

FOMENTO

APRENDIZADO EM EDIÇÃO DE GENÓMA

Pulverização de fertilizante com composto bactericida em laranjal afetado pelo greening

Instituto Agronômico vai utilizar “tesoura genética” para solucionar problemas nas culturas de cana, café e citros

Fabício Marques

Uma rede de pesquisadores sediada no Instituto Agronômico (IAC) vai utilizar técnicas de edição de genoma para buscar ampliar a qualidade e a produtividade de três culturas agrícolas de grande importância econômica: o café, a cana-de-açúcar e os citros. O esforço de pesquisa tem focos específicos, como o desenvolvimento de café com baixíssimo teor de cafeína, de laranjais resistentes a uma doença conhecida como HLB ou greening e de variedades de cana aprimoradas. Esses alvos são um pretexto para alcançar um objetivo mais ambicioso. A intenção é criar na comunidade de pesquisa em agronomia do Brasil uma expertise no uso da ferramenta CRISPR-Cas9, sigla de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (*ver* Pesquisa FAPESP n^o 288). O método funciona como uma espécie de tesoura e permite remover ou adicionar com precisão trechos do DNA de seres humanos, animais, plantas ou microrganismos. Seu potencial para criar tratamentos de doenças genéticas foi reconhecido com o Prêmio Nobel de Química de 2020, concedido às pesquisadoras Emmanuelle Charpentier, francesa, e Jennifer Doudna, norte-americana.

Na agricultura, o recurso de alterar partes do DNA de uma planta abriu horizontes novos para o campo do melhoramento genético. A edição gênica pode ter vantagens em relação à tecnologia dos organismos transgênicos, pois é mais fácil e barato alterar sequências de nucleotídeos, reescrevendo ordens específicas, do que introduzir genes inteiros. Já na comparação com as técnicas tradicionais, aquelas que buscam desenvolver variedades de plantas a partir de cruzamentos e de mutações que ocorrem aleatoriamente, a CRISPR-Cas9 promete mais rapidez e precisão. O método pode mudar características pontuais de uma espécie sem comprometer a arquitetura genética desenvolvida ao longo de décadas de pesquisas de campo.

Vinculado ao governo do estado de São Paulo, o IAC tem unidades dedicadas à pesquisa de café, citros e cana instaladas respectivamente nas cidades de Campinas, Cordeirópolis e Ribeirão Preto, mas

não fará esse trabalho sozinho. Foram estabelecidas parcerias no Brasil com grupos das universidades de São Paulo (USP), Estadual Paulista (Unesp), Federal de São Paulo (Unifesp) e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa); e, no exterior, com pesquisadores das universidades da Flórida, nos Estados Unidos, de Queensland, na Austrália, e do Instituto Max Planck, na Alemanha. A iniciativa contará com recursos e envolvimento de equipes de pesquisa de empresas como Amazon Agrosiences, CiaCamp, Daterra, GranBio, Citrosuco, Agroterenas, Jacto, Fundag, entre outras. Estão previstos investimentos de quase R\$ 35 milhões ao longo de cinco anos. A FAPESP entrará com R\$ 4,54 milhões, enquanto as empresas parceiras aplicarão R\$ 4,47 milhões. O IAC e as instituições parceiras participarão com R\$ 25,79 milhões, na forma de salários de seus pesquisadores e uso de laboratórios e equipamentos.

A iniciativa compõe o primeiro Núcleo de Pesquisa Orientada a Problemas (NPOP), um formato de rede de colaboração criado no âmbito do programa Ciência para o Desenvolvimento, lançado pela FAPESP em 2019 para resolver problemas concretos com impacto na economia do estado de São Paulo. “Nossos grupos já vinham estudando os protocolos para aplicação da edição gênica e esse projeto veio acelerar o processo”, afirma a coordenadora do NPOP, Mariângela Cristofani Yaly, engenheira-agrônoma e pesquisadora científica do Centro de Citricultura Sylvio Moreira do IAC, em Cordeirópolis.

Os recursos serão utilizados em material de pesquisa, como reagentes químicos e substratos para a produção de mudas, mas o impacto principal virá com a contratação de bolsas. “A contratação temporária de pessoal especializado, por meio de bolsas de doutorado e de pós-doutorado, além de técnicos, vai ampliar muito a nossa capacidade de investigação, uma vez que os institutos paulistas têm tido dificuldade em repor quadros com a aposentadoria de pesquisadores”, afirma Yaly. Estima-se que o projeto contará com 35 pesquisadores do IAC e de instituições parceiras e seja feita a contratação de outros 35 técnicos e bolsistas.

Na vertente de citricultura do projeto, segundo Yaly, o foco é o greening. Causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter* e transmitida por um inseto sugador de seiva, *Diaphorina citri*, a doença se espalha para raízes, ramos, folhas e frutos, que ficam pequenos e deformados. De acordo com dados do Fundecitrus, o greening atingia, em 2019, 19,02% das plantações de laranja de São Paulo e Minas Gerais. A única forma de controle é eliminar as plantas doentes e prevenir a disseminação do inseto. “Não há variedades comerciais de citros com resistência à bactéria”, diz Yaly.

O uso da CRISPR-Cas9 partirá do conhecimento acumulado no desenvolvimento de variedades transgênicas que vêm sendo testadas em experimentos de campo. “As pesquisas utilizando estratégias para prospecção nos permitiram identificar 10 genes que podem ter um papel nessa resistência à doença. Vamos agora usar a edição para tentar silenciá-los”, afirma. A meta é, dentro de cinco anos, organizar uma metodologia para aplicação da técnica e obter variedades editadas. “Mas esse esforço vai continuar pelos anos seguintes, até a validação do material de campo e o registro no Ministério da Agricultura.” Yaly vê esse esforço de pesquisa como uma sequência do Projeto Genoma, que teve início em meados dos anos 1990 com o sequenciamento de uma bactéria, *Xylella fastidiosa*, causadora também de uma doença dos laranjais, o amarelinho. “Esperamos que o NPOP alavanque o uso da CRISPR-Cas9 e crie um novo capítulo no melhoramento genético de plantas.”

Em relação ao café, a meta é intensificar a busca de variedades com baixíssimo teor de cafeína. O café descafeinado é responsável por 10% do consumo mundial, mas o processo químico de remoção da substância estimulante também retira compostos responsáveis pelo sabor e o aroma da bebida. Em 2004, um grupo de pesquisadores do IAC e da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) identificou na população silvestre de cafeeiros da

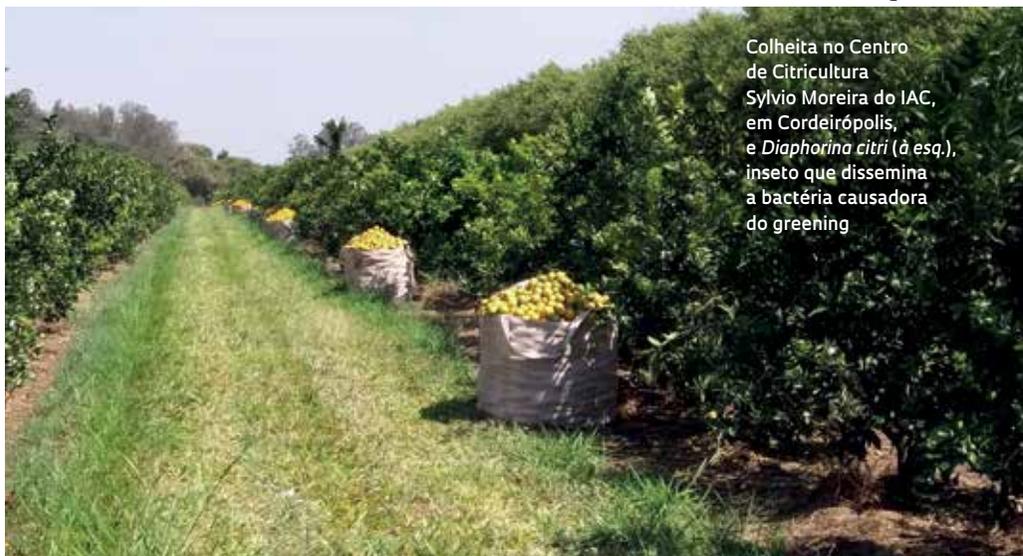
Etiópia três plantas mutantes de café tipo arábica que apresentavam teor de apenas 0,07% de cafeína. No arábica comum, o teor de cafeína varia de 1% a 1,5%, enquanto no café canéfora o índice chega a 2,2%. “Desde essa descoberta, as três plantas passaram a ser utilizadas no desenvolvimento de uma nova cultivar desprovida de cafeína por meio de métodos clássicos, que envolvem cruzamentos e autofecundações”, explica o engenheiro-agrônomo Oliveiro Guerreiro Filho, pesquisador do Centro de Café Alcides Carvalho do IAC, em Campinas, um dos membros do NPOP. “Mas esse é um processo que demora muitos anos. A cada cruzamento é preciso selecionar os híbridos com baixo teor de cafeína e fazer retrocruzamentos para resgatar todas as características desejadas.”

A edição de genoma será usada para acelerar o processo de melhoramento. “Vai nos permitir, por exemplo, silenciar apenas um gene de uma cultivar sabidamente produtiva e longeva, sem desarticular toda a sua arquitetura.” Uma dificuldade que atrasava o desenvolvimento dessas variedades já foi contornada. Utilizando as técnicas de melhoramento tradicional, só era possível aferir se uma planta híbrida produzia café com baixo teor de cafeína quando ela começava a dar frutos, dois anos após cultivada. Os pesquisadores do IAC, em parceria com uma equipe da Embrapa, conseguiram dar mais velocidade a esse processo. Identificaram marcadores moleculares capazes de apontar precocemente, a partir da análise das folhas, se as plantas estudadas têm baixa cafeína ou não. A busca do café com baixo teor de cafeína, observa Guerreiro, é um bom alvo para testar o potencial da edição gênica no aperfeiçoamento de cultivares de café. “Uma vez dominada, será possível usá-la em alvos diferentes nos cafeeiros. Agora é a cafeína, mas depois poderá ser a resistência ao déficit hídrico ou a tolerância ao calor.”

No caso da cana-de-açúcar, o foco principal do projeto é a transgenia, mas a intenção é incorporar conhecimento sobre a CRISPR-Cas9 a um conjunto de pesquisas que buscam variedades transgênicas tolerantes à seca, resistentes à praga do carvão da cana ou então mais ricas em celulose. “A transgenia



1



2

Colheita no Centro de Citricultura Sylvio Moreira do IAC, em Cordeirópolis, e *Diaphorina citri* (à esq.), inseto que dissemina a bactéria causadora do greening



Variedade de café do banco de germoplasma do Instituto Agrônomo e plantação de cana no Centro de Tecnologia Canavieira, em Piracicaba

3

é uma realidade para a cana-de açúcar e vai continuar sendo por muito tempo. Já temos algumas variedades transgênicas sendo testadas em campo”, afirma a engenheira-agrônoma Silvana Creste Dias de Souza, pesquisadora do Centro de Cana do IAC, em Campinas. “Mas queremos aprender a utilizar as ferramentas de edição gênica, que tendem a ter um impacto disruptivo.” O objetivo do projeto é, dentro de cinco anos, criar uma variedade de cana editada que seja resistente a um herbicida da classe dos inibidores de ALS, um dos mais utilizados nos canaviais. Ao mesmo tempo, buscaram-se genes que possam ser modificados pela ferramenta relacionados ao carvão da cana-de-açúcar ou a variedades da chamada “cana-energia”, com maior teor de fibras e maior potencial para produção de bioenergia. Os desafios, observa Souza, não são desprezíveis, dada a complexidade do genoma da espécie. A cana é um organismo poliploide: cada cromossomo tem de 8 a 10 cópias e eles nem sempre são iguais. “Cada gene tem vários alelos e cada um pode conferir um fenótipo [características observáveis]. Acertar um gene específico para alcançar um fenótipo desejado é bastante complexo”, observa.

A GranBio, empresa de biotecnologia que desenvolve etanol de segunda geração, extraído de celulose e hemicelulose, vai investir R\$ 1,5 milhão na vertente de pesquisa de cana-de-açúcar do NPOP. “Precisamos de variedades mais produtivas e robustas de cana e o uso da tecnologia da CRISPR-Cas9 pode ajudar a alcançá-las”, diz o agrônomo José Bressiani, diretor da Biovertis, um dos braços da GranBio. O método pode ajudar a desenvolver variedades de cana-energia, cujas paredes celulares possam ser desconstruídas com menor severidade durante o pré-tratamento, facilitando o processamento industrial na produção do etanol celulósico e elevando o rendimento. A edição de genoma poderia, por exemplo, modificar a lignina e criar um tipo de cana em que seja possível acessar com mais facilidade os açúcares da celulose e



4

da hemicelulose. “Alcançar esses resultados por meio da transgenia tende a ser mais demorado e complexo”, afirma Bressiani.

Um dos requisitos do edital dos Núcleos de Pesquisa Orientada a Problemas é que as instituições de pesquisa responsáveis pelos projetos atraiam parcerias com empresas privadas, a fim de acelerar a aplicação dos resultados. A FAPESP se dispôs a investir a mesma quantidade de recursos obtida de colaboradores privados. As equipes do IAC foram procurar antigos parceiros. O grupo do café celebrou uma parceria com a Datterra, fabricante de cafés especiais que há décadas utiliza variedades e tecnologias desenvolvidas pelo IAC ou em conjunto com o instituto. “Nossa empresa aplica 10% de seus resultados em pesquisa. Já fez mais de 10 projetos com o IAC e historicamente tem contado com a ajuda da instituição. Nunca pudemos retribuir a contento e essa parceria nos deu essa oportunidade”, afirma Luis Norberto Pascoal, diretor de pesquisa da Datterra. Parte dos experimentos de campo serão desenvolvidos em uma estação da empresa em Franca.

A cooperação não garante às empresas investidoras exclusividade sobre os resultados obtidos, mas haverá benefícios como descontos na cobrança de *royalties* durante certo período. Na pesquisa sobre citros, firmou-se uma colaboração curiosa. Uma das parceiras, a CiaCamp, é uma startup que nasceu no próprio Instituto Agrônomo em 2016 para comercializar um composto desenvolvido no Centro de Citricultura, capaz de controlar doenças bacterianas que afetam os citros (*ver Pesquisa FAPESP nº 276*). Articulada com uma fabricante de fertilizantes de São Carlos, a Amazon Agrosiences, a CiaCamp vai investir cerca de R\$ 50 mil por ano no projeto do NPOP e pretende desenvolver biofertilizantes talhados para as variedades que vierem a ser desenvolvidas. “Nós nascemos da pesquisa, fomos para o mercado e tivemos retorno financeiro. Agora podemos investir em pesquisa”, afirma a bióloga Simone Picchi, responsável pela CiaCamp, que antes de criar a startup fez dois estágios de pós-doutorado no IAC. ■