

Biofortificering af hvede: Kan vi forøge mængden og biotilgængeligheden af jern i frøhviden?

Søren Borg, Henrik Brinch-Pedersen, Birgitte Tauris og Preben Bach Holm. Aarhus Universitet, Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Institut for Genetik og Bioteknologi, Forskningscenter Flakkebjerg, 4200 Slagelse. prebenb.holm@agrsci.dk

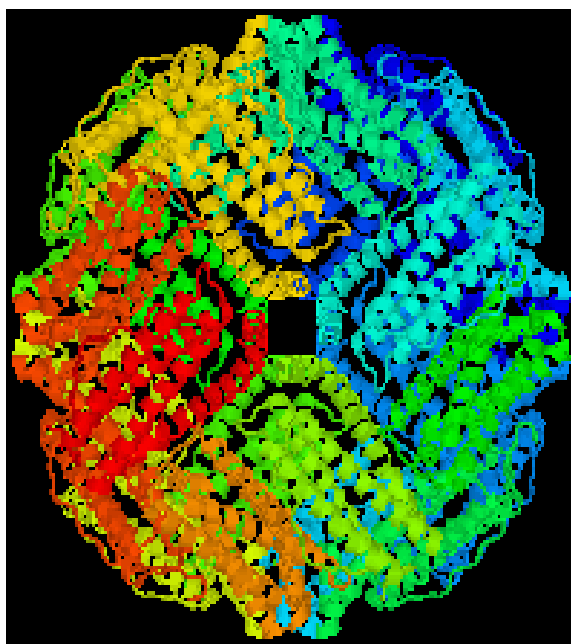
Gennem århundreder har fokus i forbedringen af vores afgrøder ligget i forædlingen mod højere udbytte, medens indholdet af essentielle mineraler stort set har været ignoreret. I de seneste år har forståelsen af de molekylære mekanismer, der ligger til grund for optagelse, transport og deponering af mineraler i planter lagt grunden til en mere målrettet angrebsvinkel for forbedring af den næringsmæssige værdi af vore afgrøder baseret på bioteknologi.

Hvede har et lavt indhold af jern, og traditionel forædling for et højere indhold synes at være særdeles besværligt. Der er en yderst begrænset genetisk variation i jernindholdet i hvedekerner, og miljømæssige faktorer som jordtype har vist sig at være meget væsentlige. Det er et yderligere problem, at omkring halvdelen af jernet i kernerne er lagret i de ydre dele af kernen og frøkimen, væv, der fjernes ved formalning af hveden til mel. I selve frøhviden er jernkoncentrationen lav. I aleurone laget, der er den yderste del af frøhviden, er jern tilmed bundet til phytat, en forbindelse, der er kendt som en meget potent hæmmer af jernbiotilgængeligheden i tarmsystemet. Forædlingsmålet er derfor at kunne forøge jernindholdet i de spiselige dele af kernen, frøhviden, og sikre at mineralet er biotilgængeligt.

Forbedring af jernstatus i kornarterne kan opnås ved forskellige strategier: 1) Forøgelse af optagelsen af jern fra jorden. 2) Forbedring af transport og fordeling af jern i planten. 3) Øgning af lagringskapacitet for jern i frøhviden. Den sidst nævnte mulighed er i dag den mest lovende metode og er opnået ved målrettet at udtrykke jernlagringsproteinet ferritin i frøhviden. Et højere indhold af ferritin i endospermen synes at foranledige en øget transport af jern ind til frøhviden. Fordelen ved at benytte ferritin er, at det er et naturligt jernbindende protein med en stor lagringskapacitet samt, at ferritin binder jern i en form, der er biotilgængelig. Ferritin er en vigtig komponent til lagring af jern hos både dyr og mennesker og er opbygget af 24 små ferritin polypeptider, der tilsammen danner en form for kugle, der kan indeholde op til 4500 jern atomer (Figur 1). Ferritin genet er reguleret på transkriptionsniveau og induceres ved overskud af jern i cellerne (Briat *et al.*, 1999). En række

undersøgelser har vist, at både animalsk og plantebaseret ferritin jern er lige så biotilgængeligt som jern i form af jernsulfat, FeSO_4 (Lonnerdal, 2007). Ferritin er derfor det ideale protein, når det gælder at øge mængden af tilgængeligt jern i kornkerner.

Goto *et al* (1999) viste som de første, at det er muligt at forøge jernindholdet i riskerner ved at udtrykke soyabønne ferritin under kontrol af en frøhvide specifik glutelin promotor. Siden har en række øvrige studier, der har anvendt den samme strategi, bekræftet, at det



Figur 1. Ferritin kugle opbygget af 24 små polypeptid ferritin subunits. (Fra www.ferritin.blogspot.com)

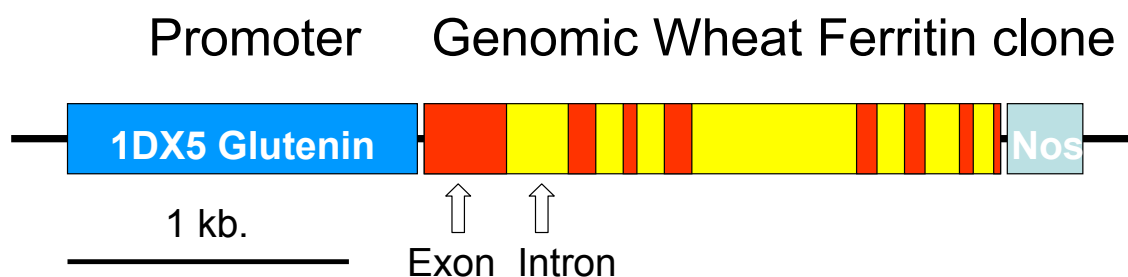


Figure 2. *TaFer1* gen konstruktion til transformation i hvede.

er muligt at øge indholdet af jern i riskernen med en faktor to til fire (Lucca *et al.*, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2003; Qu *et al.*, 2005).

I vores laboratorium har vi udviklet en række redskaber til at forstå transport og deponering af jern i hvede- og bygkernen. Vi har isoleret og klonet alle ferritin gener i hvede og vist, at hvede som ris og majs har to ferritin gener. Vi har benævnt dem *TaFer1* og *TaFer2*. Hvede er en såkaldt hexaploid, idet den er opstået ved krydsning mellem tre forskellige arter, og hvert af de tre genomer har en kopi af de to gener. Vi har undersøgt de enkelte geners udtryksniveauer og fundet, at ferritingener har et meget lavt udtryk i frøhviden sammenlignet med blade.

For genetisk modificering af hvede har vi valgt en strategi, hvor vi anvender hvedens egne ferritingener. Dette er gjort ved at benytte den genomiske klon af den mest aktive ferritin *TaFer1* og målrette dets gens udtryk til frøhviden ved at bruge en promoter fra et af hvedens egne lagerproteiner, glutenin (Figur 2). Ved at vælge at benytte hvedens egne gener, har vi taget en *cisgenetisk* frem for en *transgenetisk* tilgang i vores trans-

formationer. Dette er begrundet i, at en af befolkningens væsentligste bekymringer ved fremstillingen af transgene afgrøder synes at skyldes blandingen af genetisk materiale DNA fra arter, der ikke naturligt kan krydses med hinanden. Planter der er transformeret med gener fra andre arter, som de ikke naturligt kan krydse med, bliver derfor betragtet som "unaturlige" og mange føler sig usikre på om sådanne planter kan have en negativ effekt på sundhed og miljø. Disse forbehold prøver vi imødekomme ved *cisgenese* konceptet og derved bringe genetisk modificering mere i overensstemmelse med traditionel forædling (Jacobsen and Schouten, 2007).

Vi har fremstillet en række linier, hvor *TaFer1* konstruktion er blevet overført til almindelig hvede ved hjælp af den såkaldte partikel bombardements teknik, hvor genkonstruktionen bindes til guldpartikler, 1 mikrometer i diameter, der derefter under højt tryk skydes ind i embryonalt væv. Alle linierne viser en stigning i jernindholdet fra omkring 70mg/kg i vildtype hvede dyrket i drivhus til 120 mg/kg i de genetisk modificerede hvedeplanter. Jernets placering i hvedekernen blev undersøgt ved farvning med reagenset Perl's Prussian blue, der binder sig til jern. Som det fremgår af Figur 3 ses der i de genetisk modificerede kerner i modsætning til vildtypekernerne en blåfarvning i de yderste dele af endospermen og omkring ledningsstrengen, der ligger i den såkaldte bugfure. Ligeledes viste real time RT-PCR ekspressionsanalyser, at de transgene hvede linjer, i sammenligning med vildtype, havde et op til 40 gange højere udtryk af ferritin i frøhviden.

Vi har endnu ikke bekræftet, at det ekstra jern i endospermen er bundet til ferritin. Hvis dette er tilfældet betyder det, at den genetisk modificerede hvede kan indeholde omkring 50 mg jern/kg mel i en form, der har en høj biotilgængelighed. Da det anbefalede daglige indtag af jern er henholdsvis 15 og 10 mg for henholdsvis kvinder og mænd (under forudsætning af 15% biotilgængelighed) er det således sandsynligt, at befolkninger, der har hvedebrød som deres primære føde, vil kunne få dækket det meste eller hele deres jernbehov ved at anvende en sådan genetisk modificeret hvede.



Figur 3. Perl's Prussian blue farvning af tværsnit af genetisk modificerede og vildtype kerner.

Reference List

Briat,J.F., Lobreaux,S., Grignon,N., Vansuyt,G. (1999). Regulation of plant ferritin synthesis: how and why. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56, 155-166.

Jacobsen,E., Schouten,H.J. (2007). Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. *Trends in Biotechnology* 25, 219-223.

Lonnerdal,B. (2007). The importance and bioavailability of phytoferritin-bound iron in cereals and legume foods. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 77, 152-157.

Lucca,P., Hurrell,R., Potrykus,I. (2001). Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. *Theoretical and Applied Genetics* 102, 392-397.

Qu,L.Q., Yoshihara,T., Ooyama,A., Goto,F., Takaiwa,F. (2005). Iron accumulation does not parallel the high expression level of ferritin in transgenic rice seeds. *Planta* 222, 225-233.

Vasconcelos,M., Datta,K., Oliva,N., Khalekuzzaman,M., Torrizo,L., Krishnan,S., Oliveira,M., Goto,F., Datta,S.K. (2003). Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene. *Plant Science* 164, 371-378.

Dette projekt er blevet støttet af HarvestPlus og Aarhus Universitets Forskningsfond.