

Slutrapport för projektet: En översiktsstudie av stress-inducerad glykoalkaloidsyntes i svensk matpotatis. (V0642005)

Projektet påbörjades i november år 2006 med medel från Stiftelsen lantbruksforskning. Eftersom beviljade medel var något lägre än de sökta, har den ursprungliga projektplanen i ansökningsen inte genomförts i sin helhet. Tyngdpunkten har lagts på att etablera de viktigaste metodologiska delarna inom projekt I och II i ansökan.

Sammanfattning av de viktigaste resultaten från projektet

- Resultaten visar att induktionen av glykoalkaloider i potatisknölar efter en yttre stress (skada, ljus, el. värme) varierar med både sort och stress. Detta innebär att en sort kan vara känslig för en viss stress men tolerant mot en annan, men att det omvända kan gälla för andra sorter. Resultaten tyder på att känsligheten för olika former av stress styrs av separata genetiska anlag, aktiva i samma biosyntesväg.
- En glykoalkaloidökning efter stress är korrelerad med en ökad sterolsyntes och en förändrad sterolsammansättning. Detta är i linje med hypoteser om att steroler utgör metaboliska förstadier till glykoalkaloider.
- Stressinducerad glykoalkaloidsyntes är på ett både stress- och sortberoende sätt korrelerad med ett statistiskt signifikant ändrat uttryck av mellan 150 och 200 gener. Relevant för glykoalkaloidsyntesen är att några av de sortberoende generna har en roll i sterolsyntesen. Andra identifierade sortberoende gener kan ha en roll i den fortsatta metabolismen av steroler till glykoalkaloider, och arbete pågår med att klargöra funktionen av fyra sådana gener.

II. Bakgrund

Glykoalkaloider är giftiga föreningar som förekommer främst inom familjen potatisväxter (t.ex. potatis, tomat och äggplanta). De vanligaste glykoalkaloiderna i odlade potatissorter är α -solanin och α -chakonin, vilka förekommer i hela växten, men ibland i så höga halter att knölna blir otjänliga eller rentav farliga som föda (Friedman & MacDonald 1997). Milda symptom på glykoalkaloid-förgiftning är diarré, huvudvärk och kräkningar, men även allvarigare eller tom. livshotande symptom kan uppträda. Den totala halten av glykoalkaloider (TGA) påverkas både av genetiska och yttre faktorer; vissa sorter har vanligen låga halter, andra relativt höga eller starkt varierande. För god livsmedelssäkerhet rekommenderar Livsmedelsverket en högsta gräns på 200 mg TGA/kg friskvikt i potatisknölar (SLVFS 1993:36), och analys av TGA-halten ingår i rutinmässig kvalitetsbedömning av olika potatissorter. Normalt innehåller knölar 10-100 mg TGA/kg, men ett överskridande av de högsta tillåtna halterna är inte ovanligt. Potatissorten Magnum Bonum förekommer t.ex. inte längre i den svenska sortlistan på grund av dess tendens att bilda höga TGA-halter (Hellenäs mfl 1995).

Glykoalkaloider bildas på i stort sett okända syntesvägar från steroler, vilka är livsnödvändiga membrankomponenter i djur och växter (Hartmann 1998). Vi har i vår tidigare forskning visat att kolesterol, via reaktioner som ännu ej är klarlagda, är ett troligt förstadium till glykoalkaloider (Bergensträhle m.fl. 1996). Kolesterol förekommer i de flesta växter i mycket små mängder, vanligen 1-2%, men kan hos just potatisväxter uppgå till hela 20-25 % av den totala sterolhalten. Anledningen till de höga kolesterolhalterna i dessa växter är idag okänd. Vi har både med hormonbehandling (Bergensträhle m.fl. 1993) och med hjälp av genöverföringar (Sitbon och Jonsson 2001), visat att kolesterolhalten kan sänkas i växter genom att öka aktiviteten av enzymerna SMT1 och SMT2, vilket leder sterolsyntesen mot steroler med längre sidokedjor än kolesterol. Mer specifikt har vi visat att transgen potatis med sänkt kolesterolhalt också har sänkt TGA-halt i både blad och knölar (Arnqvist m.fl. 2003), i linje med hypotesen om att kolesterol är ett förstadium till glykoalkaloider.

TGA-halten i knölar efter skörd är inte konstant, utan kan öka kraftigt vid olika former av stress, såsom ljusexponering eller mekanisk skada. Eftersom sambandet mellan basal och inducerad TGA-halt är relativt svagt är graden av denna stressrelaterade ökning svår att förutse, och behöver därför bestämmas experimentellt för varje sort. Det är inte undersökt i någon större utsträckning om känslighet mot en viss typ av stress också innebär känslighet mot alla andra, eller om känslighet mot olika former av stress är sinsemellan oberoende egenskaper.

Mål för projektet har därför varit att kartlägga den glykoalkaloid- och sterolsyntes som sker som svar på olika stresser och i olika matpotatissorter. Under projektets gång har fysiologiska skillnader i stresskänslighet mellan potatissorter identifierats och kunnat utnyttjas för att med mikroarrayanalys kartlägga de glykoalkaloid- och sterolrelaterade gener som uttrycks på ett sortberoende sätt.

Material och metoder

En standardiserad metodik för att stressa potatisknölar med en ljusstress (konstant vitt ljus, 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) skadestress (snittning), och värmestress (20 °C resp. 37 °C), har utvecklats. HPLC-analyser enl. AOAC av totala glykoalkaloider (TGA) (α -solanin+ α -chakonin) i materialet har för publikationsexperiment utförts av Sweseed AB, medan mer rutinmässiga analyser har utförts av forskargruppen. För analyser av TGA i olika svenska potatissorter har vi i inledande försök (2006 tom 2008) utnyttjat material från lokala odlare, slumpvis utvalda från prover i detaljhandeln. För att minimera variationen i testmaterialet, har vi i en pågående repetition (2009) istället själva odlat material från certifierat utsäde av 20 potatissorter. Metodik för RNA-extraktion från potatisknölar, kvantitativ PCR av genuttryck, mikroarrayanalys av RNA och statistisk analys av resultaten har också etablerats som en del av projektet.

Resultat projekt I. En översikt av basal och stressinducerad TGA-halt i svenska matpotatissorter.

En inledande studie påbörjades i december 2006 av sorterna 'King Edward' och 'Bintje'. Material från två oberoende producenter av resp. sort standardiserades avsv. vikt och utseende. Prover om tre knölar vardera analyserades i duplikat efter att ha utsatts för en ljusstress under 96 timmar, skadestress under 48 timmar, eller värmestress vid 20 °C eller 37 °C under en vecka. TGA-halterna har i 'King Edward' ökat med 40-50% på kort tid, medan 'Bintje' inte uppvisar någon nämnvärd ökning (Fig. 1). Resultaten visar 'King Edward' som den mer stresskänsliga sorten av de två. Beträffande inbördes känslighet och trend är resultatet i god överensstämmelse med gruppens tidigare arbeten. Resultaten visar att framför allt ljusstress i 'King Edward' kan inducera en TGA-ökning mycket snabbt; inom 12 timmar var svaret i stort sett lika starkt som efter 96 timmar.

Prover togs samtidigt från de stressade knölarerna för parallella analyser av sterolhalter, klorofyll, metaboliska profiler och genuttryck. Sammantagna kommer resultaten att kunna ge en värdefull totalbild av de olika processer som sker i potatisknölar under stress.

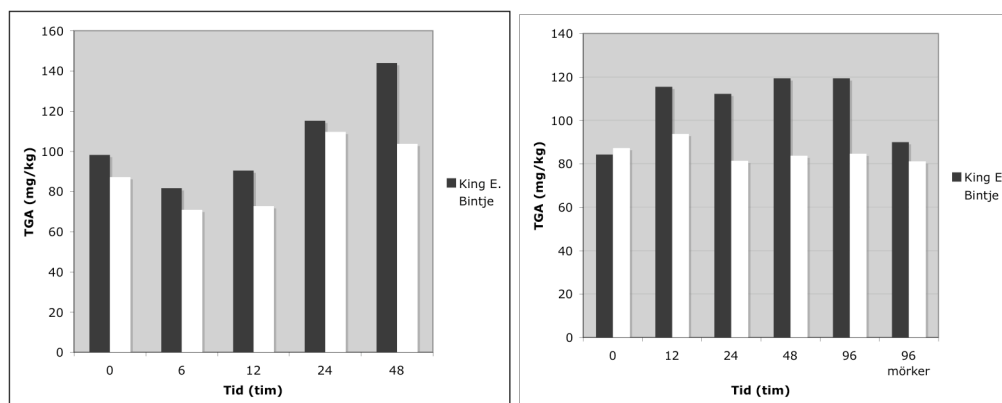


Fig. 1. TGA-halter i potatisknölar av sorterna 'King Edward' (mörka staplar) och 'Bintje' (ljusa staplar) utsatta för en skadestress (t.v.) och ljusstress (t.h.). Kvantifieringar i duplikat av prover om tre knölar för resp. sort och tidpunkt. Medelvärde från två oberoende försök med material från två skilda producenter för resp. sort. Ökningar är statistiskt signifikanta (ANOVA, $p < 0.05$) för båda sorterna efter skada, men endast i 'King Edward' efter ljus exponering.

Ett utökad stressförsök utfördes hösten 2007 med de tre sorterna 'Asterix', 'Ditta', 'Sava', jämte som tidigare 'King Edward' och 'Bintje'. Resultaten visade att stresskänsligheten varierar beroende både på stress och på sort; 'King Edward' var känslig för skada, ljus och värme i 37 °C (men inte rumstemperatur i en vecka), medan både 'Asterix' och 'Ditta' var känsliga mest för skada, och 'Sava' och 'Bintje' var relativt toleranta mot alla stresserna. Dessa olikheter i stressvar tyder på att ökningen av TGA efter skade-, ljus- eller värmestress medieras av delvis skilda mekanismer. Ett större försök med 10 sorter och 3 stresser genomfördes hösten 2008. Försöket håller f.n. (hösten 2009) på att repeteras med 20 sorter som odlats och lagrats parallellt. Detta väntas minimera resultatvariation beroende på olika producenters odlingsförhållanden/behandling av knölar efter skörd, och därigenom maximera de sortberoende skillnaderna i de olika stressvaren.

Projekt II. Analyser av sterolsammansättning i ljus- resp. skadestressad potatis.

Sterolomsättningar. Parallellt med analyser av TGA har innehållet av steroler analyserats i samma provmaterial. Resultaten visar att halten av kolesterol, ett sannolikt förstadium till glykoalkaloider, efter stress ökar signifikant mellan 2 till 5 gånger i både 'King Edward' och 'Bintje' (Fig. 2), och att detta är korrelerat med att TGA också ökar (Fig. 1). Omvänt skedde ingen signifikant ökning av TGA i 'Bintje' efter ljusstress, och en ändrad kolesterolhalt var heller inte signifikant. Resultatet är väl i linje med kolesterol som troligt förstadium till glykoalkaloider. För att studera detta vidare har kolesterol inmärkt med stabila väteisotoper anskaffats, och metodik för att studera det inmärkta kolesterolets omvandlingar till glykoalkaloider med hjälp av HPLC kopplat till masspektrometri har börjat utvecklas. Dessa försök väntas otvetydigt kunna fastställa kolesterol som ett metaboliskt förstadium till glykoalkaloider.

Genuttryck. De erhållna resultaten tyder på skillnader i stresskänslighet mellan 'King Edward' och 'Bintje' avseende både glykoalkaloid- och sterolsyntes. För att försöka identifiera dessa skillnader genetiskt har vi i samarbete med The Institute for Genomic Research, USA, under projektets gång (år 2007) med mikroarray analyserat stressändringar av aktiviteten av 15000 gener i potatisens genom. Mot bakgrund av de växtgenom som sekvenserats fullständigt antas detta antal gener representera ungefär hälften av antalet gener i potatis.

Resultaten efter en ljus- resp. skadestress visar som väntat på stark induktion av gener med en roll i fotosyntes och skaderespons, men även på en statistiskt signifikant induktion av gener med bl.a. en roll i isopren/sterolmetabolism. Detta är väl i linje med de steroländringar

vi påvisat i materialet. Intressant är att flera gener induceras endast, eller klart starkast, i 'King Edward' jämfört med 'Bintje', och att geninduktionen sker samtidigt med eller före glykoalkaloid-induktionen. Denna typ av gener kan därför tänkas ha en nyckelroll i glykoalkaloidsyntesen. Vissa gener induceras både av ljus och av skada, andra av antingen/eller. Dessutom aktiveras vissa gener med en roll i andra metaboliska reaktioner, och det är tänkbart att dessa gener kan ha en nyckelroll i de senare delarna av glykoalkaloidsyntesen. Resultaten visar också på överlag stora skillnader mellan 'King Edward' och 'Bintje' i stressvaret på gennivå. Av de gener som induceras efter skada och ljusexponering är flertalet unika för resp. sort (Fig. 3).

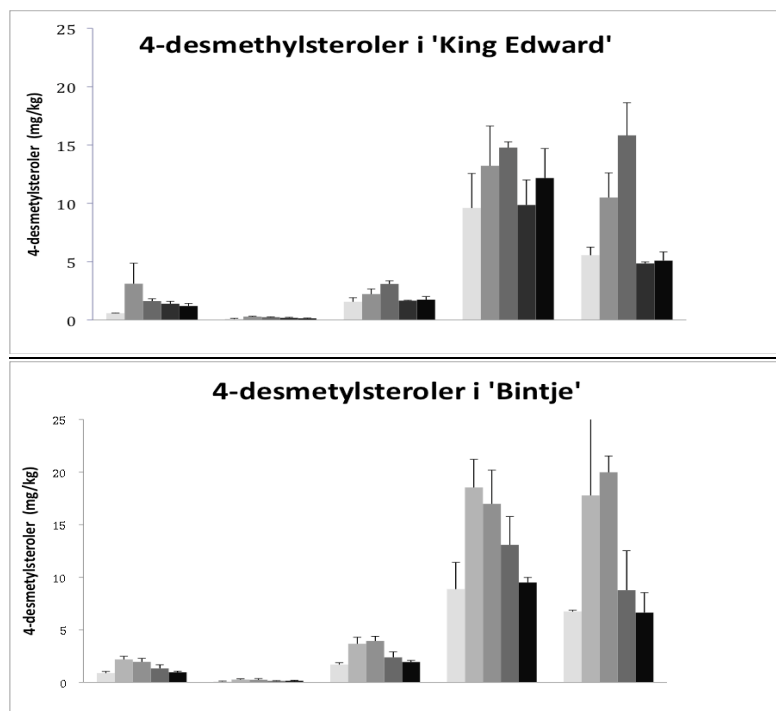


Fig. 2. Innehåll av 4-desmetylsteroler i potatisknölar av sorterna 'King Edward' och 'Bintje' efter en skade- resp. ljusstress. Steroler extraherades och analyserades på GC med 5 α -cholestan som inre standard. Grupper från vänster till höger: kolesterol, campesterol, stigmasterol, sitosterol, isofucosterol. Staplar från vänster till höger: kontroll, skada 24h, 48h, ljus 48h, 96h. Medelvärden av 3 separata extraktioner analyserade i duplikat \pm SD. En ökad kolesterolhalt relativt kontroll är signifikant (t-test) för alla behandlingar och sorter, utom för ljusbehandling av 'Bintje'.

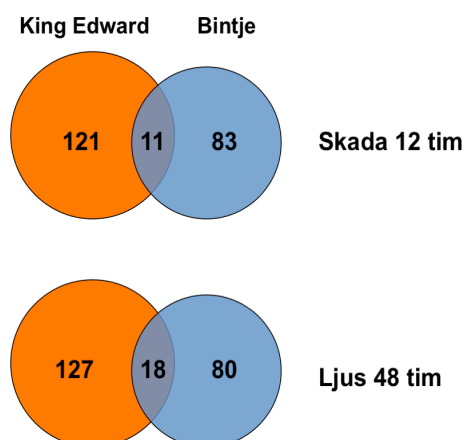


Fig. 3. Antal gener med signifikant ändrat uttryck efter en skade- resp. ljusstress. Genaktivitet analyserades med en TIGR 10.4 array i duplikatprover efter stress. Signifikant ändrade gener i resp. sort relativt kontrollprovet taget före försökets början analyserades med B-statistik ($p < 0.0001$).

Diskussion

Resultaten visar att en stress av potatis leder till en komplex metabolisk omfördelning av kol och kväve till glykoalkaloider, på ett sätt som varierar med både stress och sort. Detta tyder på att känslighet för en viss stress åtminstone delvis styrs av genetiska egenskaper som är specifika för varje potatissort, men som är aktiva i en och samma biosyntesväg. Genom att jämföra induktionsprofiler av ca 15000 gener i en stresskänslig sort med de i en mer stresstolerant, har vi identifierat aktivitet av ett fåtal gener som kan tänkas utgöra genetiska skillnader mellan de båda sorterna. Denna nya kunskap om stressinducerade gener som medverkar i glykoalkaloidsyntesen ger nu möjlighet att genetiskt och biokemiskt mer ingående studera på vilket sätt vissa potatissorter bildar mer glykoalkaloider än andra. Sådana resultat kan på sikt utnyttjas för att identifiera genetiska markörer för stresskänslighet, och arbete pågår med att analysera genregulatoriska sekvenser (promotorer) i olika potatissorter. Resultaten har dessutom identifierat gener som kan tänkas ha en roll i de okända enzymatiska steg i glykoalkaloidsyntesen som sker efter det att steroler har bildats. Arbete pågår med att öka eller blockera uttrycket av de identifierade nyckelgenerna i transgena växter för att studera genernas roll i glykoalkaloidsyntesen.

Vår studie är oss veterligen första där mikroarrayanalys utnyttjats för att förstå mekanismer bakom sortberoende genetiska skillnader i potatis. Av tekniska skäl har endast ungefär hälften av potatisens gener täckts med studien. En större mikroarray med närmare 26 000 gener blev kommersiellt tillgänglig under mitten av 2009. Detta antal gener antas kunna täcka nästan alla gener i potatis. Med stor sannolikhet kommer mikroarrayanalyser liknande den vi gjort att i en nära framtid kunna utnyttjas för att förstå en rad genetiska skillnader som är relevanta för potatis, t.ex. skillnader rörande resistens mot skadegörare.

Utifrån resultaten bedömer vi att ljusexponering är den stressform som i praktiken ger störst risk att öka glykoalkaloidhalten i potatisknölar efter skörd. Denna risk bör tas i beaktande vid transport och förvaring av potatis. Det är därför viktigt att de potatissorter som idag finns i handeln, liksom nya sorter inom olika förädlingsprogram, karaktäriseras avseende både basala och ljusinducerade glykoalkaloidhalter.

En tänkbar tillämpning av de hittills erhållna resultaten är att olika potatissorter i ökad utsträckning rutinmässigt behandlas för att minimera risken för glykoalkaloidökningar efter skörd. Exempelvis bör ljuskänsliga sorter som 'King Edward' inte förvaras ljusst eller i påsar med genomskinliga fönster. Förvaring av delikatesspotatis i genomskinliga plastpåsar ter sig också olämplig, åtminstone till dess att sorternas ljusstolerans fastställts i stressförsök.

Resultatförmedling

Vi har presenterat de inledande resultaten från projektet i en populärt skriven artikel i Potatis och Grönsaker (1). Resultat från projektet har också presenterats i seminarieföreläsning på Livsmedelsverket (2). Ett manuskript där stress-inducerade TGA-ökningar kopplas till ändrad genexpression är under färdigställande och kommer att insändas för vetenskaplig granskning i början av 2010 (3). Delar av arbetet har också presenterats på nationella såväl som internationella vetenskapliga konferenser i bl.a. i Uppsala, Linköping, och Umeå, liksom i USA och Frankrike.

1. Sitbon, F., Dutta, P., Jonsson, L. 2008. "Det går att sänka halten av glykoalkaloider". Potatis & grönsaker 11: 32
2. Sitbon, F. Reglering av glykoalkaloidsyntesen i potatis. Seminarium på Livsmedelsverket 090511
3. Nahar, N., Beste, L., Dalman, K., Jonsson, L., Dutta, P., Sitbon, F. Expression profiling of two potato cultivars in relation to their glykoalkaloid level during a light or wounding stress, reveals potential key genes in glykoalkaloid synthesis. Manuskript under färdigställande

Samarbeten: Vi har under projektets gång initierat samarbeten med prof. Thomas Moritz, UPSC, Umeå, för en metabolomisk analys av stressrespons i potatisknölar och LC-MS av glykoalkaloider. Anders Magnusson, Swegro, har varit en värdefull kontakt rörande sortval och för att närmare knyta projektet till handelsledet. Kontakt med doc. Christer Andersson, Livsmedelsverket, har också tagits för samarbete rörande andra typer av alkaloider i potatis.

Fortsatta arbeten

Resultaten visar att skillnader i den glykoalkaloidökning som sker efter stress finns både avseende stress och sort. De stora skillnader i stressinducerad genreglering som projektet visat mellan de båda testade sorterna understryker detta. Detta innebär att risken för en ökad glykoalkaloidsyntes i ett parti av en viss potatissort inte kan förutses utifrån den basala halten vid skörd, utan är en sortberoende egenskap som behöver bestämmas experimentellt för varje enskild stress och sort. Projektet visar därför att utökade studier av stressinducerade glykoalkaloidhalter i olika potatissorter är nödvändiga för att bibehålla en god kvalitet och säkerhet av potatis som livsmedel.

Vi bedömer att en inledande fas av projektet nu är avslutad. Stödet från Stiftelsen lantbruksforskning har varit mycket värdefullt för att etablera projektet, och öppnar för kommande större studier såväl som praktiska tillämpningar av resultaten. Gruppens fortsatta arbeten kommer att inriktas på ett effektivt utnyttjande av de nu uppsatta försökssystemen för att generera så mycket ny kunskap som möjligt om glykoalkaloider och hur de bildas i olika potatissorter och under olika förhållanden. Exempel på sådana kommande arbeten är biokemiska analyser av biosyntesvägar, utökade arrayanalyser, liksom mer tillämpade studier av stresskänsligheten i olika potatissorter och förpackningens betydelse för ljusinduktion av glykoalkaloider.

Stiftelsen lantbruksforskning tackas för sitt stöd till projektet.

Uppsala 091109

Folke Sitbon, projektansvarig

Litteratur

- Arnqvist L, Dutta P, Jonsson L & Sitbon F (2003) *Plant Physiol* 131:1792-1799
Bergensträhle A, Tillberg E & Jonsson L (1993) *Physiol Plant* 89:301-308
Bergensträhle A, Borgå P & Jonsson L (1996) *Phytochemistry* 41:155-161
Friedman M & McDonald GM (1997) *Crit Revs. Plant Sci.* 16:55-132
Friedman M & McDonald GM (1999) *i Impact of Processing on Food Safety*, Plenum Publ. NY pp. 121-143
Hartmann M-A (1998) *Trends Plant Sci* 3:170-175
Hellenäs K-E, Branzell C, Johnsson H & Slanina P (1995) *J Sci Food Agric* 68:249-255
Olsson K. (1986) *Potato Res.* 29:1-12
Percival G. (1999) *J. Sci. Food Agric.* 79:1305-1310
Sitbon F & Jonsson L (2001) *Planta* 212:568-572