

## O stress ambiental pode provocar mais alterações nas plantas do que a engenharia genética

*Environmental stress is the major cause of transcriptomic and proteomic changes in GM and non-GM plants*

Rita Batista<sup>1</sup>, Cátia Fonseca<sup>1,3</sup>, Sébastien Planchon<sup>2</sup>, Sónia Negrão<sup>4</sup>, Jenny Renaut<sup>2</sup>, M. Margarida Oliveira<sup>3</sup>

rita.batista@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Environmental Research and Innovation Department. Luxembourg Institute of Science and Technology, Esch-sur-Alzette, Luxembourg.

(3) Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier. Universidade Nova de Lisboa, Oeiras, Portugal.

(4) Division of Biological and Environmental Sciences and Engineering. King Abdullah University of Science and Technology, Thuwal, Saudi Arabia.

### \_Resumo

A aprovação das plantas geneticamente modificadas é precedida de vários anos de investigação intensiva de forma a garantir a sua segurança para o homem e ambiente. Recentemente demonstrámos que o *stress* da cultura *in vitro* parece ser o fator que mais influencia as diferenças proteómicas encontradas entre as plantas geneticamente modificadas (GM) e os seus controlos. Neste trabalho tentámos avaliar quantas gerações são necessárias para os efeitos da "memória" desse *stress* serem apagados. Tentámos também comparar a relevância das alterações provocadas pelo *stress* da cultura *in vitro* quando comparadas com as provocadas por outros *stresses* ambientais. Para tal seguimos três linhas de arroz durante oito gerações após a transgénese combinando técnicas de análise transcritómica e proteómica. Na geração F6 as plantas foram sujeitas a *stress* salino. Os resultados deste trabalho demonstraram que: (a) as diferenças promovidas durante a modificação genética são maioritariamente diferenças fisiológicas de curta duração, que atenuam ao longo do tempo; (b) os *stresses* ambientais podem causar mais alterações proteómicas/transcritómicas que a engenharia genética. Com base nos dados obtidos questionamos quais os ensaios que são realmente relevantes e quais aqueles claramente excessivos na avaliação do risco das plantas GM para a saúde humana e animal, plantas e ambiente.

### \_Abstract

The approval of genetically modified (GM) crops is preceded by years of intensive research to demonstrate safety to humans and environment. We recently showed that *in vitro* culture stress is the major factor influencing proteomic differences of GM vs. non-GM plants. This made us question the number of generations needed to erase such "memory". We also wondered about the relevance of alterations promoted by transgenesis as compared to environment-induced ones. Here we followed three rice lines throughout eight generations after transgenesis combining proteomics and transcriptomics, and further analyzed their response to salinity stress on the F6 generation. Our results showed that: (a) differences promoted during genetic modification are mainly short-term physiological changes, attenuating throughout generations, and (b) environmental stress may cause far more proteomic/transcriptomic alterations than transgenesis. Based on our data, we question what is really relevant in risk assessment design for GM food crops.

### \_Introdução

As preocupações com a biossegurança das plantas geneticamente modificadas têm levado os governos a implementar regras rígidas para avaliar os seus potenciais riscos antes destas serem colocadas no mercado <sup>(1)</sup>. Esta avaliação do risco é baseada na comparação entre as plantas geneticamente modificadas e os seus controlos e pretende assegurar a segurança no que diz respeito à saúde humana e animal, às plantas e ambiente.

Recentemente evidenciámos que o fator que parece mais influenciar as diferenças encontradas entre uma planta geneticamente modificada e os seus controlos é o *stress* da cultura *in vitro* imposto durante a transformação da planta <sup>(2-3)</sup>. É importante referir que a cultura *in vitro* é uma metodologia não controversa, comumente utilizada no melhoramento de plantas por exemplo para obtenção de plantas livres de pragas e de doenças causadas por bactérias, fungos e, particularmente, por vírus. Demonstrámos também que essas diferenças (causadas pelo *stress* da cultura *in vitro*) são potencialmente memorizadas ao longo das gerações, levando-nos a questionar a relevância das diferenças encontradas entre as plantas GM e os seus controlos quando da avaliação do risco <sup>(2)</sup>.

Se, de facto, as diferenças encontradas entre as plantas GM e os seus controlos forem maioritariamente alterações fisiológicas de curta duração, deverão desaparecer ao longo das gerações. Se for este o caso será de questionar quantas gerações serão precisas para que as plantas GM eliminem a memória do *stress* da cultura *in vitro*. É sabido que o extenso processo que precede a comercialização das plantas GM implica o seu

cultivo por vários anos após a modificação genética e antes da entrada no mercado. Será este período suficiente para a perda de todos os sinais epigenéticos induzidos pelos protocolos de engenharia genética?

Outra questão diz respeito à dimensão das diferenças observadas quando comparadas com as diferenças que sabemos muitas vezes acontecerem devido aos *stresses* ambientais. De facto vários estudos científicos têm evidenciado que o *stress* induz alterações transcritómicas e proteómicas nas plantas e que essas alterações podem inclusivamente alterar a sua potencial alergenicidade (4-7). As plantas que utilizamos na nossa alimentação são maioritariamente cultivadas em campo aberto e, inevitavelmente, sujeitas aos mais diversos tipos de *stress* ambientais. Apesar das estratégias da agricultura moderna tentarem minimizar estímulos indesejados, alguns fatores são imprevisíveis. Assim, potencialmente qualquer consumidor pode consumir plantas que estiveram sujeitas a períodos de *stress* ambiental durante o seu cultivo ou durante os tratamentos pós-colheita.

### \_Objetivos

Este estudo teve como objetivo principal não só perceber como as alterações promovidas pelo *stress* da cultura *in vitro* (que é inevitável durante a produção de plantas geneticamente modificadas, e que provámos ser provavelmente o fator com maior contribuição para as diferenças encontradas entre as plantas GM e os seus controlos) evoluem ao longo das gerações, mas também avaliar se diferenças promovidas por outros *stresses* ambientais *ex vitro* (neste estudo testámos a salinidade) são relevantes quando comparadas com as alterações que as plantas GM podem apresentar quando comparadas com os seus controlos.

### \_Materiais e métodos

Neste trabalho combinámos a análise proteómica (*Multiplex fluorescence 2D gel electrophoresis* acoplada à espectrometria de massa) e transcritómica (*microarrays - Affymetrix RUSGene 1.1ST ArrayStrip*) para comparar as três linhas de arroz em estudo (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponba-

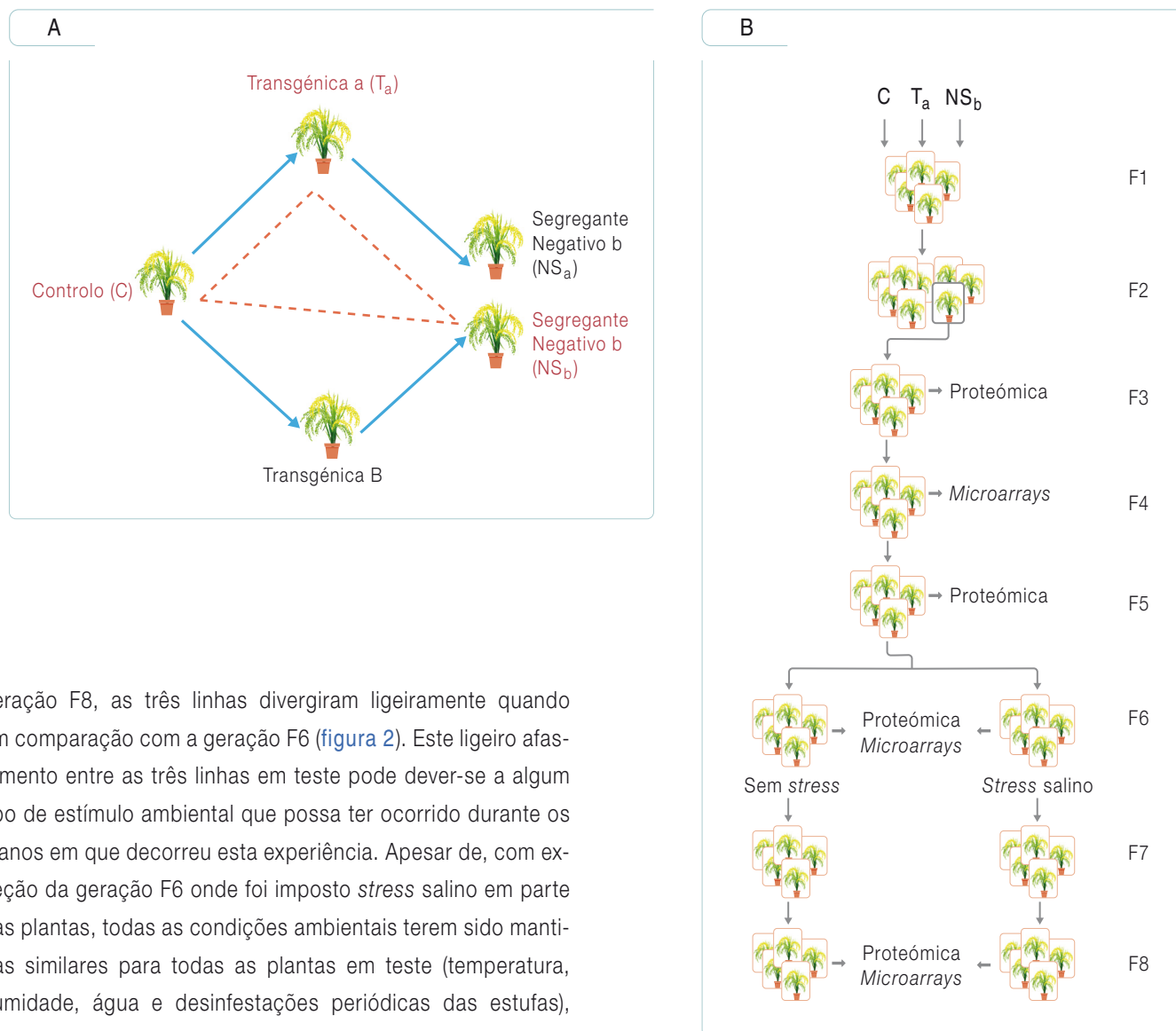
re): um controlo convencional (C), uma linha transgénica ( $T_a$ ) e uma linha segregante negativa ( $NS_b$ ) descendente de uma linha transgénica diferente ( $T_b$ ) (figura 1a). Por definição, um controlo convencional é uma linha o mais parecida possível com a linha transgénica. Neste caso, foi utilizada como controlo a linha de arroz que deu origem à linha transgénica  $T_a$ . Um segregante negativo é uma linha homozigóticas que não contém o transgene (não transgénica), obtida por auto polinização de linhas transgénicas heterozigóticas, ou por polinização cruzada entre estas e as linhas controlo convencionais. Dizem-se segregantes negativos pois são linhas que “perderam” o transgene devido à segregação mendeliana. Todas as linhas foram analisadas até à geração F8 e sujeitas a *stress* salino na geração F6 (figura 1b).

### \_Resultados

Neste trabalho confirmámos que o *stress* da cultura *in vitro* parece ser o fator que mais influencia as diferenças encontradas entre as plantas transgénicas e os seus controlos, provocando alterações que persistem ao longo das gerações e que atenuam com o tempo. De facto, os nossos dados de proteómica confirmaram que as linhas  $T_a$  e  $NS_b$  apresentam os seus proteomas alterados de forma similar ao longo das gerações ficando cada vez mais próximas da linha controlo (figura 2). No ensaio de proteómica da geração F6 já não foi possível distinguir as três linhas em teste. Demonstrámos também que, tal como para a geração F3 (2) os *spots* diferenciadamente abundantes entre as linhas  $T_a$  e  $NS_b$  vs. C na geração F5, correspondem a proteínas que podem ser relacionadas com a resposta a *stress*.

Pudemos constatar também que o número de transcritos diferenciadamente expressos entre as linhas C,  $T_a$  e  $NS_b$ , ao longo das gerações é extremamente baixo face aos 45207 transcritos analisados simultaneamente com o *array* em questão: 47, 17 e 29 transcritos diferenciadamente expressos nas gerações F4, F6 e F9, respetivamente. Os resultados de transcritómica reforçaram também a ideia de que a geração F6 foi aquela onde as três linhas em teste se apresentaram mais similares. É, no entanto, importante referir que, contrariamente ao esperado, na

Figura 1: Linhas utilizadas (A) e representação esquemática da estratégia experimental (B).



geração F8, as três linhas divergiram ligeiramente quando em comparação com a geração F6 (figura 2). Este ligeiro afastamento entre as três linhas em teste pode dever-se a algum tipo de estímulo ambiental que possa ter ocorrido durante os 4 anos em que decorreu esta experiência. Apesar de, com exceção da geração F6 onde foi imposto *stress* salino em parte das plantas, todas as condições ambientais terem sido mantidas similares para todas as plantas em teste (temperatura, humidade, água e desinfestações periódicas das estufas), algum fator não controlado pode ter sido responsável pelas diferenças observadas. Apesar desta pequena divergência observada na geração F8, no geral os nossos resultados parecem indicar que as alterações induzidas pela transgênese são escassas e vão diminuindo ao longo das gerações.

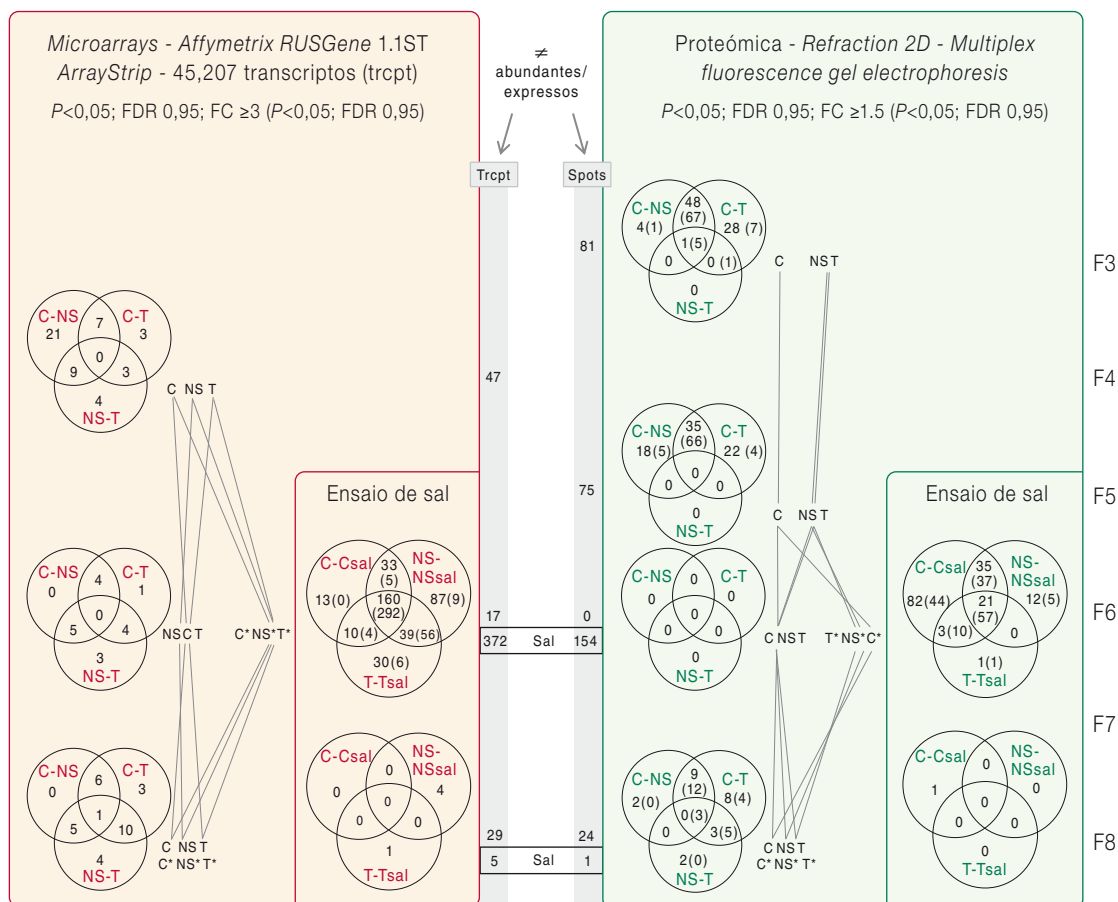
Como esperado, confirmámos que o *stress* salino influencia fortemente o proteoma/transcritoma do arroz. Encontrámos 154 *spots* diferenciadamente abundantes com uma diferença de expressão superior a 1,5 ( $FC > 1,5$ ) e 372 transcritos diferenciadamente expressos com uma  $FC > 3$  pelo menos numa das comparações (C vs. Csal; NS<sub>b</sub> vs. NS<sub>b</sub>sal and T<sub>a</sub> vs. T<sub>a</sub>sal).

Cinquenta e sete dos 154 *spots* diferenciadamente abundantes (37%) e 292 dos 372 transcritos diferenciadamente expressos (78%) viram a sua expressão alterada nas três linhas como consequência do *stress* salino (figura 2).

### \_Discussão e conclusão

É verdade que, neste estudo, o impacto da engenharia genética foi avaliado duas gerações após a transformação das plantas, e o impacto do *stress* salino foi avaliado imediatamente

Figura 2: Sumário dos transcritos diferenciadamente expressos/*spots* diferenciadamente abundantes ao longo das gerações.



Os diagramas de Venn apresentam o número de *spots* diferenciadamente abundantes com uma diferença  $\geq 1,5$  (*Fold change* (FC)  $\geq 1,5$ ) e os transcritos diferenciadamente expressos com uma diferença  $\geq 3$  (FC  $\geq 3$ ) em cada situação. Sempre que aplicado, apresentamos entre parêntesis a redistribuição destes *spots*/transcritos negligenciando a FC. Para simplificação NS<sub>b</sub>=NS; T<sub>a</sub>=T; Trcpt=Transcritos; C\*=Csal; T\*=Tsal; NS\*=NSsal; FDR=False Discovery Rate; ≠ =diferenciadamente.

após a imposição do *stress*. No entanto, a regulamentação respeitante à análise do risco das plantas GM obriga a que estas plantas sejam submetidas a uma série de testes antes de serem colocadas no mercado. A avaliação da estabilidade genética da sequência inserida/modificada e a estabilidade fenotípica da planta GM são exemplos de testes que requerem 5 gerações de análises. Assim, as plantas geneticamente modificadas que entram no mercado já passaram por várias gerações após a transgénese. Pelo contrário, todas as plantas cultivadas (GM ou não GM) são inevitavelmente expostas a diferentes *stresses* bióticos/abióticos (variações de tempe-

ratura, seca, raios ultravioletas, agentes patogénicos, etc.) e consequentemente todos os consumidores ingerem inevitavelmente plantas afetadas pelo ambiente. Porque se sabe que as condições ambientais podem influenciar a produção de proteínas eventualmente tóxicas/alérgicas (4-7), é provável que a toxicidade/alergenicidade das plantas possa variar de acordo com as condições de crescimento/processamento às quais foram sujeitas. De facto, de acordo com o *software* AlgPred (8) que prevê a alergenicidade das proteínas com base na sua sequência, 50% das proteínas que neste estudo viram a sua abundância alterada como resposta ao *stress* são

potenciais alergénios e 38% dos transcritos com expressão alterada pelo stress salino codificam para proteínas que são potenciais alergénios. Embora esta previsão, por si só, não prove a alergenicidade é indicativa de que os estímulos ambientais podem, de facto, ter impacto na alergenicidade de uma dada planta.

Se efetivamente o ambiente por si só pode originar muito mais alterações nas plantas que a engenharia genética, acreditamos ser pertinente questionar o que é relevante e o que é claramente excessivo na avaliação do risco das plantas geneticamente modificadas. Os resultados pormenorizados deste trabalho estão compilados num artigo publicado em 2017 <sup>(9)</sup>.

#### Referências bibliográficas:

- (1) EFSA Panel on Genetically Modified Organisms. Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. EFSA Journal 2011; 9(5):2150. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2150>
- (2) Fonseca C, Planchon S, Serra T, et al. In vitro culture may be the major contributing factor for transgenic versus nontransgenic proteomic plant differences. Proteomics. 2015;15(1):124-34. Epub 2014 Dec 4.
- (3) Fonseca C, Planchon S, Serra T, et al. A cultura in vitro tem impacto nas diferenças encontradas entre os alimentos transgénicos e seus controlos. Boletim Epidemiológico Observações. 2014;3(Supl 4):48-52. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2542>
- (4) Ahlholm JU, Helander ML, Savolainen J. Genetic and environmental factors affecting the allergenicity of birch (*Betula pubescens* ssp. *czerepanovii* [Orl.] Hämet-ahli) pollen. Clin Exp Allergy. 1998;28(11):1384-8.
- (5) Hänninen AR, Mikkola JH, Kalkkinen N, et al. Increased allergen production in turnip (*Brassica rapa*) by treatments activating defense mechanisms. J Allergy Clin Immunol. 1999;104(1):194-201.
- (6) Pühringer H, Moll D, Hoffmann-Sommergruber K, et al. The promoter of an apple Ypr10 gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. Plant Sci. 2000; 152(1):35-50.
- (7) Armentia A, Callejo A, Díaz-Perales A, et al. Enhancement of tomato allergenicity after treatment with plant hormones. Allergol Immunopathol (Madr). 2003;31(1):44-6.
- (8) Saha S, Raghava GP. AllPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. Nucleic Acids Res. 2006;34(Web Server issue):W202-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1538830/>
- (9) Batista R, Fonseca C, Planchon S, et al. Environmental stress is the major cause of transcriptomic and proteomic changes in GM and non-GM plants. Sci Rep. 2017;7(1):10624. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5587699/>