motivo PAM alternativas (Bolukbasi et al., 2015).

O sistema SpCas9-sgRNA pode ainda tolerar alguns erros de pareamento entre sgRNA e o DNA-alvo, podendo levar à mutação de *off-targets* (Cradick et al., 2013; Fu et al., 2013; Hsu et al., 2013). A importância de *off-targets* na edição de genomas é ainda questionável (Iyer et al., 2015; Zhang et al., 2018b) e, embora limite o potencial da aplicação de CRISPR/Cas9 em terapias de doenças humanas (Li et al., 2020b), não é considerada uma restrição para o uso da tecnologia em plantas, na qual foi demonstrada rara ocorrência, frequentemente predita *in silico* (Young et al., 2019; Gao et al., 2020a; Graham et al., 2020; Herbert et al., 2020; Zhang et al., 2020).

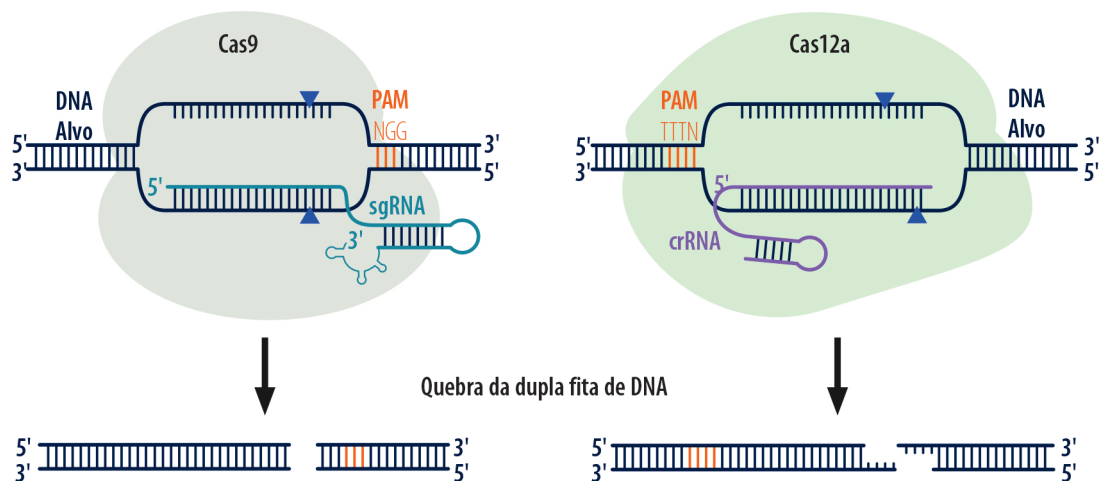
Assim, grandes avanços têm sido obtidos no desenvolvimento de ferramentas que aumentam a especificidade de Cas9. Um exemplo com vasta aplicação é o uso de variantes de Cas conhecidas como *nickases* (nSpCas9), que tiveram um de seus domínios nucleases inativados por mutações pontuais no sítio catalítico: mutação D10A no sítio HNH, ou mutação H840A no sítio RuvC (Cong et al., 2013; Mali et al.,

2013; Ran et al., 2013; Cebrian-Serrano; Davies, 2017). As *nickases* retêm a especificidade de ação (continuam reconhecendo o DNA-alvo), mas clivam apenas uma única fita do DNA. Essa abordagem de corte de uma única fita aumenta a fidelidade do reparo e a obtenção da mutação desejada (Dianov; Hübscher, 2013; Cebrian-Serrano; Davies, 2017). Além disso, *nickases* mostraram-se altamente específicas em células humanas, com redução de *off-targets* sem comprometer a eficiência de edição (Cho et al., 2014). A inativação de ambos os sítios de atividade nuclease levaram à obtenção de Cas9 desativadas (dCas9) capazes de reconhecer alvos específicos, mas com a atividade catalítica de outra proteína a ela fusionada (Brezgin et al., 2019). Outra abordagem para alcançar maior especificidade, sem perder eficiência, é a mutação de SpCas9 em resíduos envolvidos na redução de energia do complexo SpCas9-sgRNA-DNA-alvo (Kleinstiver et al., 2016; Slaymaker et al., 2016). As proteínas modificadas dessa maneira ficaram conhecidas como SpCas9-HF1 e eSpCas9 e continuam sendo otimizadas em suas versões *plus* (Kulcsár et al., 2020).

Além da proteína Cas9, o sgRNA também pode ser alvo de modificações para aumentar a especificidade pelo DNA-alvo. Por exemplo, modificações na região 5' com adição de uma pequena região do alvo, ou a adição de dois nucleotídeos de guanina extras, levaram à redução de *off-targets* (Cho et al., 2014; Fu et al., 2014; Kim et al., 2014; Kim et al., 2015), embora certa diminuição de eficiência de mutagênese tenha sido reportada para alguns alvos (Cho et al., 2014).

Finalmente, em adição à acurácia, a entrega dos componentes do sistema CRISPR/Cas9 também deve ser eficiente nas diversas aplicações, e o grande tamanho da proteína Cas9 (160 kDa) é um fator limitante nesse quesito (Mout et al., 2017). Os diferentes mecanismos de entrega, suas vantagens e desvantagens serão abordados ao longo deste livro, nos capítulos subsequentes. No geral, o tamanho dos componentes do sistema pode influenciar no sucesso da edição genômica de plantas, tanto nas aplicações que utilizam o sistema de *Agrobacterium*, para a entrega de um único vetor contendo os promotores e os genes para expressão de todo o sistema dentro da célula eucariótica, quanto nas aplicações que utilizam vetores virais para uma expressão transiente, ou mesmo quando na entrega do complexo ribonucleico pelo método de proteolítica (Murovec et al., 2017). Assim, a obtenção de mutantes de SpCas9 com deleções em regiões redundantes para diminuição de seu tamanho bem como a descoberta de outras enzimas menores, ou mesmo de sistema CRISPR alternativos (que não necessitam de tracrRNA, por exemplo), têm sido descritas (Cebrian-Serrano; Davies, 2017; Murovec et al., 2017). A descoberta de outras enzimas efectoras, pertencentes à classe 2 do sistema CRISPR, abriu novas possibilidades de aplicações. A enzima originalmente descrita como Cpf1 (agora conhecida como Cas12a) bem como suas ortólogas e suas variantes modificadas para melhoramento da especificidade (Shmakov et al., 2017; Chen et al., 2019) têm sido

usadas com especial interesse devido às suas características distintas de CRISPR/Cas9. A Cas12a não requer tracrRNA, sendo o RNA guia praticamente a metade do tamanho daquele necessário para Cas9 (~43 contra ~80 nucleotídeos, respectivamente) (Zetsche et al., 2015). Além disso, o complexo Cas12a-crRNA reconhece sequência PAM rica em T em vez de G (5'-TTTN- 3'), clivando em sítios escalonados e distantes de PAM, o que pode facilitar a redução de *off-targets* em genomas ricos em conteúdo GC (Zetsche et al., 2015; Fonfara et al., 2016; Chen et al., 2019). Uma vez que a clivagem promovida por Cas12a resulta em extremidades coesivas na dupla fita de DNA, estas podem aumentar a taxa de eficiência de estratégias HR (Figura 6) (Zaidi et al., 2017).



**Figura 6.** Representação das principais diferenças entre as nucleases Cas9 (esquerda) e Cas12a (direita). Triângulos azuis representam a posição do corte na molécula-alvo.

Fonte: adaptado de Doudna e Charpentier (2014) e Zaidi et al. (2017).

Outras enzimas da classe 2, tais como Cms1 (CRISPR de *Microgenomates* e *Smithella*) e AaCas12b (originada de *Alicyclobacillus acidiphilus*), também apresentam características interessantes, como: tamanho menor do que Cas9 e Cas12a, sítio PAM rico em AT (Begemann et al., 2017), ou atividade ótima em temperaturas altas (Teng et al., 2018). Finalmente, novas proteínas efetoras como a C2c2 (conhecida como Cas13) e suas variantes têm sido modificadas para reconhecerem e editarem alvos de RNA (Abudayyeh et al., 2017) com o emergente potencial de aplicação na interferência de RNA viral em plantas (Mahas et al., 2019).

## Técnicas variantes de CRISPR

A constante busca por modificações da ferramenta, seja na melhoria de Cas9 “engenheiradas” originárias de diferentes espécies procarióticas, seja na otimização da molécula de sgRNA, ou ainda na entrega do sistema para a célula eucariótica a ser editada, levou ao aprimoramento e aumento da eficiência e especificidade da técnica. Além das modificações já discutidas até aqui, novos conhecimentos e fusões com outras técnicas biotecnológicas estão trazendo avanços surpreendentes ao sistema de edição de genomas (Anzalone et al., 2020).

A partir do desenvolvimento de *nickases* e dCas9, novas tecnologias passaram a utilizar a capacidade dessas enzimas de reconhecimento do sítio específico da edição, mas sem a realização do corte na dupla fita de DNA. Por exemplo, a fusão de dCas9 a fatores de transcrição pode levar à ativação e repressão transcricional de genes-alvo, sem promover edição genômica propriamente dita (Bikard et al., 2013; Perez-Pinera et al., 2013). Sobretudo, duas técnicas de edição baseadas em *nickases* e dCas9 se destacam e serão abordadas aqui: *base editing* (edição de base única) e a recentemente publicada técnica de *prime editing*.

A edição de base única permite a conversão direta e irreversível de um nucleotídeo em outro, de maneira programável. A técnica, que começou a ser utilizada para edição de genomas a partir de 2016, consiste em uma Cas9 nuclease deficiente (dCas9/nCas9) fusionada ao domínio de citosina ou adenosina deaminase e ao inibidor uracila DNA glicosilase (UGI). Assim, a função da Cas9 modificada é apenas de se ligar ao DNA, guiada pela molécula de sgRNA, direcionando assim o complexo para que a citosina (ou adenosina) desaminase faça a conversão de uma única base no sítio-alvo (Anzalone et al., 2020; Mishra et al., 2020). O inibidor UGI subverte a via de reparo celular da excisão de uracila (Molla; Yang, 2019). A técnica permite quatro tipos de mutações de transição (C→T, G→A, A→G e T→C) e tem sido utilizada com sucesso em arroz, milho, trigo, batata, tomate, melancia e algodão (Mishra et al., 2020; Qin et al., 2020). Contudo, a técnica também possui limitações, entre elas a impossibilidade das oito mutações por transversões remanescentes (C→A, C→G, G→C, G→T, A→C, A→T, T→A e T→G), restringindo alvos ou regiões específicas dos alvos a serem mutados (Anzalone et al., 2020). Além das conversões de DNA, uma variante da técnica também permite mutações de RNA, convertendo adenina (A) para inosina (I). Essa técnica é conhecida como RBE, do inglês *RNA base editor* (Cox et al., 2017).

Uma alternativa para as limitações da edição de base única de DNA, conhecida como *prime editing*, foi recentemente desenvolvida para ajudar a tornar o sistema de edição seguro em terapias humanas (Anzalone et al., 2019). A técnica, contudo, já foi empregada com sucesso na edição de genomas de trigo e arroz (Li et al.,



2020a; Lin et al., 2020; Tang et al., 2020; Xu et al., 2020). Sua principal característica é a minimização de efeitos *off-target*, além de ser capaz de fazer uma variedade maior de edições, tornando a técnica mais precisa e versátil do que outras alternativas de CRISPR. De maneira simplificada, podemos descrever a técnica como sendo constituída de uma *nickase* fusionada a uma enzima transcriptase reversa modificada. O RNA guia, neste caso, também serve como o molde para a edição precisa no local de destino e recebe o nome pegRNA (abreviatura do inglês *prime editing extended guide RNA*). O trabalho pioneiro demonstrou que o sistema é capaz de reconhecer e modificar o genoma humano por meio de inserções, deleções e edição precisa de base única nas 12 possíveis conversões, constituindo uma possível vantagem sobre o método de edição de base única que utiliza citosina ou adenosina deaminase (Anzalone et al., 2019). Contudo, a técnica não é capaz de fazer inserções ou deleções muito grandes de DNA (como nas edições baseadas em recombinação homóloga, nas quais um DNA doador é adicionado ao sistema CRISPR/Cas9 convencional), uma vez que a molécula de RNA usada como molde é mais suscetível a danos causados por enzimas celulares. Portanto, é mais uma técnica complementar, assim como as demais variações discutidas anteriormente, em que diferentes tipos de edição requerem diferentes tecnologias de edição de genomas.

Apesar de todos os esforços para alcançar maior precisão, eficiência e versatilidade na edição de genomas, o gargalo para seu sucesso em plantas está na eficiência da entrega do sistema às células, considerando-se as diversas variedades genéticas que são pouco ou ineficientemente transformáveis, além do longo e laborioso processo de cultura de tecidos. Um grande avanço na redução do tempo de cultura de tecidos e no aumento de eficiência da obtenção de plantas regeneradas foi o desenvolvimento de protocolos que associam a transformação à expressão transiente de genes reguladores do crescimento e desenvolvimento, tais como *Wuschel* (*WUS*), *Baby Boom* (*BBM*) e *Shoot Meristemless* (*STM*) (Lowe et al., 2016; Zhang et al., 2019; Maher et al., 2020). A técnica já foi aplicada com sucesso em milho, sorgo, cana-de-açúcar, arroz, tabaco, tomate, uva e batata, permitindo até mesmo a brotação transgênica “de novo” a partir de tecidos vegetativos (Steinwand; Ronald, 2020). A utilização do sistema CRISPR/Cas, ou suas variantes, associada à expressão desses genes reguladores, é uma das grandes promessas para expandir o uso do sistema de edição de genomas nas diferentes variedades.

## Exemplos da aplicação de CRISPR na agricultura

Em fevereiro de 2019, iniciou-se a comercialização, nos Estados Unidos, do primeiro derivado de um vegetal com genoma editado. O produto, óleo de soja com

alto teor oleico, é produzido a partir de uma variedade desenvolvida pela Calyxt Inc. por meio do sistema TALEN e teve entrada no mercado norte-americano sem necessidade da regulamentação aplicada a OGMs (Kim; Kim, 2019).

Ao longo dos últimos anos, técnicas de mutação dirigida, como, por exemplo, por ZFN e TALEN, foram utilizadas para geração de características desejadas em diversas culturas, como arroz, milho, soja, entre outros (Jansing et al., 2019). Contudo, dada a facilidade e versatilidade do uso de CRISPR para edição genômica, outras técnicas vêm se tornando cada vez menos utilizadas, ao passo em que estudos com CRISPR crescem rapidamente.

Até o presente momento, a maioria dos trabalhos aborda provas de conceito ou visa o aperfeiçoamento das técnicas envolvidas na edição genômica, sendo poucos os relatos de ensaios de campo. Não obstante, muitos desses estudos têm aplicações orientadas para o mercado, tanto em culturas produzidas em larga escala quanto em espécies vegetais menos difundidas (Metje-Sprink et al., 2020). A seguir, abordaremos alguns exemplos do uso de CRISPR no melhoramento de diferentes características de interesse agrônomo, como a produtividade e a qualidade, além do aumento de resistência a fatores bióticos e abióticos.

## Aumento de produtividade

A produtividade é um atributo complexo, envolvendo diversos fatores que muitas vezes são específicos para cada cultura. Exemplos de características que afetam a produtividade são o número e tamanho de frutos e/ou grãos, arquitetura da planta e biomassa (Chen et al., 2019). Muitos dos fatores relacionados à produtividade são quantitativos e controlados por QTLs. Nesse sentido, a edição genômica por CRISPR se apresenta como uma poderosa ferramenta para o melhoramento, uma vez que estratégias *multiplex* podem ser utilizadas com relativa facilidade para a edição de diferentes QTLs simultaneamente (Rodríguez-Leal et al., 2017; Sedeek et al., 2019).

Por exemplo, em arroz, o *knockout* simultâneo de três genes que regulam negativamente o peso dos grãos (*GW2*, *GW5* e *TGW6*) levou a um aumento de aproximadamente 30%. O potencial da ferramenta fica evidente no estudo. Ainda que mutantes individuais para cada um desses genes já fossem conhecidos, eles estavam presentes em diferentes *backgrounds* genéticos. Além disso, foram obtidas linhagens mutantes para os três genes ainda em  $T_0$ , sendo possível a segregação do T-DNA utilizado para expressão do sistema CRISPR já em  $T_1$ , resultando assim em linhagens não transgênicas mutantes para os três genes (Xu et al., 2016). De maneira semelhante, comprimento e peso de grãos foram melhorados em dois

*backgrounds* genéticos de trigo (*Triticum aestivum*) a partir do *knockout* de três homólogos do gene *TaGASR7*. Com o uso de apenas um sgRNA, com alvo em uma região de sequência conservada entre os homólogos, foi possível realizar *knockout* dos seis alelos simultaneamente em T<sub>0</sub> (Zhang et al., 2016).

Além de *knockout* mediado por CRISPR, outras estratégias já foram utilizadas para melhoramento da produtividade. Um exemplo é a edição de regiões promotoras. Em tomate (*Solanum lycopersicum*), a edição de elementos regulatórios em *cis* de genes do circuito *CLAVATA-WUSCHEL*, responsável pelo controle do tamanho de meristemas, levou a diferentes efeitos sobre o tamanho dos frutos (Rodríguez-Leal et al., 2017). O trabalho demonstra que a regulação fina dos níveis de expressão de genes envolvidos no desenvolvimento pode ter efeitos importantes para o melhoramento vegetal.

## Melhoramento da qualidade

Assim como a produtividade, a qualidade vegetal envolve ampla gama de características, como coloração, aroma, conteúdo nutricional, tempo de prateleira, entre outros. Conteúdo nutricional é um fator de especial interesse, visto que produtos enriquecidos para determinadas substâncias podem ser usados como fonte de nutrientes, tanto diretamente quanto na produção de insumos alimentícios. Por exemplo, foram desenvolvidas linhagens de *Camelina sativa* e *Brassica napus*, cujas sementes possuem alto teor de ácido oleico (Jiang et al., 2017; Morineau et al., 2017; Okuzaki et al., 2018). Em tomate, por meio de abordagem *multiplex*, foram inibidas as vias de conversão de licopeno em  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno. Como resultado, ocorre o acúmulo de licopeno nos frutos (Li et al., 2018a).

Além de esforços para o enriquecimento de nutrientes pontuais, outras abordagens buscam modular o balanço de vias metabólicas para biossíntese maior ou menor de determinadas moléculas. Por exemplo, o amido, principal carboidrato de reserva nas plantas e amplamente utilizado na indústria, é composto por dois polissacarídeos: amilose e amilopectina. Grãos de milho costumam apresentar uma proporção de 75% amilopectina e 25% de amilose (Ricroch, 2019). Contudo, diferenças nessa proporção são encontradas em variedades de arroz e milho e refletem diretamente nas propriedades dos grãos. Assim, variedades de arroz com alto grau de amilose apresentam grãos mais firmes e bem separados após o cozimento, enquanto variedades com baixo teor resultam em grãos mais macios e aglutinados (Zhang et al., 2018a).

Visando a redução de amilose em arroz, dois grupos independentes utilizaram a estratégia de *knockout* do gene *OsWaxy*, por CRISPR, em três variedades (T65, XS134 e 9522) da subespécie *japonica*. Ambos os grupos alcançaram uma redução similar no conteúdo de amilose (aproximadamente de 20%–15% para 2.5%) (Ma et al., 2015; Zhang et al., 2018a). A rápida geração dessas linhagens é especialmente interessante quando se leva em conta que as variedades XS134 e 9522, consideradas elite, não apresentaram alteração de outras características de interesse agrônômico (altura da planta, número de grãos por panícula, número de panícula por plantas, tamanho e peso dos grãos) após a edição do gene *OsWaxy* (Zhang et al., 2018a). Com a mesma estratégia de *knockout* do gene *Wx1* por CRISPR, a DuPont Pioneer produziu uma variedade de milho cujo amido é composto 100% por amilopectina que deve ter o início de sua comercialização em 2020 (Waltz, 2016; Ricroch, 2019). Em arroz, edição por CRISPR também já foi realizada para o efeito inverso: por meio de *knockout* do gene *SBEIIb*, foram desenvolvidas linhagens com alto teor de amilose, que, por ser uma potencial fonte de amido resistente, tem seu consumo indicado para redução dos riscos de doenças crônicas não infecciosas (Sun et al., 2017).

### Eliminação de características indesejáveis

A qualidade vegetal pode ser melhorada, muitas vezes, por meio da eliminação de características indesejáveis. As proteínas do glúten, por exemplo, são conhecidas por desencadear doença celíaca em 0.7%–2% da população mundial (Rewers, 2005). Em trigo, a maior família gênica que codifica para proteínas do glúten ( $\alpha$ -gliadina) apresenta quase 100 genes e pseudogenes (Ozuna et al., 2015), de maneira que métodos convencionais de mutagênese e seleção não foram capazes de gerar variedades de trigo com glúten de baixa atividade imunogênica. Ainda que a grande quantidade de genes-alvo possa sugerir uma abordagem *multiplex*, um grupo foi capaz de realizar o *knockout* simultâneo da maioria dos domínios conservados de  $\alpha$ -gliadina utilizando apenas dois sgRNAs. Como resultado, foram geradas linhagens não transgênicas de trigo com baixo teor de glúten, que apresentam uma redução de até 85% em sua imunorreatividade (Sánchez-León et al., 2018).

Edição por CRISPR também foi realizada em batata (*Solanum tuberosum*) para a completa eliminação da produção de glicoalcaloides esteroidais, substâncias que, além de conferirem sabor amargo, podem ser tóxicas se ingeridas em grandes quantidades (Nakayasu et al., 2018). Nesse caso, o estudo ainda representa um passo inicial no desenvolvimento de uma variedade com potencial de comercialização. Dada a baixa eficiência de edição decorrente do genoma tetraploide da batata, o trabalho foi desenvolvido no sistema de cultura conhecido como *hairy roots*, contudo foi um passo importante para identificação de um gene que, quando mutado, interrompe a via de síntese glicoalcaloides.

Outro fator que vem sendo explorado pelo melhoramento por edição genômica é o escurecimento causado por enzimas polifenoloxidasas (PPO). Embora o silenciamento de PPOs já tenha sido realizado por RNAi em maçãs pela empresa Okanagan Specialty Fruits (Waltz, 2015), existem agora iniciativas de *knockout* de PPOs por mutagênese direcionada. Esse é o caso da empresa Calyxt, que, utilizando o sistema TALEN, desenvolveu uma variedade de batata que não escurece (Ricroch, 2019). Já o sistema CRISPR/Cas9 foi utilizado para *knockout* de uma PPO em champignon (*Agaricus bisporus*), melhorando o aspecto visual e o tempo de prateleira do produto (Waltz, 2016; Ricroch, 2019).

## Resistência a fatores bióticos

Doenças e pestes são um dos maiores desafios para a agricultura moderna, sendo o melhoramento da tolerância a estresses bióticos uma das maiores demandas pela aplicação da edição genômica (Ricroch et al., 2016). Dada sua importância, temos hoje considerável conhecimento acerca dos mecanismos genéticos e moleculares envolvidos em inúmeras doenças vegetais (bem como em suas vias de resistência). Diversos esforços já foram realizados com o uso de CRISPR para melhoramento de resistência a bactérias, fungos e vírus.

Uma das possíveis abordagens é a edição de fatores da planta hospedeira utilizados por patógenos para o estabelecimento da infecção e/ou sua replicação, promovendo assim a imunização da planta (Sedeek et al., 2019). Por exemplo, o gene *CsLOB1* foi reconhecido por conferir suscetibilidade ao cancro cítrico (Hu et al., 2014), uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas citri* que pode afetar diferentes espécies do gênero *Citrus*. Por meio da edição tanto de regiões promotoras quanto de codificantes do gene *CsLOB1*, foram desenvolvidas linhagens de laranja (*Citrus sinensis*) e toranja (*Citrus x paradisi*) resistentes ao cancro cítrico (Jia et al., 2017; Peng et al., 2017). Em arroz, o crestamento bacteriano é causado por *Xanthomonas oryzae*, que utiliza o efector PthXo2 para induzir a expressão do gene *OsSWEET13* na planta hospedeira. Esse gene, relacionado ao transporte de sacarose, parece ser determinante para o processo infeccioso por *Xanthomonas*. Assim, mutações promovidas por CRISPR/Cas9 na região codificante de *OsSWEET13* resultou em plantas resistentes à infecção (Zhou et al., 2015).

Estratégias semelhantes foram utilizadas para o desenvolvimento de resistência a doenças causadas por fungos. Em trigo, resistência a oídio (*Blumeria graminis*) foi obtida após a edição (por CRISPR/Cas9 e TALEN) de três homólogos do gene *MILDEW-RESISTANCE LOCUS O* (*TaMLO-A1*, *TaMLO-B1* e *TaMLO-D1*) (Wang et al., 2014). Em tomateiro, a edição do homólogo desse mesmo gene (*SIM1o1*) foi capaz

de conferir resistência total à *Oidium neolycopersici*. Como ressaltam os autores do trabalho, embora existam mutantes naturais para *SIM101*, a introgressão de tal alelo em linhagens elite seria um processo longo e laborioso. A edição de *SIM101* por CRISPR levou ao desenvolvimento de plantas (não transgênicas) da variedade elite “MoneyMaker” em apenas 10 meses (Nekrasov et al., 2017). Em outro exemplo, resistência a bruzone (*Magnaporthe oryzae*) foi alcançada em arroz após a edição do fator de transcrição responsivo a etileno *OsERF922* (Wang et al., 2016). Com esse trabalho, mais uma vez, foram obtidas plantas não transgênicas com significativo aumento da resistência ao patógeno, mas sem quaisquer alterações em características de interesse agrônomo.

Por fim, a tecnologia CRISPR também pode ser utilizada para realizar seu papel original: conferir resistência a infecções virais. Diversos trabalhos demonstram o potencial de CRISPR/Cas9 para a interferência contra diferentes vírus de DNA, como *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV), *Beet Curly Top Virus* (BCTV), *Merremia Mosaic Virus* (MeMV), *Bean Yellow Dwarf Virus* (BeYDV) e *Beet Severe Curly Top Virus* (BSCTV) (Ali et al., 2015; Baltés et al., 2015; Ji et al., 2015; Ali et al., 2016). Inclusive, o uso de um mesmo sgRNA com alvo em uma sequência viral conservada foi capaz de produzir interferência em diferentes geminivírus (Ali et al., 2015). Contudo, vale ressaltar que esses estudos são realizados como prova de conceito, majoritariamente utilizando *Nicotiana benthamiana* e também *Arabidopsis thaliana* como modelos. Os mecanismos de interferência dependem da presença de Cas9 e de sgrNAs nos tecidos vegetais, de maneira que eventuais aplicações do sistema requerem a expressão endógena de tais componentes, caracterizando um organismo transgênico. Uma alternativa à transgenia seria a entrega direta de RNPs (ribonucleoproteínas), metodologia que será abordada no Capítulo 2 – Edição de genoma via *non-homologous end joining* (NHEJ) e ribonucleoproteínas (RNP). Há ainda indícios de que o sistema CRISPR/Cas13 (Classe 2, tipo VI), capaz de clivar moléculas de RNA, apresenta potencial para ser usado na interferência contra vírus de RNA (Aman et al., 2018; Mahas et al., 2019).

## Resistência a fatores abióticos

Estresses abióticos representam importantes ameaças para a produção agrícola mundial. Em especial, o presente cenário de mudanças climáticas gera grande preocupação, dado que condições de seca e temperaturas extremas vêm aumentando consistentemente (Tong; Ebi, 2019; Sippel et al., 2020). Embora o melhoramento da tolerância a estresses abióticos seja de grande interesse, tais iniciativas são dificultadas pela maneira com a qual as plantas respondem a tais fatores, muitas

vezes envolvendo vias metabólicas complexas. Não obstante, alguns esforços para o aumento da resistência a estresses abióticos já foram bem-sucedidos.

Pesquisadores da DuPont Pioneer, por exemplo, foram capazes de melhorar a tolerância à seca em milho a partir da edição do gene *ARGOS8*, um inibidor da resposta a etileno que normalmente é expresso em baixas quantidades. Nesse trabalho, por meio de uma abordagem HR, o promotor de outro gene, *GOS2*, foi inserido na região 5'UTR de *ARGOS2*, aumentando assim sua expressão. Como resultado, as linhagens desenvolvidas sobrevivem mais e têm produtividade melhorada em condições de seca (Shi et al., 2017).

Em arroz, CRISPR/Cas9 foi utilizado para *knockout* de diferentes genes da família *OsPYL*, envolvidos na resposta ao ácido abscísico (ABA). O estudo descobriu que triplos mutantes *pyl1/4/6* apresentam maior tolerância a altas temperaturas, além de maior produtividade. Contudo, o mesmo triplo mutante parece apresentar maior sensibilidade à seca (Miao et al., 2018). Esse trabalho demonstra como muitas vezes as vias de resposta a diferentes estresses podem estar relacionadas, representando um desafio para o campo do melhoramento vegetal.

## Domesticação acelerada e “de novo” de espécies selvagens

Até agora abordamos o uso da edição genômica para o melhoramento de características pontuais. Contudo, além do uso de CRISPR em culturas já estabelecidas, uma abordagem diferente e de crescente interesse é a “redomesticação”, ou domesticação “de novo”, de espécies selvagens.

Um dos efeitos negativos decorrentes do melhoramento clássico é a perda de variabilidade genética. Essa erosão genética que acompanha o histórico de domesticação de plantas cultiváveis pelo homem é decorrência da seleção de características de interesse primário, como a produtividade de grãos e biomassa, em detrimento de características de qualidade, tolerância a pragas e doenças, etc. (Doebley et al., 2006). Dessa forma, o processo acarreta culturas agrícolas mais suscetíveis a patógenos e/ou a estresses abióticos. Para contornar esse problema, linhagens elite são frequentemente cruzadas com seus parentais selvagens, ou ainda espécies próximas, levando à introgressão de genes que eventualmente possam conferir a resistência ou característica desejada (Mazur; Tingey, 1995; Jacobsen; Schouten, 2007; Harrison; Larson, 2014). Esse processo, contudo, demanda longos períodos de tempo para realização de retrocruzamentos que visam a segregação de loci indesejados.

A “redomesticação” utiliza uma lógica inversa: genes-chave são editados em espécies selvagens para torná-las mais interessantes para o cultivo. Dessa maneira, a variabilidade genética presente em tais espécies não é perdida, ao passo que características desejáveis são nelas introduzidas (Zsögön, et al. 2017). Uma segunda vantagem dessa abordagem é a drástica redução no tempo de seleção de tais linhagens, uma vez que dispensa o extensivo processo de retrocruzamentos.

A sugestão de utilização de edição genômica para rápida domesticação “de novo” de espécies selvagens data de meados da década de 2010. Um exemplo bem estruturado é a proposta de domesticação de *Thlaspi arvense*, uma oleaginosa da família Brassicaceae. Nessa proposta, o extenso conhecimento prévio da planta modelo *Arabidopsis thaliana* (também da família Brassicaceae) foi extrapolado para a definição de genes-alvo a serem editados, o que poderia levar rapidamente ao desenvolvimento de uma linhagem de *Thlaspi arvense* com características propícias ao cultivo e utilização em larga escala (Sedbrook et al., 2014).

As primeiras publicações que descreveram aplicações da edição genômica para a domesticação de espécies selvagens ocorreram em 2018. A primeira descreve a domesticação “de novo” de uma espécie de tomate selvagem (*Solanum pimpinellifolium*), que teve seis loci de seu genoma concomitantemente editados por CRISPR/Cas9. Tais loci foram escolhidos por serem de reconhecida importância para a produtividade das atuais culturas de tomate (*S. lycopersicum*). Assim, em poucas gerações, foi obtida uma linhagem de *S. pimpinellifolium* com produção de frutos dez vezes aumentada, sendo estes três vezes maiores em comparação com a linhagem selvagem. Além disso, tal linhagem apresenta diversas vantagens em relação às atuais culturas de tomate, como um teor 500% maior de licopeno nos frutos, além de reter a diversidade genética e a tolerância a estresses das plantas selvagens de *S. pimpinellifolium* (Zsögön et al., 2018).

Em um esforço similar, no mesmo ano, quatro diferentes acessos de *S. pimpinellifolium* foram editados por CRISPR/Cas9, por meio de uma abordagem *multiplex*, de modo a gerar plantas com fenótipos domesticados (morfologia compacta, aumento no número de flores e frutos produzidos, bem como aumento da síntese de ácido ascórbico). Notavelmente, tais plantas retiveram a tolerância parental a patógenos e a altas concentrações salinas (Li et al., 2018b).

Finalmente, a edição genômica apresenta potencial para o melhoramento de espécies não convencionais, chamadas em inglês de *orphan crops* (Lemmon et al., 2018). São consideradas *orphan crops* espécies de importância regional, mas que não são comercializadas internacionalmente em larga escala, acabando por receber pouca atenção de pesquisadores quando comparadas às culturas mais difundidas (Varshney et al., 2012). Esse é o caso de *Physalis pruinosa*, outra espécie da família



Solanaceae, que também foi alvo de edição por CRISPR/Cas9 para melhoramento da arquitetura da planta, aumento de produção de flores e tamanho do fruto (Lemmon et al., 2018).

## Perspectivas e conclusões

Nas últimas três décadas, o desenvolvimento de técnicas de edição de genomas, como TALENs, ZFNs e o sistema CRISPR/Cas, tem contribuído de maneira extraordinária para o progresso da agricultura moderna. O sistema CRISPR/Cas se destaca por ser uma tecnologia sem precedentes em termos de simplicidade, especificidade, eficiência, versatilidade, robustez e baixíssimo custo. Tem sido aplicada com sucesso para a rápida obtenção de culturas agrícolas com melhor produtividade e qualidade, além de aumento de resistência a fatores bióticos e abióticos, trazendo benefícios para produtores, consumidores e meio ambiente.

Os crescentes, rápidos e elegantes avanços para melhorias e adaptações do sistema CRISPR/Cas têm permitido desde a mutagênese de um locus específico, regulação transcricional, edição de epigenoma, edição de base única, fusão de *tags* marcadores, mutações em *multiplex*, substituição de um gene ou alelo por outro de maior interesse, até a geração de uma variedade comercial contendo um alelo elite e com significativa redução do laborioso e custoso tempo dispendido pelos métodos tradicionais de introgressão.

Além disso, ao contrário dos organismos geneticamente modificados, a edição de genes não requer a inserção de DNA exógeno para produzir uma característica desejada. Assim, a tecnologia também tem levado a mudanças na regulamentação de produtos agrícolas, o que está contribuindo com a democratização da obtenção de produtos sustentáveis, não restringindo o benefício às grandes companhias de biotecnologias, mas possibilitando as pesquisas em universidades públicas, ou pequenas startups, por exemplo.

## Referências

ABUDAYYEH, O. O.; GOOTENBERG, J. S.; ESSLETZBICHLER, P.; HAN, S.; JOUNG, J.; BELANTO, J. J.; VERDINE, V.; COX, D. B. T.; KELLNER, M. J.; REGEV, A.; LANDER, E. S.; VOYRTAS, D. F.; TING, A. Y.; ZHANG, F. RNA targeting with CRISPR–Cas13. **Nature**, v. 550, n. 7675, p. 280–284, 2017. DOI: 10.1038/nature24049.

ALI, Z.; ABULFARAJ, A.; IDRIS, A.; ALI, S.; TASHKANDI, M.; MAHFOUZ, M. M. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. **Genome Biology**, v. 16, p. 1-11, 2015. DOI: 10.1186/s13059-015-0799-6.

ALI, Z.; ALI, S.; TASHKANDI, M.; ZAIDI, S. S. A.; MAHFOUZ, M. M. CRISPR/Cas9-mediated immunity to geminiviruses: differential interference and evasion. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-11, 2016.

DOI: 10.1038/srep26912.

AMAN, R.; ALI, Z.; BUTT, H.; MAHAS, A.; ALJEDAANI, F.; KHAN, M. Z.; DING, S.; MAHFOUZ, M. RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. **Genome Biology**, v. 19, p. 1–9, 2018.

DOI: 10.1186/s13059-017-1381-1.

AMITAI, G.; SOREK, R. CRISPR–Cas adaptation: insights into the mechanism of action. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 67–76, 2016. DOI: 10.1038/nrmicro.2015.14.

ANDERS, C.; NIEWOEHNER, O.; DUERST, A.; JINEK, M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. **Nature** v. 513, n. 7519, p. 569–573, 2014. DOI: 10.1038/nature13579.

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

ANZALONE, A. V.; RANDOLPH, P. B.; DAVIS, J. R.; SOUSA, A. A.; KOBLAN, L. W.; LEVY, J. M.; CHEN, P. J.; WILSON, C.; NEWBY, G. A.; RAGURAM, A.; LIU, D. R. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. **Nature**, v. 576, n. 7786, p. 149–157, 2019. DOI: 10.1038/s41586-019-1711-4.

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

BALTES, N. J.; HUMMEL, A. W.; KONECNA, E.; CEGAN, R.; BRUNS, A. N.; BISARO, D. M.; VOYTAS, D. F. Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR–Cas prokaryotic immune system. **Nature Plants**, v. 1, n. 10, p. 14, 2015. DOI: 10.1038/NPLANTS.2015.145.

BARRANGOU, R.; FREMAUX, C.; DEVEAU, H.; RICHARDS, M.; BOYAVAL, P.; MOINEAU, S.; ROMERO, D. A.; HORVATH, P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, v. 315, n. 5819, p. 1709–1712, 2007. DOI: 10.1126/science.1138140.

BEGEMANN, M. B.; GRAY, B. N.; JANUARY, E.; SINGER, A.; KESLER, D. C.; HE, Y.; LIU, H.; GUO, H.; JORDAN, A.; BRUTNELL, T. P.; MOCKLER, T. C. OUFATTOLE, M. Characterization and validation of a novel group of type V, class 2 nucleases for *in vivo* genome editing. **BioRxiv preprint**. 2017. DOI: 10.1101/192799.

BIKARD, D.; JIANG, W. Y.; SAMAI, P.; HOCHSCHILD, A.; ZHANG, F.; MARRAFFINI, L. A. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 15, p. 7429–7437, 2013. DOI: 10.1093/nar/gkt520.

BOLUKBASI, M. F.; GUPTA, A.; OIKEMUS, S.; DERR, A. G.; GARBER, M.; BRODSKY, M. H.; ZHU, L. J.; WOLFE, S. A. DNA-binding-domain fusions enhance the targeting range and precision of Cas9. **Nature Methods**, v. 12, n. 12, p. 1150–1156, 2015. DOI: 10.1038/nmeth.3624.

BREZGIN, S.; KOSTYUSHEVA, A.; KOSTYUSHEV, D.; CHULANOV, V. Dead Cas systems: types, principles, and applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 1-26, 2019. DOI: 10.3390/ijms20236041.

BROWN, J. K. M. Yield penalties of disease resistance in crops. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 4, p. 339-344, 2002. DOI: 10.1016/S1369-5266(02)00270-4.

CAMPBELL, J. E.; LOBELL, D. B.; GENOVA, R. C.; FIELD, C. B. The global potential of bioenergy on abandoned agriculture lands. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 15, p. 5791-5794, 2008. DOI: 10.1021/es800052w.

CEBRIAN-SERRANO, A.; DAVIES, B. CRISPR-Cas orthologues and variants: optimizing the repertoire, specificity and delivery of genome engineering tools. **Mammalian Genome**, v. 28, n. 7-8, p. 247-261, 2017. DOI: 10.1007/s00335-017-9697-4.

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. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050718-100049.

CHO, S. W.; KIM, S.; KIM, Y.; KWEON, J.; KIM, H. S.; BAE, S.; KIM, J. S. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. **Genome Research**, v. 24, n. 1, p. 132-141, 2014. DOI: 10.1101/gr.162339.113.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIODIVERSIDADE. **Resolução Normativa nº 16, de 15 de janeiro de 2018**. Disponível em: <<http://ctnbio.mctic.gov.br/resolucoes-normativas>>. Acesso em: 27 ago. 2020.

CONG, L.; RAN, F. A.; COX, D.; LIN, S.; BARRETTO, R.; HABIB, N.; HSU, P. D.; WU, X.; JIANG, W.; MARRAFFINI, L. A.; ZHANG, F. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819-823, 2013. DOI: 10.1126/science.1231143.

COX, D. B. T.; GOOTENBERG, J. S.; ABUDAYYEH, O. O.; FRANKLIN, B.; KELLNER, M. J.; JOUNG, J.; ZHANG, F. RNA editing with CRISPR-Cas13. **Science**, v. 358, n. 6366, p. 1019-1027, 2017. DOI: 10.1126/science.aag0180.

CRADICK, T. J.; FINE, E. J.; ANTICO, C. J.; BAO, G. CRISPR/Cas9 systems targeting  $\beta$ -globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 20, p. 9584-9592, 2013. DOI: 10.1093/nar/gkt714.

CURTIN, S. J.; MICHNO, J. M.; CAMPBELL, B. W.; GIL-HUMANES, J.; MATHIONI, S. M.; HAMMOND, R.; GUTIERREZ-GONZALEZ, J. J.; DONOHUE, R. C.; KANTAR, M. B.; EAMENS, A. L.; MEYERS, B. C.; VOYTAS, D. F.; STUPAR, R. M. MicroRNA maturation and microRNA target gene expression regulation are severely disrupted in soybean dicer-like1 double mutants. **G3-Genes Genomes Genetics**, v. 6, n. 2, p. 423-433, 2016. DOI: 10.1534/g3.115.022137.

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

DAVIES, J. P.; KUMAR, S.; SASTRY-DENT, L. Use of zinc-finger nucleases for crop improvement. In: WEEKS, D. P.; YANG, B. (Ed.). **Gene editing in plants**. San Diego: Academic Press, 2017. p. 47-63. (Progress in molecular biology and translational science, 149). DOI: 10.1016/bs.pmbts.2017.03.006.

- DIANOV, G. L.; HÜBSCHER, U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 6, p. 3483–3490, 2013. DOI: 10.1093/nar/gkt076.
- DOEBLEY, J. F.; GAUT, B. S.; SMITH, B. D. The molecular genetics of crop domestication. **Cell**, v. 127, n. 5, p. 1309–1321, 2006. DOI 10.1080/03081079.2015.1106730.
- DOUDNA LAB. **CRISPR systems**. Berkeley, 2020. Disponível em: <[https://doudnalab.org/research\\_areas/crispr-systems/](https://doudnalab.org/research_areas/crispr-systems/)>. Acesso em: 27 ago. 2020.
- DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1077–1086, 2014. DOI: 10.1126/science.1258096.
- EISENSTEIN, M. Plant breeding: discovery in a dry spell. **Nature**, v. 501, n. 7468, p. S7–S9, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1038/50157a>.
- FAO. **The state of food security and nutrition in the world: safeguarding against economic slowdown and downturns**. Rome, 2019.
- FONFARA, I.; RICHTER, H.; BRATOVIČ, M.; LE RHUN, A.; CHARPENTIER, E. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. **Nature**, v. 532, n. 7600, p. 517–521, 2016. DOI: 10.1038/nature17945.
- FU, Y.; FODEN, J. A.; KHAYTER, C.; MAEDER, M. L.; REYON, D.; JOUNG, J. K.; SANDER, J. D. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 822–826, 2013. DOI: 10.1038/nbt.2623.
- FU, Y.; SANDER, J. D.; REYON, D.; CASCIO, V. M.; JOUNG, J. K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 279–284, 2014. DOI: 10.1038/nbt.2808.
- GAJ, T.; GERSBACH, C. A.; BARBAS, C. F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 7, p. 397–405, 2013. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004.
- GAO, H.; GADLAGE, M. J.; LAFITTE, H. R.; LENDERTS, B.; YANG, M.; SCHRODER, M.; FARRELL, J.; SNOPEK, K.; PETERSON, D.; FEIGENBUTZ, L.; JONES, S.; ST CLAIR, G.; RAHE, M.; SANYOUR-DOYEL, N.; PENG, C. N.; WANG, L. J.; YOUNG, J. K.; BEATTY, M.; DAHIKE, B.; HAZEBROEK, J.; GREENE, T. W.; CIGAN, A. M.; CHILCOAT, N. D.; MEELEY, R. B. Superior field performance of waxy corn engineered using CRISPR–Cas9. **Nature Biotechnology**, v. 38, p. 579–581, 2020a. DOI: 10.1038/s41587-020-0444-0.
- GAO, H.; MUTTI, J.; YOUNG, J. K.; YANG, M.; SCHRODER, M.; LENDERTS, B.; WANG, L.; PETERSON, D.; ST CLAIR, G.; JONES, S.; FEIGENBUTZ, L.; MARSH, W.; ZENG, M.; WAGNER, S.; FARRELL, J.; SNOPEK, K.; SCHELONGE, C.; SOPKO, X.; SANDER, J. D.; BETTS, S.; CIGAN, A. M.; CHILCOAT, N. D. Complex trait loci in maize enabled by CRISPR–Cas9 mediated gene insertion. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1–14, 2020b. DOI: 10.3389/fpls.2020.00535.
- GARNEAU, J. E.; DUPUIS, M. È.; VILLION, M.; ROMERO, D. A.; BARRANGOU, R.; BOYAVAL, P.; FREMAUX, C.; HORVATH, P.; MAGADÁN, A. H.; MOINEAU, S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. **Nature**, v. 468, n. 7320, p. 67–71, 2010. DOI: 10.1038/nature09523.
- GASIUNAS, G.; BARRANGOU, R.; HORVATH, P.; SIKSNYS, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. **Proceedings of the National**

**Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 39, p. E2579–E2586, 2012. DOI: 10.1073/pnas.1208507109.

GASIUNAS, G.; YOUNG, J. K.; KARVELIS, T.; KAZLAUSKAS, D.; URBAITIS, T.; JASNAUSKAITE, M.; GRUSYTE, M.; PAULRAJ, S.; WANG, P. H.; HOU, Z.; DOOLEY, S. K.; CIGAN, M.; ALARCON, C.; CHILCOAT, N. D.; BIGELYTE, G.; CURCURI, J. L.; MABUCHI, M.; SUN, Z.; FUCHS, R. T.; SCHILDKRAUT, E.; WEIGELE, P. R.; JACK, W. E.; ROBB, G. B.; VENCLOVAS, C.; SIKSNYS, V. Biochemically diverse CRISPR-Cas9 orthologs. **bioRxiv**: the preprint server for biology, 2020. DOI:10.1101/2020.04.29.066654.

HALE, C. R.; ZHAO, P.; OLSON, S.; DUFF, M. O.; GRAVELEY, B. R.; WELLS, L.; TERNS, R. M.; TERNS, M. P. RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 945–956, 2009. DOI: 10.1016/j.cell.2009.07.040.

HARRISON, R. G.; LARSON, E. L. Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. **Journal of Heredity**, v. 105, p. 795–809, 2014. DOI: 10.1093/jhered/esu033.

HERBERT, L.; MEUNIER, A. C.; BES, M.; VERNET, A.; PORTEFAIX, M.; DURANDET, F.; MICHEL, R.; CHAINE, C.; THIS, P.; GUIDERDONI, E.; PERIN, C. Beyond seek and destroy: how to generate allelic series using genome editing tools. **Rice**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2020. DOI: 10.1186/s12284-020-0366-y.

HSU, P. D.; SCOTT, D. A.; WEINSTEIN, J. A.; RAN, F. A.; KONERMANN, S.; AGARWALA, V.; LI, Y.; FINE, E. J.; WU, X.; SHALEM, O.; CRADICK, T. J.; MARRAFINI, L. A.; BAO, G.; ZHANG, F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 827–832, 2013. DOI: 10.1038/nbt.2647.

HU, J. H.; MILLER, S. M.; GEURTS, M. H.; TANG, W.; CHEN, L.; SUN, N.; ZEINA, C. M.; GAO, X.; REES, H. A.; LIN, Z.; LIU, D. R. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. **Nature**, v. 556, n. 7699, p. 57–63, 2018. DOI: 10.1038/nature26155.

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

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. DOI: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.

IYER, V.; SHEN, B.; ZHANG, W.; HODGKINS, A.; KEANE, T.; HUANG, X.; SKARNES, W. C. Off-target mutations are rare in Cas9-modified mice. **Nature Methods**, v. 12, n. 6, p. 479–479, 2015. DOI: 10.1038/nmeth.3408.

JACKSON, D. A.; SYMONS, R. H.; BERG, P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 10, p. 2904–2909, 1972. DOI: 10.1073/pnas.69.10.2904.

JACOBSEN, E.; SCHOUTEN, H. J. Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 219–223, 2007. DOI: 10.1016/j.tibtech.2007.03.008.

- JANSEN, R.; van EMBDEN, J. D. A.; GAASTRA, W.; SCHOOLS, L. M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1565–1575, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.
- JANSING, J.; SCHIERMEYER, A.; SCHILLBERG, S.; FISCHER, R.; BORTESI, L. Genome editing in agriculture: technical and practical considerations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, p. 1-33, 2019. DOI: 10.3390/ijms20122888.
- JI, X.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; GAO, C. Establishing a CRISPR–Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. **Nature Plants**, v. 1, n. 10, p. 1-4, 2015. DOI: 10.1038/NPLANTS.2015.144.
- JIA, H.; ZHANG, Y.; ORBOVIĆ, V.; XU, J.; WHITE, F. F.; JONES, J. B.; WANG, N. Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 7, p. 817–823, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12677.
- JIANG, F.; DOUDNA, J. A. CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. **Annual Review of Biophysics**, v. 46, p. 505–529, 2017. DOI: 0.1146/annurev-biophys-062215-010822.
- JIANG, F.; ZHOU, K.; MA, L.; GRESSEL, S.; DOUDNA, J. A. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. **Science**, v. 348, n. 5242, p. 1477–1481, 2015. DOI: 10.1126/science.aab1452.
- JIANG, W. Z.; HENRY, I. M.; LYNAGH, P. G.; COMAI, L.; CAHOON, E. B.; WEEKS, D. P. Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR/Cas9 gene editing. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 5, p. 648–657, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12663.
- 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. DOI: 10.1126/science.1225829.
- JUNG, J. H.; ALTPETER, F. TALEN mediated targeted mutagenesis of the caffeic acid O-methyltransferase in highly polyploid sugarcane improves cell wall composition for production of bioethanol. **Plant Molecular Biology**, v. 92, n. 1-2, p. 131–142, 2016. DOI: 10.1007/s11103-016-0499-y.
- KIM, D.; BAE, S.; PARK, J.; KIM, E.; KIM, S.; YU, H. R.; HWANG, J.; KIM, J.; KIM, J. S. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR–Cas9 off-target effects in human cells. **Nature Methods**, v. 12, n. 5, p. 237–243, 2015. DOI: 10.1038/NMETH.3284.
- KIM, J.; KIM, J. Y. New era of precision plant breeding using genome editing. **Plant Biotechnology Reports**, v. 13, n. 5, p. 419–421, 2019. DOI: 10.1007/s11816-019-00581-w.
- KIM, S.; KIM, D.; CHO, S. W.; KIM, J.; KIM, J. S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. **Genome Research**, v. 24, n. 6, p. 1012–1019, 2014. DOI: 10.1101/gr.171322.113.
- KLEINSTIVER, B. P.; PATTANAYAK, V.; PREW, M. S.; TSAI, S. Q.; NGUYEN, N. T.; ZHENG, Z. L.; JOUNG, J. K. High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. **Nature**, v. 529, n. 7587, p. 490–495, 2016. DOI: 10.1038/nature16526.

KLEINSTIVER, B. P.; PREW, M. S.; TSAI, S. Q.; TOPKAR, V. V.; NGUYEN, N. T.; ZHENG, Z.; GONZALES, A. P. W.; LI, Z.; PETERSON, R. T.; YEY, J. R. J.; ARYEE, M. J.; JOUNG, J. K. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. **Nature**, v. 523, n. 7561, p. 481–485, 2015. DOI: 10.1038/nature14592.

KOONIN, E. V.; MAKAROVA, K. S. CRISPR-Cas: Evolution of an RNA-based adaptive immunity system in prokaryotes. **RNA Biology**, v. 10, n. 5, p. 679–686, 2013. DOI: 10.4161/rna.24022.

KOONIN, E. V.; MAKAROVA, K. S.; ZHANG, F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 37, p. 67–78, 2017. DOI: 10.1016/j.mib.2017.05.008.

KULCSÁR, P. I.; TÁLAS, A.; TÓTH, E.; NYESTE, A.; LIGETI, Z.; WELKER, Z.; WELKER, E. Blackjack mutations improve the on-target activities of increased fidelity variants of SpCas9 with 5'G-extended sgRNAs. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-15021-5.

LEMMON, Z. H.; REEM, N. T.; DALRYMPLE, J.; SOYK, S.; SWARTWOOD, K. E.; RODRIGUEZ-LEAL, D.; VAN ECK, J.; LIPPMAN, Z. B. Rapid improvement of domestication traits in an orphan crop by genome editing. **Nature Plants**, v. 4, n. 10, p. 766–770, 2018. DOI: 10.1038/s41477-018-0259-x.

LI, C.; LIU, C.; QI, X.; WU, Y.; FEI, X.; MAO, L.; CHENG, B.; LI, X.; XIE, C. RNA-guided Cas9 as an in vivo desired-target mutator in maize. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 12, p. 1566–1576, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12739.

LI, H.; LI, J.; CHEN, J.; YAN, L.; XIA, L. Precise modifications of both exogenous and endogenous genes in rice by prime editing. **Molecular Plant**, v. 13, n. 5, p. 671–674, 2020a. DOI: 10.1016/j.molp.2020.03.011.

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 Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-23, 2020b. DOI: 10.1038/s41392-019-0089-y.

LI, J.; LI, H.; CHEN, J.; YAN, L.; XIA, L. Toward Precision Genome Editing in Crop Plants. **Molecular Plant**, v. 3, n. 6, p. 811–813, 2020c. DOI 10.1016/j.molp.2020.04.008.

LI, J.; STODDARD, T. J.; DEMOREST, Z. L.; LAVOIE, P. O.; LUO, S.; CLASEN, B. M.; CEDRONE, F.; RAY, E. E.; COFFMAN, A. P.; DAULHAC, A.; YABANDITH, A.; RETTERATH, A. J.; MATHIS, L.; VOYTAS, D. F.; D'AOUST, M. A.; ZHANG, F. Multiplexed, targeted gene editing in *Nicotiana benthamiana* for glyco-engineering and monoclonal antibody production. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 2, p. 533–542, 2016. DOI: 10.1111/pbi.12403.

LI, T.; LIU, B.; SPALDING, M. H.; WEEKS, D. P.; YANG, B. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 390–392, 2012. DOI: 10.1038/nbt.2199.

LI, T.; YANG, X.; YU, Y.; SI, X.; ZHAI, X.; ZHANG, H.; DONG, W.; GAO, C.; XU, C. Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1160–1163, 2018b. DOI: 10.1038/nbt.4273.

LI, X.; LI, L.; YAN, J. Dissecting meiotic recombination based on tetrad analysis by single-microspore sequencing in maize. **Nature Communications**, v. 6, p. 1-9, 2015. DOI: 10.1038/ncomms7648.

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

- LIN, Q.; ZONG, Y.; XUE, C.; WANG, S.; JIN, S.; ZHU, Z.; WANG, Y.; ANZALONE, A. V.; RAGURAM, A.; DOMAN, J. L.; LIU, D. R.; GAO, C. Prime genome editing in rice and wheat. **Nature Biotechnology**, v. 38, p. 582–585, 2020. DOI: 10.1038/s41587-020-0455-x.
- LIN, T.; ZHU, G.; ZHANG, J.; XU, X.; YU, Q.; ZHENG, Z.; ZHANG, Z.; LUN, Y.; LI, S.; WANG, X.; HUANG, Z.; LI, J.; ZHANG, C.; WANG, T.; ZHANG, Y.; WANG, A.; ZHANG, Y.; LIN, K.; LI, C.; XIONG, G.; XUE, Y.; MAZZUCATO, A.; CAUSSE, M.; FEI, Z.; GIOVANNONI, J.; CHETELAT, R. T.; ZAMIR, D.; STADLER, T.; LI, J.; YE, Z.; DU, Y.; HUANG, S. Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. **Nature Genetics**, v. 46, n. 11, p. 1220–1226, 2014. DOI: 10.1038/ng.3117.
- LOBELL, D. B.; GOURDJI, S. M. The Influence of Climate Change on Global Crop Productivity. **Plant Physiology**, v. 160, n. 4, p. 1686–1697, 2012. DOI: 10.1104/pp.112.208298.
- LOWE, K.; WU, E.; WANG, N.; HOERSTER, G.; HASTINGS, C.; CHO, M. J.; SCELONGE, C.; LENDERTS, B.; CHAMBERLIN, M.; CUSHATT, J.; WANG, L.; RYAN, L.; KHAN, T.; CHOW-YIU, J.; HUA, W.; YU, M.; BANH, J.; BAO, Z.; BRINK, K.; IGO, E.; RUDRAPPA, B.; SHAMSEER, P. M.; BRUCE, W.; NEWMAN, L.; SHEN, B.; ZHENG, P.; BIDNEY, D.; FALCO, C.; REGISTER, J.; ZHAO, Z.; XU, D.; JONES, T.; GORDON-KAMM, W. Morphogenic regulators baby boom and wuschel improve monocot transformation. **The Plant Cell**, v. 28, n. 9, p. 1998–2015, 2016. DOI: 10.1105/tpc.16.00124.
- MA, X.; ZHANG, Q.; ZHU, Q.; LIU, W.; CHEN, Y.; QIU, R.; WANG, B.; YANG, Z.; LI, H.; LIN, Y.; XIE, Y.; SHEN, R.; CHEN, S.; WANG, Z.; CHEN, Y.; GUO, J.; CHEN, L.; ZHAO, X.; DONG, Z.; LIU, Y. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 8, p. 1274–1284, 2015. DOI: 10.1016/j.molp.2015.04.007.
- MAHAS, A.; AMAN, R.; MAHFOUZ, M. CRISPR-Cas13d mediates robust RNA virus interference in plants. **Genome Biology**, v. 20, n. 1, p. 1–16, 2019. DOI: 10.1186/s13059-019-1881-2.
- MAHER, M. F.; NASTI, R. A.; VOLLBRECHT, M.; STARKER, C. G.; CLARK, M. D.; VOYTAS, D. F. Plant gene editing through de novo induction of meristems. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 84–89, 2020. DOI: 10.1038/s41587-019-0337-2.
- MALI, P.; AACH, J.; STRANGES, P. B.; ESVELT, K. M.; MOOSBURNER, M.; KOSURI, S.; YANG, L.; CHURCH, G. M. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 833–838, 2013. DOI: 10.1038/nbt.2675.
- MARRAFFINI, L. A. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 55–61, 2015. DOI: 10.1038/nature15386.
- MARRAFFINI, L. A.; SONTHEIMER, E. J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in Staphylococci by targeting DNA. **Science**, v. 322, n. 5909, p. 1843–1845, 2008. DOI: 10.1126/science.1165771.
- MAZUR, B. J.; TINGEY, S. V. Genetic mapping and introgression of genes of agronomic importance. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 175–182, 1995. DOI: 10.1016/0958-1669(95)80028-X.
- MCCOUCH, S.; BAUTE, G. J.; BRADEEN, J.; BRAMEL, P.; BRETTING, P. K.; BUCKLER, E.; BURKE, J. M.; CHAREST, D.; CLOUTIER, S.; COLE, G.; DEMPEWOLF, H.; DINGKUHN, M.; FEUILLET, C.; GEPTS, P.; GRATTAPAGLIA, D.; GUARINO, L.; JACKSON, S.; KNAPP, S.; LANGRIDGE, P.; LAWTON-RAUH, A.; LIJUA, Q.; LUSTY, C.; MICHAEL, T.; MYLES, S.; NAITO, K.; NELSON, R. L.; PONTAROLLO, R.; RICHARDS, C. M.;



RIESEBERG, L.; ROSS-IBARRA, J.; ROUNSLEY, S.; HAMILTON, R. S.; SCHURR, U.; STEIN, N.; TOMOOKA, N.; VAN DER KNAAP, E.; VAN TASSEL, D.; TOLL, J.; VALLS, J.; VARSHNEY, R. K.; WARD, J.; WAUGH, R.; WENZL, P.; ZAMIR, D. Feeding the future. **Nature**, v. 499, n. 7456, p. 23–24, 2013. DOI: 10.1038/499023a.

METJE-SPRINK, J.; SPRINK, T.; HARTUNG, F. Genome-edited plants in the field. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 1–6, 2020. DOI: 10.1016/j.copbio.2019.08.007.

MIAO, C.; XIAO, L.; HUA, K.; ZOU, C.; ZHAO, Y.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. K. Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 23, p. 6058–6063, 2018. DOI: 10.1073/pnas.1804774115.

MISHRA, R.; JOSHI, R. K.; ZHAO, K. Base editing in crops: current advances, limitations and future implications. **Plant Biotechnology Journal**, v. 18, p. 20–31, 2020. DOI: 10.1111/pbi.13225.

MOJICA, F. J. M.; DÍEZ-VILLASEÑOR, C.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; ALMENDROS, C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. **Microbiology**, v. 155, p. 733–740, 2009. DOI: 10.1099/mic.0.023960-0.

MOJICA, F. J. M.; DÍEZ-VILLASEÑOR, C.; GARCÍA-MARTÍNEZ, 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. DOI: 10.1007/s00239-004-0046-3.

MOJICA, F. J. M.; 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. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x.

MOJICA, F. J. M.; JUEZ, G.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. **Molecular Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 613–621, 1993. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x.

MOLLA, K. A.; YANG, Y. CRISPR/Cas-mediated base editing: technical considerations and practical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 10, p. 1121–1142, 2019. DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.03.008.

MORINEAU, C.; BELLEC, Y.; TELLIER, F.; GISSOT, L.; KELEMEN, Z.; NOGUÉ, F.; FAURE, J. D. Selective gene dosage by CRISPR-Cas9 genome editing in hexaploid *Camelina sativa*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 6, p. 729–739, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12671.

MOUT, R.; RAY, M.; LEE, Y. W.; SCALETTI, F.; ROTELLO, V. M. In vivo delivery of CRISPR/Cas9 for therapeutic gene editing: progress and challenges. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 880–884, 2017. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00057.

MOYLE, L. C.; NAKAZATO, T. Comparative genetics of hybrid incompatibility: sterility in two solanum species crosses. **Genetics**, v. 179, n. 3, p. 1437–1453, 2008. DOI: 10.1534/genetics.107.083618.

MUROVEC, J.; PIRC, Z.; YANG, B. New variants of CRISPR RNA-guided genome editing enzymes. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 8, p. 917–926, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12736.

NAKAYASU, M.; AKIYAMA, R.; LEE, H. J.; OSAKABE, K.; OSAKABE, Y.; WATANABE, B.; SUGIMOTO, Y.; UMEMOTO, N.; SAITO, K.; MURANAKA, T.; MIZUTANI, M. Generation of  $\alpha$ -solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the St16DOX gene. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 131, p. 70–77, 2018. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.04.026.

- NEKRASOV, V.; WANG, C.; WIN, J.; LANZ, C.; WEIGEL, D.; KAMOUN, S. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–6, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-00578-x.
- NISHIMASU, H.; SHI, X.; ISHIGURO, S.; GAO, L.; HIRANO, S.; OKAZAKI, S.; NODA, T.; ABUDAYYEH, O. O.; GOOTENBERG, J. S.; MORI, H.; OURA, S.; HOLMES, B.; TANAKA, M.; SEKI, M.; HIRANO, H.; ABURATANI, H.; ISHITANI, R.; IKAWA, M.; YACHIE, N.; ZHANG, F.; NUREKI, O. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. **Science**, v. 361, n. 6408, p. 1259–1262, 2018. DOI: 10.1126/science.aas9129.
- OKUZAKI, A.; OGAWA, T.; KOIZUKA, C.; KANEKO, K.; INABA, M.; IMAMURA, J.; KOIZUKA, N. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in *Brassica napus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 131, p. 63–69, 2018. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.04.025.
- OZUNA, C. V.; IEHISA, J. C. M.; GIMÉNEZ, M. J.; ALVAREZ, J. B.; SOUSA, C.; BARRO, F. Diversification of the celiac disease  $\alpha$ -gliadin complex in wheat: a 33-mer peptide with six overlapping epitopes, evolved following polyploidization. **Plant Journal**, v. 82, n. 5, p. 794–805, 2015. DOI: 10.1111/tbj.12851.
- PENG, A.; CHEN, S.; LEI, T.; XU, L.; HE, Y.; WU, L.; YAO, L.; ZOU, X. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 12, p. 1509–1519, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12733.
- PEREZ-PINERA, P.; KOCAK, D. D.; VOCKLEY, C. M.; ADLER, A. F.; KABADI, A. M.; POLSTEIN, L. R.; THAKORE, P. I.; GLASS, K. A.; OUSTEROUT, D. G.; LEONG, K. W.; GUILAK, F.; CRAWFORD, G. E.; REDDY, T. E.; GERSBACH, C. A. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. **Nature Methods**, v. 10, n. 10, p. 973–976, 2013. DOI: 10.1038/NMETH.2600.
- POURCEL, C.; SALVIGNOL, G.; VERGNAUD, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. **Microbiology**, v. 151, p. 653–663, 2005. DOI: 10.1099/mic.0.27437-0.
- PURUGGANAN, M. D.; FULLER, D. Q. The nature of selection during plant domestication. **Nature**, v. 457, n. 7231, p. 843–848, 2009. DOI: 10.1038/nature07895.
- QIN, L.; LI, J.; WANG, Q.; XU, Z.; SUN, L.; ALARIQI, M.; MANGHWAR, H.; WANG, G.; LI, B.; DING, X.; RUI, H.; HUANG, H.; LU, T.; LINDSEY, K.; DANIELL, H.; ZHANG, X.; JIN, S. High-efficient and precise base editing of C •G to T•A in the allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) genome using a modified CRISPR/Cas9 system. **Plant Biotechnology Journal**, v. 18, n. 1, p. 45–56, 2020. DOI: 10.1111/pbi.13168.
- QUE, Q.; CHILTON, M. D. M.; DE FONTES, C. M.; HE, C.; NUCCIO, M.; ZHU, T.; WU, Y.; CHEN, J. S.; SHI, L. Trait stacking in transgenic crops: challenges and opportunities. **GM Crops**, v. 1, n. 4, p. 220–229, 2010. DOI: 10.4161/gmcr.1.4.13439.
- RAN, F. A.; CONG, L.; YAN, W. X.; SCOTT, D. A.; GOOTENBERG, J. S.; KRIZ, A. J.; ZETSCHKE, B.; SHALEM, O.; WU, X.; MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V.; SHARP, P. A.; ZHANG, F. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. **Nature**, v. 520, n. 7546, p. 186–191, 2015. DOI: 10.1038/nature14299.
- 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. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.021.

REWERS, M. Epidemiology of celiac disease: what are the prevalence, incidence, and progression of celiac disease? **Gastroenterology**, v. 128, n. 4, p. S47–S51, 2005. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.02.030.

RICROCH, A. Global developments of genome editing in agriculture. **Transgenic Research**, v. 28, p. 45–52, 2019. DOI: 10.1007/s11248-019-00133-6.

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

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

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

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, 2018. DOI: 10.1111/pbi.12837.

SANDER, J. D.; JOUNG, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 347–355, 2014. DOI: 10.1038/nbt.2842.

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

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

SCHNEIDER, K.; SCHIERMEYER, A.; DOLLS, A.; KOCH, N.; HERWARTZ, D.; KIRCHHOFF, J.; FISCHER, R.; RUSSELL, S. M.; CAO, Z.; CORBIN, D. R.; SASTRY-DENT, L.; AINLEY, W. M.; WEBB, S. R.; SCHINKEL, H.; SCHILLBERG, S. Targeted gene exchange in plant cells mediated by a zinc finger nuclease double cut. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 5, p. 1151–1160, 2016. DOI: 10.1111/pbi.12483.

SEDBROOK, J. C.; PHIPPEN, W. B.; MARKS, M. D. New approaches to facilitate rapid domestication of a wild plant to an oilseed crop: example pennycress (*Thlaspi arvense* L.). **Plant science**, v. 227, p. 122–132, 2014. DOI: 10.1016/j.plantsci.2014.07.008.

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

SHAH, S. A.; ERDMANN, S.; MOJICA, F. J. M.; GARRETT, R. A. Protospacer recognition motifs: mixed identities and functional diversity. **RNA Biology**, v. 10, n. 5, p. 891–899, 2013. DOI: 10.4161/rna.23764.

SHAH, T.; ANDLEEB, T.; LATEEF, S.; NOOR, M. A. Genome editing in plants: advancing crop transformation and overview of tools. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 131, p. 12–21, 2018. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.05.009.

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

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. DOI: 10.1111/pbi.12603.

SHMAKOV, S.; SMARGON, A.; SCOTT, D.; COX, D.; PYZOCHA, N.; YAN, W.; ABUDAYYEH, O. O.; GOOTENBERG, J. S.; MAKAROVA, K. S.; WOLF, Y. I.; SEVERINOV, K.; ZHANG, F.; KOONIN, E. V. Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 169–182, 2017. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.184.

SHUKLA, V. K.; DOYON, Y.; 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, n. 7245, p. 437–441, 2009. DOI: 10.1038/nature07992.

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

SLAYMAKER, I. M.; GAO, L.; ZETSCHKE, B.; SCOTT, D. A.; YAN, W. X.; ZHANG, F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. **Science**, v. 351, n. 6268, p. 84–88, 2016. DOI: 10.1126/science.aad5227.

STEINWAND, M. A.; RONALD, P. C. Crop biotechnology and the future of food. **Nature Food**, v. 1, p. 273–283, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0072-3>.

STERNBERG, S. H.; REDDING, S.; JINEK, M.; GREENE, E. C.; DOUDNA, J. A. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. **Nature**, v. 507, n. 7490, p. 62–67, 2014. DOI: 10.1038/nature13011.

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

TANG, X.; SRETENOVIC, S.; REN, Q.; JIA, X.; LI, M.; FAN, T.; YIN, D.; XIANG, S.; GUO, Y.; LIU, L.; ZHENG, X.; QI, Y.; ZHANG, Y. Plant prime editors enable precise gene editing in rice cells. **Molecular Plant**, v. 13, n. 5, p. 667–670, 2020. DOI: 10.1016/j.molp.2020.03.010.

TENG, F.; CUI, T.; FENG, G.; GUO, L.; XU, K.; GAO, Q.; LI, T.; LI, J.; ZHOU, Q.; LI, W. Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering. **Cell Discovery**, v. 4, p. 1–15, 2018. DOI: 10.1038/s41421-018-0069-3.

- TONG, S.; EBI, K. Preventing and mitigating health risks of climate change. **Environmental Research**, v. 174, p. 9–13, 2019. DOI: 10.1016/j.envres.2019.04.012.
- TOWNSEND, J. A.; WRIGHT, D. A.; WINFREY, R. J.; FU, F.; MAEDER, M. L.; JOUNG, J. K.; VOYTAS, D. F. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 442–445, 2009. DOI: 10.1038/nature07845.
- VARSHNEY, R. K.; RIBAUT, J. M.; BUCKLER, E. S.; TUBEROSA, R.; RAFALSKI, J. A.; LANGRIDGE, P. Can genomics boost productivity of orphan crops? **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 1172–1176, 2012. DOI: 10.1038/nbt.2440.
- WALTZ, E. CRISPR-edited crops free to enter market, skip regulation. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 6, p. 582, 2016. DOI: 10.1038/nbt0616-582.
- WALTZ, E. Nonbrowning GM apple cleared for market. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 326–327, 2015. DOI: 10.1038/nbt0415-326c.
- WANG, F.; WANG, C.; LIU, P.; LEI, C.; HAO, W.; GAO, Y.; LIU, Y. G.; ZHAO, K. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922. **Plos One**, v. 11, n. 4, p. 1–18, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0154027.
- 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, 2014. DOI: 10.1038/nbt.2969.
- WIEDENHEFT, B.; STERNBERG, S. H.; DOUDNA, J. A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. **Nature**, v. 482, n. 7385, p. 331–338, 2012. DOI: 10.1038/nature10886.
- XU, R.; YANG, Y.; QIN, R.; LI, H.; QIU, C.; LI, L.; WEI, P.; YANG, J. Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. **Journal of Genetics And Genomics**, v. 43, n. 8, p. 529–532, 2016. DOI: 10.1016/j.jgg.2016.07.003.
- XU, W.; ZHANG, C.; YANG, Y.; ZHAO, S.; KANG, G.; HE, X.; SONG, J.; YANG, J. Versatile nucleotides substitution in plant using an improved prime editing system. **Molecular Plant**, v. 13, n. 5, p. 675–678, 2020. DOI: 10.1016/j.molp.2020.03.012.
- XU, Y.; CROUCH, J. H. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. **Crop Science**, v. 48, n. 2, p. 391–407, 2008. DOI: 10.2135/cropsci2007.04.0191.
- YOUNG, J.; ZASTROW-HAYES, G.; DESCHAMPS, S.; SVITASHEV, S.; ZAREMBA, M.; ACHARYA, A.; PAULRAJ, S.; PETERSON-BURCH, B.; SCHWARTZ, C.; DJUKANOVIC, V.; LENDERTS, B.; FEIGENBUTZ, L.; WANG, L.; ALARCON, C.; SIKSNYS, V.; MAY, G.; CHILCOAT, N. D.; KUMAR, S. CRISPR-Cas9 editing in maize: systematic evaluation of off-target activity and its relevance in crop improvement. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-11, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-43141-6.
- ZAIDI, S. S. E. A.; MAHFOUZ, M. M.; MANSOOR, S. CRISPR-Cpf1: a new tool for plant genome editing. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 7, p. 550–553, 2017. DOI: 10.1016/j.tplants.2017.05.001.
- ZETSCHKE, B.; GOOTENBERG, J. S.; ABUDAYYEH, O. O.; SLAYMAKER, I. M.; MAKAROVA, K. S.; ESSLETZBICHLER, P.; VOLZ, S. E.; JOUNG, J.; VAN DER OOST, J.; REGEV, A.; KOONIN, E. V.; ZHANG, F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. **Cell**, v. 163, n. 3, p. 759–771, 2015. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038.

ZHANG, J.; ZHANG, H.; BOTELLA, J. R.; ZHU, J. K. Generation of new glutinous rice by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *Waxy* gene in elite rice varieties. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 60, n. 5, p. 369–375, 2018a. DOI: 10.1111/jipb.12620.

ZHANG, N.; ROBERTS, H. M.; VAN ECK, J.; MARTIN, G. B. Generation and molecular characterization of CRISPR/Cas9-induced mutations in 63 immunity-associated genes in tomato reveals specificity and a range of gene modifications. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1-13, 2020. DOI: 10.3389/fpls.2020.00010.

ZHANG, Q.; XING, H. L.; WANG, Z. P.; ZHANG, H. Y.; YANG, F.; WANG, X. C.; CHEN, Q. J. Potential high-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR/Cas9 in *Arabidopsis* and its prevention. **Plant Molecular Biology**, v. 96, n. 4-5, p. 445–456, 2018b. DOI: 10.1007/s11103-018-0709-x.

ZHANG, Q.; ZHANG, Y.; LU, M. H.; CHAI, Y. P.; JIANG, Y. Y.; ZHOU, Y.; WANG, X. C.; CHEN, Q. J. A novel ternary vector system united with morphogenic genes enhances CRISPR/Cas delivery in maize. **Plant Physiology**, v. 181, n. 4, p. 1441–1448, 2019. DOI: 10.1104/pp.19.00767.

ZHANG, Y.; GE, X.; YANG, F.; ZHANG, L.; ZHENG, J.; TAN, X.; JIN, Z. B.; QU, J.; GU, F. Comparison of non-canonical PAMs for CRISPR/Cas9-mediated DNA cleavage in human cells. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-5, 2014. DOI: 10.1038/srep05405.

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. 1–8, 2016. DOI: 10.1038/ncomms12617.

ZHOU, J.; PENG, Z.; LONG, J.; SOSSO, D.; LIU, B.; EOM, J. S.; HUANG, S.; LIU, S.; VERA CRUZ, C.; FROMMER, W. B.; WHITE, F. F.; YANG, B. Gene targeting by the TAL effector *Pthx2* reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. **Plant Journal**, v. 82, n. 4, p. 632–643, 2015. DOI: 10.1111/tpj.12838.

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, 2018.

ZSÖGÖN, A.; CERMAK, T.; VOYTAS, D.; PERES, L. E. P. Genome editing as a tool to achieve the crop ideotype and de novo domestication of wild relatives: Case study in tomato. **Plant Science** v. 256, p. 120–130, 2017.