

EDIÇÃO GÊNICA

Eduardo Romano

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, PqEB, Av.
W5 Norte u– Brasília, DF – CEP 70770-917

Introdução

Variabilidade genética é um componente chave para o melhoramento genético vegetal. A ampliação de variabilidade genética tem sido obtida há anos através de técnicas de mutagênese randômica como o uso de radiação gama e de agentes químicos como EMS. Estas técnicas por um lado ampliam a variabilidade genética que pode ser explorada nos programas de melhoramento, mas pelo seu caráter aleatório provocam deleções, rearranjos e duplicações gênicas em loci não alvo com alta frequência e consequentemente resultam em fenótipos não desejados.

Técnicas modernas de edição gênica como “zinc finger nucleases” (ZFNs), “transcription activator-like effector nucleases” (TALENs) e CRISPR / Cas9, podem ser empregadas para realizar mutações de forma altamente específica e incorporar de forma simples características agrônômicas desejáveis.

De fato, a despeito destas técnicas terem sido desenvolvidas recentemente, em poucos anos elas estão revolucionando a biologia e o melhoramento genético. Vários exemplos na incorporação de características agrônômicas foram demonstrados e recentemente plantas, microorganismos e animais modificados por edição gênica receberam aprovação para comercialização em países como EUA, Argentina e Brasil. A seguir são descritos exemplos do emprego do uso de técnicas do chamado melhoramento de precisão.

Resistência a doenças

O aumento da resistência a patógenos nas lavouras é uma maneira importante de melhorar a sustentabilidade agrícola. A resistência pode ser gerada pela eliminação de genes de plantas que são usados (“seqüestrados”) por patógenos e dos quais os patógenos dependem para o crescimento e desenvolvimento. Estes são chamados genes S (para suscetibilidade, em contraste com os genes R dominantes que conferem resistência através do reconhecimento do patógeno). Um exemplo clássico é o milho, um

mutante recessivo que tem sido eficaz na resistência à cevada há mais de 30 anos. A desativação dos genes S gerou resistência a doenças em várias espécies de culturas, mas frequentemente acompanhada por redução de produtividade causada por mutações em loci não desejados. Usando TALENs, Li et al. (2012) foram capazes de identificar e deletar uma pequena parte do promotor SWEET14 de arroz que foi alvo de uma proteína efetora secretada pelo agente causal da Bacterial Leaf Blight, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Assim, foi gerada uma linha de arroz resistente às cepas que usam esse efector. A técnica de CRISPR-Cas9 também foi usada para mutação de genes do tipo SWEET S (Zhou et al. 2014). Plantas de arroz resistentes à brusone também foram obtidas utilizando CRISPR-Cas9 para mutagenizar o gene OsERF922 (Wang et al., 2016).

Aumento de produtividade

Li e colaboradores utilizaram o sistema CRISPR-Cas9 para mutar os genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3* e *IPA1* da cultivar de arroz Zhonghua 11. Estes genes que têm sido relatados como reguladores do número de grãos, arquitetura panicular, tamanho de grão e arquitetura da planta, respectivamente. A geração T2 dos mutantes *gn1a*, *dep1* e *gs3* apresentou maior número de grãos, panículas eretas densas e maior tamanho de grão, respectivamente. Além disso, fenótipos semi-anões foram observados em mutantes *dep1*. Os mutantes *ipa1* apresentaram dois fenótipos contrastantes, com menor número de perfilhos ou mais perfilhos, dependendo das alterações induzidas na região-alvo *OsmiR156* (Li et al., 2016)

Melhoria de qualidade de carne

A miostatina é codificada pelo gene *MSTN* envolvido na inibição da diferenciação e crescimento muscular. Crispo e colaboradores utilizaram o sistema CRISPR-Cas9 para editar *MSTN* em ovinos e gerar animais knockout com o objetivo de promover o desenvolvimento muscular e o crescimento corporal. Foram gerados mRNAs CRISPR / Cas9 específicos para *MSTN* de ovinos e os microinjetados no citoplasma de zigotos ovinos. De 20 embriões analisados por sequenciamento de Sanger, dez foram mutantes. Para obtenção de cordeiros *MSTN* KO vivos, 53 blastocistos produzidos após a microinjeção CRISPR / Cas9 do zigoto foram transferidos para 29 fêmeas receptoras. Dos 22 cordeiros nascidos analisados pelo T7EI e sequenciamento de Sanger, dez apresentaram mutações no gene *MSTN*. Oito

apresentaram mutações em ambos os alelos e cinco deles eram homozigotos para os indels que geraram mutações que resultaram em códons de parada prematuros. A análise por Western blot dos fundadores de KO homozigóticos confirmou a ausência de miostatina, mostrando um peso corpóreo mais pesado do que os homólogos do tipo selvagem (Cyranoski, 2015)

Animais de produção sem chifres

A remoção de chifres em gado leiteiro é praticada para proteger os animais e seus manipuladores. Nos Estados Unidos, estima-se que 80% de todos os bezerros leiteiros (4,8 milhões por ano) e 25% (8,75 milhões de animais) de bovinos de corte tem seus chifres removidos a cada ano. Esta prática que é realizada para proteger animais e produtores de ferimentos acidentais, não é apenas cara, mas também dolorosa para os animais. Este fenótipo pode ser obtido por melhoramento convencional, mas devido à complexidade do processo de melhoramento é pouco empregado. Carlson e colaboradores usaram TALENs para introgridir o alelo PC POLLED, associado à ausência de chifres em bovinos, no genoma de fibroblastos para obter um genótipo idêntico ao obtido por melhoramento convencional. Cinco bezerros vivos foram produzidos com o fenótipo sem chifres, demonstrando que esta estratégia pode ser empregada com sucesso. A Embrapa tem empregado esta estratégia para obtenção em genótipos de alto valor econômico em raças nacionais (Carlson et al., 2016).

Regulamentação das técnicas de Edição Gênica

Organismos modificados por técnicas de edição gênica têm sido rapidamente aprovados para comercialização pelo fato de produtos editados em muitos países poderem após uma análise caso a caso, seguirem uma regulamentação simplificada e menos onerosa.

De fato, países como Estados Unidos, Brasil, Chile, Argentina e, mais recentemente, Japão já possuem sistemas regulatórios que consideram que microorganismos, plantas e animais com pequenas modificações e sem DNA exógeno, devem seguir a mesma regulamentação que os produtos convencionais não transgênicos. Conseqüentemente, produtos editados foram obtidos em prazos mais curtos e por uma fração dos custos de organismos transgênicos. No Brasil, recentemente a CTNBIO aprovou a comercialização de um milho, três microorganismos e um animal de produção editados, considerando-os como não transgênicos. Por outro lado, a

Suprema Corte Europeia considerou recentemente que organismos obtidos por estas técnicas devem estar sujeitos a mesma regulação que plantas transgênicas. Esta assimetria de regulamentação pode resultar em problemas de comércio internacional entre países exportadores de commodities como Brasil, EUA e Argentina e países importadores da União Europeia.

Conclusões

As técnicas de edição de genoma podem facilitar a produção de culturas com maior rendimento, melhor teor de nutrientes, resistência a pragas e tolerância a estresses abióticos, acelerando programas de melhoramento por custos significativamente inferiores. Considerando que a regulamentação destas tecnologias parece apontar para um sistema regulatório baseado em ciência, mais simples e menos oneroso que o aplicado a plantas transgênicas, não parece improvável imaginar que estas técnicas possam em tese ser aplicadas pelo setor público e pequenas empresas privadas e consequentemente ampliar a participação de novos players em um mercado de sementes atualmente oligopolizado. Este cenário traria amplas vantagens para a sociedade, como redução de custos e aplicação de alta tecnologia em culturas de caráter social.

Bibliografia:

Daniel F Carlson ; Cheryl A Lancto ; Bin Zang ; Eui-Soo Kim ; Mark Walton ; David Oldeschulte ; Christopher Seabury ; Tad S Sonstegard ; Scott C Fahrenkrug (2016) Nature Biotechnology. 34, 479-481.

Meiru Li, Xiaoxia Eli, Zejiao Ezhou, Pingzhi Ewu, Pingzhi Ewu, Maichun Efang, Maichun Efang, Xiaoping Epan, Xiaoping Epan, Qiupeng Elin, Wanbin Eluo, Guojiang Ewu, Guojiang Ewu, Hongqing Eli. (2016) Reassessment of the four yield-related genes Gn1a, DEP1, GS3 and IPA1 in rice using a CRISPR/Cas9 system. Frontiers in Plant Science. 7, 1-13

Crispo Mulet, Tesson Barrera, Cuadro dos Santos-Neto, Nguyen CrénéGuy, Brusselle Anegón Menchaca (2015) Efficient Generation of Myostatin Knock-Out Sheep Using CRISPR/Cas9 Technology and Microinjection into Zygotes. PLoS One. 25, 1-18

Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B (2012) High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. Nat Biotechnol 30:390–392

Zhou HB, Liu B, Weeks DP, Spalding MH, Yang B (2014) Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucl Acids Res* 42:10903–10914

Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu J-L (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* 32:947–951