

# CATÓLICA PORTO

## Organismos genéticamente modificados

7 Dezembro 2016

Marta W. Vasconcelos



“Organismo cujo material genético foi alterado utilizando engenharia genética”

1. Alimentos que contêm um gene adicional
2. Alimentos aos quais foi removido um gene
3. Alimentos/ingredientes produzidos por organismos OGM
4. Produtos animais derivados de animais alimentados com forragem OGM

# ●●●● Como é possível fazer OGMs?

- ★ **Os componentes do DNA são iguais em todos os organismos.**
- ★ **As sequências que codificam as proteínas podem ser transferidas de um organismo para outro.**



# Os primórdios do melhoramento de espécies



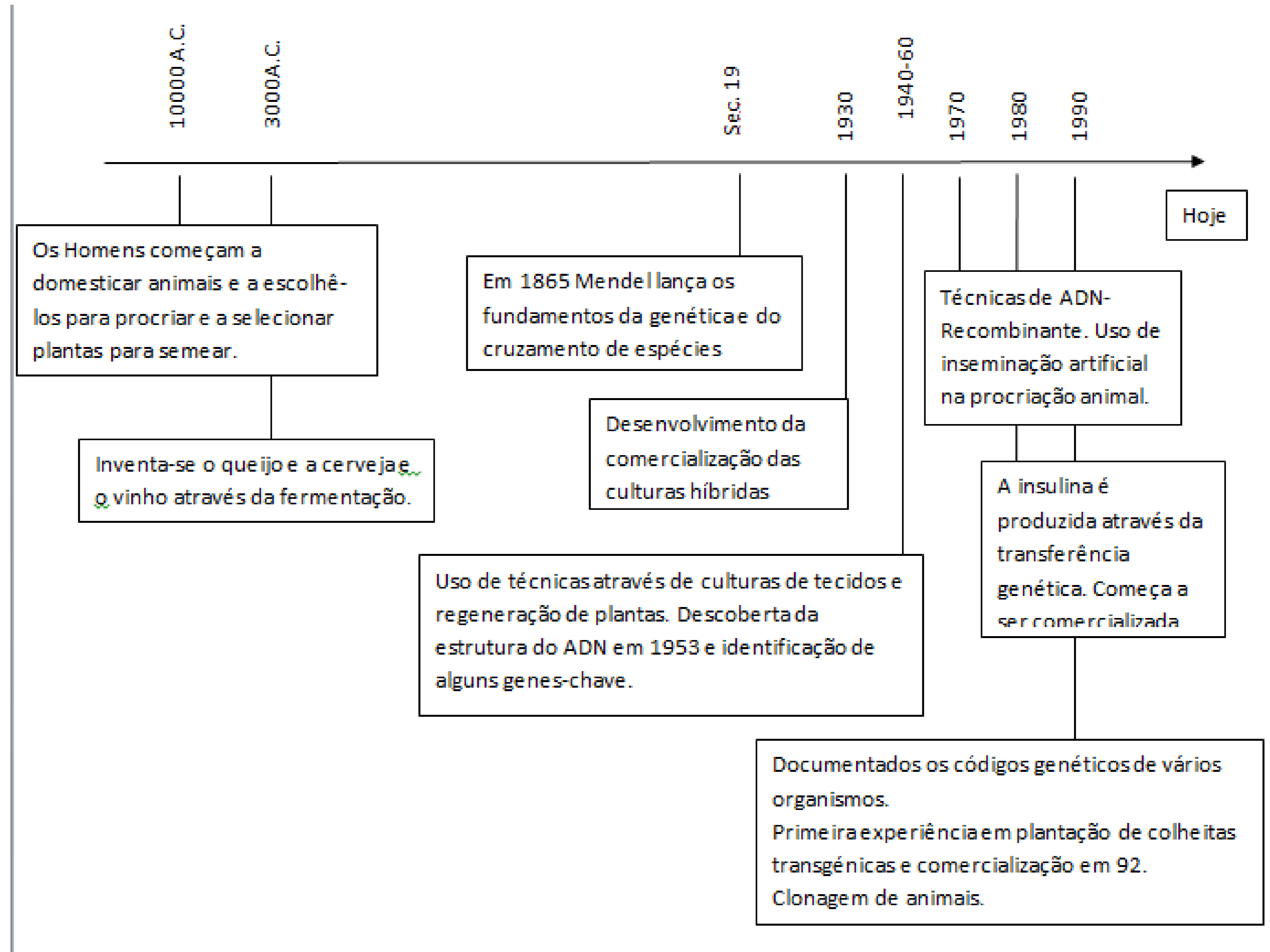
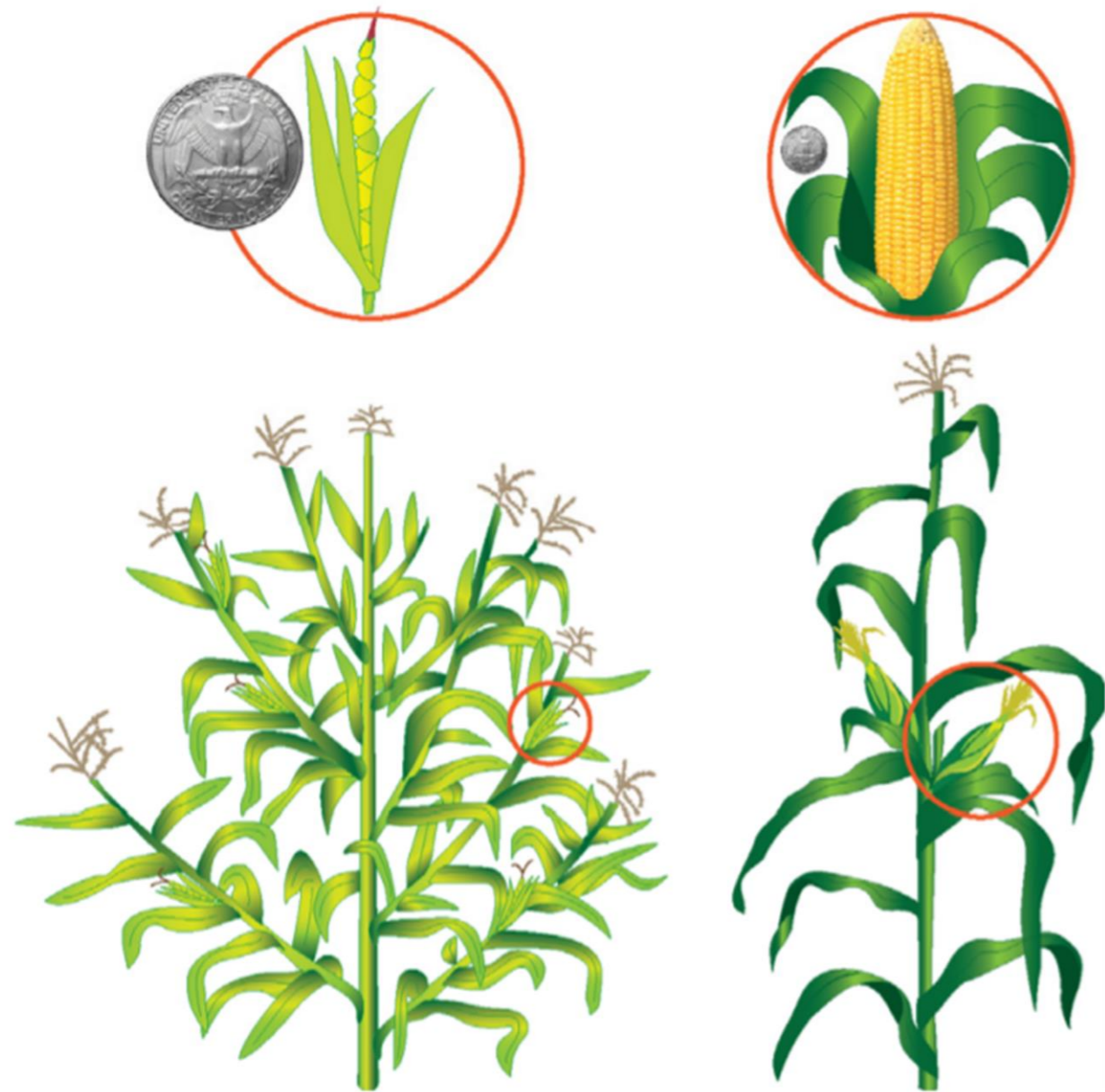
**Teosinte**  
(*Zea mays* subsp.  
*parviglumis*)



**Maize**  
(*Z. mays* subsp.  
*mays*)



# ●●●● Marcos importantes no desenvolvimento de OGMs

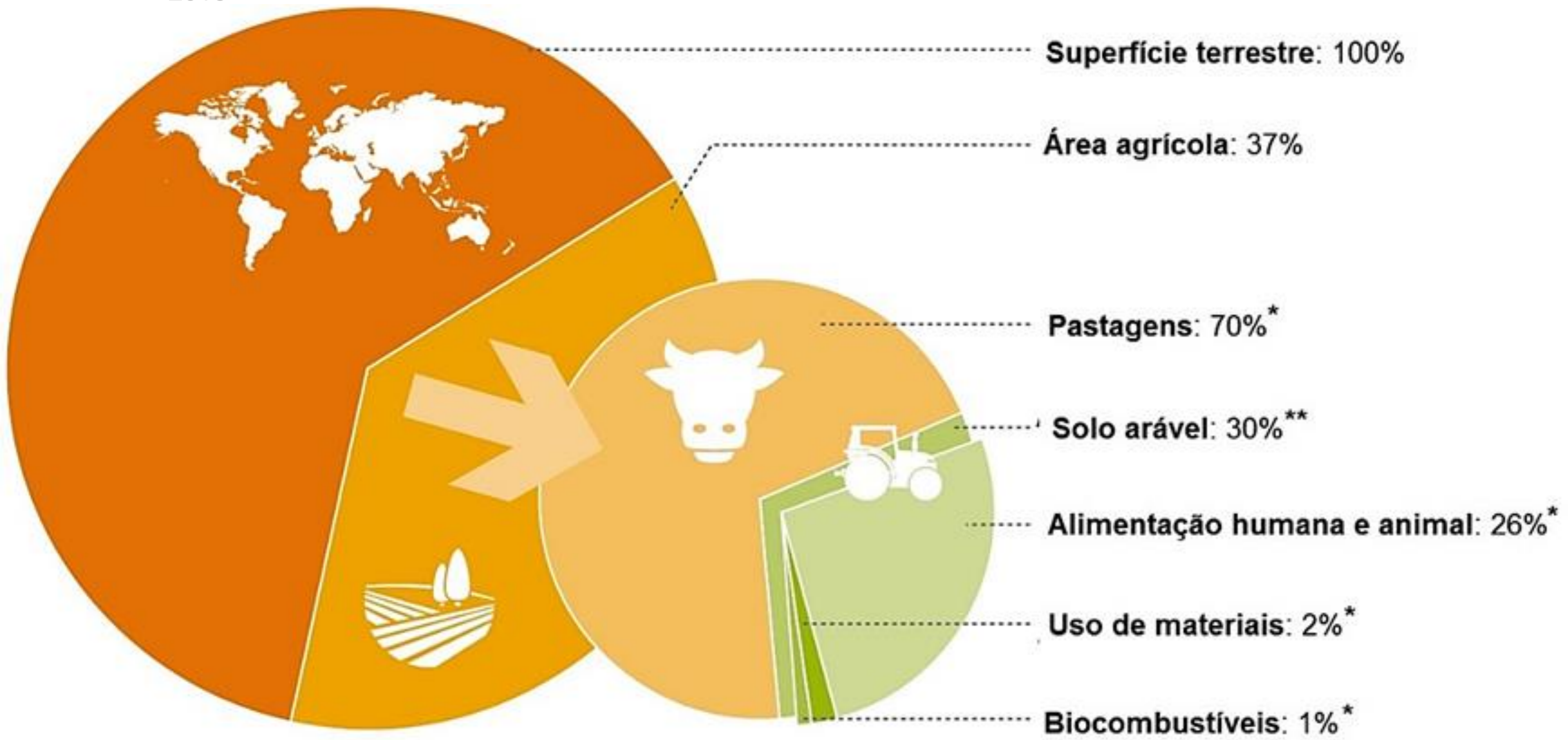


## ●●●● Como transferir o DNA?

- ▶ **Identificar o organismo com a característica desejada**
- ▶ **Isolar a sequencia genética que a codifica**
- ▶ **Inserir a sequencia no genoma da célula vegetal**
- ▶ **Permitir que a célula geneticamente modificada regenere uma planta**
- ▶ **Permitir que a planta propague**

# Área agrícola

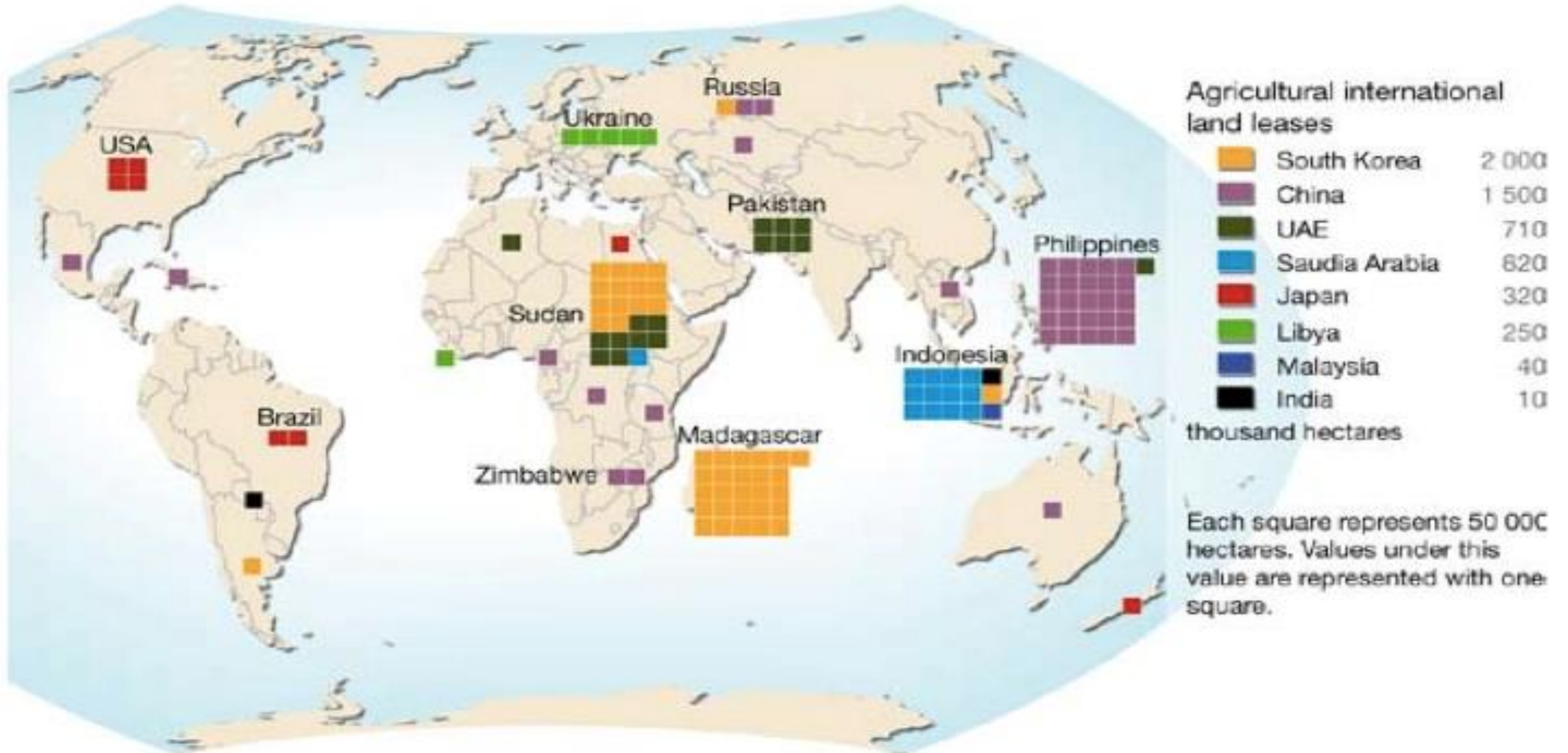
2016



\* em relação à área agrícola

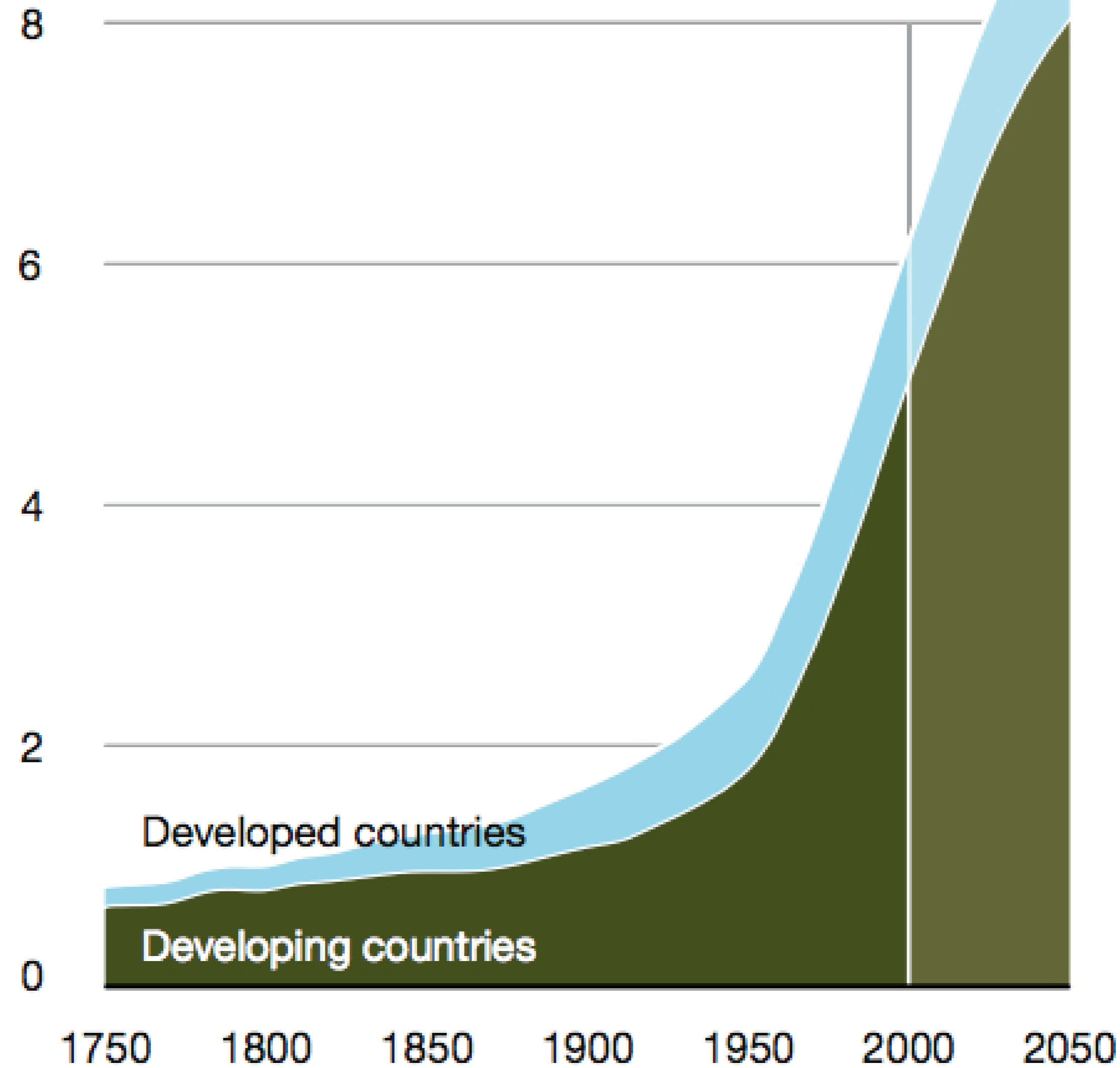
\*\* inclui aprox. 1% de solos em pousio

# Aluguer de área agrícola

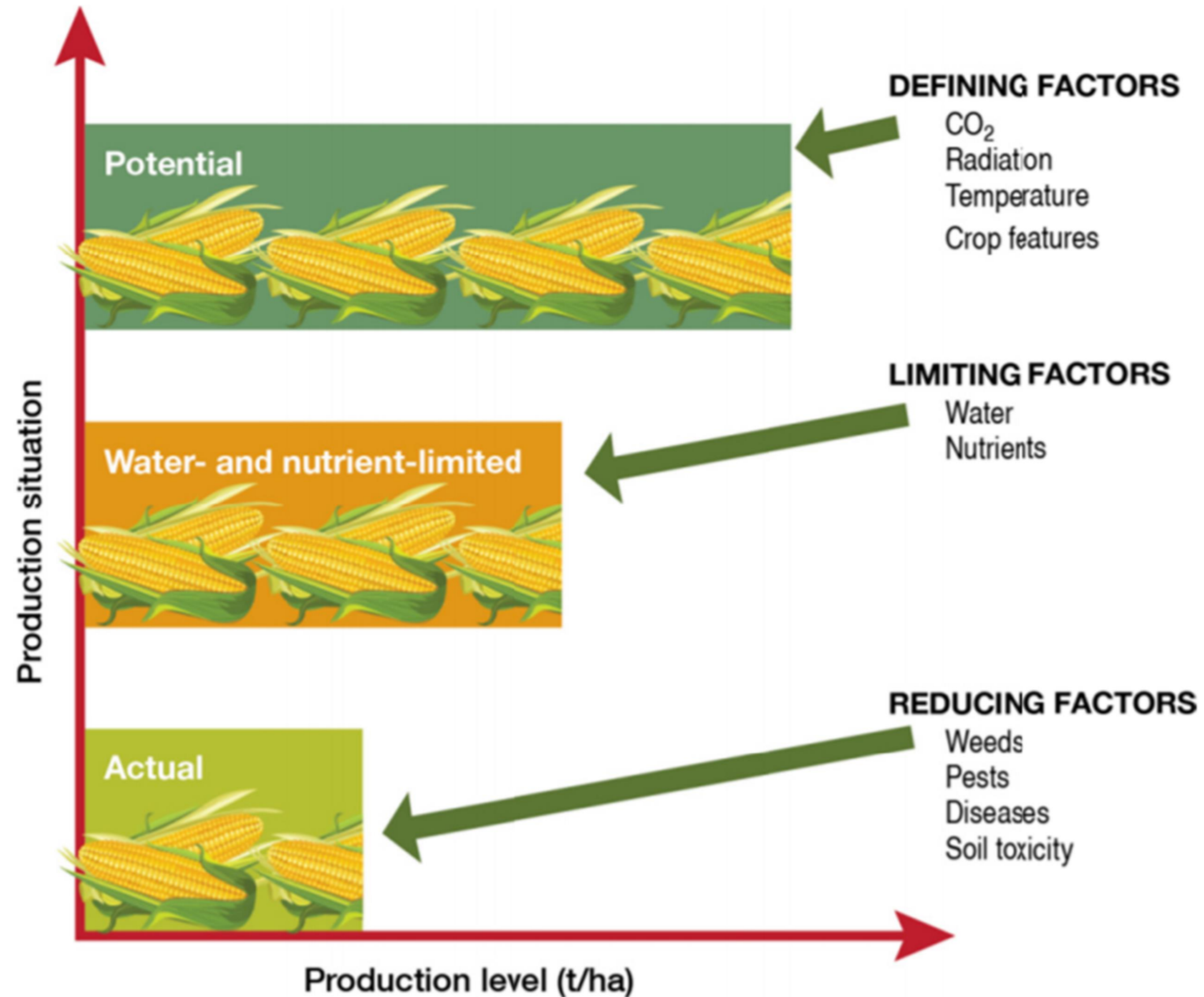


# ●●●●● Crescimento populacional

Global population, estimates and projections (billions)



# ●●●● Fatores que determinam produtividade potencial



- ★ **Reduzir a pressão ambiental de recursos**
  - ★ Culturas crescidas em terreno marginal
  - ★ Resistência à seca
  - ★ Resistência à salinidade
  - ★ Desenvolver alimentos que utilizem azoto ou outros nutrientes mais eficazmente
- ★ **Reduzir a utilização de pesticidas e herbicidas**
- ★ **Desenvolver plantas resistentes a pragas**
- ★ **Melhorar o valor nutritivo**

## *Estratégias*

- Nutrição comunitária
- Suplementação
- Fortificação
- Ajuda direta (alimentos)
- **Biofortificação**



## *Fortificação*

---

- Enriquecimento de alimentos **durante a colheita ou processamento** de forma a aumentar o conteúdo nutricional

*VS.*

## *Biofortificação*

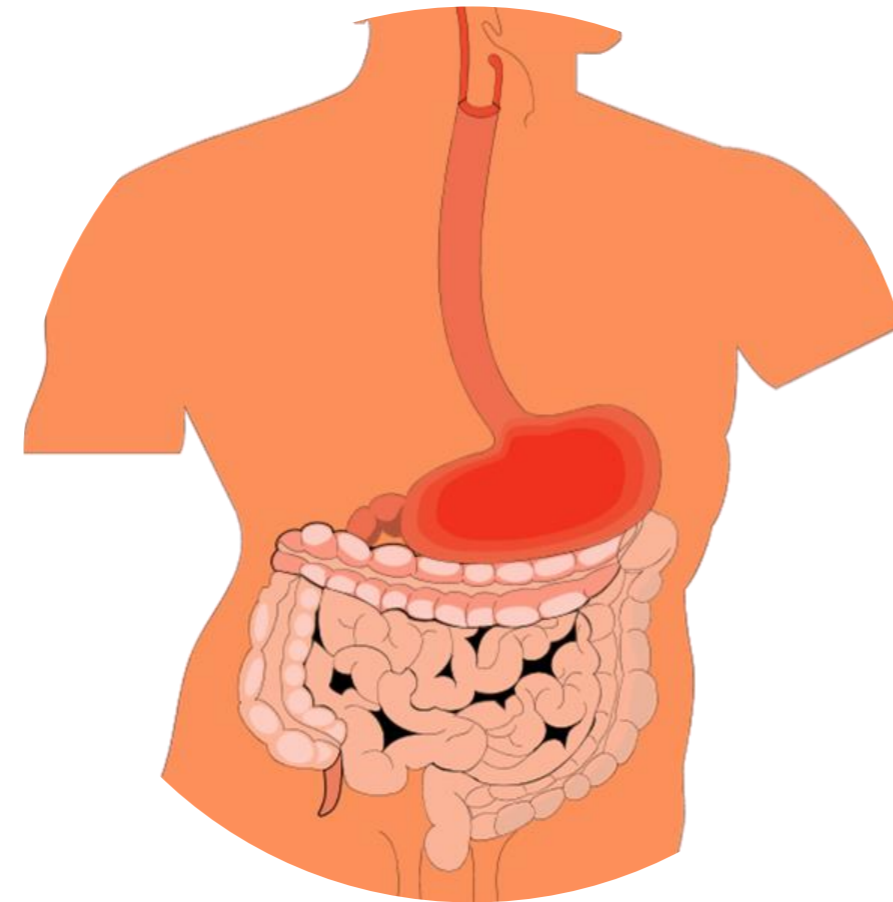
---

- Utilização de variedades melhoradas que têm a capacidade de **absorver, repartir, e/ou sintetizar** maiores níveis de nutrientes **durante o seu crescimento**, de forma a que os produtos colhidos tenham **conteúdos nutricionais mais elevados**.

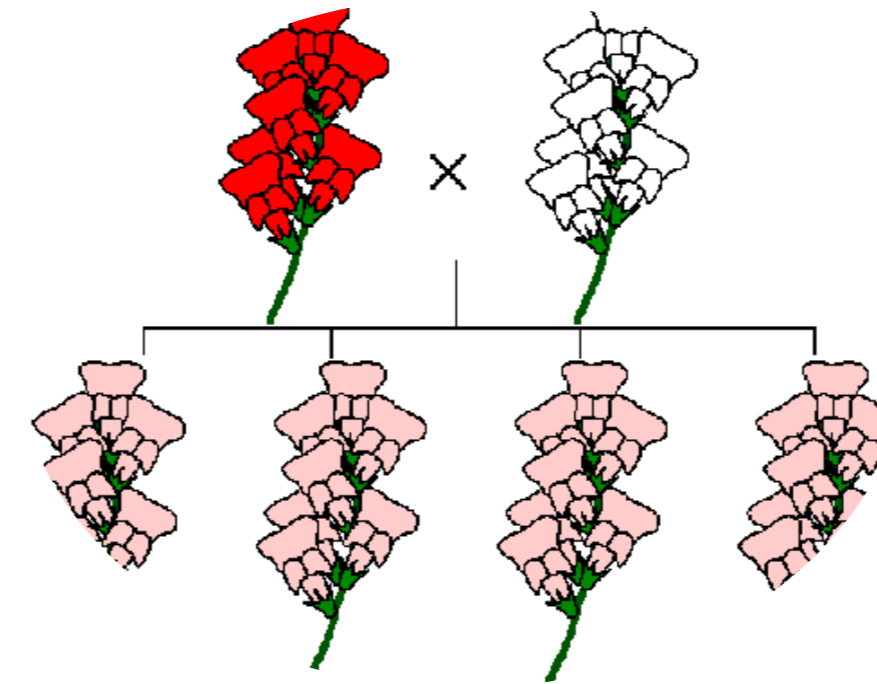
# Quais as principais estratégias?



Variação natural



Biodisponibilidade



Melhoramento convencional



Engenharia genética

## BIOFORTIFICAÇÃO

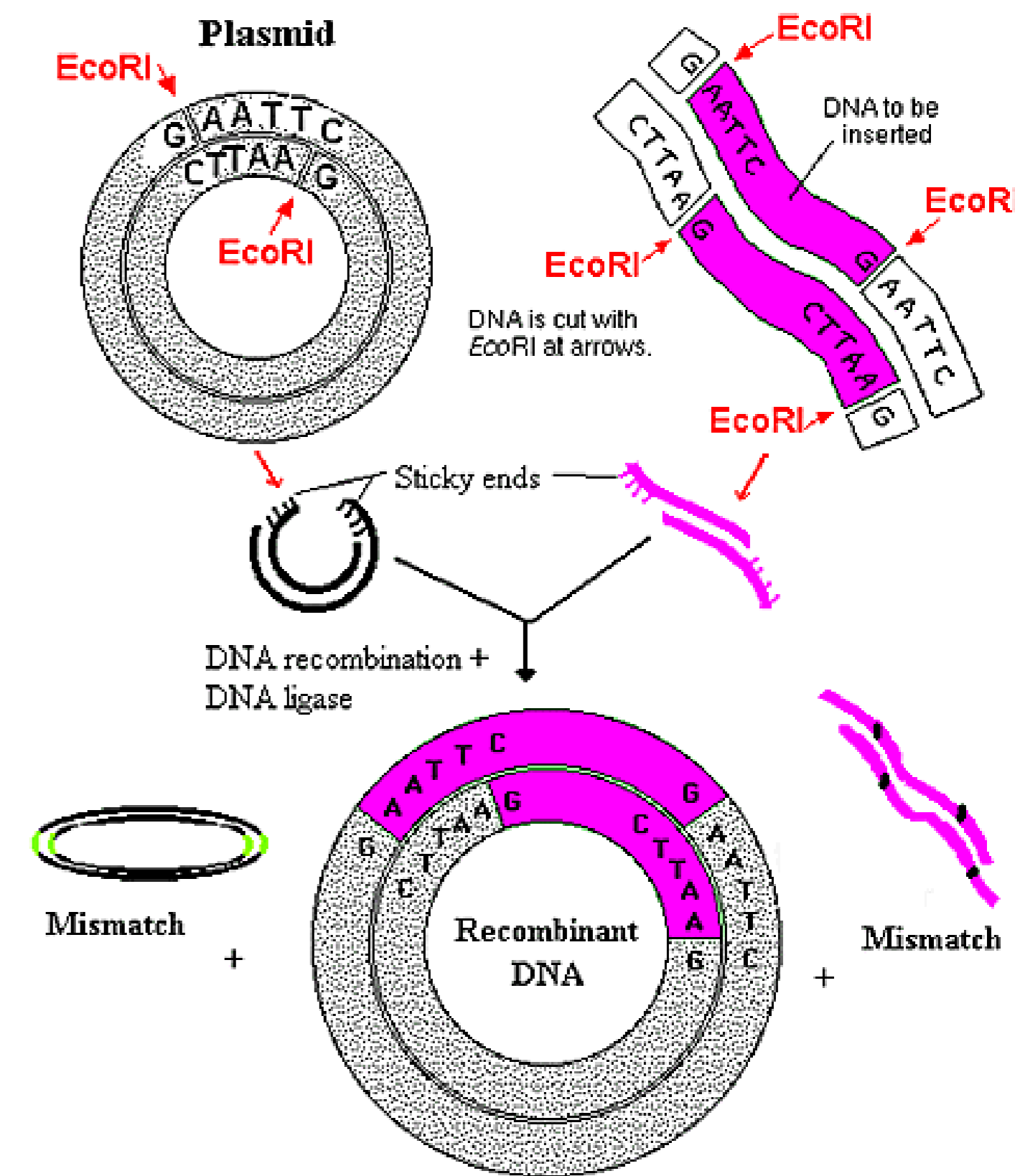
# ••••• Como transferir o DNA?

## \* Utilizamos um vetor para transportar o DNA

\* Biolística

\* *Agrobacterium tumefaciens*

\* *CRISPR, TALENs, and ZFNs*



## *Arroz*

---

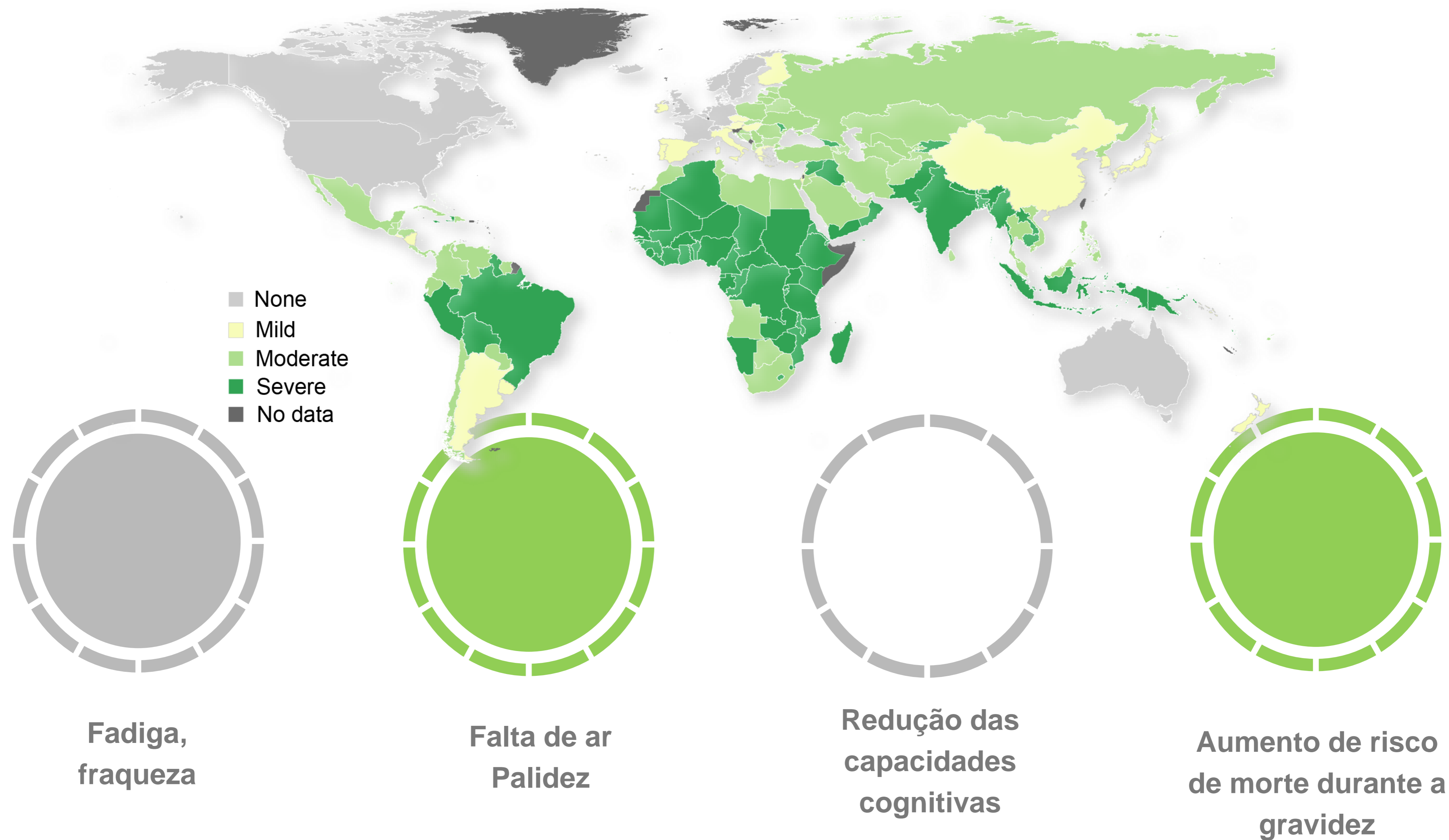
- 1) Arroz “prateado” (ferro)
- 2) Arroz dourado (betacaroteno)





# Arroz biofortificado com ferro

# Deficiência em ferro: 30% população mundial



# Quanto Fe queremos?

Doses recomendadas

<b>CROP</b>	<b>TARGET TISSUE</b>	<b>CONCENTRATION IN POPULAR VARIETIES (µg/g)</b>	<b>RECOMMENDED IRON LEVELS</b>
<b>WHEAT</b>	Whole grains	30	59 µg/g DW
<b>RICE</b>	Polished grains	2	15 µg/g DW
<b>BEANS</b>	Whole beans	50	107 µg/g DW
<b>PEARL MILLET</b>	Whole grains	47	88 µg/g DW
<b>MAIZE</b>	Whole kernels	30	60 µg/g DW
<b>SWEET POTATO</b>	Tuber	6	85 µg/g FW
<b>CASSAVA</b>	Roots	4	45 µg/g FW

# ●●●● Arroz (*Oryza sativa* L.)

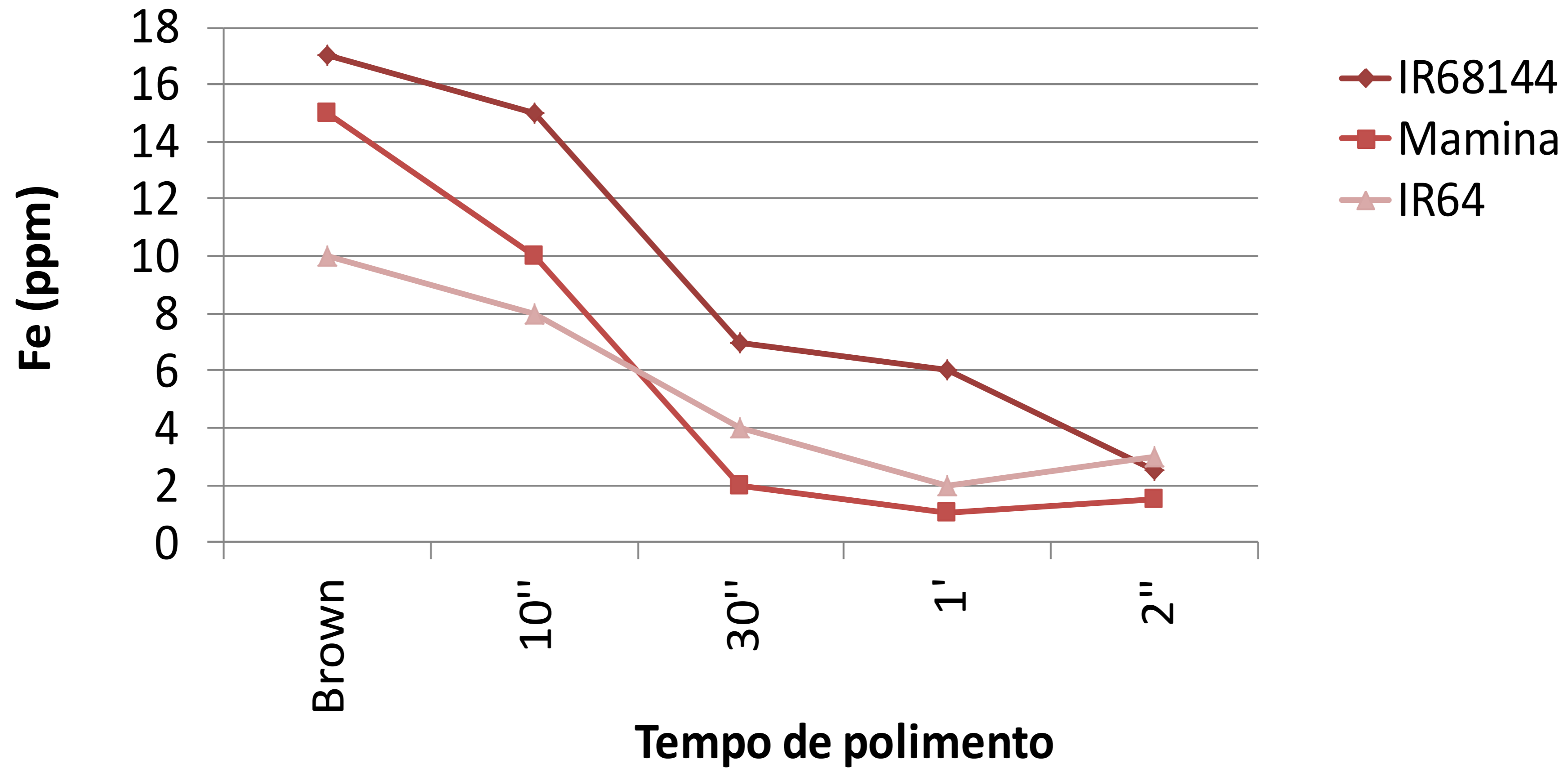


## *Arroz*

---

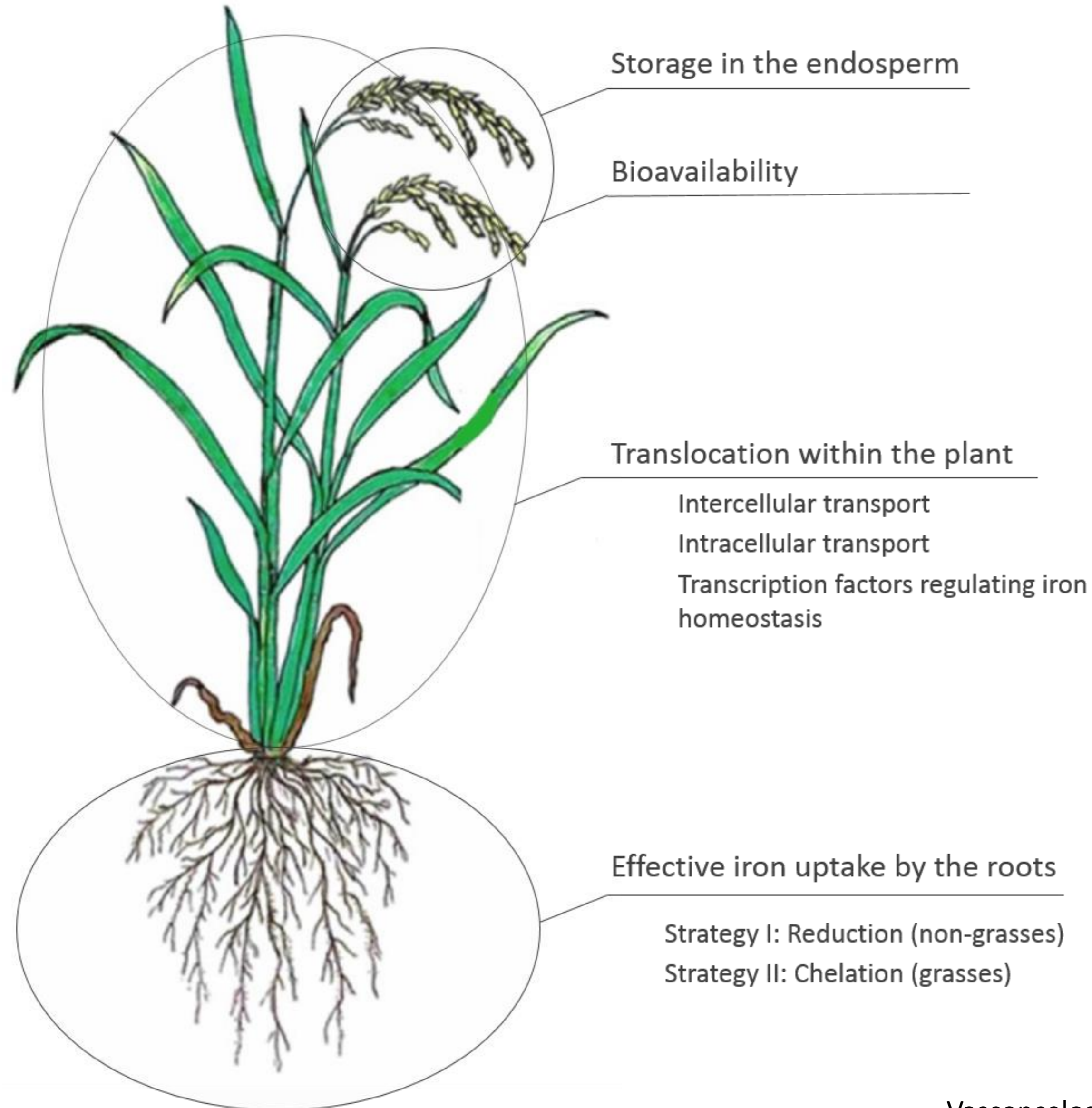
- Cresce em muitos tipos de habitat
- Alimento mundialmente mais consumido
- **Portugal:** um dos 5 produtores na Europa

## O grão de arroz é pobre em ferro

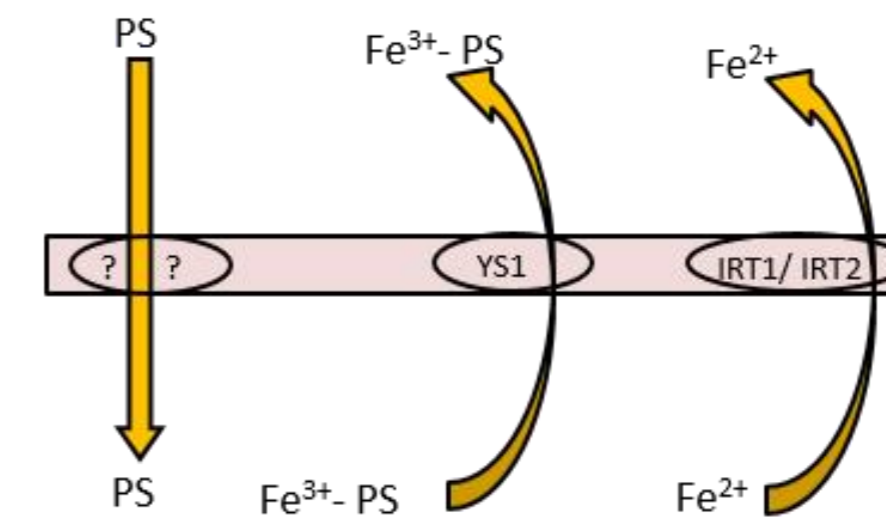
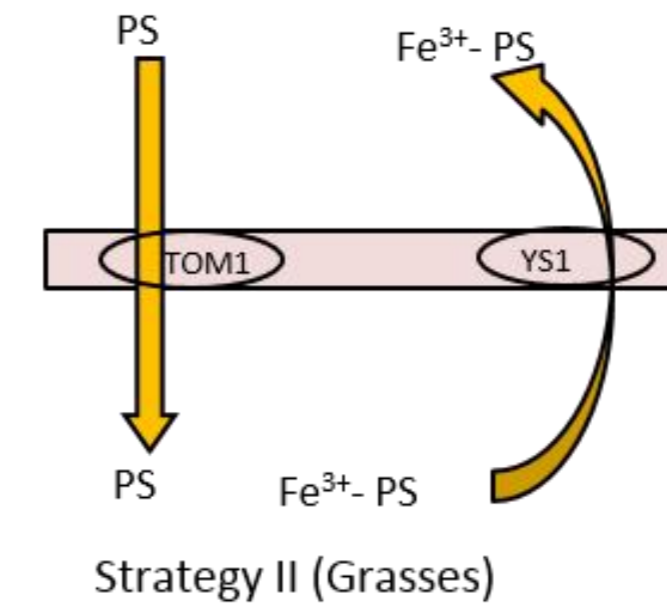
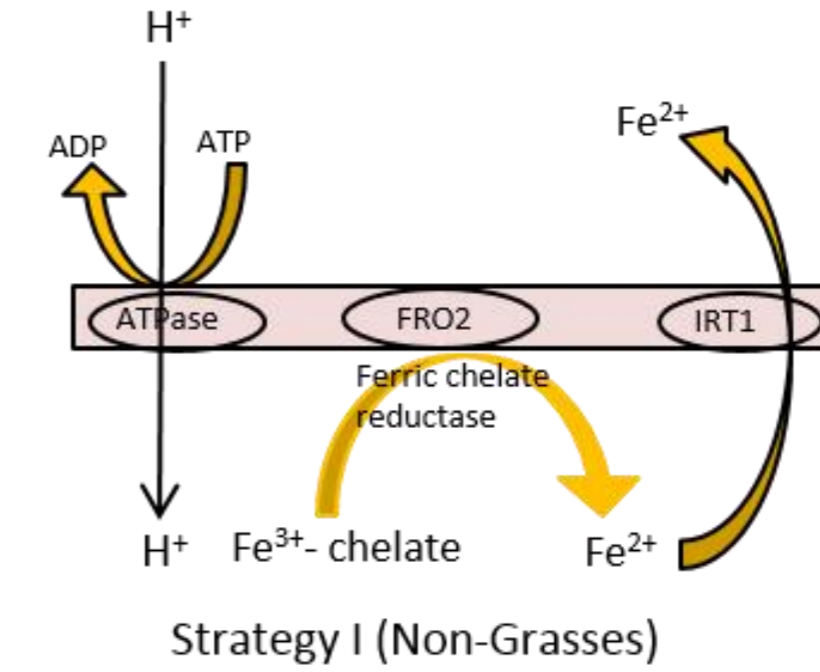


# ●●●●● Como biofortificar com Fe

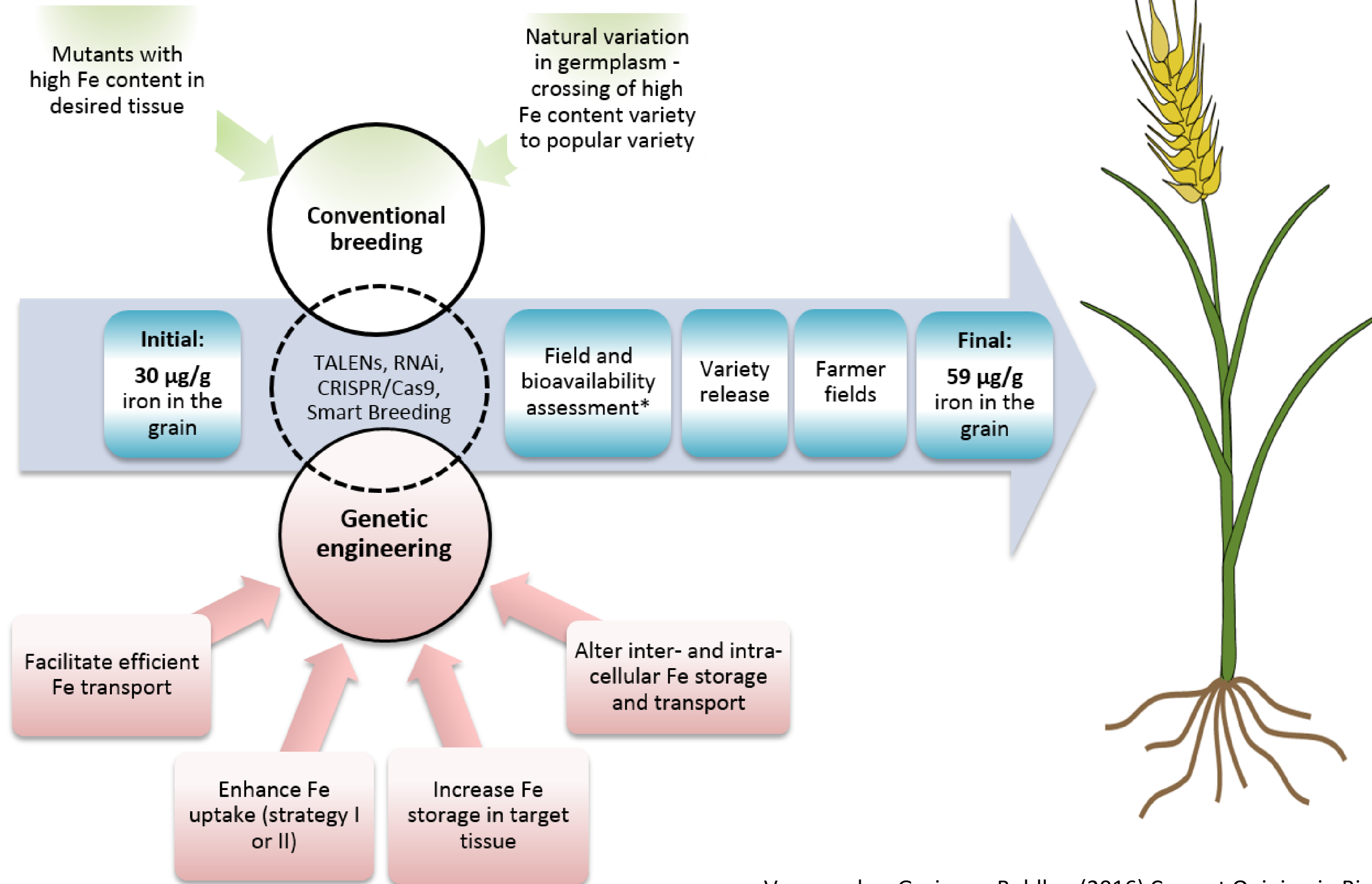
## Essential parameters for iron biofortification



## Iron uptake strategies



# As diferentes abordagens



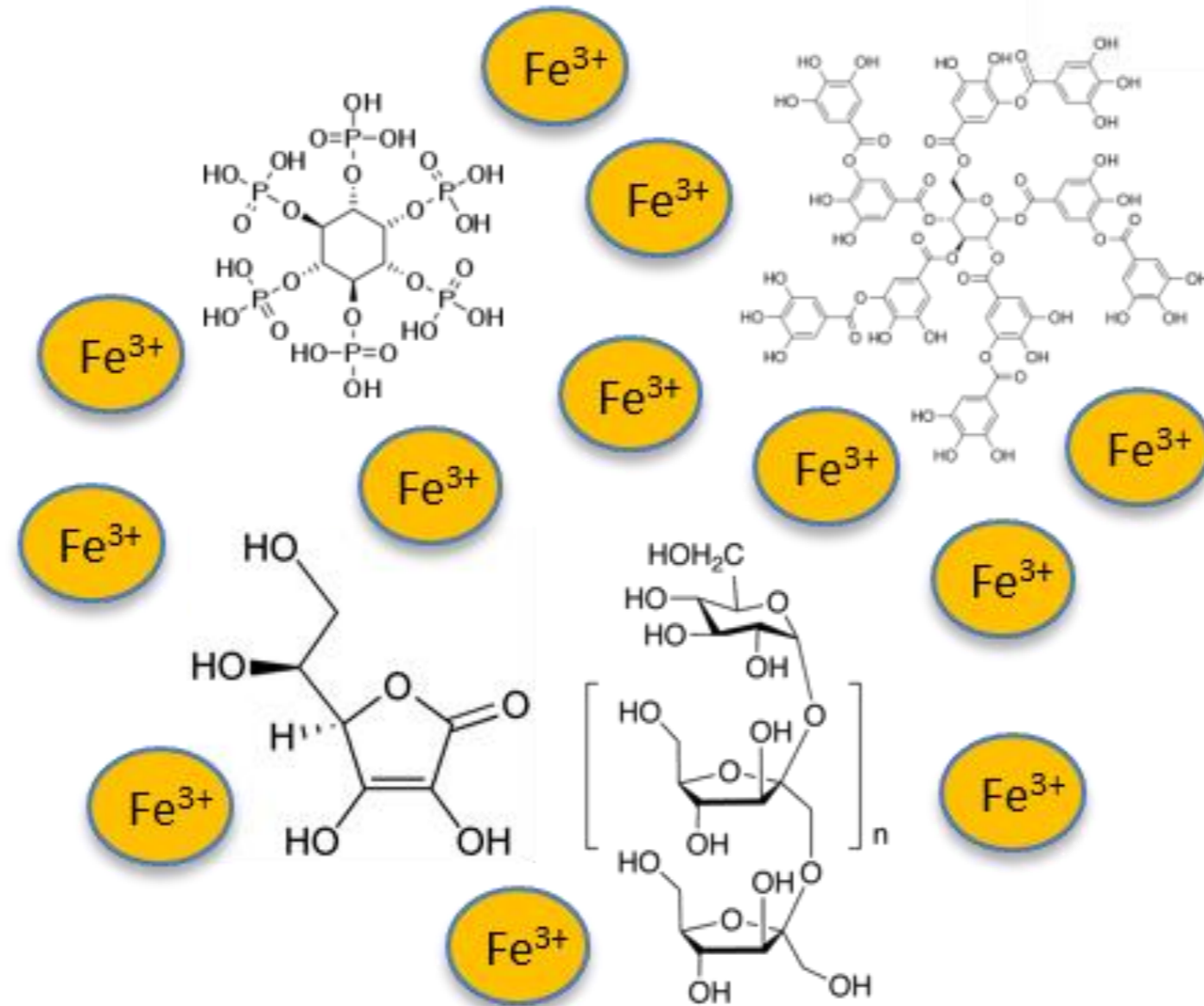
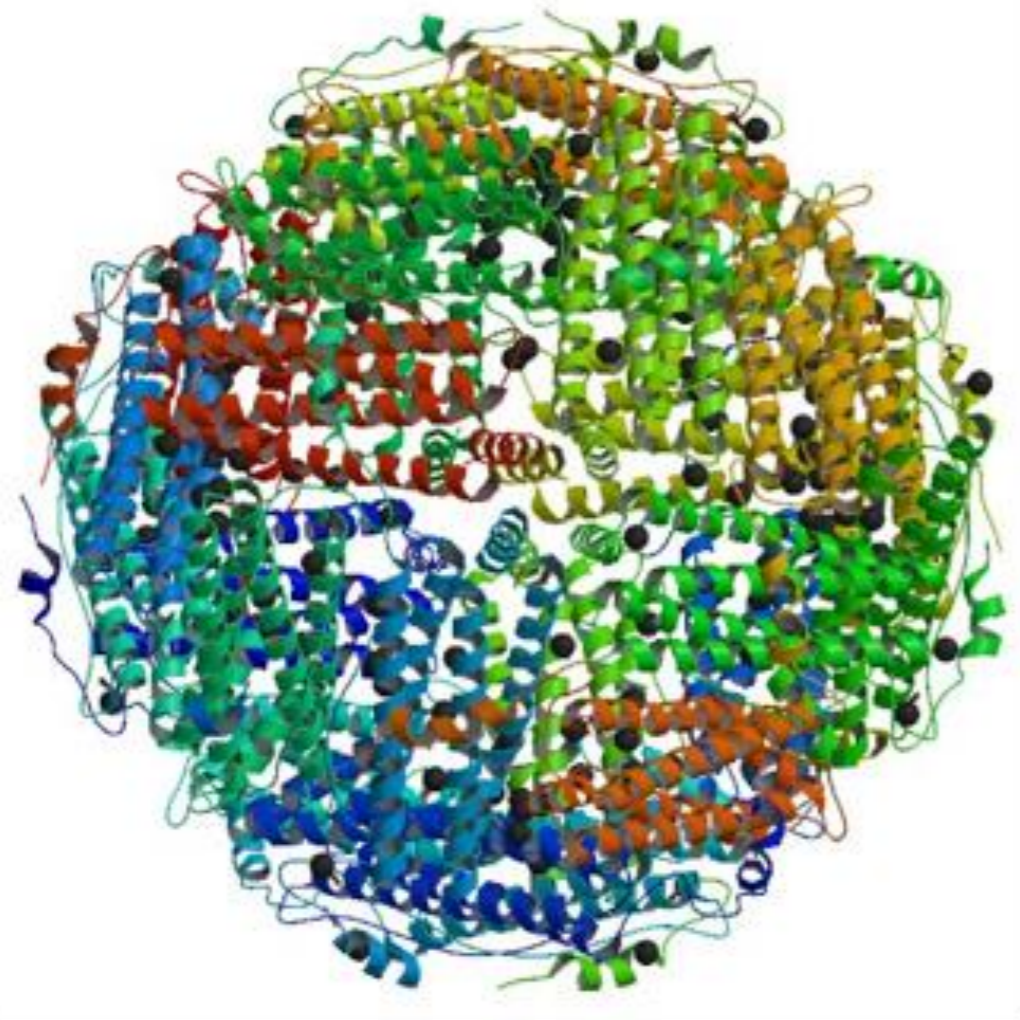
# ●●●● Aumentar a biodisponibilidade



Phytic acid  
Tannic acid



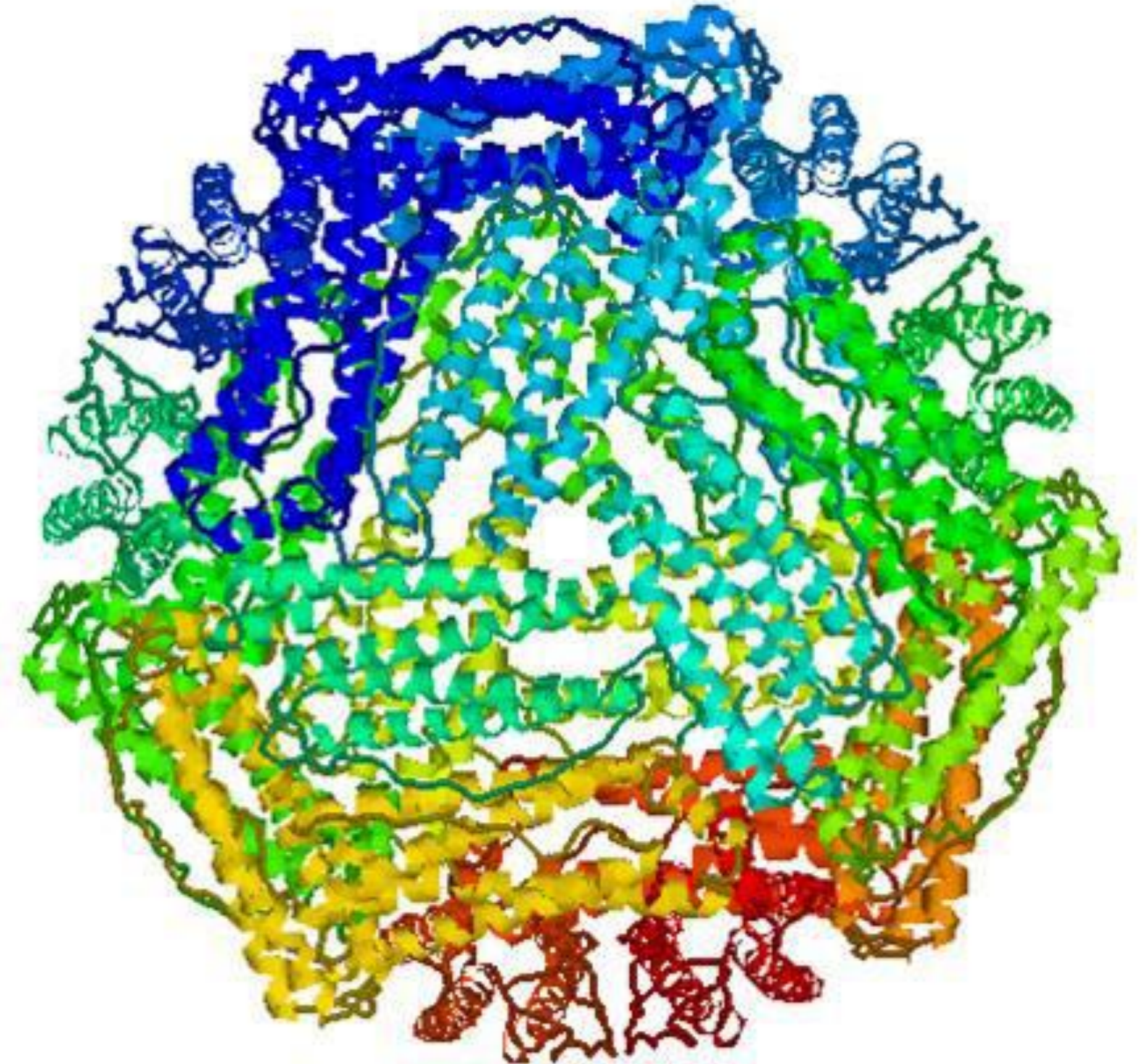
Inulin  
Vitamin C



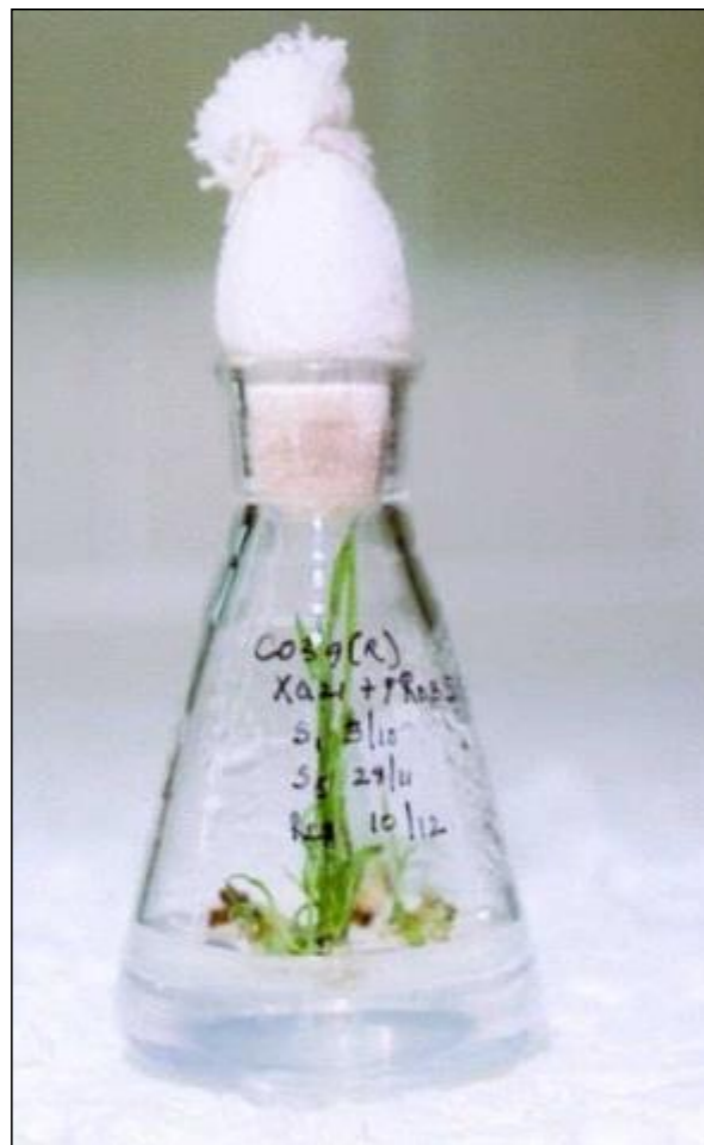
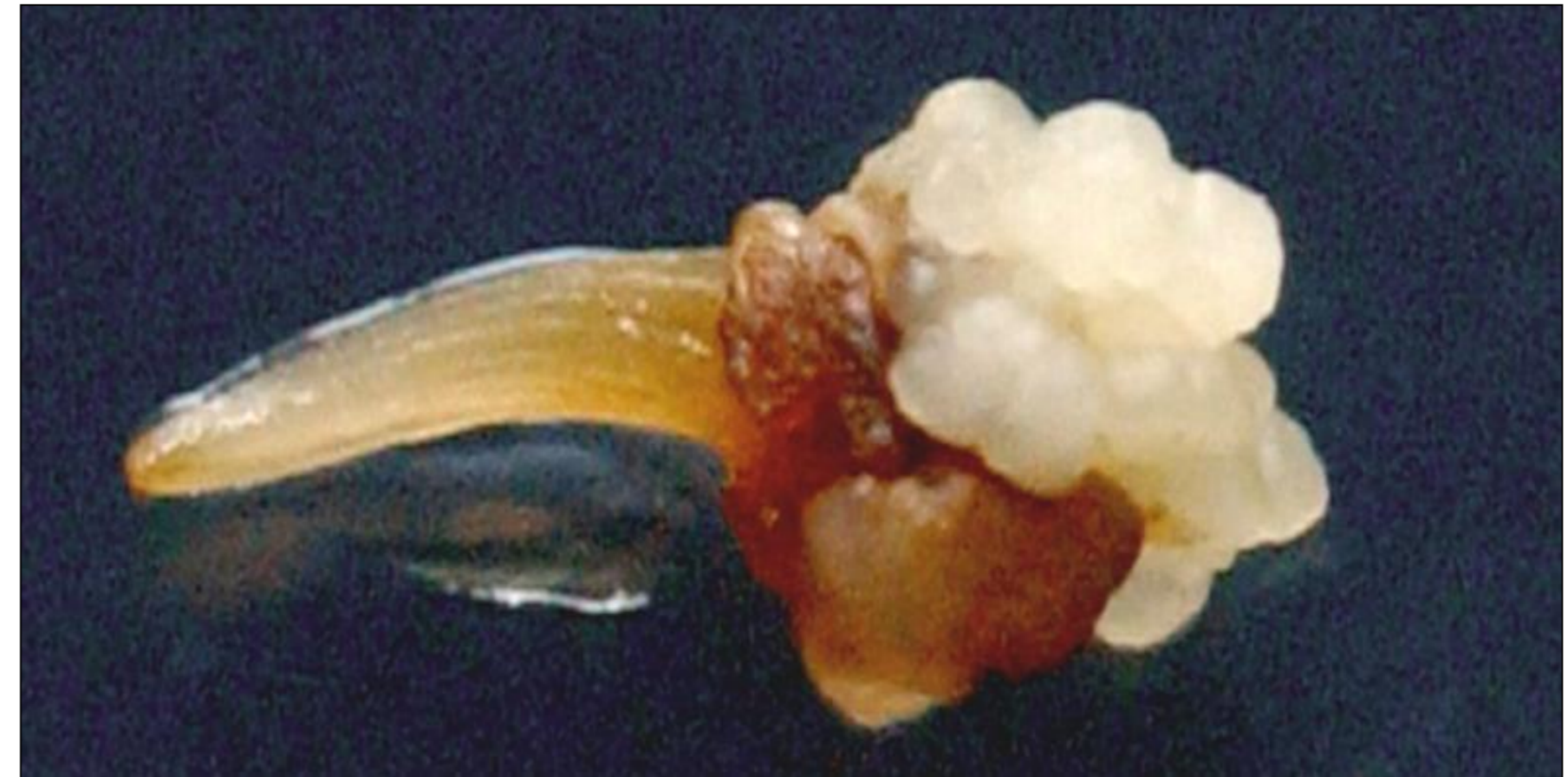
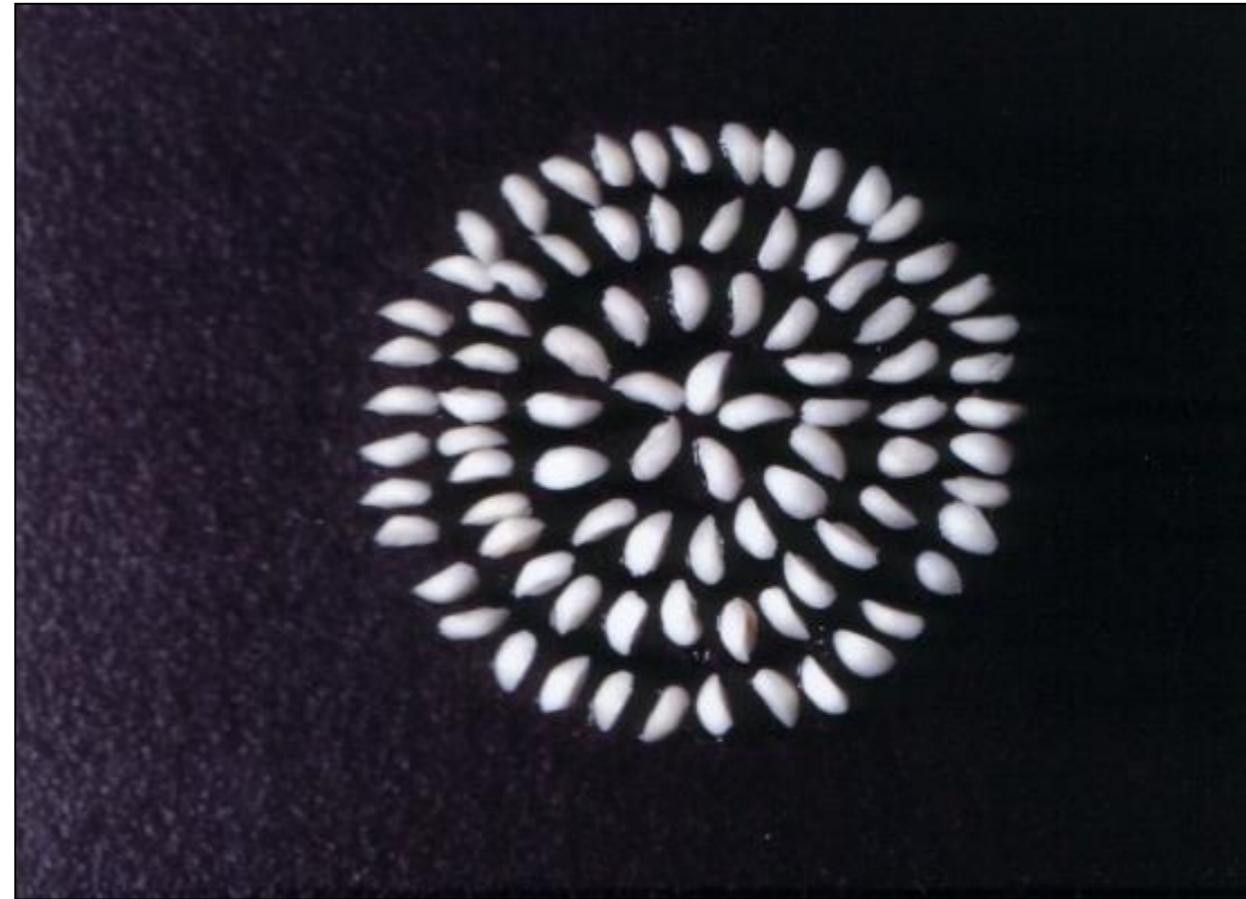
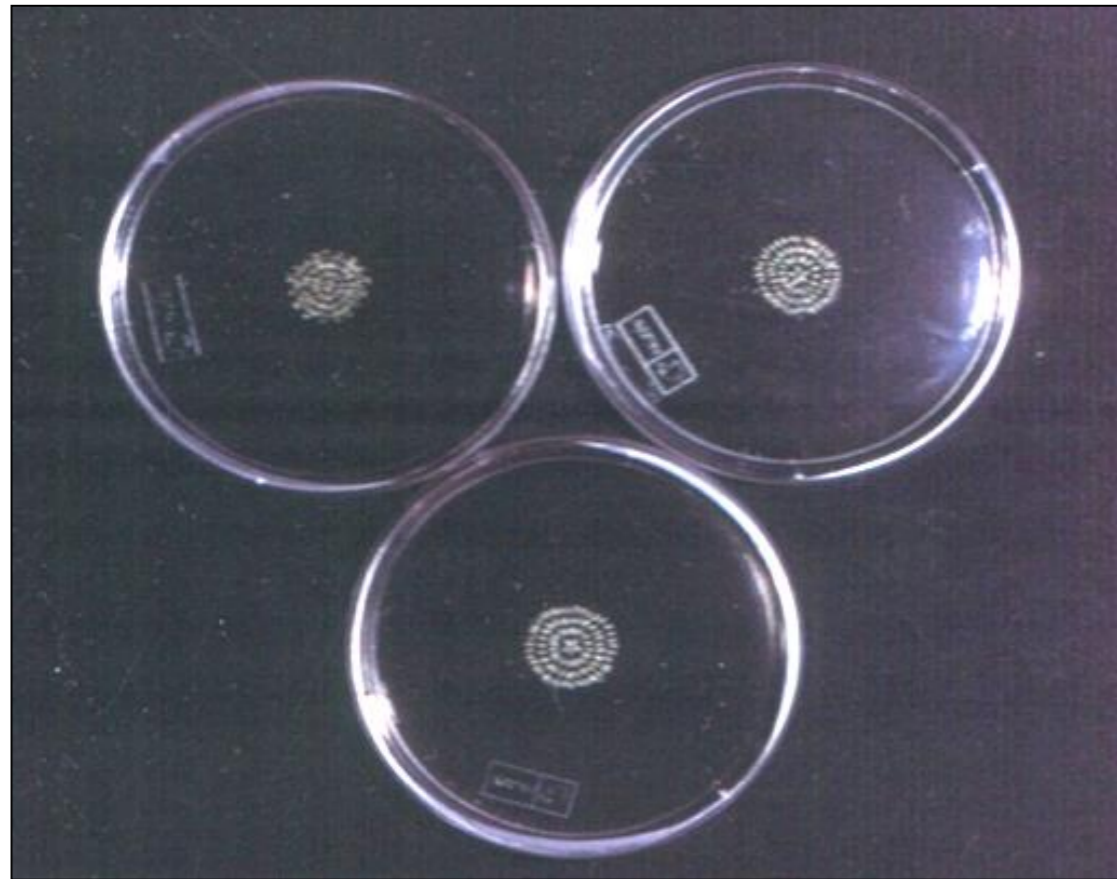
## *Introdução do gene da ferritina*

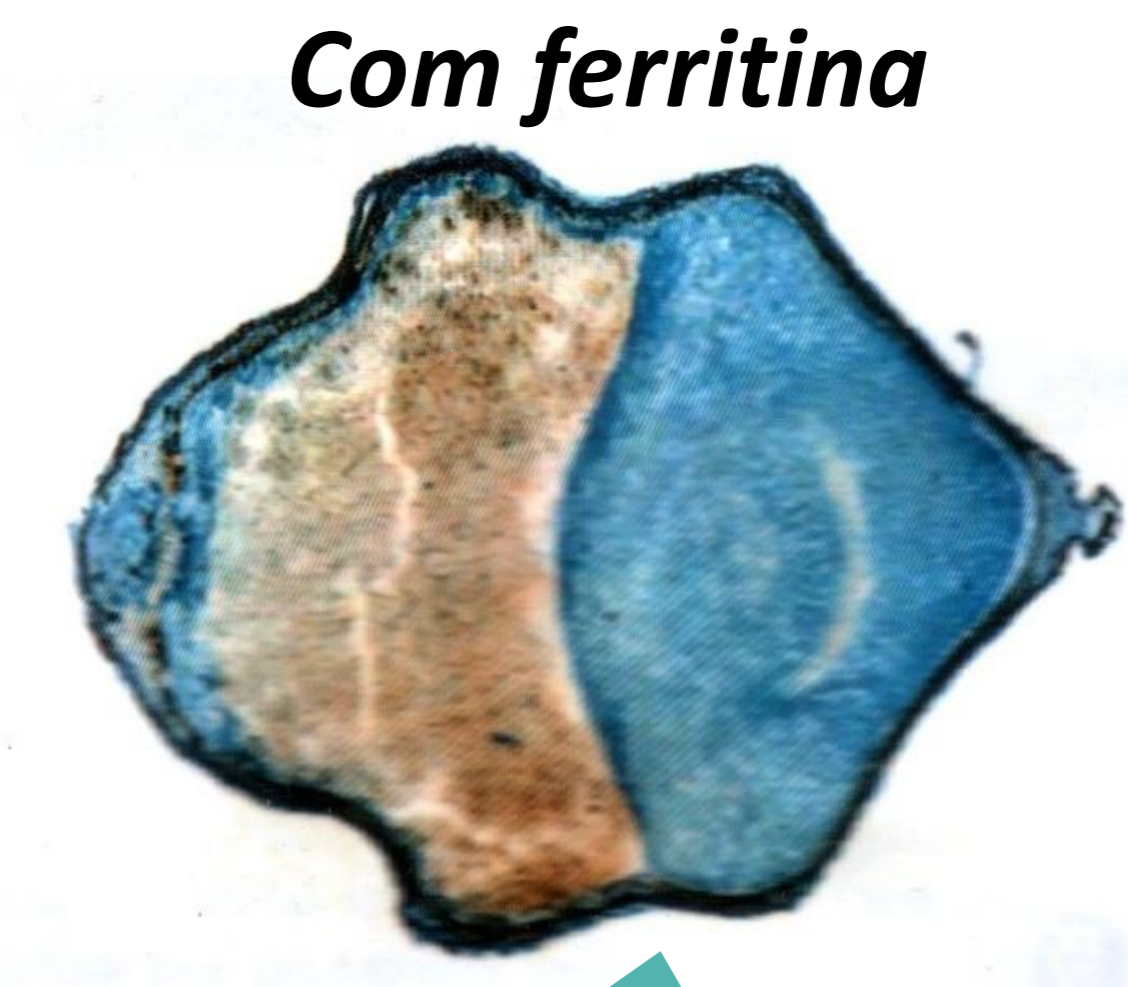
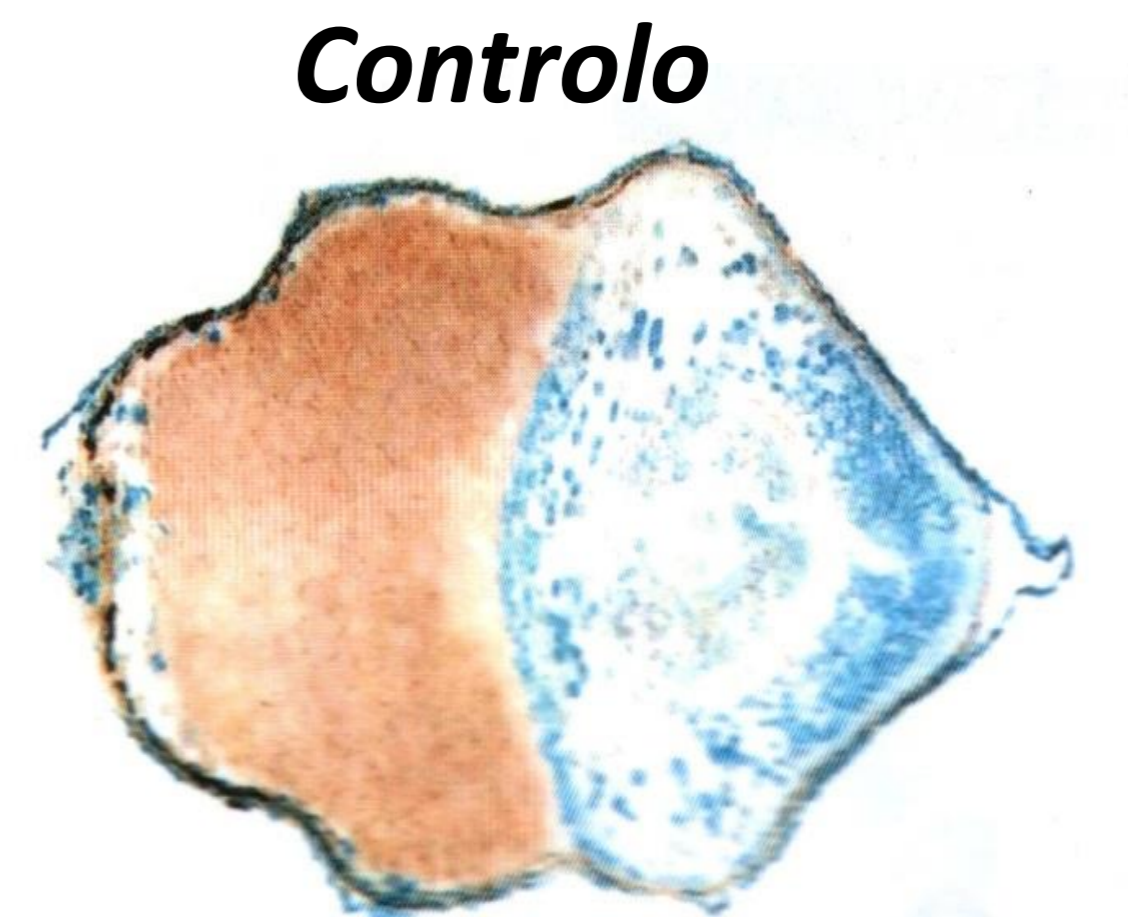
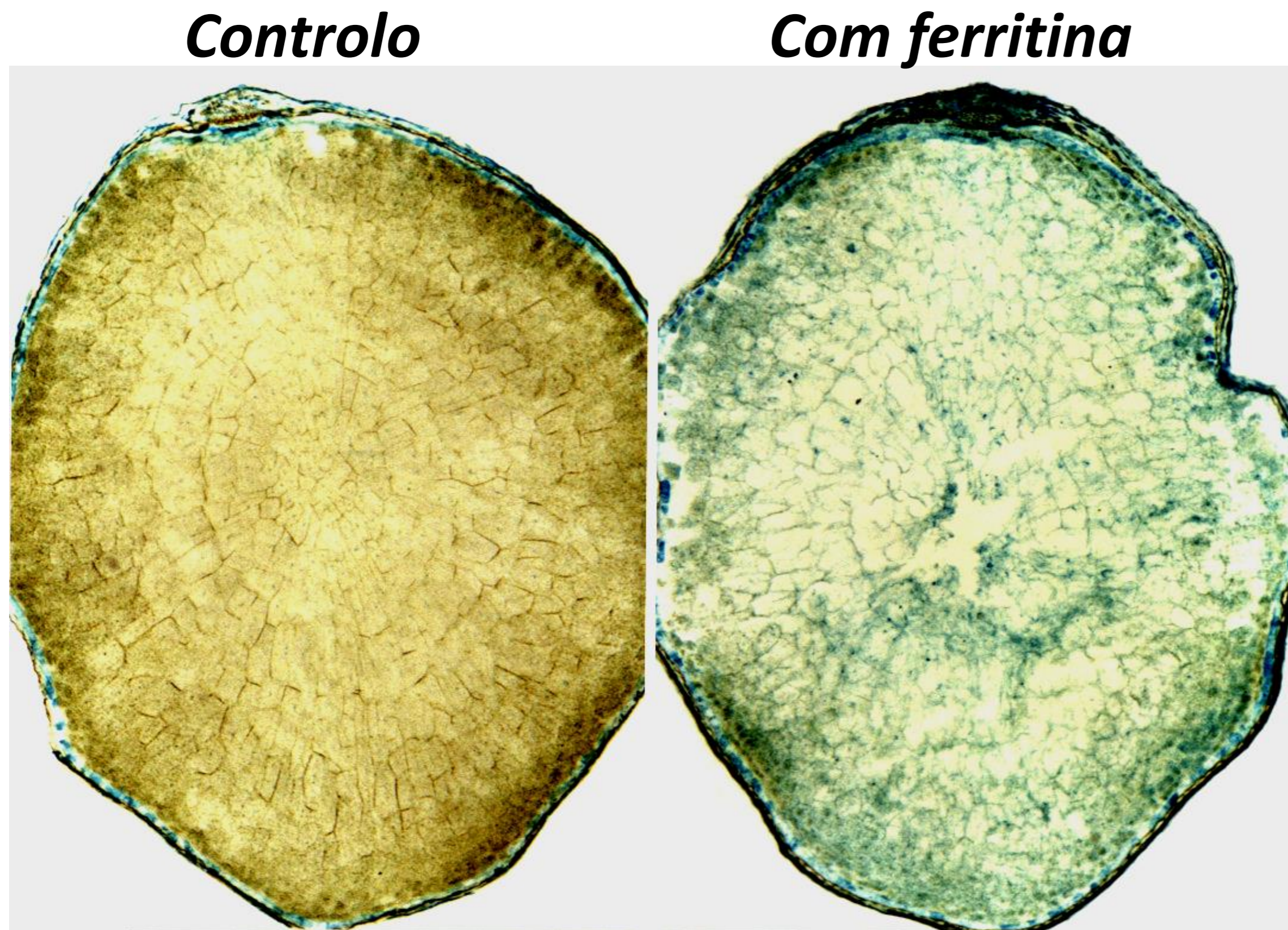
---

- Variedade
- Transformação
- Homozigotia
- ICP



# ●●●● Transformação genética





Azul localiza o ferro

- Arroz transgênico 3.7X mais rico em ferro e zinco, mesmo depois de polimento comercial dos grãos
- O ferro neste arroz é biodisponível
- Este material pode colmatar deficiências nutricionais graves, especialmente em países em desenvolvimento- e.g. Moçambique



**Table 1 | Summary of different approaches undertaken for mineral biofortification of rice.**

Gene	Promoter	Cultivar	Fold increase in Fe/Zn	Reference
<i>AtNAS1+</i> , <i>Pvferritin+</i> , <i>Afphytase</i>	CaMV 35S, Glb-1, Glb-1	<i>Japonica</i> cv. Taipei 309	6.3/1.6 <sup>1</sup>	Wirth et al. (2009)
<i>HvNAS1</i>	Actin	<i>Japonica</i> cv. Tsukinohikari	3.4/2.3 <sup>2</sup>	Masuda et al. (2009)
<i>HvNAS1</i> , <i>HvNAS1+HvNAAT</i> , <i>IDS3</i>	Genomic fragments	<i>Japonica</i> cv. Tsukinohikari	1.0/1.0 <sup>2</sup> , 1.1/1.1, 1.4/1.3	Masuda et al. (2008)
<i>OsNAS1</i> , <i>OsNAS2</i> , <i>OsNAS3</i>	CaMV 35S	<i>Japonica</i> cv. Nipponbare	2.2/1.4, 4.2/2.2, 2.2/1.4	Johnson et al. (2011)
<i>OsNAS2</i>	Activation tagging	<i>Japonica</i> cv. Dongjin	3/2.7	Lee et al. (2011, 2012b)
<i>OsNAS3</i>	Activation tagging	<i>Japonica</i> cv. Dongjin	/2.2	Lee et al. (2009b)
<i>OsNAS1</i>	GluB1	<i>Japonica</i> cv. Xiushui 110	1.0/1.3	Zheng et al. (2010)
<i>SoyferH-1</i>	Glu-B1	<i>Japonica</i> cv. Kitaake	3.0	Goto et al. (1999)
<i>PvFerritin+ rgMT</i>	Glb-1	<i>Japonica</i> cv. Taipei 309	2.0 <sup>3</sup>	Lucca et al. (2001)
<i>SoyFer</i>	Glu-B1	<i>Indica</i> cv. IR68144	3.7/1.4	Vasconcelos et al. (2003)
<i>SoyFer</i>	Glu-B1; Glb-1	<i>Japonica</i> cv. Kitaake	3.0/1.1	Qu et al. (2005)
<i>OsFer2</i>	<i>OsGluA2</i>	Basmati rice ( <i>Indica</i> cv. Pusa-Sugandh III)	2.1/1.4	Paul et al. (2012)
<i>TOM1</i>	CaMV 35S	<i>Japonica</i> cv. Tsukinohikari	1.2/1.6	Nozoye et al. (2011)
<i>OsYSL2</i>	<i>OsSUT1</i>	<i>Japonica</i> cv. Tsukinohikari	4.4	Ishimaru et al. (2010)
<i>OsIRT1</i>	Ubi	<i>Japonica</i> cv. Dongjin	1.1/1.1 <sup>3</sup>	Lee and An (2009)
<i>OsYSL2+</i> , <i>SoyFerH2+</i> , <i>HvNAS1</i>	<i>OsSUT1</i> , Glb-1, Glb-1, Glu-B1, Act	<i>Japonica</i> cv. Tsukinohikari	6 or 4 <sup>4</sup> /1.6	Masuda et al. (2012)

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Biofortified indica rice attains iron and zinc nutrition dietary targets in the field

Received: 11 September 2015

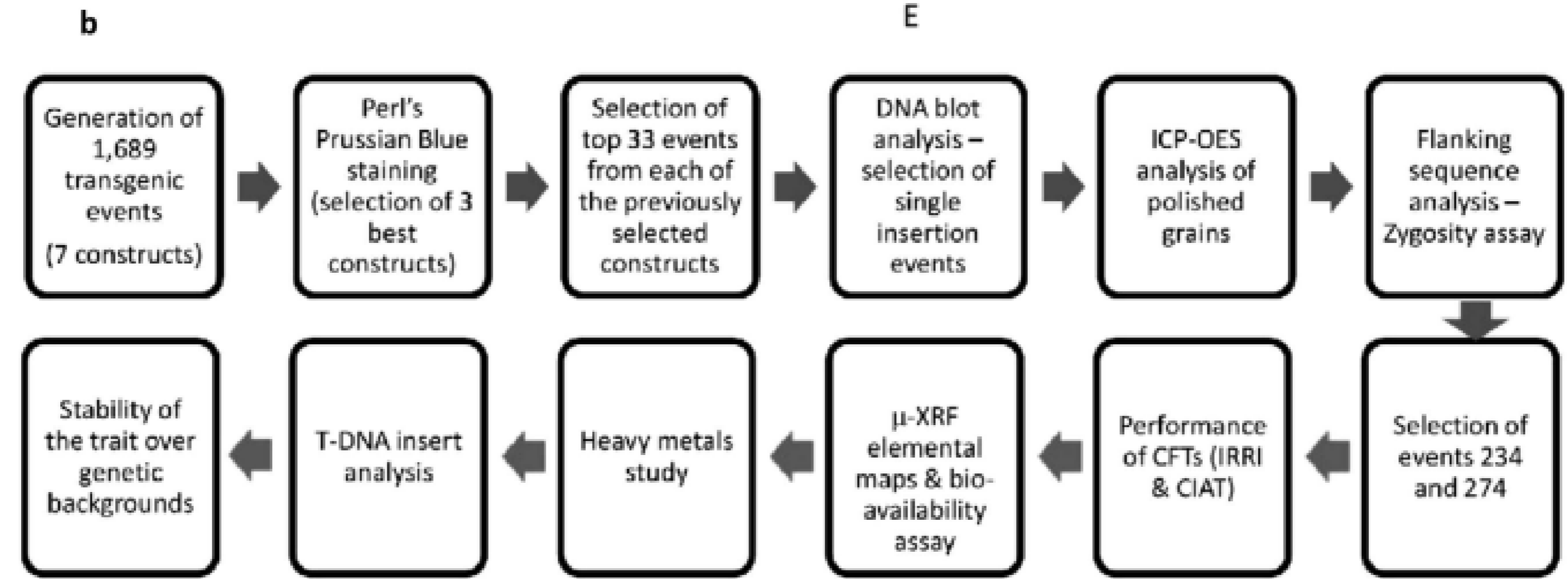
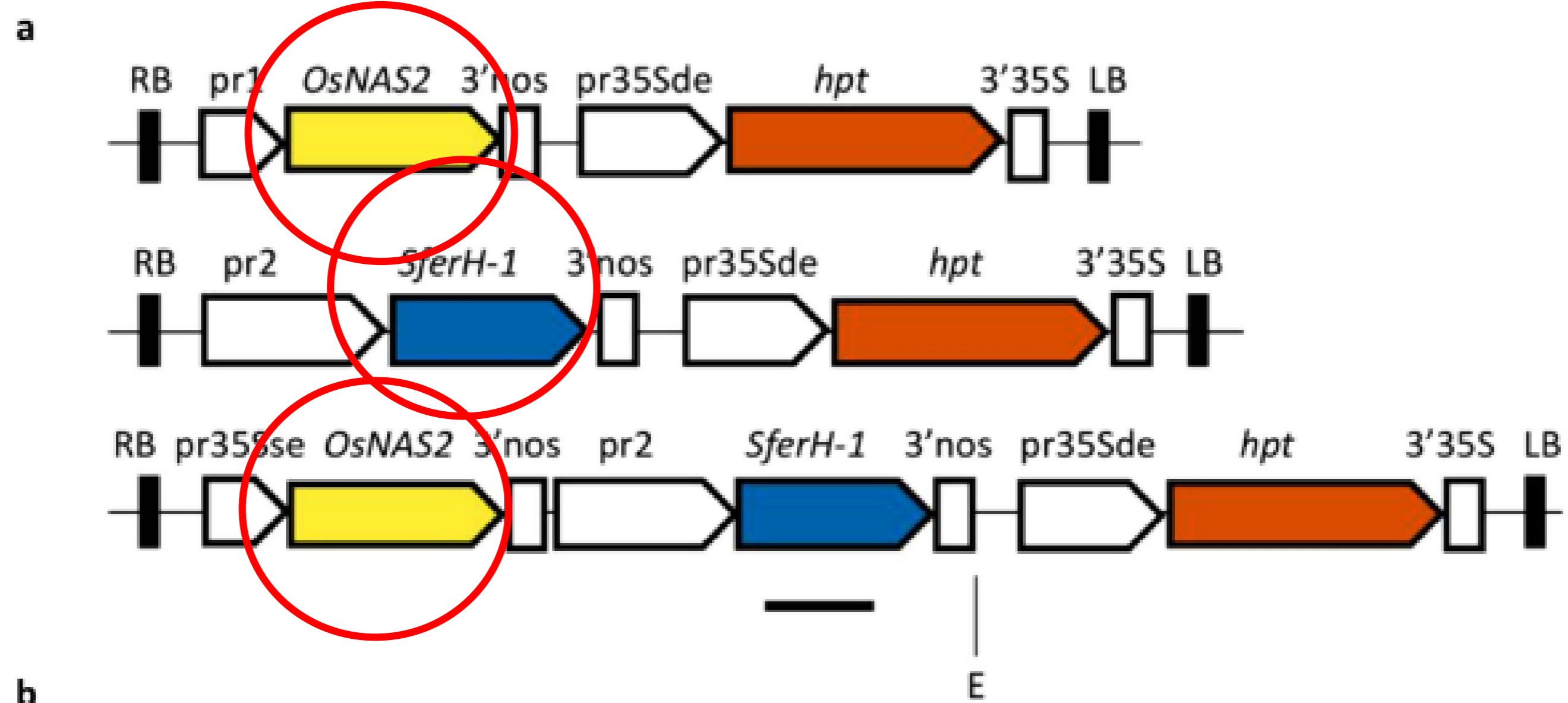
Accepted: 07 December 2015

Published: 25 January 2016

Kurniawan R. Trijatmiko<sup>1,10</sup>, Conrado Dueñas<sup>1</sup>, Nikolaos Tsakirpaloglou<sup>1</sup>, Lina Torrizo<sup>1</sup>, Felichi Mae Arines<sup>1</sup>, Cheryl Adeva<sup>1</sup>, Jeanette Balindong<sup>1</sup>, Norman Oliva<sup>1</sup>, Maria V. Sapasap<sup>1</sup>, Jaime Borrero<sup>2</sup>, Jessica Rey<sup>1</sup>, Perigio Francisco<sup>1</sup>, Andy Nelson<sup>3,4</sup>, Hiromi Nakanishi<sup>5</sup>, Enzo Lombi<sup>6</sup>, Elad Tako<sup>7</sup>, Raymond P. Glahn<sup>7</sup>, James Stangoulis<sup>8</sup>, Prabhjit Chadha-Mohanty<sup>1</sup>, Alexander A. T. Johnson<sup>9</sup>, Joe Tohme<sup>2</sup>, Gerard Barry<sup>1</sup> & Inez H. Slamet-Loedin<sup>1,11</sup>

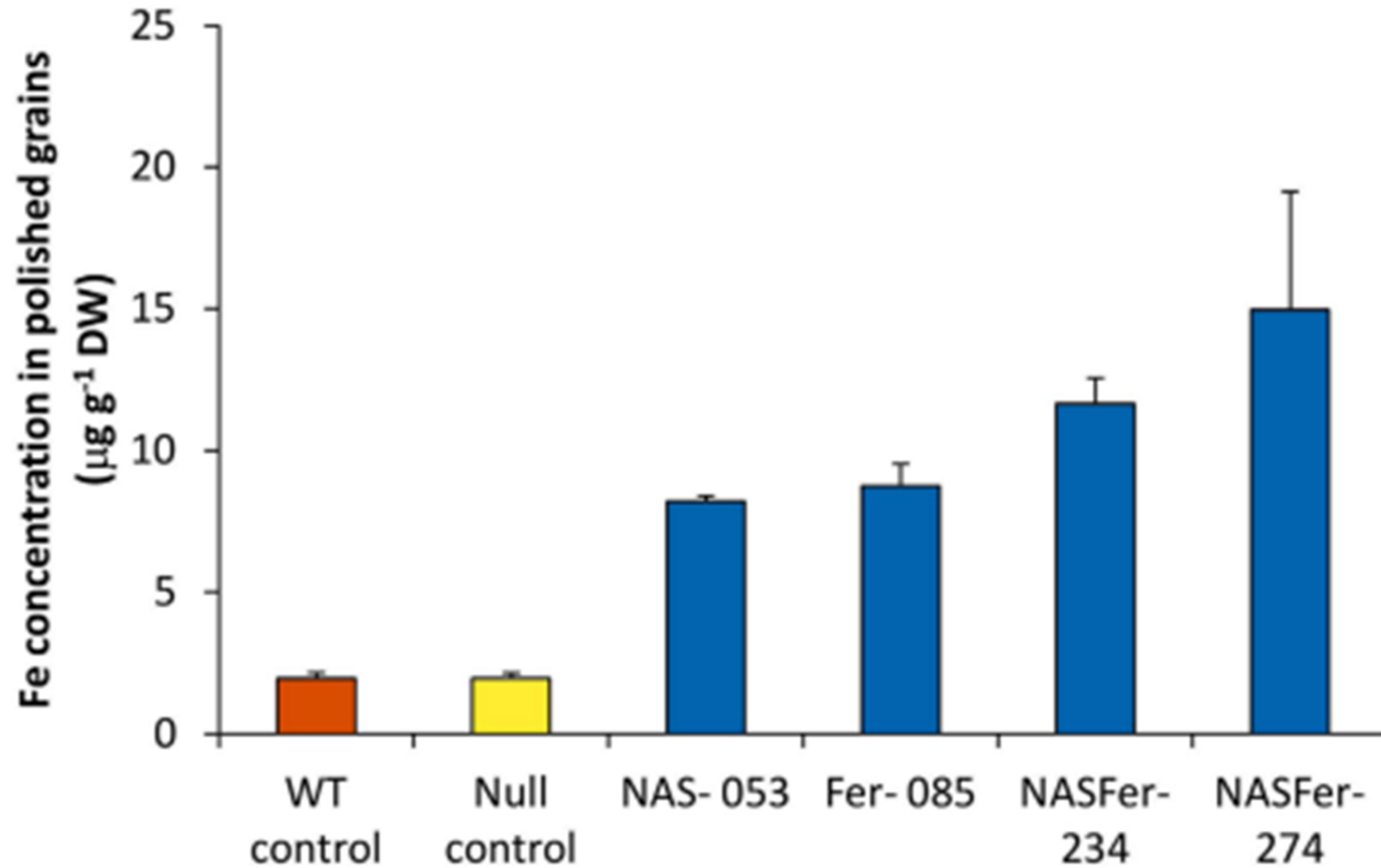
# Os últimos trabalhos

Trijatmiko et al (2016) Nature Sci Reports



# Os últimos trabalhos

Trijatmiko et al (2016)





# Arroz biofortificado com pró-vitamina A

## Arroz

---

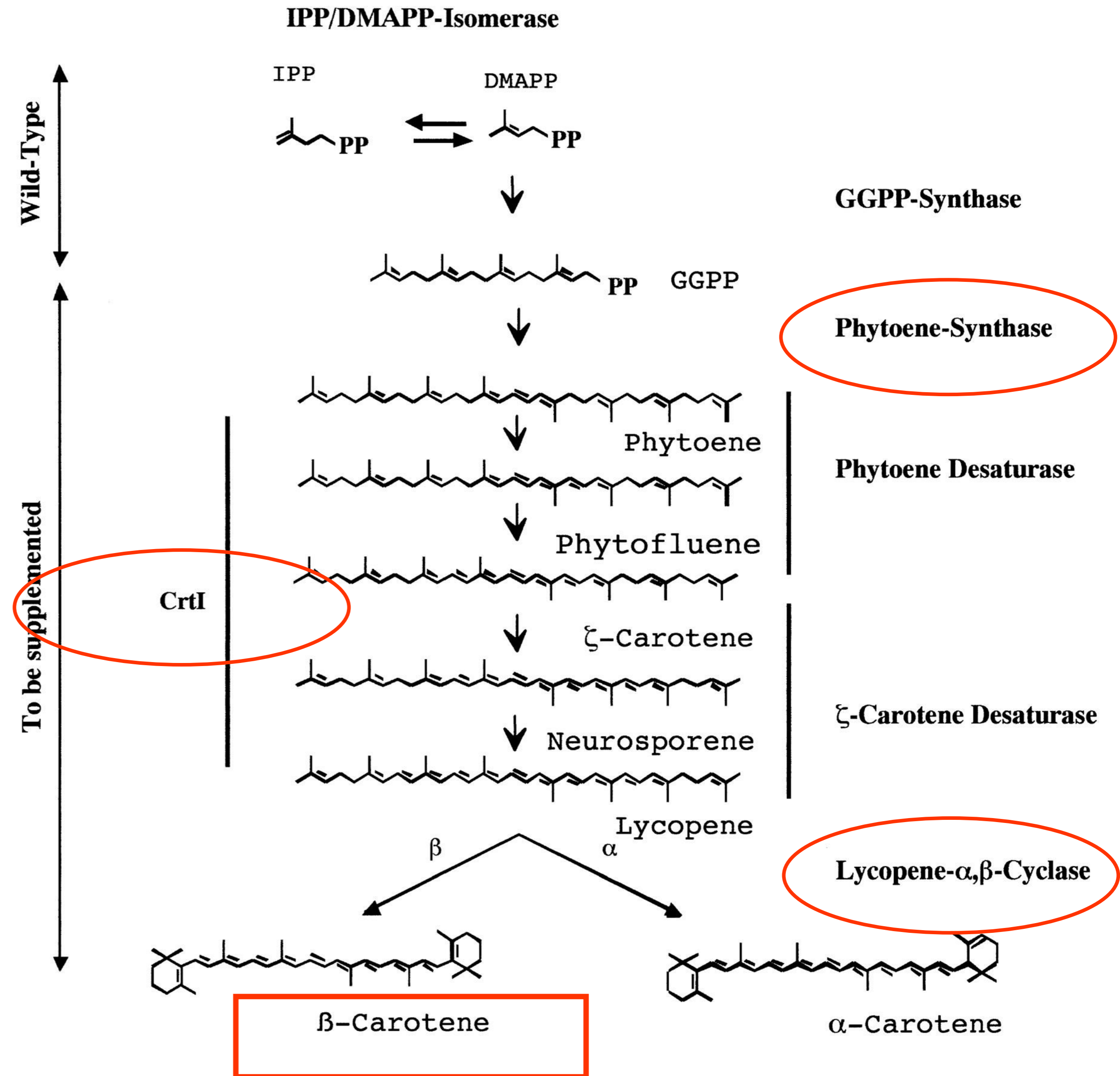
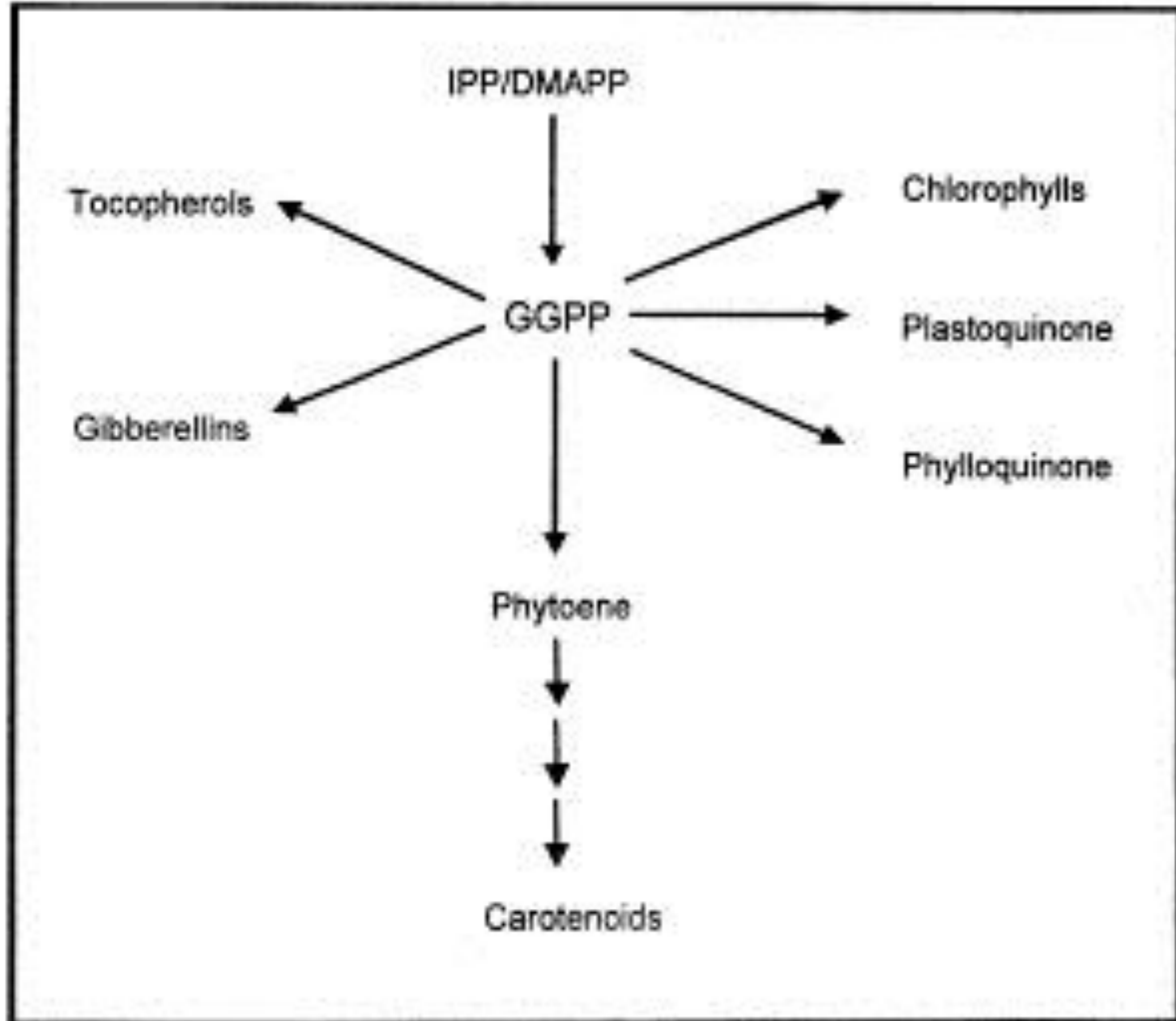
- Não produz  $\beta$ -caroteno (pró-vitamina A)
- Apesar dos genes estarem presentes no grão, alguns estão “desligados” durante o desenvolvimento
- Em sociedades que consomem muito arroz, a falta de Vit A reflete-se em cegueira, suscetibilidade a doenças e morte infantil prematura

## Vitamina A

“Todos nós precisamos de vitamina A, mas as crianças são as mais suscetíveis à sua deficiência. O RDA para crianças dos 1-3 anos é de 300 µg por dia. Fornecer metade desta quantidade manteria um nível saudável desta vitamina no sangue.”



# ●●●● A estratégia



●●●● Arroz dourado 1

**1.6  $\mu\text{g/g}$**

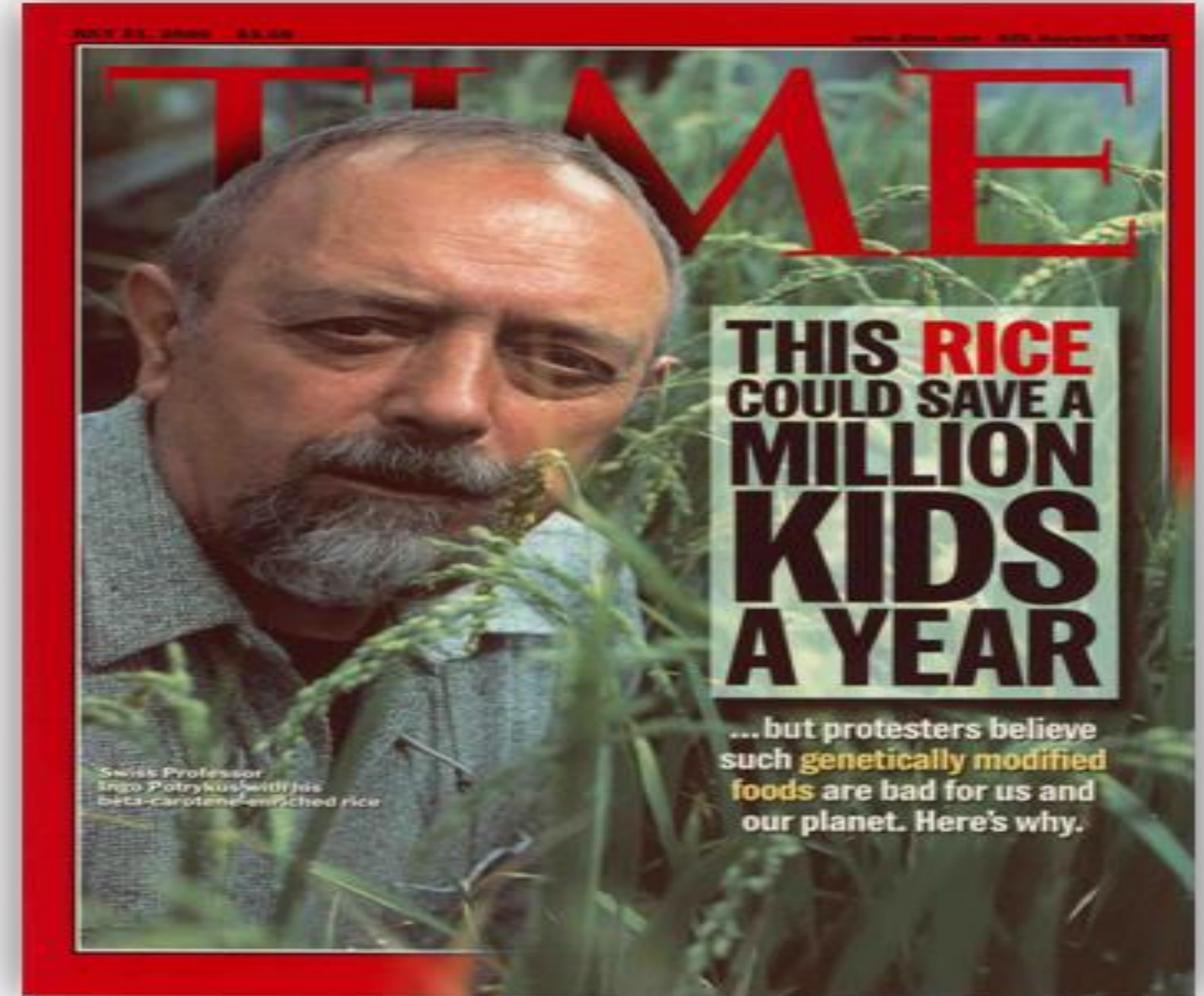


●●●● Arroz dourado 2

**37  $\mu\text{g/g}$**



72 gr de Golden Rice 2 fornece metade do RDA!





## Crop Biotech Update

April 22, 2015

[www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate](http://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate)



### Golden Rice Project Wins Patents for Humanity Award 2015

Section: [News from Around the World](#)



The White House Office of Science and Technology Policy and the United States Patent and Trademark Office (USPTO) bestow the 2015 Patents for Humanity Award to the Golden [Rice](#) Project. The award is given to patent owners working to bring life-saving [technologies](#) to the underserved people of the world in the fields of [medicine](#), sanitation, household [energy](#), living standards, and [nutrition](#).

The award given on April 20, 2015 at the White House recognizes the vision of Golden Rice (GR) co-inventors Ingo Potrykus and Peter Beyer, and GR Humanitarian Board Secretary Adrian Dubock whose patent application of the project enabled small holder [farmers](#) to benefit from Golden Rice.

"Royalty-free access to key technologies used in Golden Rice has enabled IRRI and public institutions to continue research and development of Golden Rice on a not-for-profit basis. Through this royalty-free arrangement and by breeding Golden Rice into already popular inbred varieties, resource-poor farmers can afford and reuse the seeds when they become available," according to the IRRI media release.

For details, see [Golden Rice news](#) and the [IRRI media release](#).

- 
- Feijão com Fe
    - República democrática do Congo
    - Rwanda
  - Pearl Millet com Fe
  - Cassava com Vitamina A
  - Milho com Vitamina A
  - Batata doce com Vitamina A
  - Arroz com zinco
  - Trigo com zinco

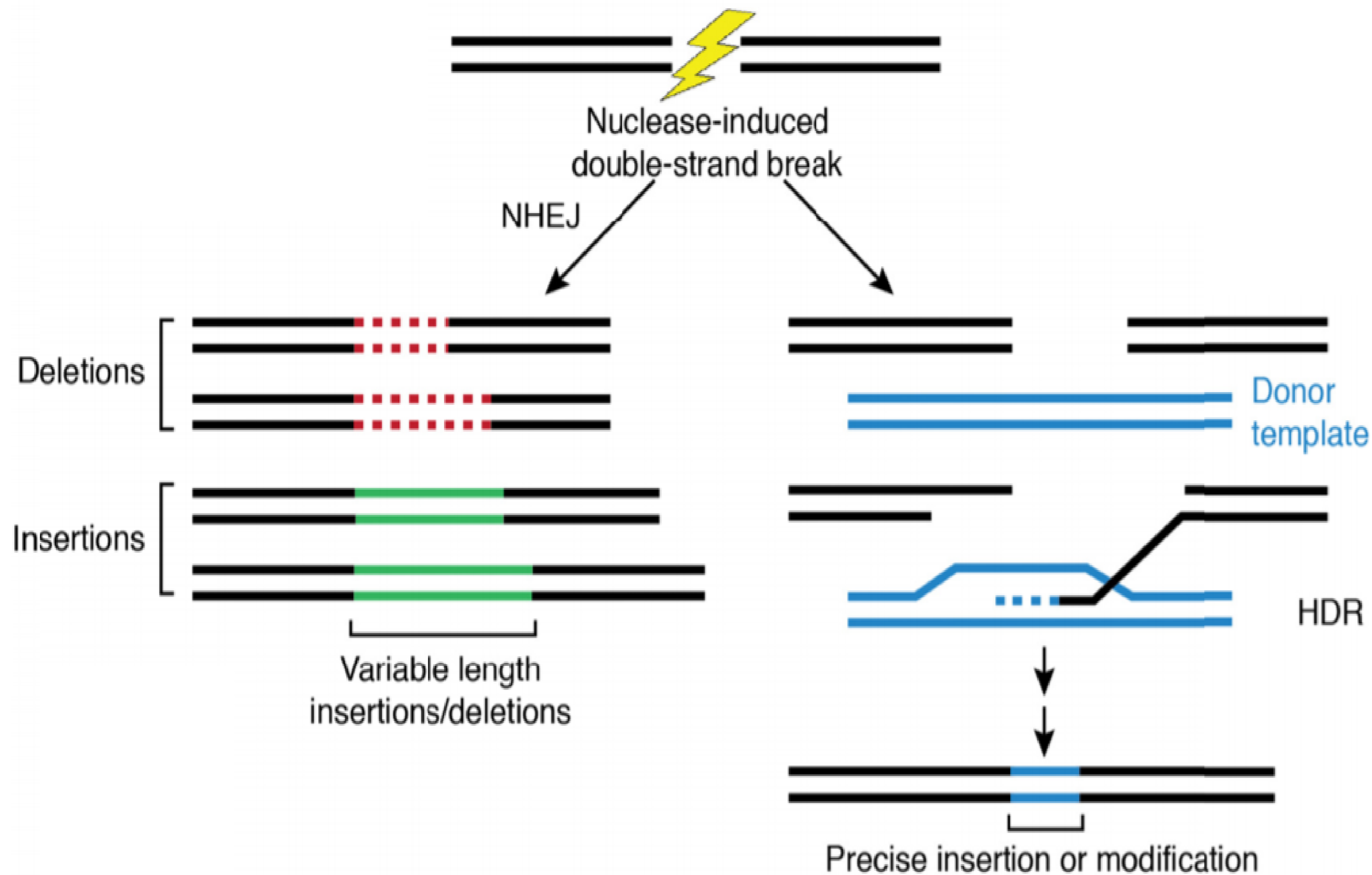


# Novas tecnologias para OGMs



# Tecnologias emergentes

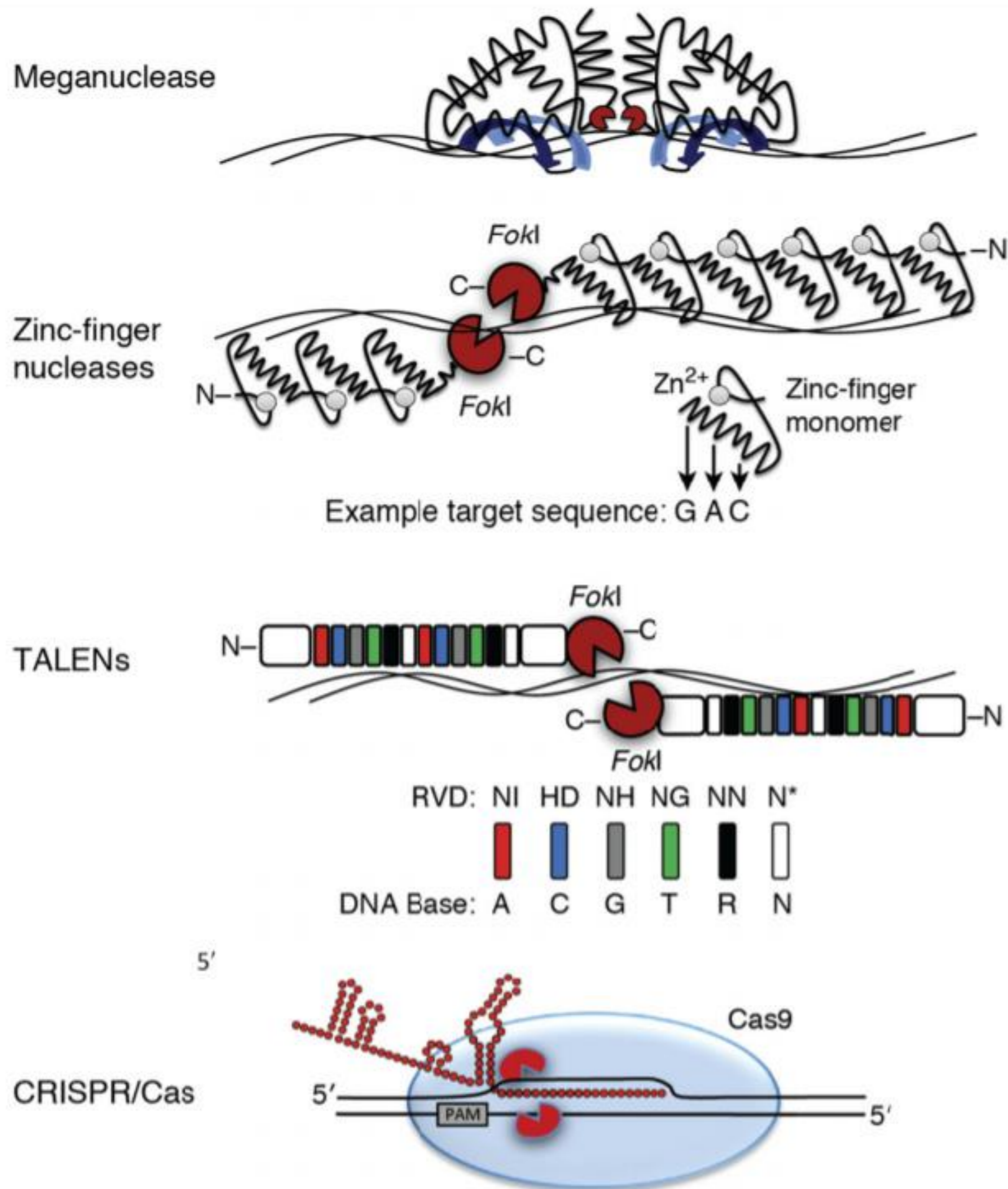
Consequências da quebra do DNA



- Utilizam **nucleases dirigidas** para mutar sequencias **específicas** no organismo: adicionando, removendo ou modificando o DNA
- O DNA é reparado:
  1. Através de “**Non homologous end- joining process (NHEJ)**” - mutação
  2. Se molécula dadora de DNA for fornecida ao mesmo tempo que o DNA for cortado, ativa-se a “**Homology directed repair (HDR)**”

# Tecnologias emergentes


Como funcionam as site-directed nucleases (sequence-specific nucleases; SSNs)




- **Meganucleases:** bactérias, eucariotas; reconhecem sequência de 12 nucleótidos; reparação por NHEF e HDR; difícil modificar sequência alvo
- **Zinc-finger nucleases:** podem manipular-se para se ligarem a seq. específicas
- **TALENs:** *Xanthomonas*; facilmente modificados para se ligarem a sequencias específicas; ligam-se a promotores das plantas para inibir resistência ao patogéneo; ligam-se a domínio FokI
- **CRISPR/Cas9:** mais recente; bactérias possuem CRISPR como defesa contra vírus; insere-se DNA entre as seq. repetitivas do locus CRISPR

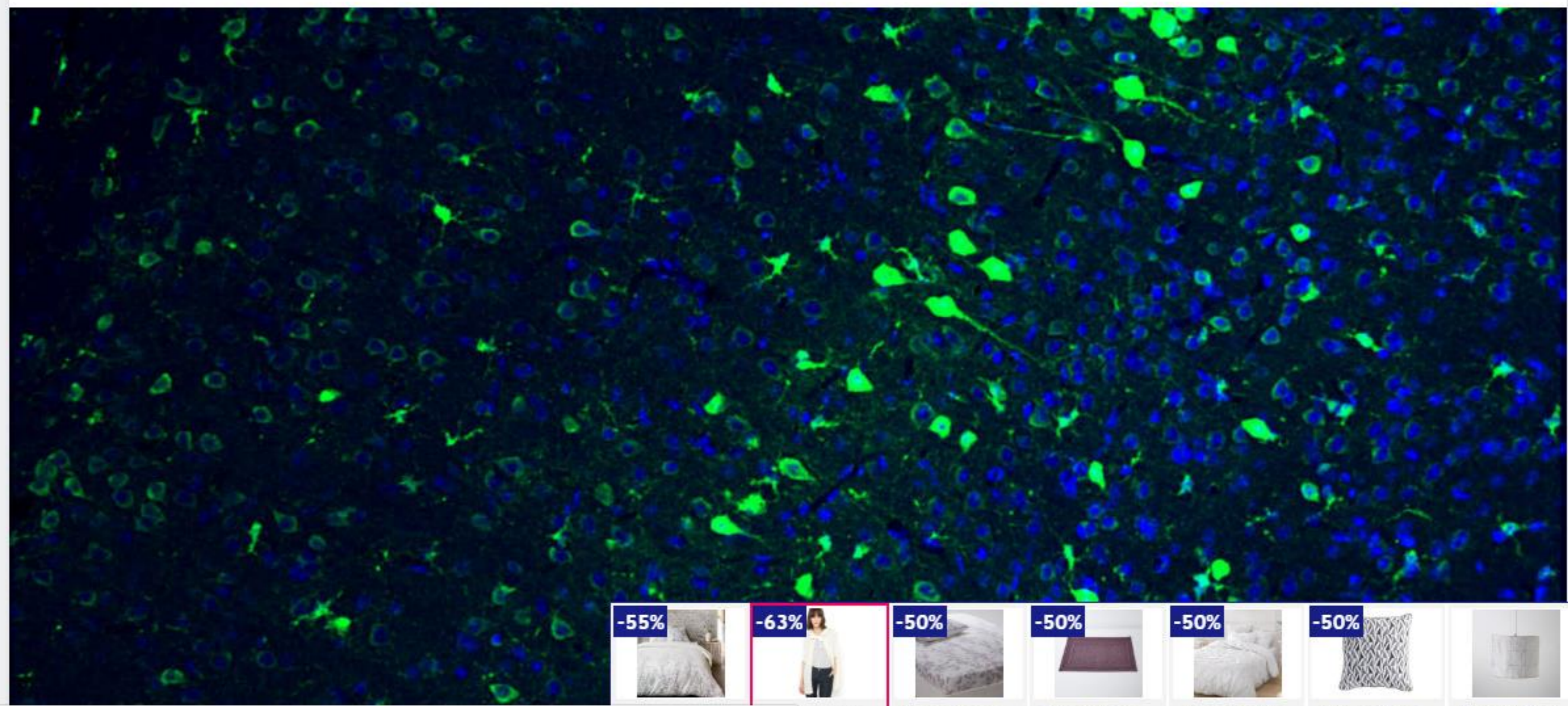
# Gene-Editing Breakthrough Partially Restores Sight To Blind Rats

7.6K  
SHARES

 Share on Facebook

 Share on Twitter





**nature**

Home | News & Comment

Research > Letters > Article

NATURE | LETTER

## *In vivo* genome homology-inde

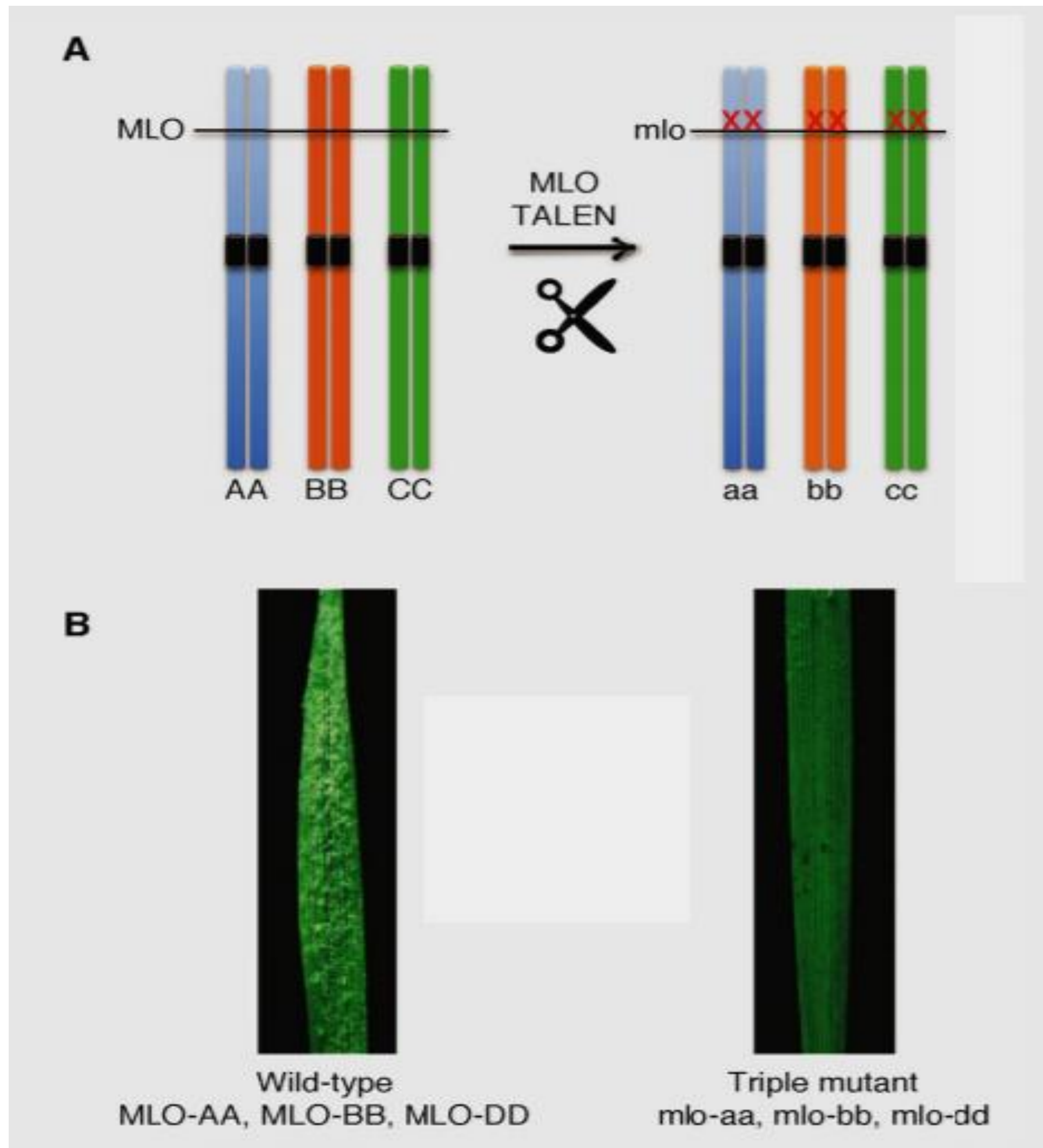
Keiichiro Suzuki, Yuji Tsun Kim, Fumiyuki Hatanaka, M Tomoaki Hishida, Mo Li, Er Soligalla, Jing Qu, Tingshu W. Travis Berggren, Jeroni

Waiting for www.facebook.com

 <p>-55%</p>	 <p>-63%</p>	 <p>-50%</p>	 <p>-50%</p>	 <p>-50%</p>	 <p>-50%</p>	 <p>Suspensão e...</p>
---	---	---	---	---	---	---

# Introdução de resistência a fungos

Usando tecnologias emergentes

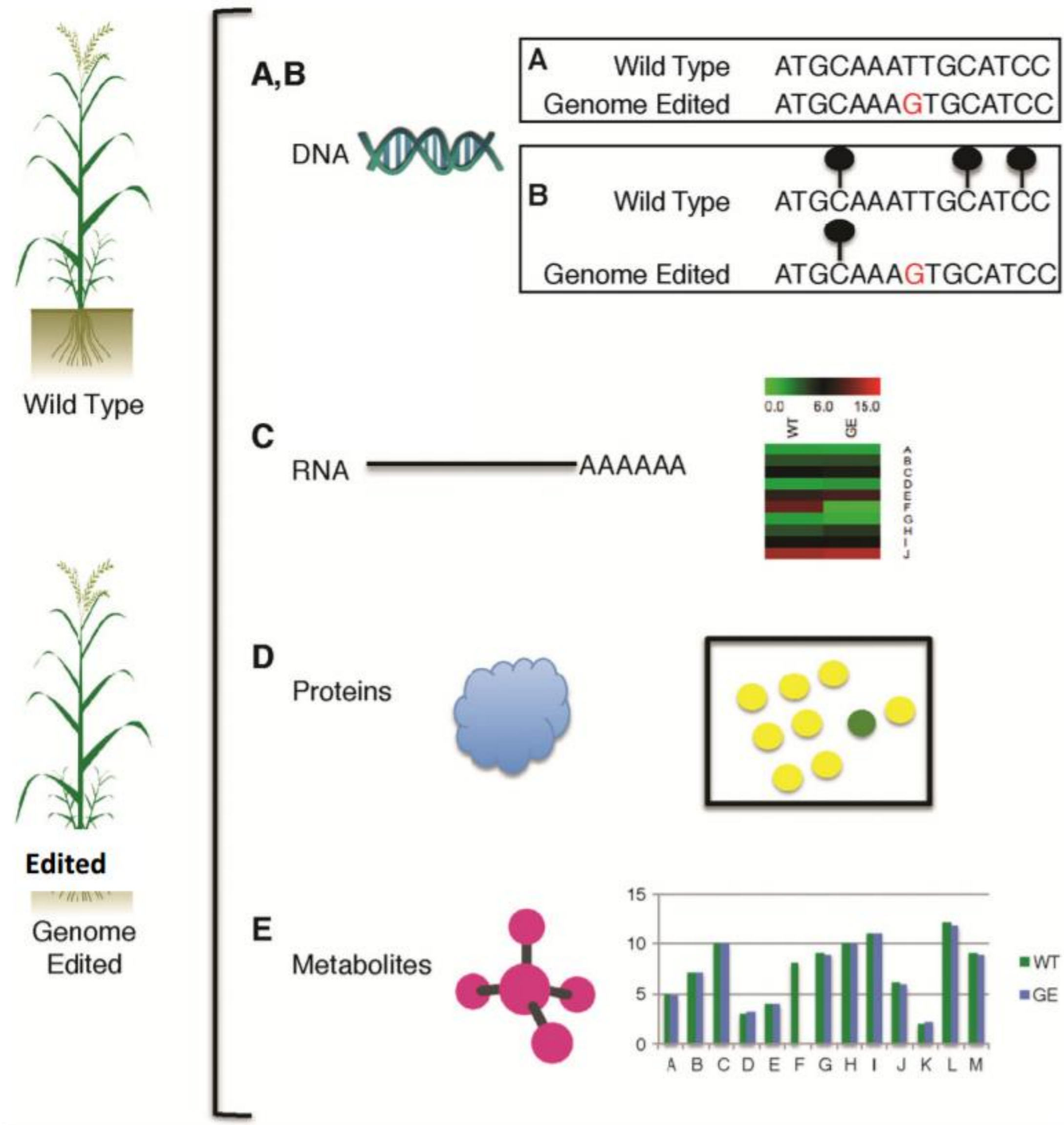


**A-** Trigo codifica gene MLO dominante (poliplóide, 3 loci homólogos) que confere suscetibilidade a fungo é editado usando TALEN

**B-**Trigo wt (esq.) é suscetível, triplo mutante (dir) é resistente

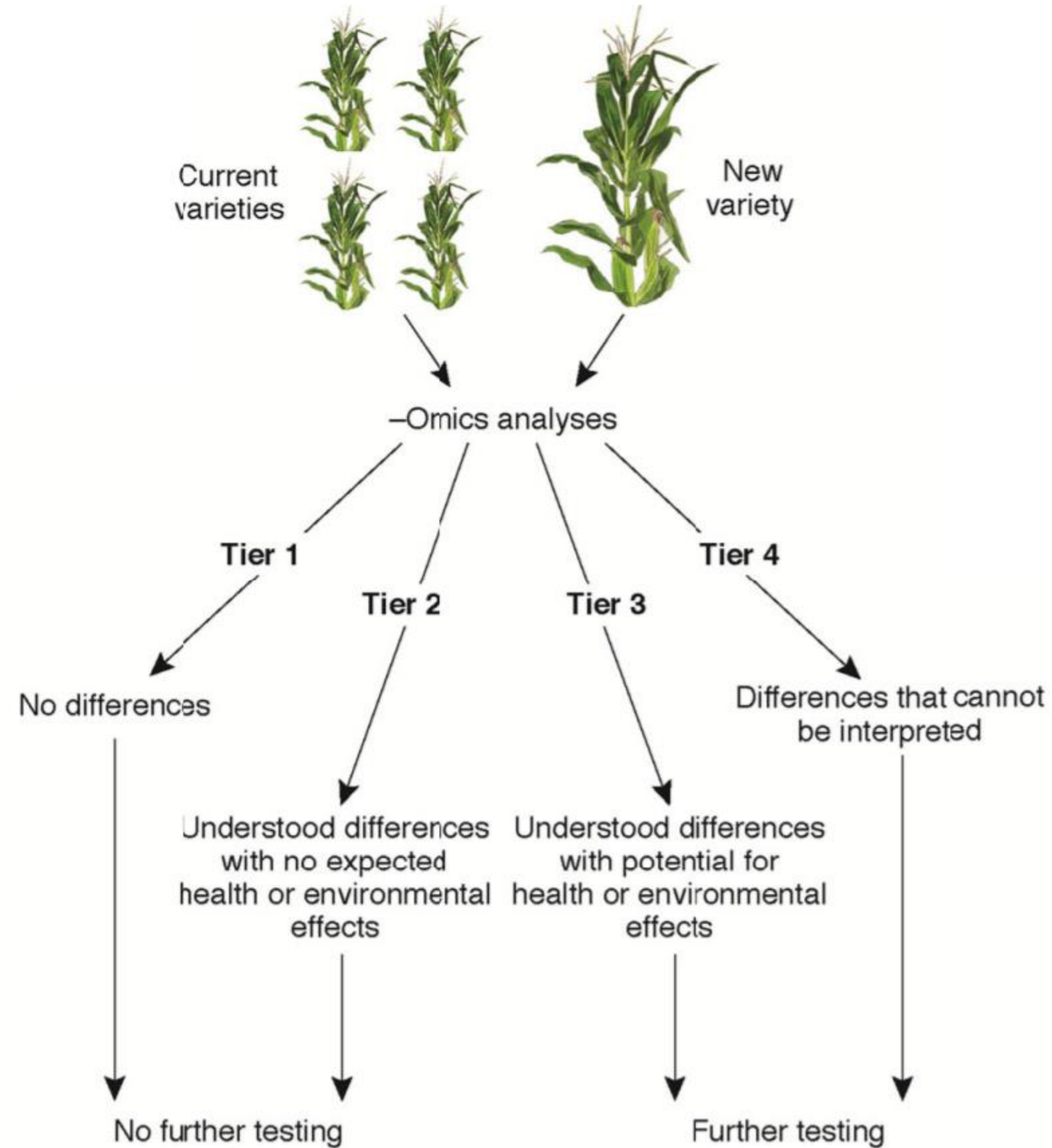
# Resequencing

Potencial



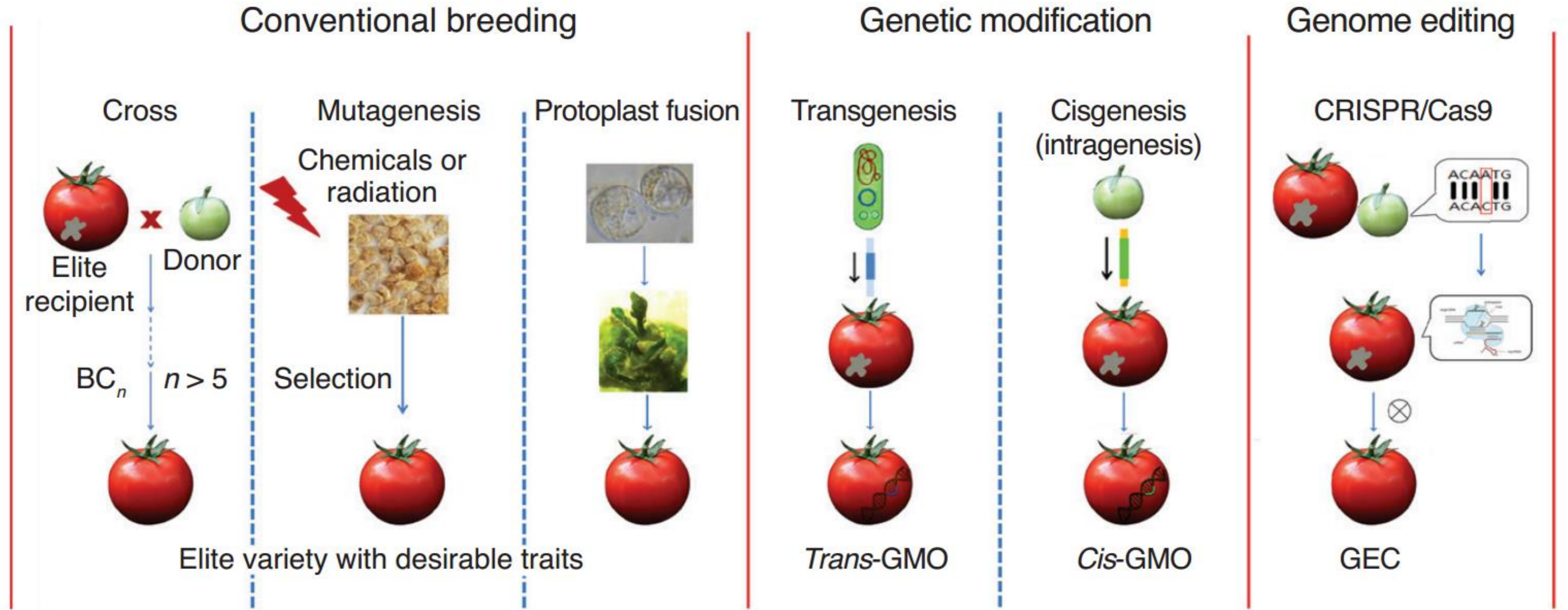
- Alinhar o genoma de interesse com o genoma de referencia;
- Descobrir variações induzidas pela modificação genética;
- Detetar alterações no epigenoma, metaboloma, proteoma e transcrito
- Descobrir novos alelos, funções
- Pouco dispendioso, permite muitas buscas
- **Limitações:** qualidade das sequencias; coverage; assemblagens diferentes, etc

# ●●●● Avaliação das culturas utilizando as ômicas



# Melhorados, mutados, editados ou transformados?

Descubra as diferenças





## COMMENTARY

### A proposed regulatory framework for genome-edited crops

Sanwen Huang<sup>1,2</sup>, Detlef Weigel<sup>3</sup>, Roger N Beachy<sup>4</sup> & Jiayang Li<sup>5,6</sup>

**Crop breeding is being revolutionized by rapid progress in DNA sequencing and targeted alteration of DNA sequences by genome editing. Here we propose a regulatory framework for precision breeding with 'genome-edited crops' (GECs) so that society can fully benefit from the latest advances in plant genetics and genomics.**

Crops provide food, feed and fiber for human-kind, with the top 60 species covering 96% of arable land in the world. The survival and well-being of our species critically depend on the output of these crops. The growing human population faces a plethora of challenges, from degradation and loss of arable land and climate change to the sensible demand for more sustainable agriculture practices. These are multifaceted problems, but crop breeding surely has an essential role in meeting the goals of agriculture and food production. To address these challenges, it is essential to fully exploit the latest developments in all scientific disciplines.

#### Crop genome sequencing

Genomics is beginning to provide a holistic perspective from which to dissect the orga-

nization and regulation of biological circuits, and this knowledge is greatly accelerating crop breeding. It has been 16 years since the first reference genome sequence of a plant, the model species *Arabidopsis thaliana*, was finished in 2000 (ref. 1); two years later, the genome sequences of two important crops, the two major types of cultivated rice (*Oryza sativa* ssp. *indica* and *japonica*)<sup>2,3</sup>, were published. The advent of next-generation sequencing accelerated crop genome sequencing: the first crop with a short-read genome assembly was cucumber<sup>4</sup>, which has since been followed by assemblies for approximately 50 other crops (Supplementary Table 1). Among the crops that remain to be sequenced are those with very large genomes such as onion (16.4-Gb haploid genome size) and very complex, polyploid genomes such as

predetermined locus using a sequence-specific nuclease. Three types of sequence-specific nucleases are in general use, namely zinc-finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs) and clustered, regularly interspaced short palindromic repeat-associated endonucleases (CRISPR/Cas). The tradeoffs between these three systems, in terms of efficiency versus off-target effects, are still being investigated. Sequence targeting using ZFNs and TALENs is mediated by protein-DNA interactions, whereas CRISPR/Cas recruits a guide RNA to direct an endonuclease to a target DNA sequence via base-pairing. The type II CRISPR/Cas9 system from *Streptococcus pyogenes* is currently the most widely used, owing to its high efficiency and simplicity, with alternatives such as the recently described CRISPR-Cpf1 system<sup>11</sup> promising further improvements. By

© 2016 Nature America, Inc. All rights reserved.





# ●●●● Alimentos OGM nutricionalmente melhorados

**Rice**  
Beta-carotene  
Folate  
Alpha-tocotrienol  
Protein/amino acid  
Fatty acids  
Starch  
Flavonoids  
Fe  
Zn

**Wheat**  
Zn  
Low phytate  
Fe

**Soybean**  
Fatty acids  
Protein/amino acids  
Tocopherol  
Isoflavone

**Maize**  
Beta-carotene  
Ascorbic acid  
Folate  
Vitamin E  
Protein/amino acid  
Iron

**Potato**  
Anthocyanin  
Aminoacids  
Carotenoids  
Zeaxanthin  
Carbohydrate

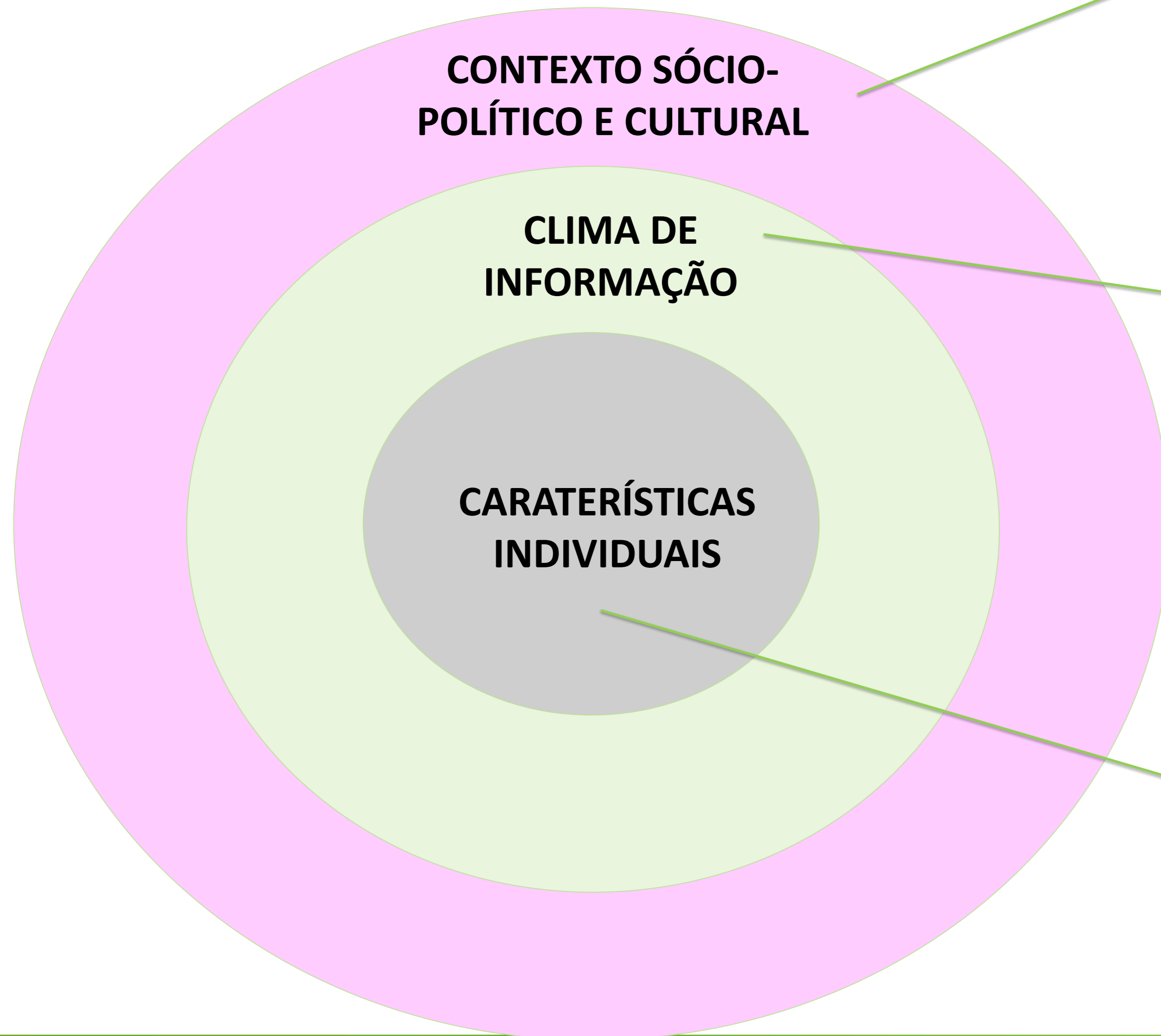
**Cassava**  
Protein  
Iron

**Canola**  
Fatty acids  
Carotenoids

**Lettuce**  
Folate  
Resveratrol  
Iron

**Carrot**  
Calcium

**Tomato**  
Antioxidants  
Carotenoids  
Poliamines  
Folate  
Isoprenoids



- Religião
- Instituições
- Aspectos socio-económicos

- Cobertura pelos media
- Mensagens de marketing
- Televisão, filmes, documentários
- Mensagens educacionais

- Atitudes relativas à ciência
- Considerações morais
- Perceção de risco e benefício
- Conhecimento sobre o tema
- Experiências pessoais
- Confiança no fornecedor de informação
- Deferência à comunidade científica

- ✓ São alimentos seguros. Apesar da incerteza, não há evidências em contrário.
- ✓ Mas protegem contra insetos e ervas daninhas.
- ✓ Tolerância a herbicidas e introdução de Bt diminuiram o uso de pesticidas, embora diminuições tenham ocorrido precocemente e algumas não tenham sido duradouras.
- ✓ O aumento do uso de glifosato levou a ervas daninhas resistentes ao glifosato.

- ✓ Benefícios económicos para agricultores bem documentados, mas resultados individuais variam.
- ✓ Dificuldade em perceber esses ganhos económicos por causa do preço das sementes
- ✓ As conversas públicas sobre culturas transgénicas devem transparentes e informadas.
- ✓ Regulamentação adequada é imperativa e essa regulação deveria basear-se nas características da cultura, e não na técnica utilizada para desenvolvê-la, seja ela ou não OGM.

●●●●● Muito obrigada pela vossa atenção!

mvasconcelos@porto.ucp.pt

