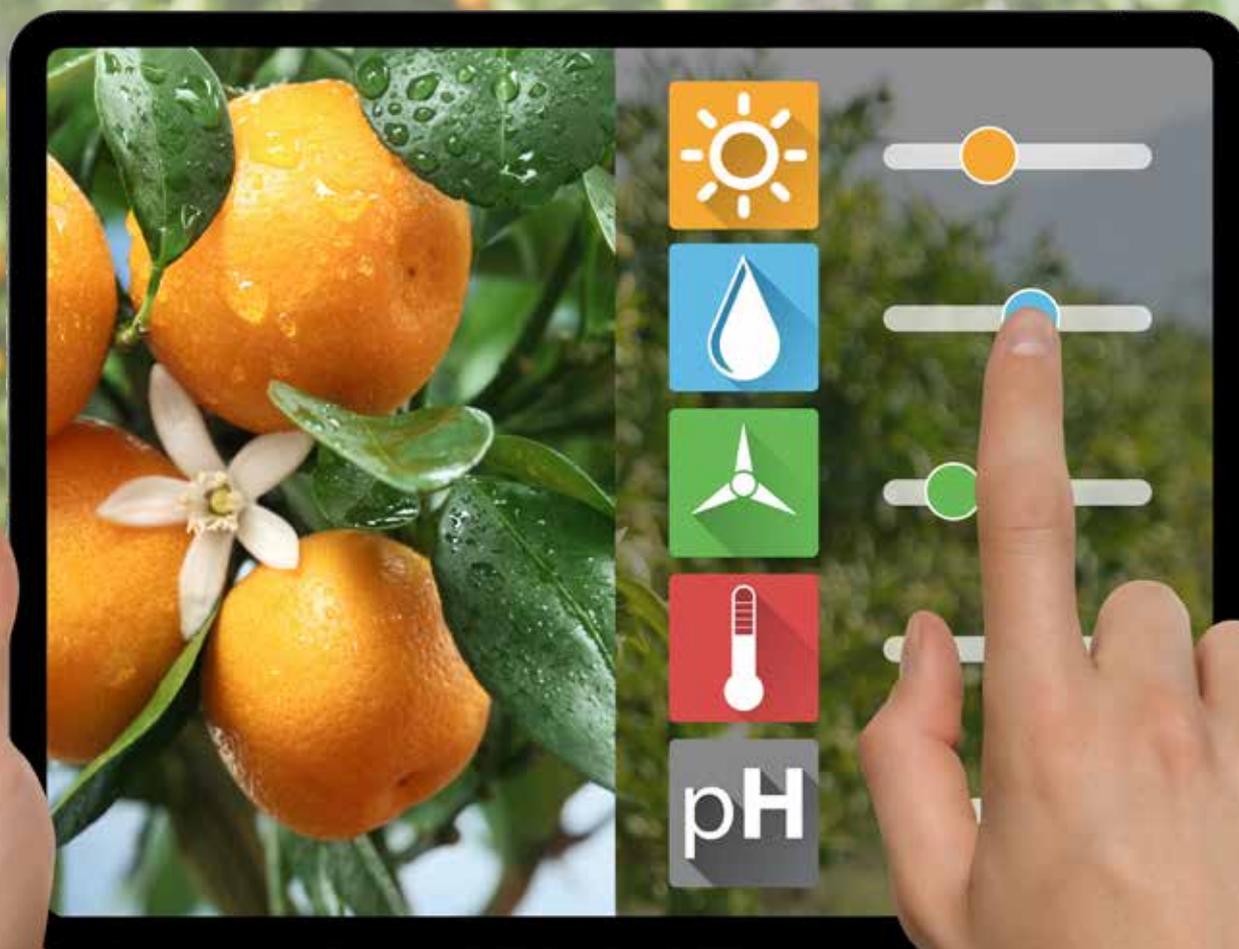


Citricultura Atual

Revista do Grupo de Consultores em Citros



*Com o impacto da estiagem de 2021,
o cenário para a temporada 2022/2023
mostra recuperação dos preços
recebidos pelos produtores*



Edição gênica e sua aplicação em citros

COM O AVANÇO DAS TÉCNICAS INOVADORAS DE MELHORAMENTO DE PRECISÃO, COMO A EDIÇÃO DE GENOMAS PELO SISTEMA CRISPR, É POSSÍVEL DESENVOLVER VARIEDADES MELHORADAS DE UMA FORMA MAIS DIRECIONADA E ESPECÍFICA

Em todo o mundo, o agronegócio vem sendo impulsionado a produzir de maneira mais eficiente e consciente. Hoje, os produtores se deparam com consumidores mais exigentes e mercados que priorizam a sustentabilidade e defendem o menor uso de defensivos químicos. Neste sentido, diversas tecnologias têm sido aplicadas na produção de alimentos; no entanto, além dos aspectos de mercado, constantes alterações climáticas e o aparecimento de pragas e doenças se tornam grandes limitantes da produção agrícola.

Frente aos desafios, a citricultura brasileira tem o apoio de grandes instituições de pesquisa, como o Centro de Citros Sylvio Moreira (CCSM), sediado no Instituto Agrônomo (IAC), que acumula informações científicas e tecnológicas, bem como equipes competentes e infraestrutura de pesquisa. Desta forma, o CCSM desenvolve há anos pesquisas voltadas para o melhoramento genético por meio de técnicas inovadoras de engenharia genética, e atualmente com experimentação em campo para seleção de genótipos elite tolerantes a doenças, produtividade e qualidade do fruto. De fato, plantas geneticamente modificadas trouxeram resultados positivos nos últimos anos, como é o caso, por exemplo, da soja, milho, algodão, eucalipto e, mais recentemente, da cana-de-açúcar.

Atualmente, com o avanço das Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMPs), é possível desenvolver variedades melhoradas de uma forma mais direcionada e específica. Uma tecnologia TIMP que tem se destacado em diferentes áreas é a edição de genomas pelo sistema CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. Esta tecnologia foi desenvolvida a partir do conhecimento sobre um mecanismo de defesa das bactérias para se protegerem contra vírus invasores. Esse mecanismo foi adaptado pela engenharia genética para se transformar na mais potente ferramenta de modificação genômica, conhecida também como ‘tesoura genética’ (figura).

Para fins didáticos, vamos tomar como exemplo o uso da tecnologia CRISPR (ou tesoura genética) em plantas. De forma simplificada, são necessários três componentes para fazer a edição: a região do DNA que se quer modificar (DNA alvo), uma molécula guia (sgRNA) e a proteína que promove o corte do DNA alvo, e a mais conhecida hoje é a proteína Cas9. A edição (ou corte) é guiada por uma pequena molécula que possui uma sequência complementar à região alvo a ser modificada. Quando ocorre o pareamento entre as sequências (alvo e guia) a proteína Cas9 funciona como uma tesoura, cortando o DNA em regiões específicas (figura).

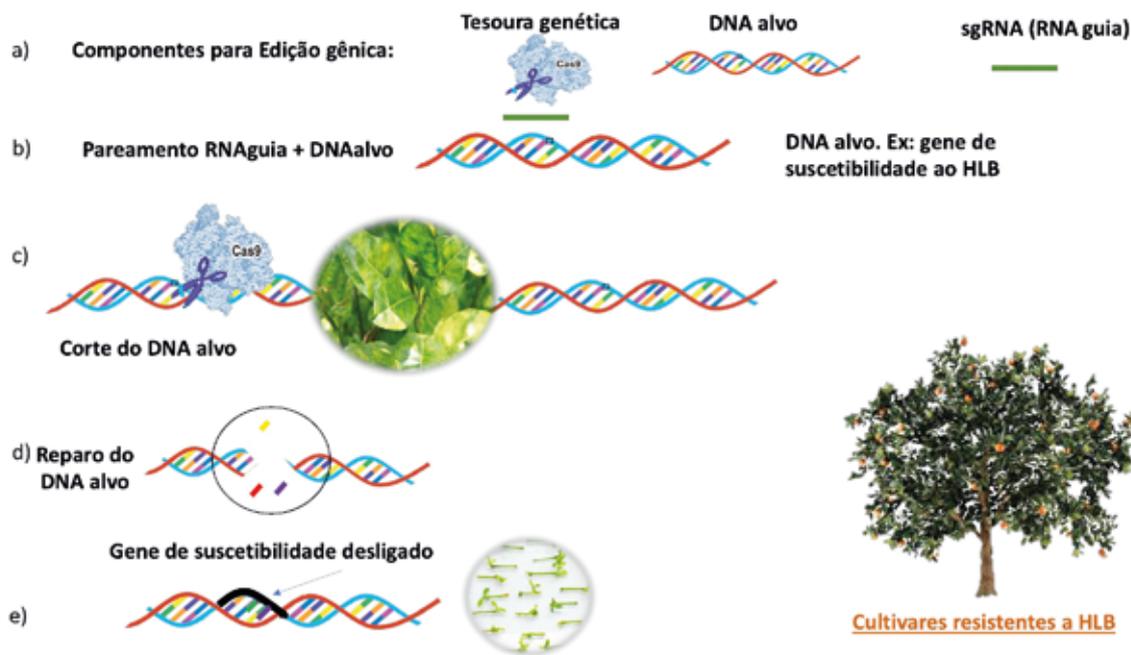
Em comparação com as técnicas de transgenia convencionais, a edição de genoma tem como principal vantagem a especificidade de modificação, ou seja, é possível escolher exatamente o local do genoma onde será feita a alteração genética. Um exemplo recente foi a obtenção de tomates que tiveram um gene editado e apresentaram aumento de cinco vezes no teor de um aminoácido (GABA) essencial ao nosso organismo (<https://sanatechseed.com/en/20201211-2-2/>). Este tomate já está sendo comercializado no Japão.

O CCSM vem há algum tempo trabalhando com a tecnologia de edição de genomas no laboratório de Biotecnologia. A edição já foi estabelecida para plantas modelo, como o tabaco, nas quais genótipos albinos foram obtidos. As próximas etapas da equipe de pesquisa estão voltadas para estabelecer a tecnologia para as espécies cítricas. No momento, o CCSM tem como objetivo principal trabalhar com genes que responderam ao ataque de patógenos de citros e que podem explicar parte dos sintomas desenvolvidos pelas plantas suscetíveis.

As doenças que mais têm desafiado a citricultura atualmente são o Cancro Cítrico, causado pela *Xanthomonas citri*, e o HLB, que no Brasil é associado principalmente à bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs). Dessa maneira, os alvos principais para a edição de genes são relacionados com a resposta a esses patógenos, os quais também são o objetivo de trabalhos realizados fora do Brasil. Os trabalhos publicados com citros até o momento, utilizando a tecnologia CRISPR, são oriundos dos Estados Unidos e China (Salonia *et al.*, 2020).

Visando a resistência ao Cancro Cítrico, um grupo de genes relacionados com a suscetibilidade da laranja doce, a *X. citri*, tem sido explorado pelos pesquisadores do CCSM. Em relação à resistência ao HLB, os genes alvo foram escolhidos com base em

Figura. Funcionamento da edição gênica por CRISPR-Cas9



estudos realizados em híbridos de *Poncirus trifoliata* e *Citrus sunki*, que têm se mostrado resistentes à infecção por CLAs após 12 anos a campo, em uma área de alta incidência de HLB (Curtolo *et al.*, 2020). Genes de diferentes vias fisiológicas foram associados à resistência, tolerância e suscetibilidade ao patógeno. Esses genes estão envolvidos com a produção de calose e de proteínas que se aglomeram, causando o bloqueio do floema e distúrbios no fluxo de seiva das folhas para a raiz. Esse bloqueio resulta no acúmulo de açúcar, na forma de amido, nas folhas. A hipótese é que o acúmulo excessivo de amido nos cloroplastos das folhas causa o rompimento do cloroplasto, produzindo os sintomas foliares de mosqueamento, típicos de HLB. Assim, os pesquisadores do CCSM visam modificar esses genes usando a técnica da ‘tesoura genética’, determinando a perda da sua atividade, o que levaria à redução dos sintomas da doença, mantendo a produtividade.

Métodos de transformação genética utilizando *Agrobacterium tumefaciens* são os mais utilizados e a técnica já é rotineiramente utilizada pelos pesquisadores do CCSM. Porém, neste caso, a planta modificada continua sendo uma planta transgênica, o que pode gerar mais dificuldades com a legislação e aceitação no mercado consumidor. A tecnologia de edição via CRISPR permite alternativa a este sistema, a partir da utilização do complexo da proteína Cas9 e do sgRNA em lugar da *Agrobacterium tumefaciens*. Esse complexo vem sendo utilizado para editar protoplastos (células sem parede celular) de citros. Essa abordagem resulta em plantas editadas não transgênicas, mas, no entanto, ainda é bastante limitada a algumas espécies, incluindo os citros, devido às dificuldades no processo de regeneração das plantas. A vantagem nesse caso é que as plantas editadas desta maneira seriam regulamentadas diferentemente de transgênicos, pela existência de

uma lei estabelecida na CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança), que trata separadamente as TIMPs.

Com a aprovação recente do projeto Centro de Ciência para o Desenvolvimento – CCD-NPOP-IAC (Citros, Cana, Café) financiado pela FAPESP e por empresas parceiras, a equipe do Instituto Agrônomo pretende aprimorar essa técnica de edição gênica para culturas de importância econômica para o Estado de São Paulo (<https://revistapesquisa.fapesp.br/aprendizado-em-edicao-de-genoma/>). No caso de citros, o foco da nossa equipe é a obtenção de plantas resistentes ao HLB. Com a experiência prévia adquirida pelas pesquisas desenvolvidas no Centro de Citricultura e pelos parceiros do projeto, visamos a melhoria contínua da citricultura, com base na ciência, inovação e transferência de tecnologia para o setor.

REFERÊNCIAS

- Salonia F, Ciacciulli A, Poles L, Pappalardo HD, La Malfa S and Licciardello C (2020) New Plant Breeding Techniques in Citrus for the Improvement of Important Agronomic Traits. A Review. *Front. Plant Sci.* 11:1234. doi: 10.3389/fpls.2020.01234
- Curtolo M, de Souza Pacheco I, Boava LP, et al. (2020). Wide-ranging transcriptomic analysis of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki*, *Citrus sinensis* and contrasting hybrids reveals HLB tolerance mechanisms. *Sci Rep* 10:1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77840-2>.
- Sanatech seed. Disponível em: <https://sanatech-seed.com/en/20201211-2-2/>. Acesso em: 4 de outubro de 2021. ●

Bióloga Alessandra Alves de Souza
 Biotecnóloga Maiara Curtolo
 Biólogo Marco Aurélio Takita
 Bióloga Raquel Luciana Boscarior-Camargo