



Doctoral Thesis

## Genetic engineering towards $\beta$ -carotene biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) endosperm

**Author(s):**

Burkhardt, Peter

**Publication Date:**

1996

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001592222> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 11573

**Genetic engineering towards  $\beta$ -carotene biosynthesis in  
rice (*Oryza sativa* L.) endosperm**

A dissertation submitted to the  
**Swiss Federal Institute of Technology Zürich**

for the degree of  
**Doctor of Natural Sciences**

presented by  
**Peter Burkhardt**  
Dipl.-Biol.  
Universität Hohenheim

born March 12, 1963  
in Stuttgart, Germany



accepted on the recommendation of  
**Prof. Dr. I. Potrykus, examiner**  
**Prof Dr. N. Amrhein, co-examiner**  
**PD Dr. P. Beyer, co-examiner**

**1996**

## Summary

Vitamin A deficiency is a serious problem in Southeast Asia. Indica rice as a major staple in this region completely lacks vitamin A or compounds with provitamin A activity. The aim of this work was to identify possible ways to initiate provitamin A biosynthesis in rice endosperm. Provitamin A-containing rice could provide an easy and convenient way to overcome vitamin A deficiency without requiring those people who rely predominantly on rice as a staple food to alter their dietary habits.

$\beta$ -carotene in plants can serve as provitamin A for mammals. Carotenoid biosynthesis is a branch of isoprenoid metabolism in plants. For this reason the status of isoprenoid biosynthesis in rice endosperm was assessed. The presence of geranyl geranyl diphosphate, the direct precursor of the first carotenoid-specific intermediate, phytoene, was demonstrated. The transformation of rice with phytoene-synthase and phytoene desaturase-encoding constructs was therefore expected to lead to the accumulation of further intermediates in the biosynthesis of  $\beta$ -carotene that had not been present before.

For rice transformation, two sets of cDNA constructs were made using daffodil phytoene synthase and phytoene desaturase sequences. The first set made use of the constitutive CaMV 35S promoter and the second of the endosperm-specific rice Gt1 promoter. In both cases a hygromycin phosphotransferase gene under control of a CaMV 35S promoter was linked as a selectable marker gene for rice transformation. In order to assess the functionality of these constructs a transient expression system using immature wheat and maize endosperms as targets for microprojectile bombardment was established. However, only the activity of the Gt1 promoter fused to a reporter gene could be clearly demonstrated using wheat immature endosperm.

As a prerequisite for stable rice transformation the suitability of several indica rice varieties for tissue culture was assessed. The most responsive varieties were used for transformation experiments via microprojectile bombardment. For this purpose a particle inflow gun was used. These experiments did not result in the production of transgenic plants. Therefore, immature embryos of japonica rice variety Taipei 309 was used as a model system. 220 transgenic plants containing various constructs could be regenerated from microprojectile bombardment experiments using a particle inflow gun. Molecular analysis of these plants revealed the presence of the respective chimeric transgenes used for transformation.

RT-PCR analysis demonstrated the presence of the corresponding mRNA, thus revealing the expression of the phytoene synthase cDNA in transgenic rice tissue. Protein analysis showed the presence of the mature phytoene synthase in transgenic rice seeds. The immunoreactive signal detected clearly indicated the import and processing of the phytoene synthase preprotein in the amyloplast compartment of rice endosperm.

In transgenic plants transformed with the phytoene desaturase cDNA no immunoreactive signal was detected in seeds. Biochemical analysis of transgenic rice seeds from these plants did not reveal the presence of  $\zeta$ -carotene, the expected enzyme product.

Biochemical analysis of transgenic rice seeds from plants transformed with the phytoene synthase cDNA unequivocally demonstrated the presence of up to 0.74  $\mu\text{g}$  phytoene per gram endosperm tissue. The transgene was inherited in the next generation in a Mendelian manner as shown by segregation of antibiotic resistance and Southern blot analysis. The seeds of  $R_1$  plants also produced phytoene in their endosperms.

Thus, for the first time it could be demonstrated that carotenoid biosynthesis in rice endosperm tissue is, in principle, possible. This opens the way for engineering of  $\beta$ -carotene biosynthesis in rice endosperm by subsequently introducing the other genes necessary.

## Zusammenfassung

Der Mangel an Vitamin A ist ein schwerwiegendes Problem in Südostasien. Indica Reis, das Hauptnahrungsmittel in dieser Region, enthält weder Vitamin A noch Stoffe, mit Provitamin A-Eigenschaften. Das Ziel dieser Arbeit war es, Wege aufzuzeigen, um die Vitamin A-Synthese im Reisedosperm zu ermöglichen. Provitamin A-haltiger Reis würde auf einfache und elegante Art und Weise den Vitamin A Bedarf der Menschen decken, die sich hauptsächlich von Reis ernähren, ohne dass sie ihre Ernährungsgewohnheiten umstellen müssten.

$\beta$ -Carotin aus Pflanzen dient Säugetieren als Provitamin A und die Carotinoidbiosynthese in Pflanzen ist ein Zweig des Isoprenoid Stoffwechsels. Aus diesem Grund wurde zuerst die Isoprenoidbiosynthese im Reisedosperm untersucht. Dabei wurde Geranyl-geranyl-diphosphat (GGPP) zweifelsfrei nachgewiesen. GGPP ist die direkte Vorstufe von Phytoen, des ersten spezifischen Zwischenprodukts der Carotinoidbiosynthese. Damit konnte davon ausgegangen werden, dass eine Transformation von Reis mit Phytoensynthase- und Phytoenedesaturase-cDNAs zu einer Bildung von weiteren Zwischenprodukten der  $\beta$ -Carotinbiosynthese führt, die vorher nicht vorhanden waren.

Um Reis zu transformieren, wurden Phytoensynthase und Phytoenedesaturase cDNA-Sequenzen aus der Narzisse verwendet. Beide Sequenzen wurden sowohl an den CaMV 35S Promotor als auch an den Reis Gt1 Promotor gekoppelt. Der CaMV 35S Promotor wird konstitutiv exprimiert, während der Gt1 Promotor endospermspezifisch ist. In alle Konstrukte wurde das Hygromycinphosphotransferasegen unter der Kontrolle eines CaMV 35S Promotors als selektierbares Markergen eingefügt. Die Funktionsfähigkeit der Konstrukte sollte mit Hilfe eines eigens entwickelten transienten Expressionssystems durch Mikroprojektilbeschuss von unreifem Endospermgewebe aus Weizen und Mais getestet werden. Diese konnte jedoch nur für den Gt1 Promotor über ein Reportergen klar gezeigt werden.

Als Grundvoraussetzung zur Transformation von Indica Reissorten wurden verschiedene Varietäten auf ihre Eignung für die Gewebekultur getestet. Die am besten geeigneten Varietäten wurden zu Transformationsexperimenten mittels Mikroprojektilbeschusses, unter Verwendung einer "particle inflow gun", eingesetzt. Aus den Versuchen gingen jedoch keine transgenen Pflanzen hervor. Aus diesem Grund wurden unreife Embryonen der Japonica Sorte Taipei 309 als Transformationsmodell verwendet. Aus Transformationsexperimenten mit der "particle inflow gun" konnten 220 transgene Pflanzen regeneriert werden.

Mittels molekularer Analysen konnten alle verwendeten chimären Konstrukte in diesen Pflanzen nachgewiesen werden. Das Vorhandensein von mRNA und damit die Expression der Phytoensynthase in transgenem Reisgewebe konnte mittels RT-PCR gezeigt werden. Analyse transgener Reiskaryopsen wies eindeutig das Protein der Phytoensynthase nach. Der Import und die korrekte Verarbeitung des Vorläuferproteins der Phytoensynthase in Amyloplasten des Reisendosperms konnten anhand der Grösse des Antikörpersignals klar gezeigt werden.

In Pflanzen, die mit der Phytoendesaturase cDNA transformiert waren, konnte kein spezifisches Antikörpersignal nachgewiesen werden. Biochemische Untersuchungen der Karyopsen dieser Pflanzen erbrachten auch keinen Hinweis auf  $\zeta$ -Carotin, das zu erwartende Enzymprodukt.

Eine biochemische Untersuchung von phytoenesynthase-transgenen Reiskaryopsen ergab bis zu 0,74 ppm Phytoen im Endosperm. Auch die Samen der R<sub>1</sub> Pflanzen produzierten Phytoen in ihrem Endospermgewebe. Die Vererbung des Transgens nach den Mendelschen Gesetzen, konnte durch die Aufspaltung des selektierbaren Markergens und durch molekulare Analysen bewiesen werden.

Damit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die Carotinoidbiosynthese im Reisendosperm prinzipiell möglich ist. Die Übertragung der restlichen benötigten Gene könnte auf diese Weise zur Synthese von Provitamin A im Reisendosperm führen.