

文章编号: 1000-8551(2005)05-404-05

富铁水稻研究进展

王雪艳¹ 左晓旭¹ 舒小丽¹ 吴殿星^{1,2}

(1. 浙江大学原子核农业科学研究所, 浙江 杭州 310029; 2. 浙江大学水稻生物学国家重点实验室, 浙江 杭州 310029)

摘要: 本文简述了水稻品种间铁含量的差异性及其遗传控制, 综述了采取提高铁绝对含量及增加其生物有效性开展富铁水稻的研究进展, 包括常规育种、诱变育种、转基因技术。对富铁水稻研究中存在的问题及诱变技术在该方面的应用前景也作了探讨。

关键词: 水稻; 铁; 生物有效性

ADVANCES IN HIGH IRON RICE RESEARCH

WANG Xue-yan¹ ZUO Xiao-xu¹ SHU Xiao-li¹ WU Dian-xing^{1,2}

(1. Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang, 310029;

2. State Key Lab of Rice Biology, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang, 310029)

Abstract: The genetic variability among rice varieties and genetic control of iron content in rice grain were briefly summarized. Progresses in breeding for rice enriched with iron content were reviewed based on improving absolute high content of iron or its bioavailability, including traditional breeding, induced mutation and genetic engineering method. The problems and prospects through induced mutation in the dense iron rice research were discussed.

Key words: rice; iron; bioavailability

铁是人体必需的微量元素, 其主要功能是与血红蛋白和肌红蛋白结合形成红血球, 参与组织中氧气和二氧化碳的转运和交换。缺铁可导致缺铁性贫血的发生和不良怀孕等。WHO 数据显示, 世界上有近 37 亿人口缺铁^[1], 缺铁已成为影响世界上 30% 人口的严重营养问题^[2], 尤其是那些以植物性食物为主要食品的国家 and 地区^[3]。尽管通过食品添加剂和摄入片剂药物可有效控制铁的缺乏, 但由于相关的费用过高难以在发展中国家实施。

造成如此严重的缺铁性问题, 与铁在食物中的存在形式密切相关。铁在食物中主要以 2 种形式存在: (1) 非血红素铁——以 Fe^{3+} 形式与蛋白质、氨基酸和有机酸结合形成络合物, 主要存在植物性食物中。该形式的铁必须先经胃酸作用还原成 Fe^{2+} 后才能被吸收利用。(2) 血红素铁——与血红蛋白和肌红蛋白中卟啉结合的铁。这种铁可直接被肠粘膜上皮细胞吸收。血红素铁的吸收不受内外因素的干扰。由于植物性食物中存在较多抑制铁吸收的因素, 如植酸盐、草酸盐、碳酸盐等往往与铁形成不溶性的铁盐, 而促进铁吸收的因素(如蛋白质、氨基酸及维生素 C) 含量较少, 故铁吸收率一般较低, 大米中铁的吸收率仅为 1%^[4]。

水稻是世界第二大粮食作物。长期以来, 稻米一直是南亚、东南亚和我国人民营养和能量的主要来源, 随着稻米消费量的不断增长, 其营养问题也日益暴露出来。因此, 提高铁绝对含量及增加其生物有效性以培育富铁稻米, 是解决全球性缺铁性营养危机的有效办法, 尤其对发展中国家低收入人群的意义

收稿日期: 2004-12-06

基金项目: 863 专项优质超级两系杂交水稻新组合选育(2002AA207001)、科技部高铁高伽玛氨基丁酸水稻研究与开发(2004BA540C)、浙江省重大项目(011102471)

作者简介: 王雪艳(1980-), 女, 河北张家口人, 硕士研究生, 主要从事诱变与生物技术研究。吴殿星为通讯作者, dxwu@zju.edu.cn

Tel & Fax: 0571 86971202

重大。

1 稻米中含量的品种间差异性及其遗传控制

Juliano 等^[5]研究表明,水稻籽粒各部位中铁的含量以稻糠居多,而后依次为稻壳、糙米和精米,其含量分别为 8.6%~43.0%、3.9%~9.5%、0.2%~5.2%、0.2%~2.8%。在精米的加工过程中,稻米中铁的含量明显下降^[6,7]。去糙过程中铁含量的损失率为 60%^[8];经碾磨、浸泡和蒸煮等一系列加工后,稻米中仅 10%的铁可进入日常的饭碗之中。

水稻品种间铁含量差异可达 15% 以上。如国际水稻所选育的水稻品种 IR3 中铁含量仅为 10.1mg/kg,而非洲水稻品种 *Ganjay Eoozy* 中铁含量高达 26.4mg/kg。Kabir 等^[9]的研究表明,地方品种铁和锌的含量普遍高于主栽高产水稻品种,香稻中铁和锌的含量一般比普通品种高,研究也发现铁和锌含量存在明显正相关。裘凌沧等^[8]发现红米和紫米中的铁含量显著高于普通糙米。吕文英^[10]研究表明,黑米中铁的含量最高,红米中含量次之,大米、糯米中含量相近,小米中最低。由此可见,研究铁吸收利用的生理机制及其相关基因的定位和克隆,培育食用高铁水稻新品种,将是今后的研究重点。

值得注意的是,由于稻米中存在含量丰富的植酸,它可与铁络合形成人和反刍动物不能消化吸收的络合物,阻止人体对铁的有效吸收,导致稻米中人体可吸收铁仅为 1%^[11]。同时,摄入体内的植酸还会和其它来源的铁元素络合,造成铁的生物有效性进一步下降,从而加剧铁营养缺乏症。

水稻品种间铁含量的变化很大,主要受相关基因的控制。3 个控制铁含量的重要 QTL 位点已被定位在第 7、8、9 条染色体上,其分别能解释 30.3%、21.3%和 19.0%的性状变异。张名位等^[12]分析了籼型黑米稻品种双列杂交 F_1 和 F_2 种子粒型性状与矿质元素铁、锌、锰和磷含量间的遗传相关性。结果表明:铁、锌、锰含量的种子直接效应比母体效应和细胞质效应的作用更大;粒长与种子中铁和锰含量成直接加性相关。在育种实践中,一方面可在早世代结合农艺性状选择单株上各元素含量较高的种子,另一方面可选择细长的单粒种子,有利于提高铁和锰含量。

2 富铁水稻的研究

富铁水稻的选育主要采取两种策略:一是提高铁在水稻中的绝对含量,二是通过增加其生物有效性以提高铁的相对含量。目前,两种研究途径均已取得了重要进展。

2.1 提高稻米中铁含量的研究

2.1.1 高铁水稻的常规育种 1992 年,世界粮农组织(FAO)和国际卫生组织(WHO)开始关注东南亚地区水稻主食人群的营养缺乏症状,并在亚洲发展银行与联合国儿童基金的资助下开展相关研究。1994 年开始,由国际农业研究磋商小组(CGIAR)和国际粮食政策研究所(IFPRI)主持,受世界银行及亚洲发展银行等的资助,开展了高铁等微量元素水稻育种研究,育成了铁含量超过 25mg/kg 的富铁高产水稻新品种 IRI64。

我国水稻种质资源丰富,已鉴定出许多铁含量较高的品种(系)。中国水稻研究所在高铁水稻育种方面开展了系列研究,包括高铁水稻的筛选、复交、诱变结合组织培养、DNA 分子标记辅助选择等^[13]。

郭孔雁等^[14]选育了一批香稻新种质,其中晚粳新品种特 3029 和晚粳糯新品种紫香糯糙米中铁含量分别达到了 47.6mg/kg 和 46.1mg/kg;赖来展等^[15]采用稻穗离体杂交、孤雌诱导及子房培养的方法,培育了水稻新品种黑优粘 3 号,铁含量高达 52.20mg/kg,显著高于国外培育的高铁水稻;赵则胜等^[16]从广西玉林地区引进特种水稻,在上海驯化筛选了黑米新品种乌贡 1 号,其糙米铁含量达 62.77mg/kg。以上数据均是铁在水稻中的绝对含量,并不能反映其实际营养价值和生物有效性。

2.1.2 高铁水稻的诱变育种 利用化学诱变的方法,日本九州大学和农业生物资源研究所从优质粳稻品种越光中筛选了铁含量比普通品种高 3~6 倍的富铁突变体。以此突变体杂交选育的富铁水稻新品种 GCN4 和系 026,作为贫血病专用品种于 2000 年 3 月通过审定并推广应用。浙江大学采取物理诱变,

最近也从杂交稻恢复系和保持系中筛选了若干高铁突变体。

2.1.3 铁蛋白转基因高铁水稻 研究发现,铁蛋白中的铁具生物有效性^[17]。大豆^[18]、法国豆^[19]、豌豆^[20]、玉米^[21]中的铁蛋白均已被分离且测序,为铁蛋白基因导入水稻的研究提供了可能。

Goto 等^[22]采取农杆菌介导法将大豆铁蛋白基因导入水稻,受水稻种子谷蛋白启动子 *GuB-1* 的特异性调控,大豆铁蛋白基因可在水稻胚乳中高效表达,铁含量高达 $38.1 \pm 4.5 \text{ mg/kg}$,是野生型品种 ($11.2 \pm 0.9 \text{ mg/kg}$) 的 3 倍。Lucca 等^[23]将 *Phaseolus vulgaris* 铁蛋白基因导入水稻种子,使铁含量增加了 2 倍。徐晓晖等^[24]以 *CaMV35S* 为启动子将豌豆铁蛋白基因导入粳稻品种秀水 11,经测定转基因水稻中铁含量显著提高。

Takahashi 等^[25]将带有 35S 启动子的 *Naat-A* 基因导入水稻,获得几个在石灰质土壤中能抗缺铁胁迫的水稻品系。Vasconcelos 等^[26]将 2 个携带促进铁积累基因 (*Ferritin*) 和铁吸收基因 (*FR02*) *P_{ty}-bar/Fe* 和 *P_{cambia} 1300/FR02*,同时导入印度水稻品种 *CVIR68144* 未成熟胚中,经选择、鉴定,发现转基因水稻中铁的分配和积累能力均明显加强。

2.2 提高稻米中铁的生物有效性研究

2.2.1 低植酸突变水稻 临床试验表明,食用低植酸突变体的人群铁的吸收利用比食用正常品种的人群高 50%,而锌则高达 76%^[27]。由此可见,培育低植酸水稻,有助于提高人体对铁等微量元素的消化吸收。有美国农业部最先从爪哇稻品种 *Kaybonnet* 获得低植酸突变体 *1pa1-1*^[28]。该突变体籽粒中磷含量由 71%降低至 39%,无机磷由 5%升高至 32%,但总磷含量无变化。在我国,目前仅浙江大学开展了类似研究,建立了高效的低植酸突变筛选技术,并利用诱变技术,先后从超级稻亲本 9311、杂交稻保持系协青早 B、恢复系 7954、晚粳稻秀水 110、早籼稻浙辐 906 等不同遗传背景的水稻中创造了一批低植酸突变体。这些水稻突变体中的植酸含量可由原来的 70%下降至 10%~30%。

研究已证实^[28],低植酸突变属隐性突变,受 1 对非等位基因控制。电子显微法分析突变体和正常水稻的糊粉层细胞表明,正常水稻籽粒蛋白中植酸球体的直径比突变体大,中植酸球体减少与植酸磷的降低有关。原子吸收法对比分析突变体和正常水稻籽粒中铁、锌、钾、镁、钙和锰的含量,表明,这些元素含量基本未发生变化^[29]。

2.2.2 植酸酶转基因水稻 研究表明,外源植酸酶可以通过食品加工和消化过程降低植酸含量,从而显著增强铁的消化吸收^[30]。Lucca 等^[23]将从曲霉属 (*Aspergillus fumigatus*) 的植酸酶导入水稻中。遗憾的是,由于植酸酶的耐热性较低,经稻米蒸煮后其活性大大降低,保留的活性不能充分降解稻米中的植酸。

2.2.3 MIPS 转基因水稻 肌肉肌糖-3-磷酸合酶 (MIPS) 的作用是催化植酸第一步生物合成^[31]。该基因 (*RINO1*) 已从水稻中分离,且证实其在籽粒内植酸生物合成过程中起关键作用。因此,可通过降低 *RINO1* 的表达可降低稻米中植酸的含量。

水稻 MIPS 突变基因已被定位于水稻第 3 号染色体上,它可与野生型的 MIPS 基因明显区分^[28]。为降低 *RINO1* 的表达,Yoshida 等^[32]以 *CaMV35S*、水稻种子谷蛋白启动子 *GuB-1* 或以对 *GuB-1* 表达调控的转录因子 (*RISBZ1*) 为启动子,采用农杆菌介导法将 *RINO1* 的 cDNA 正义链和反义链导入水稻。检测表明,而转基因 T1 籽粒中无机磷含量从 12%到 63%均有不同程度地提高,而总磷含量基本未变。表明在转 *RINO1* 基因的水稻中,植酸含量确有所下降。

2.2.4 金属硫蛋白转基因水稻 早在 80 年代,科学家就发现肉类中的半胱氨酸和含有半胱氨酸的多肽可增加人体对非血红素铁的吸收^[33]。Cook 等^[34]发现消化过程中产生的含半胱氨酸的多肽可以提高肌肉组织从谷类食物中吸收铁的能力。陈建华等^[36]将半胱氨酸同亚铁离子结合成 1 比 2 的配合物,对其药效进行了初步试验,结果表明半胱氨酸亚铁作为补铁剂效果比硫酸亚铁显著。半胱氨酸通过硫醇中心与铁结合,促进非血红素铁的吸收。Lucca 等^[23]将富含半胱氨酸的金属硫蛋白基因导入水稻中,使半胱氨酸在种子蛋白中的含量增加了 7 倍。

2.3 高铁及高生物有效性水稻的研究

2.3.1 转基因技术 Lucca 等^[23]将 *Phaseolus vulgaris* 铁蛋白基因、*Aspergillus fumigatus* 的植酸酶基因、

富含半胱氨酸的金属硫蛋白基因导入水稻,获得了3种基因均在水稻胚乳中特异性表达的转基因水稻,并使得稻米中铁含量提高了2倍。

2.3.2 诱变技术 浙江大学重点开展了低植酸型高铁水稻的研究,采取途径主要有3种:(1)对杂交籼稻保持系、恢复系和粳稻等不同遗传背景的水稻诱变,获得一批低植酸突变体,并以此为亲本,与引进高铁(锌)水稻品种杂交,从低植酸水稻中筛选高铁新品系;(2)以诱变筛选获得的高铁突变体或引进的高铁(锌)特种水稻和常规水稻品种为起始材料,通过理化诱变,从高铁水稻中筛选低植酸突变体;(3)高铁突变体和低植酸突变体相互杂交,采取花药培养快速稳定,选育低植酸型高铁水稻。

3 存在问题与诱变技术应用前景

运用常规方法进行富铁水稻的选育,目前存在以下几方面的问题:(1)不同水稻品种分析表明,特种稻和地方品种中铁含量一般比主栽高产品种明显要高,而特种稻和地方品种普遍表现产量低、适应性差以及适口性不佳等多种问题,如何培育高产富铁水稻以解决最大数人的营养问题将是今后考虑的重点;(2)稻米中铁的含量受环境因素影响很大,如何保持其表达的稳定性值得深入系统的研究;(3)铁含量分析需专门的仪器设备,用于连续多代和大规模育种群体的分析,测定成本较高,十分必要研究发展便于育种利用的间接方法。

转基因技术在富铁水稻研究中取得了一些重要进展。但与其它转基因作物一样,转基因水稻的生物安全性问题依然让人忧虑,转基因水稻的商业化应用还存在诸多障碍。另外,外源基因的导入也存在高效与稳定表达的问题。此外,对于植酸酶转基因水稻,由于植酸酶的耐热性差,在稻米蒸煮后蛋白质活性大大降低,因此实际中难以达到预期的效果。

在水稻种子萌动时,植酸及其盐类在植酸酶的作用下解离,释放出金属离子,以满足种子萌动过程中代谢所需并维持种子中较稳定的无机磷含量。因此,水稻中植酸含量的降低将改变水稻种子中正常磷的储存方式和种子的发芽率。另外,研究发现,部分水稻突变体在植酸含量降低的同时,其农艺性状及品质性状也发生了不利变异^[28]。此外,一些研究也报道植酸对人体有抗氧化和抗癌作用^[36~37]。因此,在水稻低植酸突变的研究中,如何适度控制植酸含量降低以尽量减少可能的不利效应,值得深入研究。

无论是从提高铁的绝对含量还是增加其生物有效性方面,国内外均有利用诱变技术选育富铁水稻的成功报道。尤其是在高铁难以向主栽高产品种转移、铁含量环境效应较大以及缺乏廉价铁含量测定方法的背景下,利用诱变技术创造低植酸突变显得更为有效。因为它完全保留诱变方法的技术优势,不仅可短时间内直接从主栽水稻品种创造低植酸突变,同时也可消除植酸进入体内后影响铁吸收的间接效应。

诱变技术在富铁水稻研究中应用途径多种,既可选用低植酸突变体和高铁突变体为杂交亲本,开展突变体的间接利用,又可连续诱变直接培育低植酸型高铁水稻。此外与转基因技术相比,诱变技术可避免复杂繁琐的生物安全性评价问题,便于今后的品种推广应用和食品加工生产。因此有理由相信,诱变技术在富铁功能性水稻的培育方面将有广泛的应用前景。

参考文献:

- [1] 胡繁荣,段智英,胡培松,吴殿星. 稻米功能性成分育种研究进展. 核农学报, 2004, 18(5): 364~367
- [2] World Health Organization (WHO). National Strategies for Overcoming Micronutrient Malnutrition. Document A45/3. WHO. Geneva, Switzerland. 1992
- [3] Cralg WJ. Iron status of vegetarians. Am J Clin Nutr, 1994, 59: 1233~1237
- [4] 李静主编. 人体营养学与社会营养学. 北京: 中国轻工业出版社, 1993, 162~163
- [5] Juliano B O. Rice in human nutrition. FAO, Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Rome, Italy, 1993, 56~59
- [6] Drakakaki G, Paul C, Eva S. Constitutive expression of soybean cDNA in transgenic wheat and rice results in increased iron levels in vegetative tissues but not in seeds. Transgenic Res, 2000, 9: 445~452.
- [7] Yoshihara Y. et al. Assessment of common regulatory regions required for the endosperm specific expression of rice storage protein glutelin genes by

- hybrid promoters. *Plant Sci*, 1996, 121:63~73
- [8] 裴凌沧, 潘 军, 段彬伍. 有色米及白米矿质元素营养特征. *中国水稻科学*, 1993, 7(2):95~100
- [9] Kabir KA, Haque M, Hossain MA, Dipti SS, Tetens I. Breeding for iron-dense rice in Bangladesh. In: *Rice Science: Innovations and Impact for Livelihood*. Edited by Mew TW, Brar DS, Peng S, Dawe D and Hardy B. IRRI, 2003, 397~402
- [10] 吕文英. 米类食品中锌铁钙锰铜等元素含量测定与研究. *微量元素与健康研究*, 2000, 17(4):46~47
- [11] Maberly GF, et al. Programs against micronutrient malnutrition: ending hidden hunger. *Ann Rev Public Health*, 1994, 15:277~301
- [12] 张名位, 郭宝江, 彭仲明. 籼型黑米稻粒形性状与其中某些矿质元素含量的遗传相关性. *作物学报*, 2003, 29(2):305~310
- [13] 胡培松. 功能性稻米研究与开发. *中国稻米*, 2003, 5:3~5
- [14] 郭孔雁, 冯 敏. 稻米营养价值及其食味的研究. *湖南农学院学报*, 1989, 15(4):1~5
- [15] 赖来展, 李宝健. 应用生物技术选育黑优粘系列新品种的研究. *中山大学学报(自然科学)*, 1989, 8(4):123~127
- [16] 赵则胜. 乌贡一号引种驯化的研究. *上海农学院学报*, 1991(增刊):10~15
- [17] Vasconcelos M, Datta K, Oliva N, Khalekuzzaman M, Torrizo L, Krishnan S, Oliveira M, Goto F. Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene. *Plant Sci*, 2003, 164:371~378
- [18] Regland M, Briat J F, Cagnon J, Lanthère J P, Massenet O. Evidence for a conservation of ferritin sequences among plants and animals and for a transit peptide in soybean. *J Biol Chem*, 1990, 265:18339~18344
- [19] Spence MJ, Henzi MT, Lanners PJ. The structure of a *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding the iron storage protein ferritin. *Plant Mol Biol*, 1990, 17:499~504
- [20] Lobreaux S, Massenet O, Briat J F. Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. *Plant Mol Biol*, 1992, 19:563~575
- [21] Lobreaux S, Yewdall S, Briat J F, Harrison P M. Amino-acid sequence and predicted three-dimensional structure of pea seed (*Pisum sativum*) ferritin. *Biochem J*, 1992, 288:931~939
- [22] Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, Toki S, Takaiwa F. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnol*, 1999, 17:282~286
- [23] Lucca P, Hurrell R, Potrykus L. Approaches to improving the bioavailability and level of iron in rice seeds. *J Sci Food Agric*, 2001, 81:828~834
- [24] 徐晓晖, 郭泽建, 等. 铁蛋白基因的水稻转化及其功能初步分析. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2003, 29(1):49~54
- [25] Takahashi M. Purification, Characterization and DNA sequencing of nicotianamine aminotransferase (NAA). Ando T, Mori S. eds. *Expressed in Fe deficient rice roots. Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997, 79~283
- [26] De Vasconcelos M, Datta K, Oliva N. Enhanced iron accumulation and absorption in rice: a binary approach to improve iron. Beijing: International Rice Research Institute International Rice Congress, 2002
- [27] Mendoza C, Viteri FE, Lonnerdal B. Effect of genetically modified, low phytic acid maize on absorption of iron from tortillas. *Am J Clin Nutr*, 1998, 68:1123~1128
- [28] Larson ER, Rutger JN, Young KA, Raboy V. Isolation and genetic mapping of a non-lethal rice (*Oryza sativa* L.) low phytic acid 1 mutation. *Crop Sci*, 2000, 40:1397~1405
- [29] Lott JN, Liu JC, Irene O, Michael T. Low phytic acid rice: Grain structure and mineral nutrients. 2003, *Plant Biology: Friday, July 25-Wednesday July 30, 2003-Honolulu, Hawaii USA*
- [30] Hurrell RF, Juillerat MA, Reddy MB, Lynch SR, Dassenko SA, Cook JD. Soy protein, phytate and iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr*, 1992, 56:573~578
- [31] Yoshida KT, Tonikichi W, Hiroshi K, Ritsuko MF, Satoshi N. Temporal and spatial patterns of accumulation of the transcript of *Myo-Inositol-1-Phosphate synthase* and phytin containing particles during seed development in rice. *Plant Physiol*, 1999, 119(1):65~72
- [32] Yoshida KT, Feng X, Ohyama A, Takaiwa F. Molecular approaches for producing low phytic acid grain. 2003, 7th International Congress on Plant Molecular Biology
- [33] Taylor PG. The effect of cysteine-containing peptides released during meat digestion on iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr*, 1986, 43:68~71
- [34] Cook JD, Reddy MB, Burri J, Juillerat MA, Hurrell F. The influence of different cereal grains on iron absorption from infant cereal foods. *Am J Clin Nutr*, 1997, 65:964~969
- [35] 陈建华, 李宗清. 半胱氨酸亚铁药效学研究. *中国药科大学学报*, 1996, 27(6):383~384
- [36] Graf E, Epton LL, Eaton JW. Phytic acid: a natural antioxidant. *J Biol Chem*, 1987, 262:11647~11650
- [37] Graf E, Eaton JW. Suppression of colonic cancer by dietary phytic acid. *Nutr Cancer*, 1993, 19:11~19

[编者按:米成分尤其是功能性成分育种是当前和今后水稻育种的研究热点,鉴于此本刊将按成分的分布规律及其专用特性先后陆续刊登有关水稻高铁、高抗性淀粉、高伽玛氨基丁酸、高氨基酸及新颖胚乳突变的系列综述文章,希望对广大读者的工作有所帮助。]