

Syntese af glucosinolater i tobaksplanter

Et skridt på vejen mod biotek-kartoffelplanter med øget sygdomsresistens

Af professor Barbara Ann Halkier, Institut for Plantebiologi og Bioteknologi, Det biovidenskabelige Fakultet, KU

Ved Det biovidenskabelige Fakultet, KU, er det lykkedes os at få tobaksplanter til at syntetisere glucosinolater – de bioaktive naturstoffer, som kendes fra f.eks. sennep og kål. Målet er at udvikle en glucosinolatproducerende kartoffel vha. bioteknologi. Dyrkning af sådanne kartoffelsorter forventes at reducere det høje pesticidforbrug i kartoffelmarkerne, og det vil være et vigtigt skridt på vejen mod et bæredygtigt landbrug.

Kartoffeldyrkning kræver højt pesticidforbrug

Med et udbytte på over 300 mio. tons (2007) er kartofler verdens 4. største afgrøde efter majs, ris og hvede, og kartofflen udgør en meget væsentlig del af kosten for befolkningerne i både rige og fattige lande. Desværre kræver afgrøden et stort forbrug af sprøjtemidler, hvis man vil undgå meget betydelige udbyttetab.

I Danmark dyrkes der kartofler på 6% af landbrugsarealet. 25% af det samlede forbrug af pesticider bruges i disse kartof-



Figur 1. Peruviansk mark med kartoffel- og mashuaplanter.

felmarker, der ofte sprøjtes 8 til 10 gange i løbet af en vækstsæson. Man kunne opnå en betydelig stigning i verdens kartoffelproduktion, hvis man udviklede bedre metoder til at bekæmpe kartoffelplantens primære patogener, såsom kartoffelskimmel.

Kartoffeldyrkningen stammer fra Andesbjergene, hvor kartofler har spillet en vigtig rolle som primær næringskilde i flere tusinde år. De oprindelige indianere havde tradition for at dyrke kartoflerne sammen med andre afgrøder som en integreret del

af et "subsistens"-landbrug. Et eksempel på sådan et afgrødemakkerpar er dyrkning af kartofler sammen med "mashua" (*Tropaeolum tuberosum*) - en tallerkensmækkeragtig plante med et stærkt naturligt forsvar (figur 1). Mashua beskytter mod sygdomsangreb på kartoffelplanterne, hvilket resulterer i større udbytter i de traditionelle dyrkningssystemer, end hvis kartoflerne dyrkes alene.

Mashua indeholder naturstofferne glucosinolater, også kaldet sennepolieglucosider. Det er bioaktive naturstoffer, som er karakteristiske for planter fra korsblomstfamilien.

Glucosinolater – bioaktive naturstoffer

Der findes over 100 forskellige glucosinolater, som alle er β -thioglucosid-*N*-hydroximosulfater (figur 2) og dannes ud fra aminosyrer. Benzylglucosinolat, som findes i mashuaplanten, syntetiseres ud fra aminosyren phenylalanin. Ved hydrolyse, som katalyseres af en β -thioglucosidase kaldet myrosinase, omformes glucosinolater vha. Lossen-omlejring til en lang række stoffer, dog oftest isothiocyanoater og nitriler. Glucosinolater, eller snarere deres hydrolyseprodukter, er planteforsvarsstoffer og er med til at beskytte planterne mod både mikroorganismer og skadedyr.

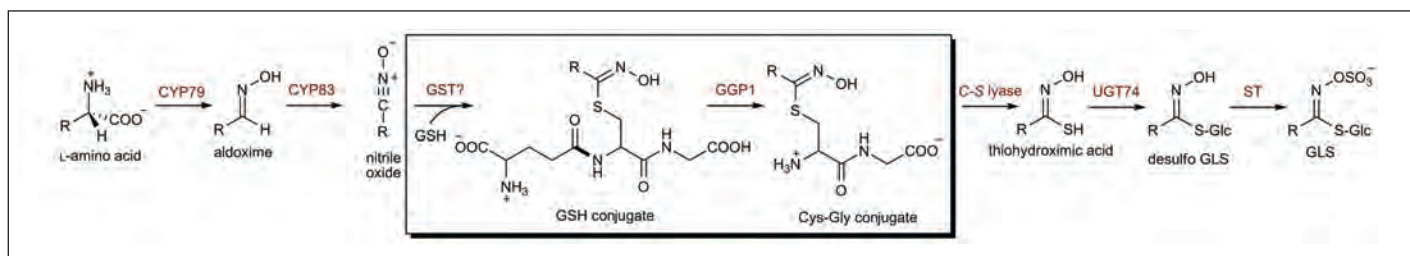
I landbruget indgår glucosinolatproducerende afgrøder, som f.eks. raps, i sædskiftet for at bryde sygdomsfremkaldende mikroorganismers livscyklus. Raps og andre *Brassica*-afgrøder dyrkes også som forafgrøde eller efterafgrøde, som pløjes ned i jorden. Her virker glucosinolaterne som biofumiganter, der bekæmper jordbårne patogener.

For mennesket er glucosinolater kendt for deres kræftforebyggende egenskaber, f.eks. i broccoli, samt for deres skarpe smag i sennep og peberrod. Studier af glucosinolater er således relevante både i miljø- og produktionsmæssige samt sundhedsmæssige og kulinariske sammenhænge.

Den lille ukrudtsplante gåsemad (*Arabidopsis thaliana*) er planteforskernes yndlingsmodelplante. Med sit lille genom var gåsemad den første planteart, hvis genom blev sekventeret. Gåsemad tilhører korsblomstfamilien, og mht. opklaringen af glucosinolatbiosyntesen har det været en stor fordel, at sekvensen for alle generne har været tilgængelig siden december 2001. Følgelig er alle generne i biosyntesen af glucosinolater tæt på at være identificeret og karakteriseret (figur 2). Dog har det som noget af det sidste været et uafklaret spørgsmål, hvor S-atomet i thioglucose-delen kom fra. Tidligere *in vivo* fodringsforsøg viste, at det ikke stammede fra thioglucose, og i den videnskabelige litteratur har det været diskuteret, om det er cystein, der donerer S-atomet.

Engineering af glucosinolater

I 2002 blev jeg kontaktet af en peruviansk kemiker, professor Eric Cosio fra Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima. Han foreslog, at vi skulle samarbejde om at introducere glucosinolater i kartoffelplanten. Dermed ville vi kombinere erfaringerne fra den traditionelle kartoffeldyrkning i Andesbjergene med moderne bioteknologiske forædlingsmetoder. Formålet var at udvikle et bæredygtigt og produktivt landbrug med et redu-



Figur 2. Biosyntesevejen for benzylglucosinolat. Boksen angiver nyligt identificerede mellemprodukter. Strukturen R=benzyl.

ceret forbrug af pesticider. Jeg blev straks fascineret af tanken, men jeg var usikker på, om det bioteknologisk ville være muligt at overføre en så kompleks biosyntesevej i en ubeslægtet planteart. Det ville i hvert fald være noget af en udfordring.

Da vi indledte vores engineering-projekt, kendte vi 5 gener i biosyntesevejen af benzylglucosinolat i gåsemad. Vi introducerede de 5 biosyntesegener i tobak vha. *Agrobacterium tumefaciens* i håb om, at tobaksplanten ville "oversætte" generne til deres respektive biosynteseenzym, og at disse enzymer ville være aktive. En top i HPLC-chromatogrammet fortalte os, at benzylglucosinolat var blevet syntetiseret, dvs. at enzymerne fra biosyntesevejen i gåsemad havde fundet sammen inde i den artsfremmede tobakscelle. Nærmere analyse ved LC-MS viste, at S-[(Z)-phenylacetohydroximoyl]-L-glutathion (GS-B) akkumulerede i langt større mængder (over 100 gange) end benzylglucosinolat. Mulige forklaringer kunne være, at mellemproduktet benzylnitriloxid var blevet detoxificeret ved konjugering til glutathion (GSH), eller at vi manglede et enzym i syntesevejen.

Gåsemad har mange år på bagen som modelplante, og der findes et væld af bioinformatiske og genomiske redskaber for denne uanseelige lille plante, heriblandt en co-ekspressions-database, dvs. en database hvor man kan se hvilke gener som co-regulerer med et givent gen. γ -Glutamylpeptidase1 (*GGP1*) var blandt de gener, hvis ekspresion korrelerede med glucosinolatbiosyntesegener. Da vi efterfølgende introducerede *GGP1* sammen med de øvrige 5 biosyntesegener i tobak, blev akkumulering af GS-B elimineret, og vi observerede øget produktion af benzylglucosinolat (figur 3, side 24). Det var de første eksperimentelle data, som indikerede, at GSH var svovldonor for S-atomet i thioglucose, hvilket er blevet yderligere bekræftet i senere forsøg.

Status for projektet og perspektiver

Det overordnede mål for det dansk-sydamerikanske samarbejdsprojekt er at øge kartoffelplantens sygdomsresistens gennem produktion af benzylglucosinolat i kartoffelplantens blade. Vi valgte at afprøve strategien i tobak, der ligesom kartofler

Patenter | Varemærker | Kommerciel rådgivning

„Ingen jubler hvis markedsandelen skrumper“

Patenter er en investering, der sikrer dig eneretten til din opfindelse og værner om din markedsposition. Beskyt din viden og optimér din konkurrenceevne. Den rette patentstrategi forvandler dine gode idéer til forretningsmæssige aktiver.

Chas. Hude A/S er blandt Danmarks førende virksomheder inden for rådgivning om Intellectual Property Rights (IPR). Vi beskytter, overvåger, håndhæver og forsvare immaterielle rettigheder for danske og udenlandske kunder. Chas. Hude blev grundlagt i 1896 og har i dag 90 medarbejdere. Mød vores kompetente profiler på www.chashude.dk

Steven Richard Kitchen,
European Patent Attorney

CHAS. HUDE

København | H. C. Andersens Boulevard 33 | 1780 København V | Telefon 33 19 34 00
Århus | Marselisborg Havnevej 36 | 8000 Århus C | Telefon 33 19 35 60 | www.chashude.dk



Bøger til den professionelle kemiker

SE MERE & BESTIL PÅ
nyttf.dk

Mikrobiologi

Fødevarer
Hygiejne
Genteknologi
Gennemgår den grundlæggende mikrobiologi med særlig fokus på de tre fagområder.

589 kr. inkl. moms

Kemisk Ordbog

Alfabetisk fortegnelse over godt 13.500 kemiske stofnavne, stofnavneforkortelser mm.

199 kr. inkl. moms

Kemisk binding og spektroskopi

Skrevet til kurser i kvantekemi, spektroskopi og kemisk binding på de kemirelaterede universitetsuddannelser.

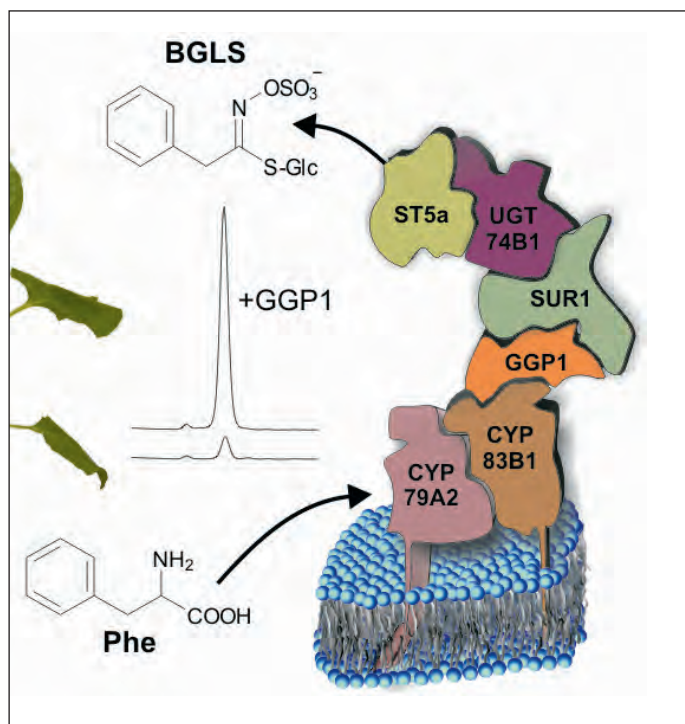
399 kr. inkl. moms

Alle priser er inkl. moms og ekskl. forsendelse. Der tages forbehold for fejl og prisstigninger.




Nyt Teknisk Forlag

BIOTEKNOLOGI



Figur 3. Skematisk fremstilling af benzylglucosinolats syntesevej med to membranbundne cytochrom P450 enzymer og 4 associerede, opløselige enzymer.

tilhører natskyggefamilien, fordi tobak notorisk er nemmere og hurtigere at arbejde med end kartoffelplanten. Vores samarbejdspartnere på "Det Internationale Kartoffelcenter" i Lima er nu i fuld gang med at introducere generne i kartoffelplanten.

Det er målet at have glucosinolatproducerende kartoffelplanter ved udgangen af 2010. De skal testes under kontrollerede forhold i drivhus. Svar herfra forventes at være klar i 2011. Først derefter følger godkendelse til markforsøg med GMO-planter, hvilket kan tage mange år.

Engineering af syntesen af benzylglucosinolat i tobaksplanter har ført til udvikling af en teknologisk platform, som kan danne grundlaget for overførsel af biosynteseveje af mange andre naturstoffer og til opdagelse af hidtil ukendte biosyntesegener.

E-mail-adresse

Barbara Ann Halkier: bah@life.ku.dk

Kilde

Geu-Flores F, Nielsen MT, Nafisi M, Møldrup ME, Olsen CE, Motawia MS and Halkier BA (2009) Engineering the production of benzylglucosinolate identifies γ -glutamyl peptidase. *Nature Chemical Biology*, 5, (publiceres 20. juli 2009). *Nature Chemical Biology*, 5, (publiceres 20. juli 2009).



KEMIKRYDS

Se Kemikryds

Side 32 - 5-lodret