

Bælgplanter, bønner og bedre ernæring

Cristina Cvitanich, Institut for Molekylærbiologi, Aarhus Universitet. crc@mb.au.dk

Jern er et nødvendigt mikronæringsstof for alle organismer. Jernmangel er et væsentligt problem, for en stor del af verdens befolkning og især i udviklingslande, hvor folk lever af enkeltafgrøder. Dette skyldes, at jern i tilstedeværelsen af ilt danner tungt opløselige forbindelser, som er svært tilgængelige for levende organismer. Planter har udviklet mekanismer til at optage jernet fra jordskorpen, og er hovedansvarlige for at bringe jern til fødekæden. Planternes evne til at optage og lagre jern i deres spiselige dele har stor betydning for human ernæring. Formålet for den verdensomspændende organisation, "HarvestPlus", er at forbedre næringsværdien af vigtige afgrøder ved at øge deres indhold af biotilgængelige mikronæringsstoffer, som pro-vitamin A, zink og jern gennem planteforædling eller transgene teknikker. Denne proces kaldes "biofortifikation". Da bønner er vigtige afgrøder i udviklingslande, er forøgelsen af mikronæringsstoffer i denne bælgplante et af målene. Ved at studere modelbælgplanten *Lotus japonicus* og relaterede arter kan vi bidrage til forædlingen af bønner med et højere indhold af for eksempel jern og zink.

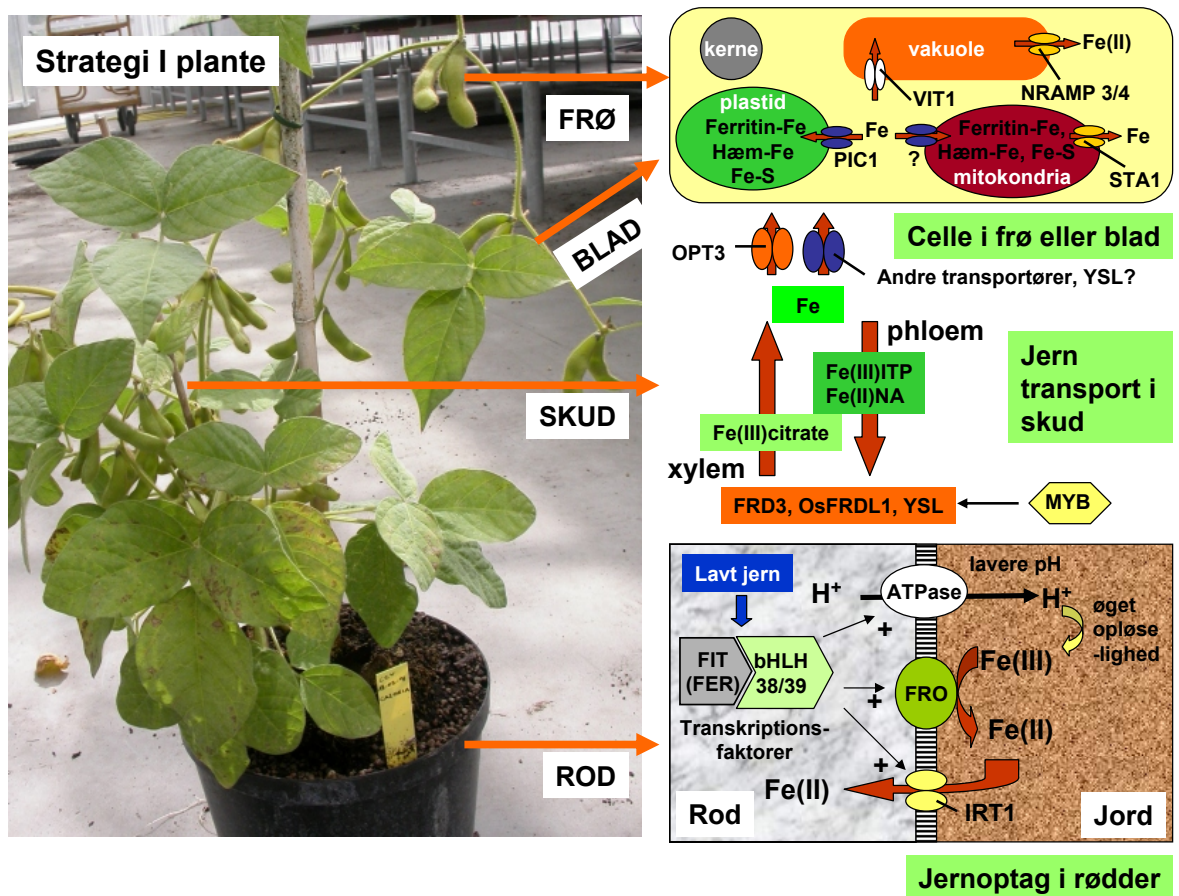
Jernmangel et stort problem for verdensbefolkningen

Det anslås, at næsten halvdelen af tilfældene af blodmangel skyldes mangel på jern^{W1}. WHO (World Health Organization) anslår, at 24,8 % af verdens befolkning lider af blodmangel, men blandt børn fra et halvt til fem år og gravide kvinder er tallet højere end 40 %^{W2}. Jernmangel, især hos småbørn, hæmmer desuden udviklingen af nervesystemet¹, hvilket har negativ virkning på samfundsudviklingen i de påvirkede områder. Småbørn og gravide kvinder i udviklingslande er de mest udsatte grupper. For eksempel skønnes 67 % af alle småbørn i Afrika at lide af blodmangel. I mange tilfælde lever disse grupper af enkeltafgrøder som for eksempel ris, majs og hvede, der kun indeholder små mængder af biotilgængeligt jern og zink. Endvidere forsvinder meget af jernet, når skallen poleres af ris og hvedekerner for at fremstille hvide ris og hvedemel. Det er ikke ligegyldigt, hvilke afgrøder måltiderne er sammensat af. Normalt er jernindholdet i kornkerner lavere end i bælgplanter. Samtidig har bønner et højt indhold af protein, men indeholder mindre af de svovlholdige aminosyrer som methionin². I modsætning hertil indeholder kornkerner mere af de svovlholdige aminosyrer, men mangler andre aminosyrer som for eksempel lysin. Dermed vil en diæt sammensat af både kornkerner og bælgplanter være mere nærende end en diæt, som består af et enkelt planteprodukt.

Hvorfor opstår der jernmangel når jorden er så rig på jern?

Selv om jordskorpen indeholder ca. 5 % jern, er dette jern ikke særligt tilgængeligt for levende organismer. Mens Fe^{2+} er letopløseligt i vand, bliver det meste jern på jordens overflade, som er rig på ilt, oxideret til tungt opløselige Fe^{3+} forbindelser. I planterne er jern en vigtig komponent af enzymer, som har afgørende betydning for fotosyntesen og respirationen, og dermed for planternes vækst og udvikling. Da planter udelukkende lever af de elementer, som findes i jorden og i luften, samt af solens energi og vand, er de afhængige af at kunne optage jernet fra jordskorpen. En betingelse for at jernet kan optages af planterne er, at det er opløseligt i vand. For at opnå en højere opløselighed af dette element har planterne udviklet flere mekanismer^{3, 4}.

Den ene som bruges mest af græsserne, og dermed kornsorterne, er baseret på udskillelsen af organiske molekyler, som binder jernet i jordpartiklerne. Dermed gøres dette vandopløseligt og kan optages af planterne. Den anden mekanisme, som bruges hovedsageligt af de andre plantetyper, benytter sig af, at jernets opløselighed stiger med faldende pH. For eksempel er opløseligheden af jern fra $\text{Fe}(\text{OH})_3$ henholdsvis 2×10^{-9} , 2×10^{-15} , 2×10^{-18} og 2×10^{-24} M ved pH 4, 6, 7, og 9. Derfor udskiller rødderne af disse planter protoner som sænker pH'en ved røddernes overflade og dermed bliver jernet mere opløseligt i netop dette område. Dernæst producerer planterne et enzym, Ferric Chelate Reductase (FRO), som reducerer



Figur 1. Gener og proteiner som regulerer jernmetabolismen i planter^{3, 8, 9}. Modificeret fra Briat³. VIT1: vacuolar iron transporter 1, NRAMP 3/4: *A. thaliana* proteiner med homologi til Natural Resistance Associated Macrophage Protein, STA1: *A. thaliana* ABC transporters, OPT3: *A. thaliana* oligopeptide transporter 3, YSL: Yellow Stripe Like transporter proteiner, FRD3 og OsFRDL1: proteiner fra MATE (Multidrug And Toxin Efflux) familien, MYB: MYB transkriptionsfaktor, FIT (FER): transkriptionsfaktorer af bHLH (basic helix-loop-helix) familien, bHLH 38/39: bHLH38 og bHLH39, FRO: Ferric Chelate Reductase, IRT1: Iron Root Transporter 1 som er en ZIP type kation transporter, Ferritin-Fe: jern bundet til ferritin, h m-Fe: jern som findes i h m grupper, Fe-S: jern som findes i svovl clusters, Fe(III)ITP: jern bundet til ITP (Iron Transport Protein), Fe(II)NA: jern bundet til NA (nicotianamine), PIC1 (Permease in chloroplasts1)

Fe³⁺ til Fe²⁺ (se Figur 1). Det er Fe²⁺ som kan optages igennem den divalent kation transportør IRT1 (som tilhører ZIP familien) i røddernes epidermis.

Ved at optage jordskorpens jern er planterne de væsentligste kilder til jern i fødekæden. Indeni planternes celler skal tilstedeværelsen af jern reguleres meget omhyggeligt. Frit jern er giftigt for cellerne, da det kan indgå i Fenton reaktioner, der producerer meget reaktive iltforbindelser, som kan ødelægge vigtige cellekomponenter, f. eks. cellemembraner. Derfor er stort set alt jernet i cellerne bundet til organiske molekyler, f. eks. citrat, nicotianamine (NA), peptider eller proteiner.

Hvilke forbindelser, jernet indgår i, har en betydning for dyrenes og menneskernes ernæring. Det vides for eksempel at jern i h m fra hæmoglobin, som findes mest i kødprodukter, er letoptageligt og dermed er ca. 20 % af det jern som findes i kød biotilgængeligt. I modsætning er det jern, som findes bundet til fosfor i for eksempel fytat eller det jern, som bindes af tanniner (garvesyre) i planteprodukter mindre biotilgængeligt. Man regner

med at ca. 5 % af det jern, som findes i planteprodukter, er biotilgængeligt.

Men disse biotilg ngelighedstal er ikke særligt præcise, da de bliver påvirket af mange faktorer⁵. Organismens behov påvirket f. eks. den effektivitet, hvormed jern bliver optaget. Således kan en person, som mangler jern, optage mere jern fra et måltid end en person, som er velern ret. Samtidig har måltidets sammensætning og tilberedning en stor effekt på jernets biotilgængelighed. Derfor vil planternes evne til at lagre jern i forskellige forbindelser, plus lagring af andre stoffer i deres spiselige dele, have betydning for jernets biotilgængelighed.

Hvor meget jern findes der i bønner, og hvad betyder det for human ernæring?

For alle planteprodukter gælder, at der er stor variation i jernindholdet mellem forskellige sorter indenfor samme art, og værdierne varierer også med vækstbetingelserne. For eksempel viser nogle studier, at jernkoncentrationen i brune ris varierer fra 7,5 til 24,4 mg jern/kg ris, i brødhvede fra 28,8 til 56,5 mg jern/kg hvede, mens bønner

indeholder fra 34 til 92 mg jern/kg⁶. Normalt antages, at ca. 5 % af det jern, som findes i korn og bønner, er biotilgængeligt. Ud fra denne antagelse skal kvinder over 18 år indtage 58,8 mg jern/dag fra disse afgrøder, mens mænd i samme aldersgruppe kan nøjes med 27,4 mg/dag (FAO/WHO)^{W3}.

Hvis man omregner det til den mængde bønner, der skal indtages pr. dag, vil værdierne for kvinderne være lidt over 600 g af de mest jernrige og 1,7 kg af de mest jernfattige bønner, mens værdierne for mændene er hhv. 300 og 800 g. Ud fra disse værdier er det tydeligt at se, hvorfor bønner med højt jernindhold vil kunne yde et væsentligt bidrag til ernæringen. Det er ikke kun jernindholdet, som varierer mellem bønnesorter, også biotilgængeligheden af jernet er forskelligt⁷. Dermed vil det være fordelagtigt, hvis højt jernindhold kombineres med høj biotilgængelighed.

"Biofortifikation" af bønner

Bælgplanteprodukter er vigtige afgrøder i udviklingslande, hvor jernmangel er et problem. Bælgplanters evne til at vokse i ufrugtbar jord takket være symbiotisk kvælstoffiksering gør dem til gode afgrøder for lavindkomstbefolkningsgrupper. Bønner, *Phaseolus vulgaris*, er den vigtigste bælgplante, som bliver brugt til direkte menneskeføde². De bliver hovedsageligt dyrket i Latinamerika og i Øst- og Sydafrika på små landbrugsejendomme (1-10 ha) på skråninger med dårlig jord.

Det Internationale Center for Tropisk Landbrug (CIAT) i Colombia, forædler nye bønnesorter med forhøjet indhold af vigtige mikronæringsstoffer som jern og zink (se artiklerne af Preben Bach Holm *et al* og Matthew Blair *et al*, samt Yassir Islam og Bonnie McClafferty i denne Biozoom udgave). Variationen af jern- og zinkindholdet i dyrkede bønner er så stor, at de ønskede forhøjelser for disse mineraler kan opnås ved traditionel planteforædling og uden at skulle bruge vilde bønnegenotyper eller transgene planter. Gode kvalitets bønnesorter med højt indhold af jern og zink er allerede blevet fremstillet, og deres effekt på human ernæring vil snart blive afprøvet i Brasilien. Men der skal forædles flere sorter, hvis de fleste forbrugere af bønner skal nås. Dette skyldes, at forskellige befolkningsgrupper foretrækker forskellige sorter samt diversiteten i vækstbetingelser.

Hvordan forædles nye bønnesorter?

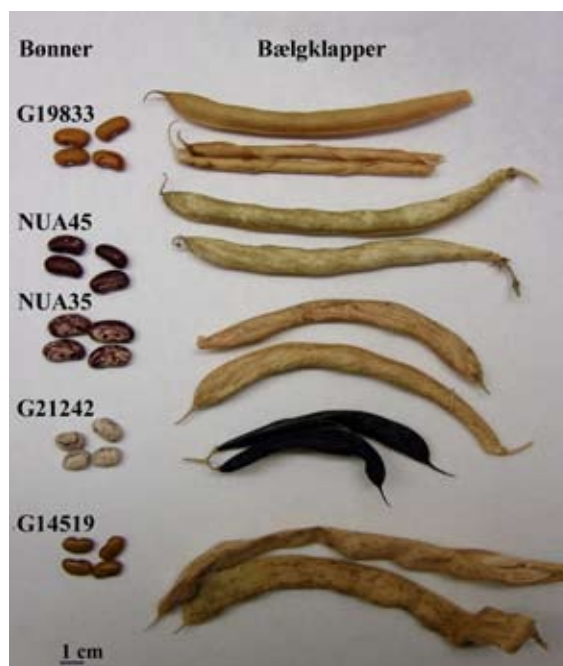
Forædling af nye høj kvalitets-bønnesorter som indeholder mere af et mikronæringsstof, f. eks. jern, opnås ved at en elite-bønnesort, dvs. en sort som foretrakkes af landmænd og forbrugere, som giver højt udbytte, og som er tilpasset vækstbetingelserne, krydses med en bønnesort, som har et højt indhold af mikronæringsstoffet. Afkommet fra dette kryds testes for de vigtigste egenskaber, f. eks. vækstegenskaber. Figur 2 viser en typisk forsøgsmark i CIAT, Colombia. Bønner med uønskede egenskaber sorteres fra, og de resterende undersøges mere detaljeret for andre ønskede egenskaber, f. eks. indholdet af mikronæringsstoffer. Bønnernes egenskaber, f. eks. ensartethed, farve og smag studeres. I



Figur 2. Forsøgsmark med nye bønnesorter i CIAT, Colombia. Planternes tilstand noteres af Hector Buendia, som er ansvarligt for at føre tilsyn med planternes vækstegenskaber.

Figur 3 kan man se nogle repræsentanter fra fem forskellige bønnesorter. Da analyserne af ca. 3000 genotyper hvert år resulterer i nogle få forbedrede bønnesorter, er processen både tidskrævende og kostbar.

Derfor er der stor interesse for at udvikle molekylære DNA-markører, som følger ønskede egenskaber. Disse DNA-markører er baseret på den genetiske diversitet, som findes mellem sorterne, og som forårsager den variation i egenskaberne, som findes mellem dem. Når man ved hvilke dele af genomet (loci), der har betydning for den ønskede egenskab, kan der bruges DNA-markører der følger disse loci til at følge egenskaben under planteforædlingen.



Figur 3. Bælgklapper og bønner fra fem forskellige bønnesorter fra CIAT, Colombia. G19833, NUA45, NUA35, G21242, og G14519 er sorterens navne.

Fordelen ved at bruge markører under forædlingsprocessen også kaldet "marker assisted breeding" er, at man kan analysere for tilstedeværelsen af flere forskellige markører og dermed loci, som er ansvarlige for flere ønskede egenskaber, i DNA fra kimplanter. Hvis man f. eks. kender, hvilke loci, der har en effekt på sygdomsresistens, udbytte, bønnestørrelse eller indhold af vigtige næringsstoffer, vil man kunne udvælge de planter, som indeholder alle disse loci allerede mens planterne er små. Dermed kan analyser og markførsøg udføres med et begrænset udvalg af linjer, som indeholder de ønskede loci.

Fra gener til markører

Hvis gener, som er ansvarlige for et karaktertræk, f. eks. højt jernindhold i frø eller høj jernbiotilgængelighed, kendes, kan der laves DNA-markører, som er specifikke for disse gener. Undersøgelser af indholdet af mikro-næringsstoffer, som f. eks. jern og zink, og ikke mindst deres biotilgængelighed, er kostbar.

De mekanismer og gener, som er involveret i planternes evne til at optage jern, har længe været studeret og flere gener kodende for jerntransporterende proteiner samt transkriptionsfaktorer, som koordinerer planternes reaktioner på jernmangel, er blevet karakteriseret de seneste år ^{3, 8, 9}, se Figur 1. Selv om der er gjort store fremskridt på området, vides kun lidt om jernlagring i frøene. Ferritin er et protein som kan danne et kugleformet molekyle bestående af 24 ferritin enheder. Denne "kugle" kan oplagre op til 4500 jernatomer.

I mennesker er dette protein involveret i jernlagring og derfor har man indtil for nyligt antaget, at ferritin også var "jernlagringproteinet" i planterne ¹⁰. Men nye resultater peger på at ferritins hovedfunktion ikke er jernlagring i planternes frø ^{11, 12}. I planternes ledningsvæv menes jern at være bundet til citrat i xylemet og til NA (nicotianamine) eller ITP (Iron Transport

Peptides) i phloemet. Jern i mitokondrier og kloroplaster findes i Fe-S clusters, i hæm forbindelser og i ferritin. Det vides ikke, hvordan jern transporten til disse organeller, men STA1, et protein fra ABC-transportører familien, er muligvis involveret i transporten af Fe-S ud af mitokondriaen. Ny viden tyder på, at vakuolen er vigtig for jernlagring i frø. I *Arabidopsis* frø er jern lagret i forbindelse med de celler, som vil danne ledningsvæv i kimbladerne ¹¹.

Mutationen af et gen, *vit1*, som koder for en transportør der er lokaliseret i vakuolens membran, resulterer i frø hvis jern er lagret længere væk fra ledningsvævet og i planter med svækket udvikling under jernmangel ¹¹. NRAMP, som tilhører en familie af transportører af divalente kationer, og som også er lokaliseret i vakuolens membran, er involveret i at mobilisere jern under frøspiring ¹³ og en transportør, AtOPT3, som tilhører en familie af oligopeptid transportører, synes at have en funktion ved jernlagring i *Arabidopsis* frø ¹⁴.

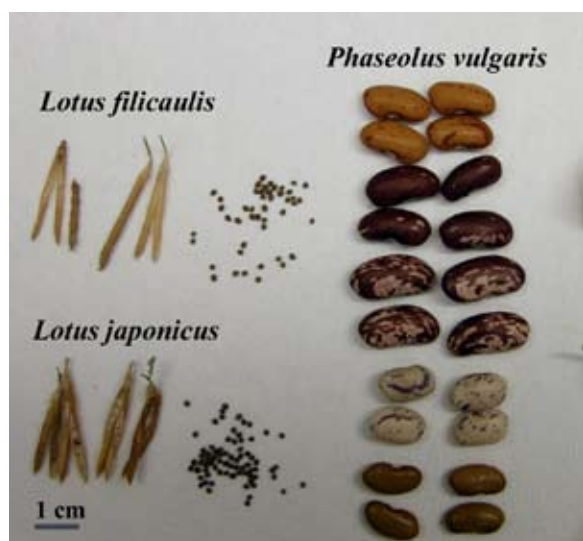
Før jernet kan nå frøene, skal den transporteres igennem plantens ledningsvæv. Nogle af de transportører som menes at være ansvarlige for at flytte jernforbindelser mellem celletyperne er transportører af YSL (Yellow Stripe Like) familien. Disse membranproteiner kan for eks. transportere Fe-NA. Deres navn stammer fra jernmangel symptomerne, i form af klorosis, i majsplanter som manglede en af disse proteiner (YS1). FRD3 og OsFRDL1, proteiner fra MATE (Multidrug And Toxin Efflux) familien, er ansvarlige for transporten af citrat til xylemet i rødderne og dermed påvirker mobilisering af jern fra rødderne til skuddene.

Udtrykket af flere af de nævnte gener bliver reguleret af jern igennem aktivering af transkriptionsfaktorer. FER fra tomat, og dets ortolog FIT1 i *Arabidopsis*, tilhører bHLH (basic helix-loop-helix) familien af transkriptionsfaktorer. FIT1 interagerer med to andre bHLH proteiner (bHLH38 og 39), når den kontrollerer jernmangel reaktionerne i rødderne. DwMYB2 er en MYB transkriptionsfaktor, som muligvis er involveret i styring af jerntransporten mellem rod og skud.

De fleste gener, som koder for ovennævnte proteiner, er blevet karakteriseret i modelplanten *Arabidopsis thaliana*. Det er muligt, at tilsvarende gener i bælgplanterne regulerer jernindholdet i frø. I vores laboratorium forsøger vi at finde ud af, om disse eller andre gener er ansvarlige for jernoplagering i bælgplanternes frø. Samtidig undersøger vi, hvor i frøene jern oplagres, samt ligheder og forskelle i jernoplagering mellem forskellige arter af bælgplanter. Vi undersøger også om jernfordelingen i bønnerne har en effekt på biotilgængeligheden.

Gener som er ansvarlige for jernoplagering i bælgplanternes frø

For at finde hvilke gener, der er vigtige for lagring af næringsstoffer i bælgplanternes frø, bruger vi modelbælgplanten *Lotus japonicus* ¹⁵. *L. japonicus* er en art, som er tæt beslægtet med den danske almindelig kællingetand,



Figur 4. Frø og bælgklapper fra to *Lotus* arter, *L. japonicus* og *L. filicaulis*, sammenlignet med de fem bønnesorter fra Fig. 2.

hvis latinske navn er *Lotus corniculatus*. Fordelen ved at bruge modelplanter er, at mange bioteknologiske teknikker, som for eksempel transformation, er veludviklede i disse planter, og at modelplanter som regel er mindre end deres dyrkede beslægtede arter og dermed kan vokse på et mindre areal og i mere kontrollerede omgivelser. Figur 4 viser størrelsesforskellen mellem bønnerne og to Lotus arter. Modelplanternes genom er også relativt lille, hvilket gør genanalyserne mere tilgængelige. For *L. japonicus* er en stor del af genomet sekventeret. Der findes en stor samling sekvenser af udtrykte gener (EST). Der er lavet Affymetrix chips, som kan bruges til at studere genregulering, og der findes samlinger af muterede planter, som f. eks. TILLING og EMS mutanter, som kan bruges til at studere funktionen af bestemte gener.

Da der er væsentlige forskelle mellem jernindholdet i frø fra *L. japonicus* sammenlignet med *L. filicaulis*, kan deres afkom bruges til at bestemme loci, som er vigtige for jernlagring i frø. Figur 5 viser *L. japonicus* og *L. filicaulis* frø farvet ved brug af Perl's Prussian Blue metoden, som giver blå farvning de steder, hvor Fe^{3+} er til stede. *L. filicaulis* frø viser stærkere blå farvning end *L. japonicus*.

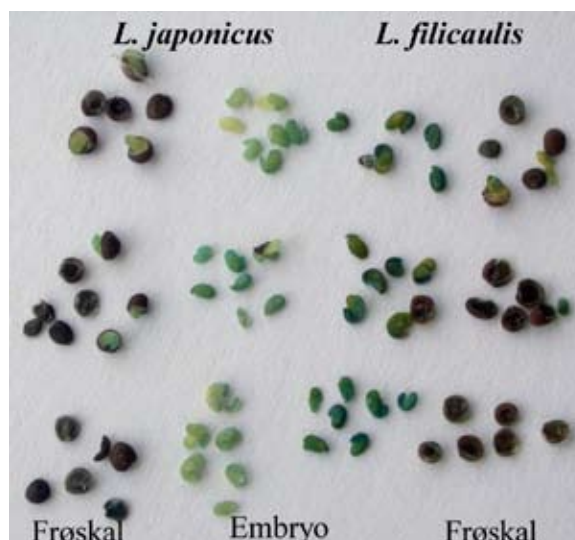
Kloning af et gen, som er ansvarligt for en bestemt egenskab eller har en betydelig indvirkning herpå, ud fra et kortlagt locus, er en krævende proces, som forenkles betydeligt, når plantens genom er sekventeret. Derfor vil *L. japonicus* sekvensdatabaser blive brugt til at undersøge kortlagte loci for tilstedeværelsen af gener, som kunne være årsagen til ændringer i jernlagringen i frø.

Endvidere undersøges det hvordan *L. filicaulis* og *L. japonicus* reagerer på jernmangel. Disse studier kan belyse hvilke mekanismer, der er årsag til forskellen i jernoptag mellem disse arter. I Figur 6 kan man se, at *L. japonicus* planter, vokset uden tilsat jern i deres vækstmedie, får typiske symptomer på jernmangel, som f. eks. gule blade.

Detaljerede undersøgelser af jernlokaliseringen i deres frø vil også vise, om den højere mængde jern bliver lagret jævnt igennem frøene, eller om der er bestemte celler eller områder af frøene, som er ansvarlige for jernlagring. Denne viden vil støtte jagten på de gener, som er ansvarlige for jernlagring i frø, da de vil pege på, hvor og hvornår i frøudviklingen, generne vil være aktive.

Jernlokalisering, gener, bedre bønner

En bedre forståelse af hvor og hvordan jern oplagres i frø, vil også støtte karakterisering af, hvilke molekyler, der er bundet til jern i frø. Disse molekyler kan påvirke biotilgængeligheden af jern og dermed have en betydning for ernæringen af dem, der spiser frøene. Derfor bliver jernlokalisering ikke kun studeret i Lotus frø, men også i bønner og i andre bælgplanter. Vores studier viser at bønner med højt indhold af jern, ligesom Arabidopsis frø, lagrer jern i forbindelse med ledningsvævet. Jern i dette område kunne ikke detekteres i bønner med

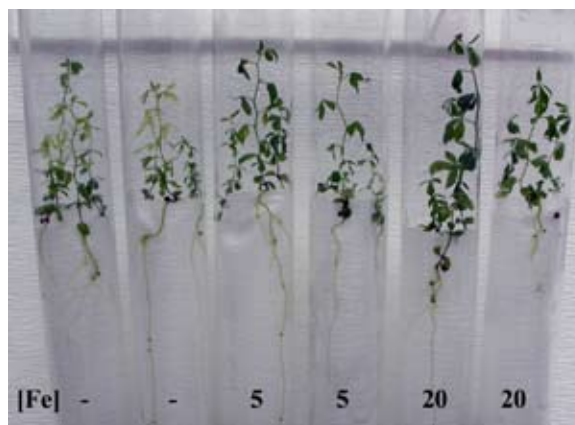


Figur 5. Perl's Prussian Blue farvning af *L. japonicus* og *L. filicaulis* frø. Jern bliver farvet blå og på billedet kan ses at *L. filicaulis* viser en kraftigere blå farvning end *L. japonicus*.

lavt jernindhold, og heller ikke i en tæt beslægtede art, *Phaseolus lunatus*.

Vores studier viste at der var tydelige forskelle i jernlagringstrategierne imellem forskellige frø, selv indenfor tæt beslægtede arter. Nogle bælgplanter ser ud til at opsamle en stor del af deres jern i frøskallen, op til 40 % af det totale jern i frøene, mens andre lagrer en ubetydelig mængde jern i frøskallen. Indenfor samme art var variationen også stor. Nogle bønner havde 20 % af deres jern i frøskallerne, mens andre har under 5 % af jernet i dette væv. Denne lokalisering kan have en stor betydning for hvor meget jern, der bliver tabt under tilberedning af måltidet, men også for biotilgængeligheden.

Hvis der findes en sammenhæng mellem biotilgængelighed og jernlokalisering, kan gener som bestemmer jernlokalisering bruges til at følge biotilgængeligheds



Figur 6. *L. japonicus* planter som er vokset i røret med plantevækstmedie hvor der ikke er tilsat jern (-), hvor der er tilsat 5 μ M jern (5) eller 20 μ M jern (20). Tydelige jernmangel symptomer, i form af gule blade og mindre vækst, kan ses på planterne som vokser uden tilsat jern (-).

egenskaben. Dermed kan studier, der sammenligner jernlokalisering i Lotus og i bønner med biotilgængelighed, danne baggrund for at avle bønner, som har et forhøjet indhold af biotilgængeligt jern og dermed være med til at afhjælpe udviklingslandenes jernsultproblemer.

Dette projekt er blevet støttet af: Aarhus Universitets Forskningsfond, Forskningsrådet for Teknologi og Produktion og HarvestPlus.

Tak til alle medarbejdere og studerende som har bidraget til dette projekt på Institut for Molekylærbiologi, Aarhus Universitet samt til vores samarbejdspartnere i Danmark, Colombia, USA og Sydafrika. En særlig tak til Jens Stougaard og Erik Ø. Jensen som muliggjorde dette projekt og til Niels Sandal for hjælpen med dette manuskript.

Referencer

1. Beard, J. L. Why iron deficiency is important in infant development. *The Journal of Nutrition (J. Nutr.)* **138**, 2534-2536 (2008).
 2. Broughton, W. J. *et al.* Beans (*Phaseolus* spp.)- model food legumes. *Plant and Soil* **252**, 55 (2003).
 3. Briat, J. F. Iron dynamics in Plants. *Advances in Botanical Research*, (ed. Delseny, J.-C. K. a. M.) 137-180 (Academic Press, 2007).
 4. Schmidt, W. Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Trends in plant science* **8**, 188-193 (2003).
 5. Zijp, I. M., Korver, O. & Tijburg, L. B. Effect of tea and other dietary factors on iron absorption. *Critical reviews in food science and nutrition* **40**, 371-398 (2000).
 6. Graham, R., Senadhira, D., Beebe, S., Iglesias, C. & Monasterio, I. Breeding for micronutrient density in edible portions of staple food crops: conventional approaches. *Field Crops Research* **60**, 57-80 (1999).
 7. Ariza-Nieto, M., Blair, M. W., Welch, R. M. & Glahn, R. P. Screening of iron bioavailability patterns in eight bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes using the Caco-2 cell in vitro model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 7950-7956 (2007).
 8. Kim, S. A. & Guerinot, M. L. Mining iron: iron uptake and transport in plants. *FEBS letters* **581**, 2273-2280 (2007).
 9. Briat, J. F., Curie, C. & Gaymard, F. Iron utilization and metabolism in plants. *Current opinion in plant biology* **10**, 276-282 (2007).
 10. Briat, J. F. & Lobreaux, S. Iron storage and ferritin in plants. *Metal ions in biological systems* **35**, 563-584 (1998).
 11. Kim, S. A. *et al.* Localization of iron in Arabidopsis seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science (New York, N.Y.)* **314**, 1295-1298 (2006).
 12. Ravet, K. *et al.* Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. *The Plant Journal : for cell and molecular biology* (2008).
 13. Lanquar, V. *et al.* Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *The EMBO journal* **24**, 4041-4051 (2005).
 14. Stacey, M. G. *et al.* The Arabidopsis AtOPT3 protein functions in metal homeostasis and movement of iron to developing seeds. *Plant Physiology* **146**, 589-601 (2008).
 15. Szczyglowski, K. & Stougaard, J. Lotus genome: pod of gold for legume research. *Trends in Plant Science* **13**, 515-517 (2008).
- W1 http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596657_eng.pdf
- W2 Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005. *WHO Global Database on Anaemia*. http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596657_eng.pdf.
- W3 FAO corporate document repository. Chapter 13: iron. <http://www.fao.org/DOCREP/004/Y2809E/y2809e0j.htm#bm19.2>