

水稻营养品质的改良

王为民* 赵倩 于静娟 朱登云

(中国农业大学农业技术国家重点实验室 北京 100094)

摘要 稻米是我国的主要食粮,但其蛋白质含量低、营养不够全面,满足不了人们对营养的需求。长期以来,人们一直采用传统的育种方法来选育高蛋白质的水稻新品种,但收效不大。近年来,水稻遗传转化技术的飞速发展和不断完善,应用生物技术改良水稻营养品质已逐步变为现实,并显示出诱人的前景。综述了利用生物技术进行水稻营养品质改良的途径、研究进展,并指出在水稻营养品质改良中存在的问题及解决途径。

关键词 生物技术 水稻 营养品质

水稻(*oryza sativa*)是重要的谷类作物,世界上一半以上的人口以稻米作为主要食粮。但是,在食用精米中蛋白质的平均含量仅为6.3%~7.1%,在谷类作物中是最低的,且蛋白质中赖氨酸含量仅为3.5%~4.0%,维生素B₁、B₂和含铁量也较低,也不含维生素A、D、C。此外,稻米中还含有一些抗营养因子^[1]。因此,提高水稻产量、改良稻米营养品质成为植物基因工程研究的重要对象之一。

稻米的营养品质受品种、环境因素、栽培技术、收获加工和烹调技术等的影响,其中,主要还是受品种的控制。传统育种技术已大大提高了水稻的产量(9t/hm²),但是存在着周期长、不能够彻底解决诸如稻米中维生素A含量低、蛋白质的氨基酸营养组分不平衡等问题。随着对植物化学成分合成途径的了解及分子生物学的发展,利用现代生物技术改良水稻,使其具有更加优良的营养品质,作为传统育种技术的一种补充,已日益受到人们的重视。

自从Hiei(1994)第一次获得水稻转基因再生植株后,不断完善的水稻遗传转化技术,成功地分离出水稻种子中特异性表达的蛋白质基因及鉴定出在内胚乳特异性表达的启动子,使利用基因工程改良水稻的营养品质变为可能^[2]。

1 水稻营养品质改良的途径和研究进展

与大豆、玉米、小麦等相比,水稻作为蛋白质来

源的主要局限是含量较低,提高稻米中蛋白质和赖氨酸的含量可增加其营养价值。因此,利用传统育种方法提高稻米中蛋白质的含量是水稻育种的一个重要方面。国际水稻所(1967)利用从世界各地征集的高蛋白质品种与品种IR8进行杂交,对筛选的一些繁育品系进行鉴定,发现其蛋白质含量比IR8(7.5%)高18%~23%,而稻谷产量无显著差异。

随着水稻原生质体培养技术的成熟,筛选抗氨基酸及其类似物的突变体为改良水稻的营养品质提供了另外一条技术途径。在植物体中,甲硫氨酸、赖氨酸、苏氨酸和异亮氨酸生物合成的前体均为天冬氨酸。高浓度的赖氨酸通过反馈作用抑制着上述氨基酸生物合成途径的限速酶——天冬氨酸激酶(AK)和二氢吡啶二羧酸合成酶(DHDPS)的活性,使由该途径合成的氨基酸含量急剧减少,细胞最终因缺乏这些氨基酸而死亡。在抗性系中,由于AK和DHDPS对反馈抑制不敏感,使变异细胞系可以利用该途径合成赖氨酸及相关氨基酸,这样抗性系就能在高浓度赖氨酸环境中生存。在非选择培养基上,由于该生物合成途径缺乏有效的反馈抑制而始终处于开放状态造成氨基酸的积累,可以利用这一点来选择高赖氨酸含量的变异株系。Schaeffer等^[3]利用在培养基中添加赖氨酸和苏氨酸来筛选水稻愈伤组织的突变体,对其再生植株连续4代的种子分析表明,突变体种子蛋白质中的赖氨酸含量比对照平均提高12%~14%,个别株系种子蛋白质中的赖氨酸含量高达4.57%,种子中蛋白质的含量平均达12.3%,与对照相比提高了24.7%。

收稿日期:2004-01-17 修回日期:2004-03-18

* 电子邮箱: wwm1970@hotmail.com

但是稻米的垩白率高达 9.2%, 严重影响了稻米的商品品质, 使改良的水稻难以在生产中推广应用。

20 世纪后半叶, 植物细胞工程和基因工程等学科的发展为利用转基因技术改良水稻营养品质奠定了基础。

1.1 增加稻米中赖氨酸和蛋白质的含量

(1) 将合成代谢中对赖氨酸反馈抑制不敏感的关键酶 AK 和 DHDPS 的基因导入水稻, 使其在种子中特异性表达, 以提高水稻种子中的赖氨酸含量。用此方法虽然成功地提高了大豆和油菜种子中的赖氨酸含量, 但由于在谷类作物种子中, 赖氨酸分解代谢的关键酶——赖氨酸 2 酮戊二酸还原酶 (LOR)、酵母氨酸脱氢酶 (SDH) 特异性存在于内胚乳中, 种子中赖氨酸的含量同时受 LOR、SDH 活性的控制, 故目前在水稻的改良中尚未见到成功的报道^[4]。(2) 利用基因工程改变种子贮藏蛋白质基因使其产生改进的氨基酸组成, 将改良的贮藏蛋白质基因导入受体植物, 或将自然界植物体内分子量较小且富含赖氨酸的蛋白质基因导入水稻, 使其稳定遗传和表达, 提高稻米中的赖氨酸含量^[5]。由于豆类种子蛋白质中赖氨酸的含量较高, 含硫氨基酸的含量偏低, 与水稻蛋白质中的氨基酸成分在营养上具有互补性, 因此多选用豆类蛋白质基因转入水稻中以改良其营养品质。Zheng 等^[6,7]通过 PEG 诱导法分别将菜豆和豌豆的球蛋白基因导入水稻中。通过对再生植株的种子进行分析, 表明上述基因已在水稻种子的内胚乳中表达, 其中菜豆球蛋白约占内胚乳蛋白质总量的 4%。Momma 等^[8]通过电击法将大豆球蛋白基因 (*AlaB1b*) 导入水稻中, 检测结果表明, 大豆球蛋白基因已在转基因水稻种子中表达。大豆球蛋白的量约占种子蛋白质质量的 4%~5%, 达 40~50mg/g 蛋白质。转基因水稻种子中蛋白质含量 (0.08g/g) 比对照 (0.065g/g) 高约 20%, 转基因水稻种子中几乎所有的氨基酸包括赖氨酸均比对照高出 20%, 并且稻米中维生素 B6 的含量 (5.7μg/g) 比对照 (3.8μg/g) 高出 50%, 而其他性状如稻米的外形、矿物质含量则没有改变。高越峰等^[9]用基因枪法将来源于四棱豆的高赖氨酸蛋白质基因导入水稻中, 经检测表明该基因已整合到水稻的基因组中。但由于驱动目的基因表达的启动子是非种子特异性启动子, 结果仅提高了的转基因水稻叶片中的赖氨酸含量, 未能达到改良水稻营养品质的目的。用豆类蛋白质基因改良水稻的营养

品质同样存在着不足之处。一方面, 目前已克隆的豆类蛋白质基因的表达产物中赖氨酸含量不够高, 转基因水稻种子中的表达量不足以大幅度地提高赖氨酸的含量。另一方面, 目的基因的数量有限, 难以满足生产实践要求。解决上述问题的一个方法是将种子蛋白质中赖氨酸含量高的作物的总 DNA 导入水稻中, 在转基因后代中筛选符合要求的株系。洪亚辉等 (1999) 采用花粉管通道法将密穗高粱总 DNA 导入水稻品种鄂宜 105 中, 从 D1 至 D5 代变异材料中选育出 DH3、DH4、DH5 等新品系。米质分析结果表明, 直链淀粉含量为 15.0%~16.1%, 蛋白质含量为 9.8%~10%, 均超过部颁标准 (分别为 <20% 和 >7%) 的要求, 均属高蛋白优质稻。由于在转基因后代中难以获得明确的分子检测结果, 用此方法改良水稻的营养品质目前尚有争议。(3) 通过导入水稻过敏蛋白的反义基因, 降低水稻种子中过敏蛋白的含量, 改善水稻的营养品质。Nakamura 等^[10]利用对大米过敏病人的抗体 IgE, 从稻米中分离出过敏性蛋白质, 进而在 cDNA 文库中分离出相应的基因序列, 利用反义 RNA 原理构造了一个嵌合基因, 通过电击法将其导入水稻中。通过对再生植株种子进行分析, 非转基因对照的种子中过敏性蛋白含量约为 300μg/粒, 转基因水稻种子中过敏性蛋白含量约为 60~70μg/粒, 表明在种子成熟过程中过敏性蛋白的合成通过反义 RNA 技术得到了抑制。

稻米蛋白质含量愈高, 其营养价值也愈高, 但是稻米蛋白质含量与稻米的食味品质呈一定程度的负相关^[11]。因此对于食用米而言, 营养品质改良应侧重于提高稻米蛋白质中的赖氨酸含量。饲料用米改良则应侧重于最大限度地提高稻米中的蛋白质含量。

1.2 增加稻米中维生素的含量和品种

将维生素合成代谢的关键酶导入水稻, 使其在内胚乳中特异性表达, 提高其在内胚乳中的含量。Burikhardt 等 (1997) 利用基因枪法将一个维生素原合成的关键酶——八氢番茄红素合成酶导入水稻中。通过检测, 在转基因水稻种子的内胚乳中发现有八氢番茄红素的积累。瑞士植物研究所 Ye 等^[12]利用农杆菌介导法将维生素 A 原 (β-胡萝卜素) 合成途径的 3 个关键酶: 八氢番茄红素合成酶 (*psy*)、细菌八氢番茄红素去饱和酶 (*at1*)、番茄红素 β-环化酶 (*lcy*) 同时导入水稻中, 检测表明类胡

萝卜素已在转基因水稻种子中形成,内胚乳呈黄色,部分种子内胚乳中的类胡萝卜素含量高达1.6mg/g。Ye的工作首次实现了通过植物基因工程使水稻种子产生本不存在的类胡萝卜素,为作物营养品质改良提供了一个良好的范例。

1.3 增加稻米中微量矿质营养元素铁的含量

将蛋白质中含铁量高的外源基因导入水稻,使其能特异性地在内胚乳中表达,提高稻米中的铁含量,提高水稻中与铁的吸收和转运有关的蛋白质和酶的表达量,减少抗铁吸收因子的生成^[5],例如减少草酸的生成。Goto等^[13]通过农杆菌介导法将大豆铁蛋白基因转入水稻中,对转基因种子进行的原位免疫印迹反应结果表明,该基因在水稻内胚乳中得到了特异性表达。对T₁代种子进行分析表明,非转基因对照中的平均铁含量为(11.2±0.9)μg/g DW,转基因水稻种子中铁平均含量为(22.5±1.3)μg/g DW,其中转基因水稻种子中最高的铁含量达(38.1±4.5)μg/g,为对照种子铁含量的3倍。

2 存在的问题及解决方法

2.1 安全性问题

在水稻营养品质改良的基因工程中,生物安全性主要考虑两个方面:一方面要避免目的基因产物对人和动物具有毒性和致敏性,这可通过选择目的基因的来源和数据库比较初步确定其安全性。另一方面要减小转基因水稻的生态风险和消除公众对标记基因及其产物的疑惧。解决这一问题的办法主要有两种:一是消除标记基因;二是使用无争议的生物安全标记基因或目前研究认为是安全的标记基因。

目前在植物基因工程中常用的消除标记基因的方法,如共转化和遗传分离方法、染色体同源重组诱导缺失法等,在水稻营养品质改良的基因工程中尚未见到成功的报道。

位点专一性重组是通过重组酶的作用在DNA专一位点间实现同源交换,该反应系统由重组酶及其识别位点组成,当两个识别位点正向排列时,重组酶催化两位点之间序列的切除。目前应用于植物遗传转化的重组酶系统有3种:源于大肠杆菌噬菌体PI的Cre/lox、源于酿酒酵母2μm质粒的FLP/FRT和源于接合糖酵母pSRI质粒的R/RS重组系统。Hoa等^[14]报道利用Cre/lox系统从水稻基

因组中特异性地切除了lox序列及其中的hpt基因,Toriyama等^[15]报道R/RS系统能够从水稻基因组中高效地切除RS序列及其中间的DNA片段,Lyznik等^[16]报道FLP/FRT系统在水稻基因组中能够高效地将两个FRTs片段和其中的DNA片段切除。上述实验结果表明,利用位点专一性重组系统可获得无标记基因的转基因水稻植株,这正是植物基因工程育种的理想策略之一。

目前在水稻营养品质改良中采用的标记基因主要有bar基因、npt II基因、6-磷酸甘露糖异构酶基因和甜菜碱醛脱氢酶基因。现有资料表明,含bar基因和npt II基因的转基因水稻对人和环境是相对安全的^[17,18]。bar基因不仅具有选择标记作用,而且能作为目的基因用于水稻对除草剂Basta的抗性,此特性已被巧妙地用于转基因杂交稻和直播稻去除杂草。6-磷酸甘露糖异构酶基因和甜菜碱醛脱氢酶基因属于生物安全性标记基因,具有产物安全、筛选剂价格低廉、筛选程序简单、效果显著,转基因植株生长比较旺盛等特点,有望成为水稻营养品质改良转基因筛选系统的主流^[19,20]。

2.2 目的基因的稳定遗传和高效表达问题

近20年的发展历史表明,转基因植物往往会出现目的基因表达效率低、表达产物不稳定等现象,导致转基因植物无法投入实际应用。针对这些问题,近年来人们对水稻营养品质改良的转基因技术进行了以下几方面的改进:(1)应用能在水稻种子特异性表达的启动子,如水稻谷蛋白启动子、醇溶蛋白启动子、球蛋白启动子和清蛋白启动子,上述启动子均能使目的基因在水稻种子中特异和高效表达^[5,19]。(2)对植物表达载体进行改进和优化。如果目的基因是来自于原核生物,可以对其编码区进行改造,选用植物偏爱的密码子、改变GC含量、去除原序列中影响mRNA稳定的元件、在表达载体中添加合适的内含子序列及在目的基因两侧连接MAR序列等措施来提高目的基因的表达量。或采用多基因策略,在转化中把两个或两个以上的能起协同作用的基因同时转入植物,将会获得比单基因转化更为理想的结果。(3)探索新的转化技术,提高转化效率,扩大T₀代群体,从后代中筛选出目的基因能够高效表达和稳定遗传的株系。

3 结 语

随着我国水稻基因组研究计划的完成及科学

的进步, 科学家们可根据水稻的遗传信息, 通过遗传转化对水稻进行基因转移——基因添加、基因剔除来调节稻米蛋白质、脂肪、淀粉等品质, 估计到21世纪中叶, 将有更多的优良新品种在农业生产中得到广泛推广, 并被消费者接受。

参考文献

- [1] Juliano B O, 谷承译. 水稻与人类营养. 北京: 中国农业科技出版社, 1995. 9
- [2] Wu C Y, Adachi T, Hatano T, *et al.* Promoters of rice seed storage protein genes direct endosperm-specific gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiol*, 1998, 39(8): 885~ 889
- [3] Schaeffer G W, Sharpe F T. Electrophoretic profiles and amino acid composition of rice endosperm proteins of a mutant with enhanced lysine and total protein after backcrosses for gemplasm improvements. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 230~ 235
- [4] Azevedo R A, Lea P J. Lysine metabolism in higher plants. *Amino Acids*, 2001, 20: 261~ 279
- [5] Grusak M A, DellaPenna D. Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Ann Review of Plant Physiology and Plant Mol Bio*, 1999, 50: 133~ 161
- [6] Sindhu A S, Zheng ZhenWei, Murai N, *et al.* The pea seed storage protein legumin was synthesized, processed, and accumulated stably in transgenic rice endosperm. *Plant Science Limerick*, 1997, 130(2): 189~ 196
- [7] Zheng ZhenWei, Sumi K, Tanaka K, *et al.* The bean seed storage protein beta-phaseolin is synthesized, processed, and accumulated in the vacuolar type II protein bodies of transgenic rice endosperm. *Plant Physiology*, 1995, 109(3): 777~ 786
- [8] Momma K, Hashimoto W, Ozawa S, *et al.* Quality and safety evaluation of genetically engineered rice with soybean glycinin: analyses of the grain composition and digestibility of glycinin in transgenic rice. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1999, 63(2): 314~ 318
- [9] Gao YueFeng, Jing YurXiang, Shen ShiHua, *et al.* Transfer of

- lysine rich protein gene into rice and production of fertile transgenic plants. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 48(5): 506~ 511
- [10] Nakamura R, Matsuda T. Rice allergenic protein and molecular genetic approach for hypoallergenic rice. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1996, 60(8): 1215~ 1221
- [11] Sunitha Padmavathi P. Effect of amylose and protein content on eating quality of rice varieties grown in Andhra Pradesh. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 2001, 14(4): 1042~ 1045
- [12] Ye Xudong, Al Babili S, Kloeti A, *et al.* Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 2000, 287: 303~ 305
- [13] Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, *et al.* Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(3): 282~ 286
- [14] Hoa T T C, Bong B B, Huq E, *et al.* Cre/lox site-specific recombination controls the excision of a transgene from the rice genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104(4): 518~ 525
- [15] Toriyama K, Chiba A, Nakagawa Y. Visualization of somatic deletions mediated by R/RS site-specific recombination and induction of geminal deletions caused by callus differentiation and regeneration in rice. *Plant Cell Rep*, 2003, 21: 605~ 610
- [16] Lyznik L A, Mitchell J C, Hirayama L, *et al.* Activity of yeast FLP recombinase in maize and rice protoplasts. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(4): 969~ 975
- [17] Metz P L J, Stiekema W J, Nap J P. A transgene-centered approach to the biosafety of transgenic phosphinothricin-tolerant plants. *Molecular Breeding*, 1998, 4(4): 335~ 341
- [18] 徐茂军. 转基因食品中标志基因 aph(3)-IIa 等安全性评价. *中国公共卫生*, 2002, 18(3): 371~ 372
- [19] Todd R, Tague B W. Phosphomannose isomerase: a versatile selectable marker for *Arabidopsis thaliana* gemr line transformation. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2001, 19(4): 307~ 319
- [20] 郭岩, 张莉, 肖岗, 等. 甜菜碱醛脱氢酶基因在水稻中的表达及转基因植株的耐盐性研究. *中国科学(C辑)*, 1997, 27(2): 151~ 155

Advances in the Study on the Improving Nutritional Quality of Rice

WANG Wei-min ZHAO Qian YU Jing-juan ZHU Deng-yun

(National Laboratories for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract Rice is the staple food in our country but its protein content is lower and nutrition quality is poorer so that it cannot meet the needs of people. Traditional breeding is applied frequently to select new rice varieties with high protein content for a long time but achieved less. In recent years, with the development and the perfection of rice transformation technology, improvements of rice nutrition quality have been gradually changed into reality by using biotechnological methods and show a good prospect. The approaches and advances of improving nutritional quality of rice are reviewed, and the significant suggestions are provided for the problems in the process of improving nutritional quality of rice by biotechnology.

Key words Biotechnology Rice Nutritional quality