



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS **SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2025**

A tecnologia CRISPR-CAS9 aplicada ao modelo biológico *Arabidopsis thaliana* L (Brassicaceae)

Wasny Oliveira da Silva¹; Cláudia Araújo Bastos²

1. Wasny Oliveira da Silva, PROBIC/UEFS, CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, e-mail: wasnyuefs@gmail.com

2. Cláudia Araújo Bastos, DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, e-mail: cabastos@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: CRISPR/Cas9, *Arabidopsis thaliana*, edição genômica.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os avanços na biotecnologia têm impulsionado o desenvolvimento e a consolidação de sistemas de edição genética. Essas ferramentas permitiram a manipulação de diversos organismos, como as *zinc finger nucleases* (ZFNs), *transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) e *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) (PEREIRA *et al.*, 2016). Dentre essas, CRISPR se mostra como a técnica mais simples, de baixo custo, altamente específica e eficiente, e também permite a manipulação de mais de um gene ao mesmo tempo (PEREIRA *et al.*, 2016; MA *et al.*, 2015).

Esse sistema baseia-se em uma endonuclease (Cas9), e moléculas de RNA-guia (sgRNAs), funcionando assim como uma “tesoura molecular”, clivando uma parte específica do DNA, nocauteando ou regulando a expressão gênica (MOLINARI *et al.*, 2020). Em organismos modelo experimentais, CRISPR/Cas9 passou a ser frequentemente utilizada, conforme evidenciado em revisões anteriores que trouxeram diversas pesquisas com edição gênica em *Drosophila melanogaster* (COSTA *et al.*, 2022). A aplicação desse sistema também se torna relevante para o melhoramento de plantas de interesse agrônomo, visando o desenvolvimento de resistência a pragas e doenças, tolerância ao estresse hídrico e aos demais fatores abióticos (MOLINARI *et al.*, 2020). Sob essa perspectiva, a dicotiledônea *Arabidopsis thaliana* L. (Brassicaceae) tem sido usada como modelo experimental para aplicação de CRISPR/Cas9 em plantas, pois é uma planta pequena, com ciclo de vida curto, genoma completamente sequenciado e simples, sendo assim um organismo modelo passível de abordagens moleculares (MÜLLER; GROSSNIKLAS, 2010).

Por se tratar de uma abordagem de manipulação genética, essa técnica demanda o cumprimento de parâmetros laboratoriais específicos, incluindo certificação em biossegurança (CQB), disponibilidade de insumos apropriados e capacitação de equipe especializada. Nesse sentido, aqui propõe-se uma revisão sistemática sobre o uso do CRISPR/Cas9 em *Arabidopsis thaliana*, descrevendo um protocolo para edição e reiterando que esse levantamento é essencial para orientar a implementação prática dessa ferramenta de engenharia genética.

2 METODOLOGIA

A revisão sistemática foi conduzida com base na metodologia descrita por COSTA *et al.* (2022). Foi realizada uma busca nas principais bases de dados com artigos publicados disponíveis online: *AirXiv*, *Science Direct*, *Microsoft Academic Search*, SciELO e Google Acadêmico. Os descritores utilizados em português foram: CRISPR/Cas9, CRISPR, *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis*, edição genômica; em inglês: CRISPR/Cas9, CRISPR, *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis* e genomic editing. Operadores de pesquisa “e, ou, and e or” foram utilizados para combinar os termos de busca a fim de ampliar ou limitar a recuperação de dados do levantamento.

Os artigos foram selecionados inicialmente pelos títulos, seguida da leitura dos resumos, dentro do recorte temporal adotado que compreendeu o período de 2010 a 2024. Como critérios de exclusão, foram desconsiderados os artigos fora do recorte estabelecido, aqueles que aplicaram técnicas distintas do CRISPR, revisões bibliográficas, capítulos de livros e estudos que não envolvessem *A. thaliana*. Adotou-se a escala PRISMA para organização da análise dos dados em quatro etapas: identificação, triagem, elegibilidade e inclusão (MOHER *et al.*, 2009).

A plataforma *ScienceDirect* apresentou um total de 6.403 artigos, enquanto *AirXiv* e SciELO apresentaram nenhum resultado, e *Microsoft Academic Search* encontra-se desativada desde 2021. Diante disso, realizou-se uma busca complementar no *Google Acadêmico*, que recuperou 62.380 artigos. Somados aos resultados obtidos no ScienceDirect, obteve-se um total inicial de 68.710 publicações. No final, 103 publicações foram selecionadas para a sistematização dos dados, incluindo artigos que descrevem protocolos de aplicação do CRISPR/Cas9 em plantas. Todo o processo de seleção dos artigos para revisão sistemática está detalhado na Figura 1.

Para sistematização dos dados, foram feitas duas planilhas com informações fundamentais. Na primeira, foram extraídos os autores, objetivos, método utilizado, genes alvos e alterações encontradas. Enquanto na segunda, foram reinseridos autores, genes alvos, funções dos genes, perspectivas, material e procedimentos para o desenvolvimento da técnica CRISPR/Cas9.

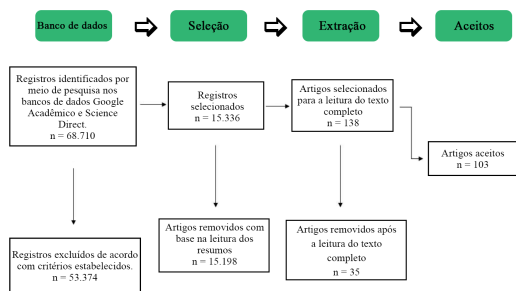


Figura 1: organograma do processo de extração dos dados, incluindo os bancos de dados, seleção dos artigos e extração dos dados. Adaptado de COSTA *et al.*, 2022.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Evidencia-se que 73 dos 103 artigos têm por objetivo criar mutações em genes específicos em *Arabidopsis thaliana*, 20 desenvolveram protocolos, três buscaram provocar alterações, seis procuraram deleções em genes, dois substituíram genes, dois criaram mutações em múltiplos genes, um buscou mutações cromossômicas e um

apresentou técnicas para detectar mutações. Dentre os 13 métodos apresentados pelos autores, o mais utilizado foi o método de imersão floral, identificado em 90 dos 103 trabalhos e associado à maioria dos demais métodos.

Ao todo, 98 genes alvo foram encontrados na revisão, sendo PDS (fitoeno desaturase) e a sua variação PDS3 (fitoeno desaturase 3) os mais frequentes dentre os resultados que apresentam como objetivo desenvolvimento de protocolos de edição, cuja função em *A. thaliana* é a biossíntese de carotenóides e clorofila (LI *et al.*, 2013; LU *et al.*, 2024). A perda de função deste gene resulta em fenótipos albinos.

O estudo mais antigo da pesquisa data de 2013, e relata a aplicação da tecnologia CRISPR/Cas9 em plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas, incluindo *Arabidopsis thaliana* (JIANG *et al.*, 2013). Até aquele momento não havia nenhuma demonstração da transmissão estável de genes modificados por esse sistema. Por isso JIANG *et al.* (2014), com base no experimento anterior, testaram a eficiência desse sistema para demonstrar a herança bem-sucedida de genes modificados, obtendo mutantes também além da geração T1 em *A. thaliana*.

O método de imersão floral consiste na imersão dos tecidos florais em estágio de desenvolvimento em uma solução contendo o vetor *Agrobacterium tumefaciens* que carrega o sistema CRISPR/Cas9, além de sacarose 5% e o surfactante Silwet L-77. Para a construção do sistema, é necessária a síntese de seus componentes. Assim, os autores descrevem a busca em plataformas online, como TAIR, NCBI e AddGene, para obtenção das sequências referentes aos genes-alvo, à endonuclease Cas9 e ao RNA-guia. (LOW *et al.*, 2020; SUN *et al.*, 2023).

Antes da transformação, as plantas devem ser cultivadas por 3 a 4 semanas até atingirem a floração em sala de crescimento, sob condições específicas (WOLABU *et al.*, 2020) (Figura 2). Os botões florais devem ser mergulhados na solução de *A. tumefaciens* por 1 a 2 segundos, depois cobertos com plástico por 24h antes de retornarem para o crescimento, que durará de 3 a 4 semanas para coleta das sementes (LOW *et al.*, 2020). As sementes deverão ser esterilizadas, estratificadas e cultivadas, com adição de antibióticos no meio, que funcionam como marcadores para identificar plantas que foram transformadas com sucesso, como higromicina e carbenicilina (Figura 2).

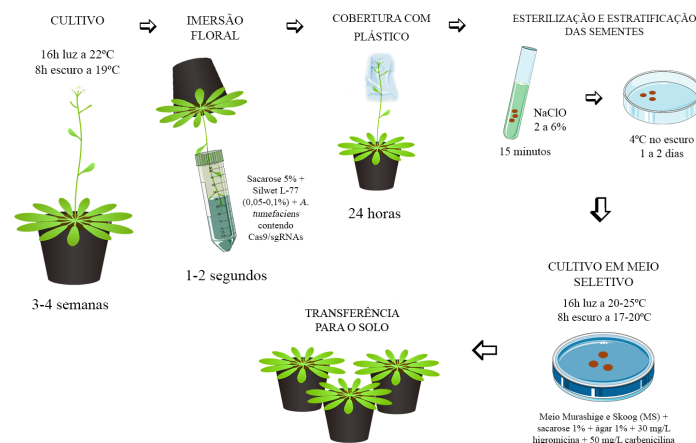


Figura 2: Esquema do método de imersão floral em *A. thaliana* para entrega de Cas9/sgRNAs. Figuras obtidas no Centro de Banco de Dados para Ciências da Vida (DBCLS), CC BY 3.0

CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

A partir de experimentos com *Arabidopsis thaliana*, desenvolvimentos metodológicos têm sido transferidos com sucesso para culturas de interesse econômico, isto é evidenciado em estudos que abordaram a edição gênica em outras culturas além da planta modelo. Essa ampla aplicabilidade ressalta o grande potencial do CRISPR/Cas9 como uma ferramenta versátil para edição precisa do genoma em diversas espécies de plantas de importância ornamental, médica e agrícola.

REFERÊNCIAS

- COSTA, Matheus Araújo et al. A tecnologia CRISPR/Cas9 aplicada ao modelo biológico *Drosophila melanogaster* / CRISPR/Cas9 technology applied to the *Drosophila melanogaster* biological model. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 4, p. 27610–27642, 18 abr. 2022.
- LI, Jian-Feng et al. 97. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 688–691, ago. 2013.
- LOW, Yee Chen; LAWTON, Michael A.; DI, Rong. 95. Validation of barley 2OGO gene as a functional orthologue of *Arabidopsis* DMR6 gene in *Fusarium* head blight susceptibility. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 9935, 18 jun. 2020.
- LU, Pengjun; ZUO, Erwei; YAN, Jianbin. 5. Developing a multi-modular assembled prime editing (mPE) system improved precise multi-base insertion efficiency in dicots. **Journal of Advanced Research**, v. 71, p. 81–92, 2024.
- PEREIRA, Tiago et al. Introdução à técnica de CRISPR. **Sociedade Brasileira de Genética**, 2016.
- SUN, Wenjun et al. 14. The Tartary buckwheat bHLH gene ALCATRAZ contributes to silique dehiscence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, v. 333, p. 111733, ago. 2023.
- MA, Xingliang et al. 3. 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, ago. 2015.
- MOLINARI, Hugo et al. Tecnologia CRISPR na edição genômica de plantas. **Embrapa**, 2020.
- MÜLLER, Bruno; GROSSNIKLAUS, Ueli. Model organisms — A historical perspective. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 11, p. 2054–2063, out. 2010.
- MOHER, David et al. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: **The PRISMA Statement**, v. 89, n. 9, p. 873–880, 2009.
- WOLABU, Tezera W. et al. 41. Improving the genome editing efficiency of CRISPR/Cas9 in *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. **Planta**, v. 252, n. 2, p. 15, ago. 2020.