

MEMÓRIAS
DA
ACADEMIA DAS CIÊNCIAS
DE
LISBOA

CLASSE DE CIÊNCIAS

TOMO XLVII
Volume 1

Genómica Funcional de Plantas
Um futuro arriscado para a nossa
agricultura?
Ou para nós

RUI MALHÓ



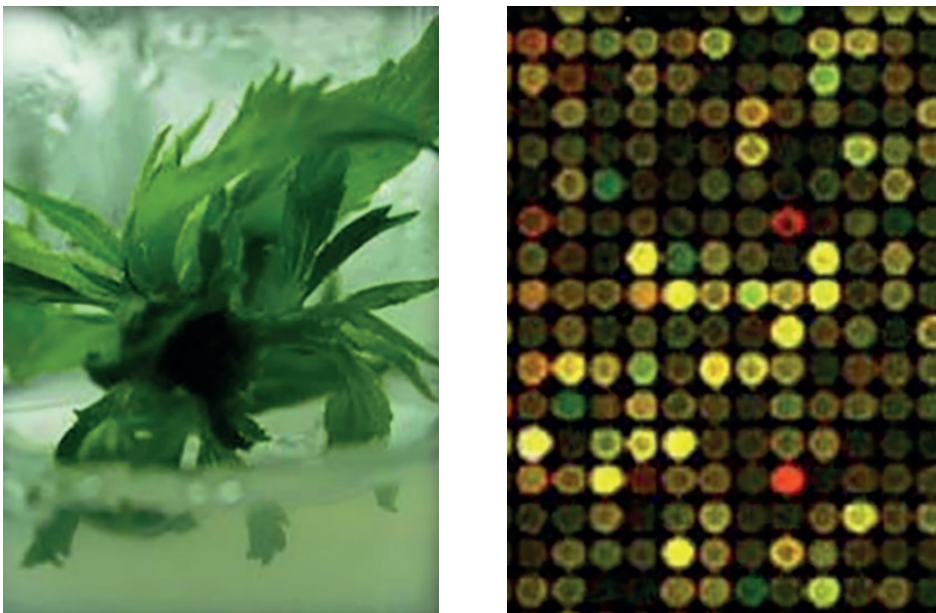
ACADEMIA DAS CIÊNCIAS
DE LISBOA

LISBOA • 2020

Genómica Funcional de Plantas

Um futuro arriscado para a nossa agricultura? Ou para nós

RUI MALHÓ



Fotos ilustrando planta em cultura in vitro e placa de microarray

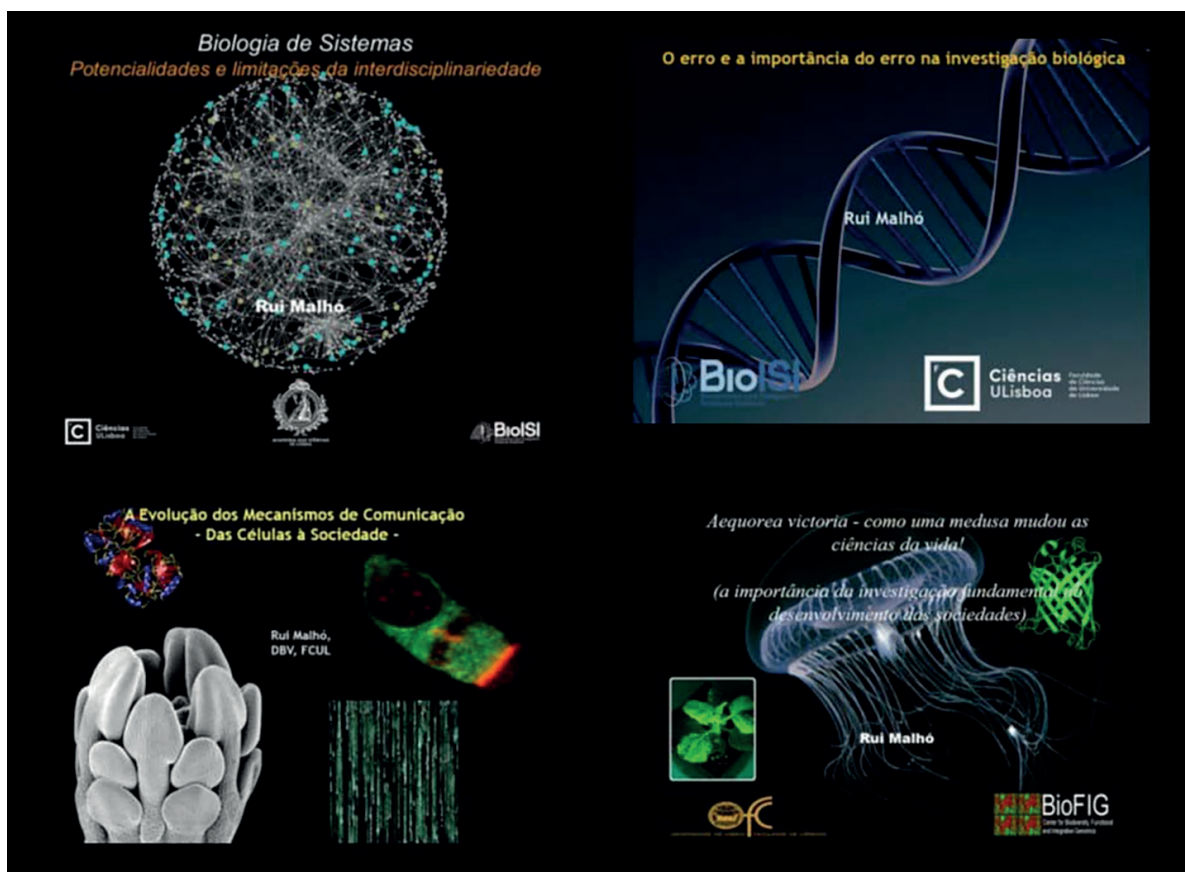
A elaboração desta apresentação surge na sequência de uma reflexão do autor sobre a área disciplinar da Genómica Funcional de Plantas, área da Biologia Vegetal, que envolve a caracterização funcional de genes, proteínas e metabolitos em plantas com vista à sua utilização em programas de melhoramento para uma agricultura sustentável e uma alimentação saudável. Quer do ponto de vista científico como tecnológico, é uma área onde a multidisciplinaridade é uma mais-valia o que, naturalmente, coloca tanto desafios como as potencialidades que alberga.

Os estudos de Genómica Funcional, que decorrem no grupo de investigação, são inerentemente de carácter fundamental mas o desenvolvimento científico e tecnológico tem sido de tal forma céleres que tem permitido análises com impacto diverso e o estabelecimento de protocolos de colaboração com a indústria, em particular na área da viticultura.

No âmbito desta apresentação e também considerando a comunicação anterior a esta Academia, escolheu-se como exemplo paradigmático, por estar próximo da sua área principal de investigação, as

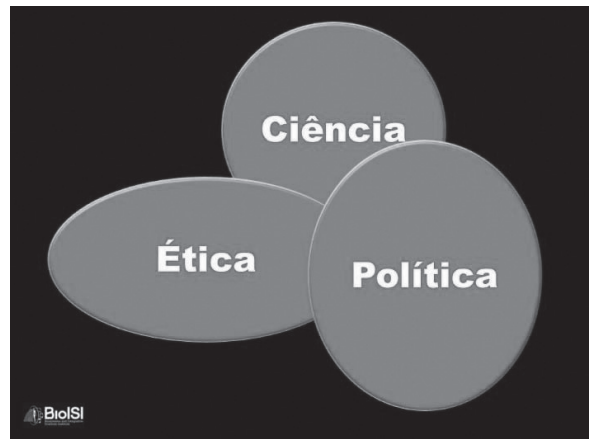
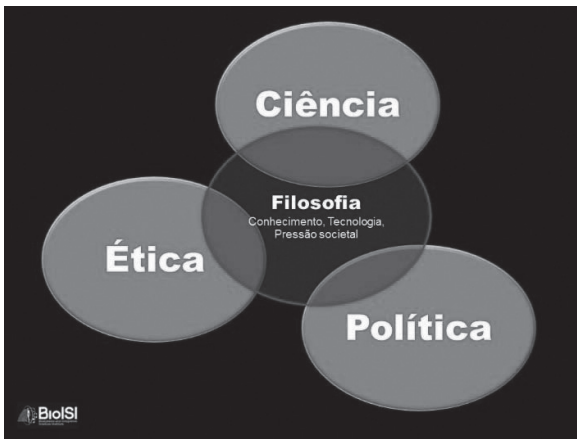
descobertas e aplicações associadas à resistência versus susceptibilidade de diferentes castas de videira (*Vitis vinifera*) ao fungo *Plasmopara viticola* (fungo responsável pela doença do míldio). Os resultados que se têm obtido nestas pesquisas e a forma como esses resultados influenciam o procedimento experimental subsequente foram também analisados na apresentação em termos de filosofia de evolução da Ciência e seus impactos sociais.

A palestra iniciou-se com a contextualização dos tópicos apresentados em comunicações anteriores e que são transversais no nosso trabalho científico. A saber: (1) A importância do conhecimento fundamental relativo ao funcionamento dos organismos, para que as eventuais aplicações desse conhecimento possam ter alicerces sólidos; (2) A importância do erro, da experimentação e validação pelos pares como base de qualquer ciência; (3) A importância da multi- e da interdisciplinaridade no desenvolvimento tecnológico e no avanço da Ciência; (4) A importância da relação Sociedade-Conhecimento no nosso desenvolvimento, nos nossos desafios, nos problemas que se criam e se resolvem.



Fotos ilustrando tópicos de anteriores comunicações à Academia

Estes tópicos mostram-nos que Ciência, Política e Ética são três substantivos que deveriam estar interligados por princípios filosóficos dinâmicos de acordo com os ditames de uma sociedade em constante alteração e pela evolução do conhecimento.



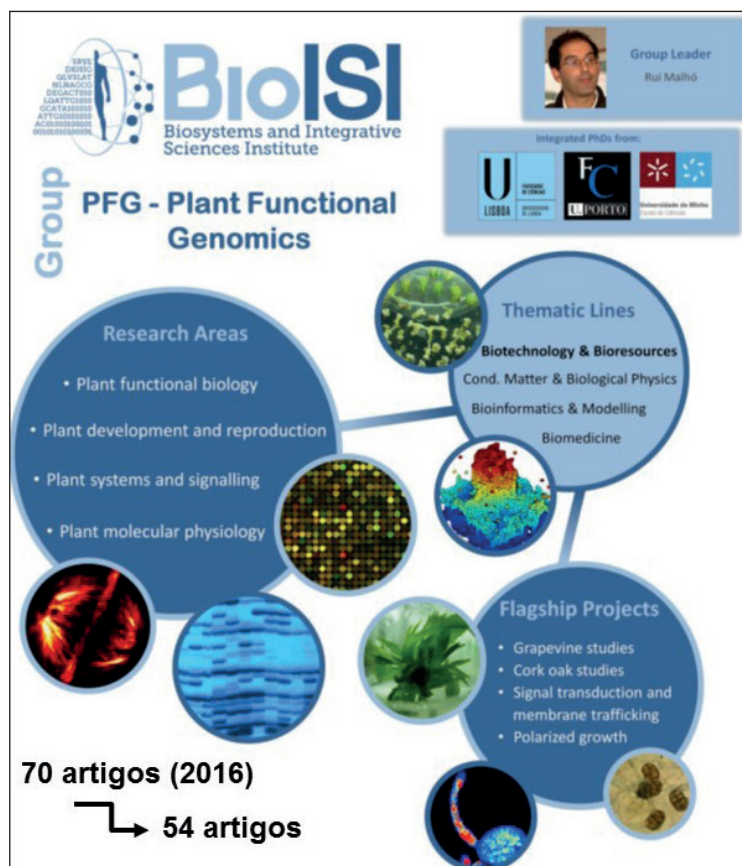
Ciência, Ética e Política – Interligação ou Sobreposição?

Contudo, temos assistido à sua efectiva sobreposição analisando-se dados científicos à luz de aspectos eticamente pouco debatidos e subjacentes a agendas políticas. Se nalguns casos esta sobreposição se tem revelado relativamente inócua, esse não é definitivamente o caso quando se aborda a manipulação genética de plantas ou de animais. Esta sobreposição não só tolda boas práticas como refreia a necessária e saudável discussão ética e a implementação de boas políticas globais. Com este contexto, tentou-se nesta comunicação abordar os aspectos científicos da Genómica Funcional de Plantas, dissociados mas interligados às questões éticas e políticas.



Ciência, Ética e Política – Aspectos relacionados com a Genómica Funcional de Plantas

Proseguiu-se com uma breve resenha das actividades do grupo “Plant Functional Genomics” liderado pelo autor e integrado na unidade de investigação BioISI (Instituto de Biosistemas e Ciências Integrativas).



Grupo “Genómica Funcional de Plantas” do BioISI – Áreas de investigação e projectos emblemáticos

Reforçou-se a noção de que tal investigação só é actualmente pertinente numa óptica inter- e multidisciplinar, ancorada em desenvolvimento tecnológico e partilha de saberes.

Facilities

TL Biotechnology offers:

- Biomaging
- Molecular and –omics tools
- Plant cell culture & growth chambers

TL Biotechnology benefits from:

- Computing Sequencing
- AFM-RT

“Genómica Funcional de Plantas” do BioISI – Laboratórios e tecnologias disponíveis

Foram de seguida apresentados alguns exemplos recentes da investigação que decorre no grupo, neste tópico da Genómica Funcional (que em 2016 representou cerca de 80% das nossas publicações em revistas internacionais com avaliação pelos pares).

Insights into molecular and metabolic events associated with fruit response to post-harvest fungal pathogens
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00889>

Revisiting *Vitis vinifera* Subtilase Gene Family: A Possible Role in Grapevine Resistance against *Plasmopara viticola*
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01783>

Genomic reshuffling in advanced lines of hexaploid tritordeum.
 DOI: 10.1007/s10722-016-0439-3

Effect of 24-epibrassinolide on ROS content, antioxidant system, lipid peroxidation and Ni uptake in *Solanum nigrum* L. under Ni stress
 DOI: 10.1016/j.envexpbot.2015.09.010


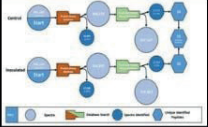
BioISI
 Institute for Biological Sciences

“Genómica Funcional de Plantas” do BioISI – Alguns exemplos de trabalhos recentes

Seguidamente e como acima mencionado, apresentou-se de forma mais detalhada o modelo biológico preferencial para ilustrar esta comunicação - a investigação em *Vitis vinifera* e os mecanismos de resistência/susceptibilidade à infecção por fungos patogénicos, nomeadamente *Plasmopara viticola*. Do ponto de vista biológico é um modelo interessante no estudo das relações hospedeiro-patogénio e da evolução dos mecanismos genéticos e celulares de resistência e adaptação. Do ponto de vista societal é também relevante considerando a importância económica da vinha e das perdas por infecção com o míldio. É conhecido que diferentes castas apresentam diferentes graus de resistência (ou susceptibilidade) a este fungo pelo que, a caracterização funcional deste processo (e.g. os genes e metabolitos envolvidos na resistência) tem uma relevância acrescida. Os estudos no grupo de investigação tem-se centrado na análise comparativa de duas castas, uma susceptível à infecção (Trinca-deira) e outra resistente (Regent).


PROTEOGRAPE

“Grapevine shotgun proteomics as a tool for the characterization of downy mildew associated resistance traits and improvement of grapevine genome annotation”



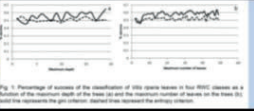
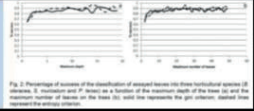
Proteogenomics search:

Preliminary results on the comparative analysis between inoculated and non-inoculated grapevine leaves allowed the identification of 349 differentially accumulated proteins mainly involved in photosynthesis, signalling and defense mechanisms. Almost 50% of the identified proteins were unnamed, uncharacterized or hypothetical *Vitis vinifera* proteins. Thus we have used a proteogenomics approach to improve database annotation. Preliminary results indicate that the analysis of our MS dataset allowed the identification of 29 novel peptides, which 15 are present in both conditions (non-inoculated and inoculated).




OPTIGRAPE

“Optical techniques for the automatic identification of fungal infection-resistant grapevine cultivars”

Preliminary results show a moderate success in the automatic identification of the closely related species *V. riparia* and *V. vinifera*. Automatic identification of water stressed *Vitis* plants was also only partly achieved. On the contrary, a high success was obtained in the automatic identification of less phylogenetically related horticultural species. We are now improving the plants growth conditions, optimizing the spectroscopic protocols and exploring new classification algorithms.



Proteogrape e Optigrabe – Projectos em curso no grupo “Genómica Funcional de Plantas”

Em dois projectos em curso – *Proteogrape* e *Optigrabe* – identificaram-se já genes diferencialmente expressos e acumulação de proteínas em resposta à infecção. A análise inclui estudos genómicos, transcriptómicos, proteómicos e metabolómicos de plantas das duas castas, em condições controlo e infectadas pelo fungo. Em ambos os casos seguiu-se o desenvolvimento da planta e o amadurecimento do fruto. Sendo que a maior parte dos genes estão envolvidos em respostas de sinalização e defesa (a reacção da planta à infecção), outros estão envolvidos em processos relacionados com a fotossíntese o que afecta directamente a produtividade¹. Muitas das proteínas encontradas não têm ainda

¹ Uma análise mais detalhada destes resultados foi apresentada anteriormente à Academia das Ciências de Lisboa na comunicação intitulada *Biologia de Sistemas: Potencialidades e limitações da interdisciplinaridade*. Em sùmula:


- a casta resistente apresenta um maior número de transcriptos (RNAm) associados a genes de defesa e sinalização; em oposição, apresenta menor número de transcriptos associados a genes da fotossíntese.
- a casta resistente apresenta um maior número de metabolitos correlacionados com defesa e sinalização; em oposição, apresenta menor concentração de alguns açúcares.
- a casta resistente apresenta uma maior concentração de espécies reactivas de oxigénio (envolvidas em respostas a stress); em oposição, apresenta menor concentração de antioxidantes.

caracterização funcional o que atesta o longo caminho que há a percorrer para uma compreensão detalhada destes mecanismos.

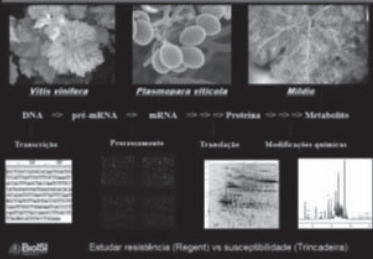
Os dados apresentados na comunicação foram o mote para iniciar um outro tópico desta problemática: a questão da translação deste conhecimento fundamental em aplicabilidade.

Ciência básica vs aplicabilidade

- Identificação de genes de resistência (stress biótico e abiótico) e diversidade genética
- Produção de cultivares melhoradas (OGMs e/ou transgênicos)
- Caracterização funcional de fenótipos (análises fisiológicas, bioquímicas, etc)
- Cruzamento com variedades “elite” (backcrossing *)
- Estudos de campo /impacto ambiental



Exemplo: Resistência a stress biótico em *Vitis vinifera*

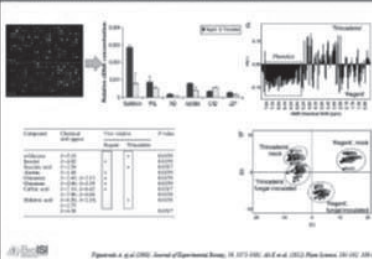


DNA → pré-mRNA → mRNA → Proteína → Metabolito

Transcrição → Processamento → Tradução → Modificações químicas

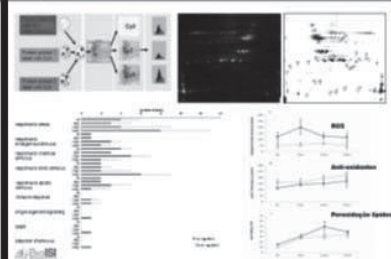
Estudar resistência (Regent) vs susceptibilidade (Trincadeira)

Exemplo: Resistência a stress biótico em *Vitis vinifera*



Figures 1 and 2: Anal. of Gene Expression Data, 16-17/2002, Biol. J. 131, 100-102, 2002

Exemplo: Resistência a stress biótico em *Vitis vinifera*



Network diagram showing gene interactions.

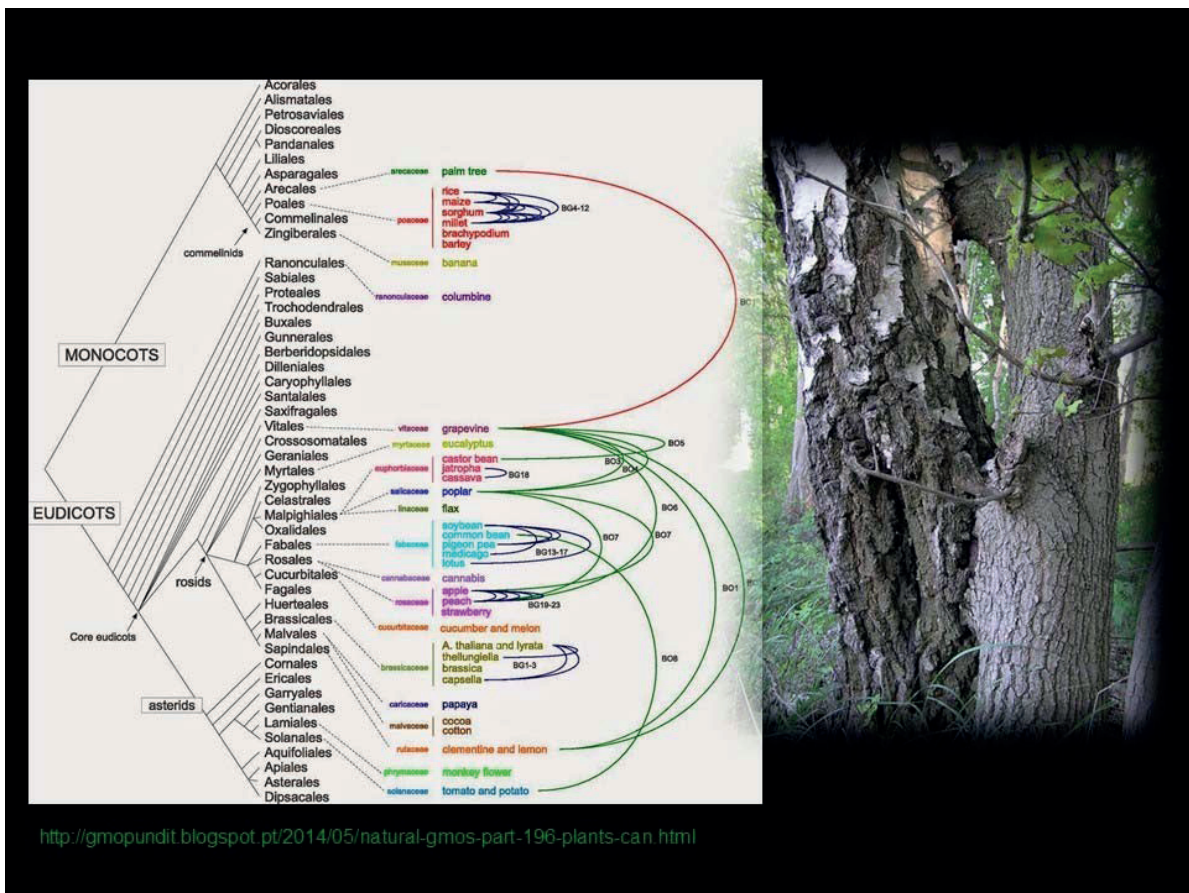
* Backcrossing: crossing of a hybrid with one of its parents or an individual genetically similar to its parent, in order to achieve offspring with a genetic identity which is closer to that of the parent.

Aspectos metodológicos e regulamentação da translação dos dados da Genômica Funcional de Plantas para uma agricultura moderna e sustentável.

Foram assim apresentados alguns dos métodos actualmente utilizados na obtenção de cultivares melhorados estabelecendo-se uma distinção entre “transgênico” (organismo que recebe informação genética de outra espécie) e OGM (organismo geneticamente modificado com material genético alterado proveniente da mesma ou de outra espécie).

Foram também referidos métodos que precedem a introdução de OGMs na agricultura moderna tal como o cruzamento com variedades “elite” (aquelas cujas características já foram testadas e de qualidade reconhecida), os estudos de campo para apuramento de impacto ambiental e as moratórias para assegurar um princípio de precaução. Referiu-se a propósito a grande diversidade legislativa sobre a utilização de OGMs, nomeadamente na União Europeia o que em nada contribui para um esclarecimento informado da sociedade sobre os problemas e potencialidades da Biotecnologia Vegetal. Este é um caso paradigmático de como a sobreposição de aspectos políticos aos éticos e científicos pode atrasar

significativamente o avanço do conhecimento e a melhoria dos próprios métodos. Sublinha-se aqui o facto de que a Ciência não exclui a possibilidade de erro, atribui-lhe é uma probabilidade de ocorrência. E neste contexto, os métodos que foram apresentados, sujeitos a um intenso escrutínio científico, tem-se revelado robustos e, tanto quanto se pode afirmar, seguros para a agricultura. A título de curiosidade, mostrou-se um quadro documentando transferências horizontais espontâneas de material genético, já documentadas, e que têm sido apontadas pelos críticos das técnicas de Engenharia Genética como algo negativo e não natural. Apresentou-se também um quadro comparativo sobre os diferentes métodos utilizados no melhoramento vegetal (@Kevin Folta, 2012) ilustrando que em todos há vantagens e desvantagens mas que as técnicas recentes de Engenharia Genética possibilitam uma redução de tempo para produção de variedade melhorada e com maior controlo sobre eventuais transferências (perdas ou ganhos) de material genético².



Quadro ilustrativo de transferências horizontais de genes (de uma espécie para outra) documentadas na natureza (<http://gmopundit.blogspot.pt/2014/05/natural-gmos-part-196-plants-can.html>)

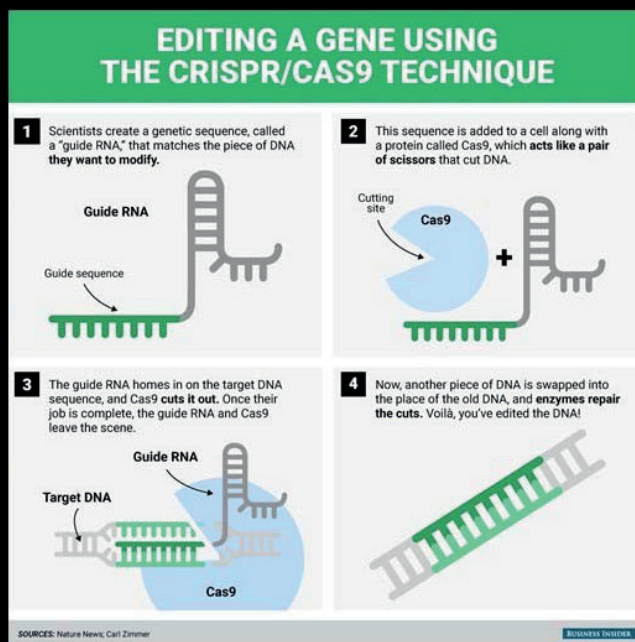
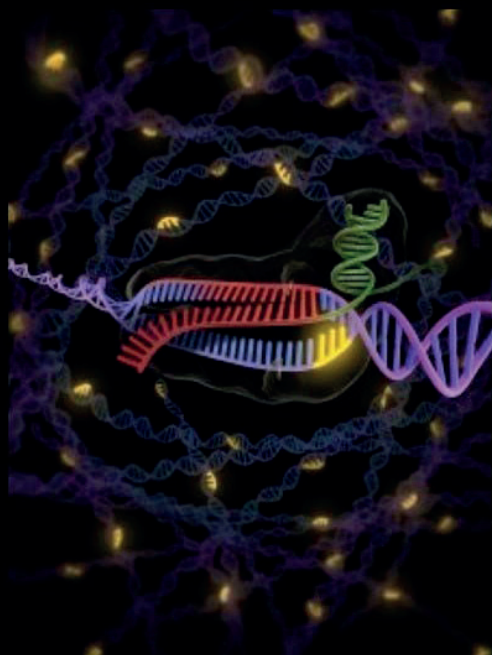
² Na segunda metade do século XX, a produção de híbridos e a indução de mutações (por radiação e/ou agentes químicos) foi crucial para um aumento da produtividade vegetal e consequentemente para um aumento do bem-estar humano e da população (vide mais informação em https://en.wikipedia.org/wiki/Green_Revolution). Actualmente esses programas de mutação foram em larga medida abandonados pois, embora não estejam documentados danos para a saúde humana, os resultados não são direccionáveis.

2012 Kevin M. Folta @kevinfolta	Hybrids (cross between two non-clonal plants)	Polyploids (whole genomes duplicated or added)	Mutation breeding (Chemical or radiation induced damage to DNA)	Crossing Species Barriers (interspecific crosses)	Transgenics (rDNA method to add a gene- "GMO")	Cisgenics (rDNA method to add a gene)
Examples in common foods	Almost everything	Strawberries, wheat, bananas, brassicas, others	Some bananas, pears, apples, rice, yams, mint, others	Pluots, tangelos, some apples, rice, wheat	Much corn, canola, soybeans, cotton, papaya	Coming soon.
Transfers genes from one species to another	Yes, sometimes	Yes, often	No	By definition	Yes	No
Occurs in nature	Yes	Yes	Yes, transposon movement, mutation from environment	Yes, rare, seldom fertile	Yes, Agrobacterium, other horiz. trans.	N/A
Human intervention	Yes, for crop improvement	Can be induced chemically to improve crops	Yes, to introduce variation for crop improvement	Yes, for crop improvement	Yes, for precision crop improvement	Yes, for precision crop improvement
Number of genes affected	10K to >300K, depending on species	10K to >800K	No way to assess	10-300K	1-3	1-3, usually 1
Know what genes moved or affected do	No.	No	No	No	Yes	Yes
Know where affected genes are in genome	No	No	No	No	Yes	Yes
Plant patentable	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Documented adversity	Yes	??	???	Yes	No	No
Environmental assessment	No	No	No	No	Yes	Will see.
Organic acceptable	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No
Time for new variety	5-30 years	>5 years	>5 years	5-30 years	<5 years	<5 years
Demanding label	No	No	No	No	Yes	Will see.

Métodos utilizados em melhoramento vegetal (@Kevin Folta, 2012)

Acresce a este facto que a introdução da técnica de edição de genomas com o auxílio do sistema enzimático CRISPR/CAS9 (já abordado em comunicação anterior) irá acelerar ainda mais o processo de melhoramento e reduzir a necessidade de introdução de elementos genómicos de outras espécies.

“Edição” de genoma com CRISPR (*)



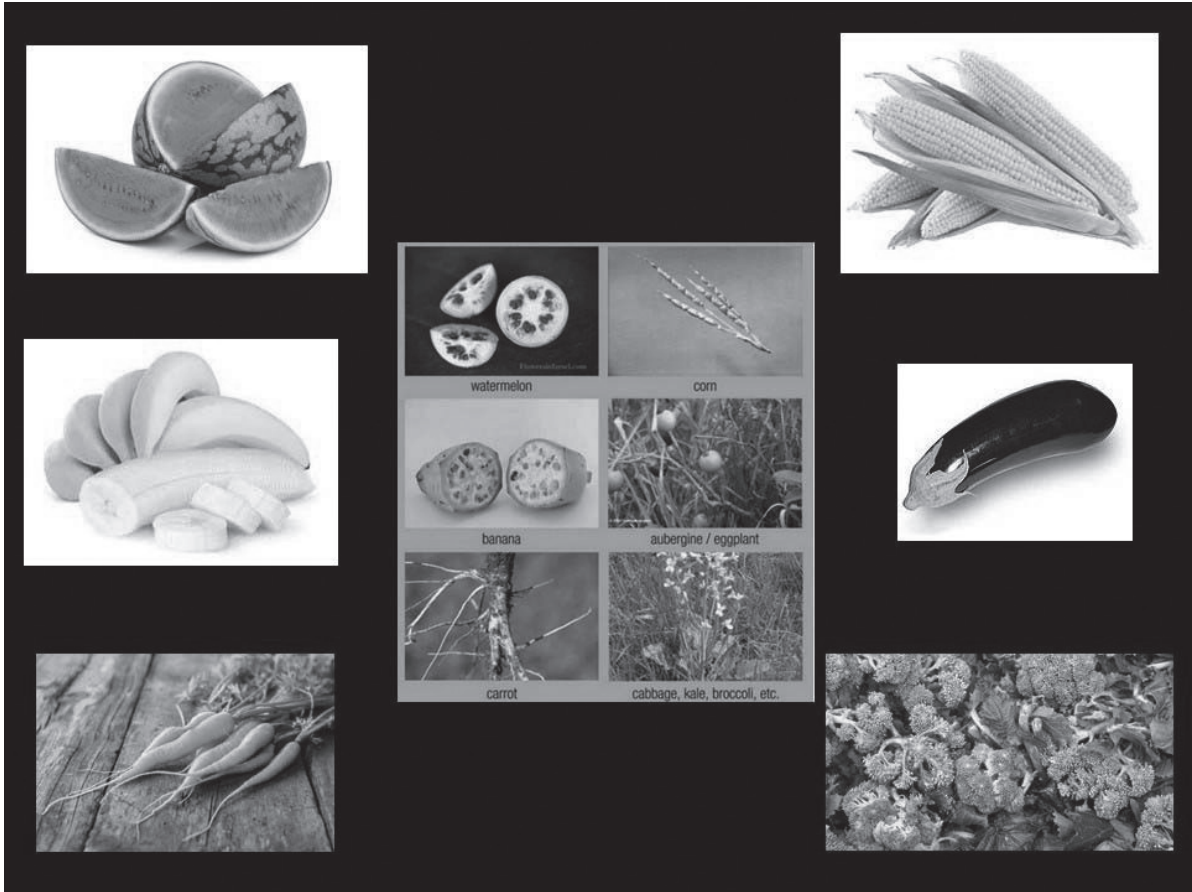
(*) *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

Edição de genomas com CRISPR/CAS9 (<https://en.wikipedia.org/wiki/CRISPR>)


Efectivamente, esta técnica de edição não deixa “vestígios” genéticos do processamento efectuado, o que é cientificamente relevante mas levanta muitas questões éticas. Que implicações trará para a introdução de novos cultivares na natureza? Como controlar e regulamentar o seu uso? Quais os limites, se alguns, deveremos ter na edição de genes?

A comunicação terminou com alguns casos bem conhecidos de alteração dos fenótipos silvestres por uma selecção agrícola geneticamente “cega”, feita a partir de cruzamentos e com uma metodologia de selecção que privilegiou a dimensão e o aspecto mas que levou a uma perda de diversidade genética (parâmetro que o agricultor obviamente não controla). Esta perda de diversidade pode ter sérias consequências, não apenas a nível de biodiversidade mas também económicas. Um exemplo paradigmático – e para cuja reversão a Genómica Funcional de Plantas pode agora contribuir significativamente – é a perda de genes de resistência a doenças tornando as actuais variedades mais susceptíveis. Um outro exemplo, e com o qual muitos de nós se identificam, é a progressiva perda de sabor nas variedades de tomate comercialmente disponíveis. Utilizando técnicas modernas de Engenharia Genética, uma equipa internacional reintroduziu na planta do tomate vários genes presentes na planta silvestre, mas progressivamente perdidos nos processos de selecção sem contudo perder outras características entretanto melhoradas (como textura, dimensão, etc.).

Os produtos finais da expressão destes genes são metabolitos secundários que conferem sabor como flavonoides e terpenos mas que podem ter outras finalidades biológicas como ajuda na resistência a stresses bióticos (p. ex. infecções) ou abióticos (p. ex. seca). Este caso alerta-nos pois para a importância de preservarmos variedades silvestres, seja em reservas de biodiversidade, seja em bancos de sementes (germoplasma) como um complemento essencial para uma agricultura moderna, sustentável e segura.



Exemplos de alguns frutos e vegetais seleccionados pelo Homem nas práticas agrícolas convencionais



REPORT

PLANT SCIENCE

A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor

Denise Tieman,^{1,2*} Guangtao Zhu,^{1,2*} Marcio F. R. Resende Jr.,⁴ Tao Lin,^{1,2} Cuong Nguyen,² Dawn Bies,² Jose Luis Rambla,² Kristy Stephanie Ortiz Beltran,² Mark Taylor,² Bo Zhang,² Hiroki Ikeda,² Zhongyuan Liu,² Josef Fisher,⁶ Itay Zemach,⁶ Antonio Monforte,² Dani Zamir,⁶ Antonio Granell,² Matias Kirst,⁷ Sanwen Huang,^{1,2}† Harry Klee^{1,2,†}

Modern commercial tomato varieties are substantially less flavorful than heirloom varieties. To understand and ultimately correct this deficiency, we quantified flavor-associated chemicals in 398 modern, heirloom, and wild accessions. A subset of these accessions was evaluated in consumer panels, identifying the chemicals that made the most important contributions to flavor and consumer liking. We found that modern commercial varieties contain significantly lower amounts of many of these important flavor chemicals than older varieties. Whole-genome sequencing and a genome-wide association study permitted identification of genetic loci that affect most of the target flavor chemicals, including sugars, acids, and volatiles. Together, these results provide an understanding of the flavor deficiencies in modern commercial varieties and the information necessary for the recovery of good flavor through molecular breeding.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the NSF (grant IOS-0923312 to H.K.), the China National Key Research and Development Program for Crop Breeding (grant 2016YFD0100307 to S.H.), the Leading Talents of Guangdong Province Program (grant 00201515 to S.H.), the National Natural Science Foundation of China (grant 31601756 to G.Z.), the European Research Council (grant ERC-2011-AdG 294691 YIELD to D.Z.), and the European Commission Horizon 2020 program (TRADITOM grant 634561 to A.G. and D.Z.) This work was also supported by the Chinese Academy of Agricultural Science (ASTIP-CAAS) and the Shenzhen municipal and Dapeng district governments. We acknowledge the assistance of L. Kates in fieldwork and volatile, sugar, and acid quantification.

Re-introdução de metabolitos no tomate para retomar o sabor – Um exemplo de investigação internacional no tópico da Genómica Funcional para corrigir erros de melhoramento vegetal.

Genómica Funcional de Plantas

Um futuro arriscado para a nossa agricultura? Ou para nós?

Sim...se apostarmos na ignorância!



Obrigado

Rui Malhó

(COMUNICAÇÃO APRESENTADA À CLASSE DE CIÊNCIAS NA SESSÃO DE 2 DE FEVEREIRO DE 2017)