

DOI: 10.13376/j.cbls/2015142

文章编号: 1004-0374(2015)08-1028-09



严建兵, 博士, 教授。主要从事玉米基因组学和分子育种研究。现任华中农业大学生命科学技术学院教授, 兼任作物遗传改良国家重点实验室副主任, 生命科学技术学院副院长。回国工作后, 在 *Nature Genetics*、*Nature Communications*、*PNAS*、*PLoS Genetics* 等主流期刊发表通讯作者(含共同)论文 20 余篇。担任 *Theoretical and Applied Genetics* 和 *Molecular Breeding* 等期刊编委。2010 年获日本国际青年农业科学家奖, 2011 年获杜邦青年教授奖, 2011 年入选楚天特聘教授, 2012 年入选优秀青年基金, 2013 年入选中组部首批青年拔尖人才计划, 2014 年获国际玉米小麦改良中心杰出校友奖。

玉米维生素A生物强化研究进展和展望

刘楠楠, 严建兵*

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 维生素 A 对机体细胞分化、免疫功能、视觉感受等多个生理过程发挥重要作用。维生素 A 缺乏 (vitamin A deficiency, VAD) 是世界五大微量营养素缺乏问题之一, 全球每年有 25 万~50 万儿童因维生素 A 缺乏患夜盲症, 我国尤其欠发达地区也深受其影响。主要作物的生物强化是解决微量营养素缺乏最经济有效的手段之一。在回顾了维生素 A 对人体的重要功能、全球维生素 A 缺乏的现状的基础上, 现重点综述了玉米维生素 A 强化的研究进展, 并探讨了玉米维生素 A 生物强化面临的挑战和需要重点关注的问题。

关键词: 维生素 A; 玉米; 生物强化

中图分类号: Q945.1; R977.21; S513 **文献标志码:** A

The progress and perspective of vitamin A biofortification for maize

LIU Nan-Nan, YAN Jian-Bing*

(National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Vitamin A plays critical roles in many physiological processes of organisms such as cell differentiation, immune functions, and visual sense. Vitamin A deficiency (VAD) is one of the most severe micronutrient deficiencies in the world, 250,000-500,000 children suffer from blindness each year owing to VAD. China is also a country especially in the poor regions suffering from VAD. Breeding increased micronutrient levels in cereal grains (biofortification) is an economical and efficient approach to address the challenge globally. This article summarized the significant functions of vitamin A, the issue of vitamin A deficiency and the progress of vitamin A biofortification in crops especially in maize (*Zea mays* L.). Besides these, it discussed the challenges and issues about the biofortified vitamin A maize that needs to be paid close attention to in the future.

Key words: vitamin A; maize; biofortification

收稿日期: 2015-02-05; 修回日期: 2015-04-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31222041); 中组部青年拔尖人才计划资助项目

*通信作者: E-mail: yjianbing@mail.hzau.edu.cn

1 维生素A的重要性、代谢途径和利用思路

1.1 维生素A是人体必需的重要微量营养素之一

维生素A(vitamin A)是一系列脂溶性类维生素A(retinoid)的统称,包括视黄酯、视黄醇、视黄醛和视黄酸等衍生物。在动物体内,不同形式的维生素A承担不同的功能。视黄酯是维生素A的主要储存形式,主要储存在肝脏中。当血清中维生素A含量下降时,视黄酯可转化成视黄醇,使血清中视

黄醇含量保持稳定^[1];视黄醛是视紫红质的辅基,可与视蛋白结合作为光感受器^[2];视黄酸在很多生理过程中起重要作用,如细胞分化增殖、胚胎发育、生育能力和免疫功能等^[3-6](图1)。维生素A是人体必需的微量营养素,但自身不能合成,只能从食物中获得。动物性产品,如蛋奶制品和动物肝脏中富含活性的维生素A;某些植物性食品,如绿叶和黄色蔬菜及橙色的水果通常富含 β -胡萝卜素,其在人体中可转化为维生素A^[7]。

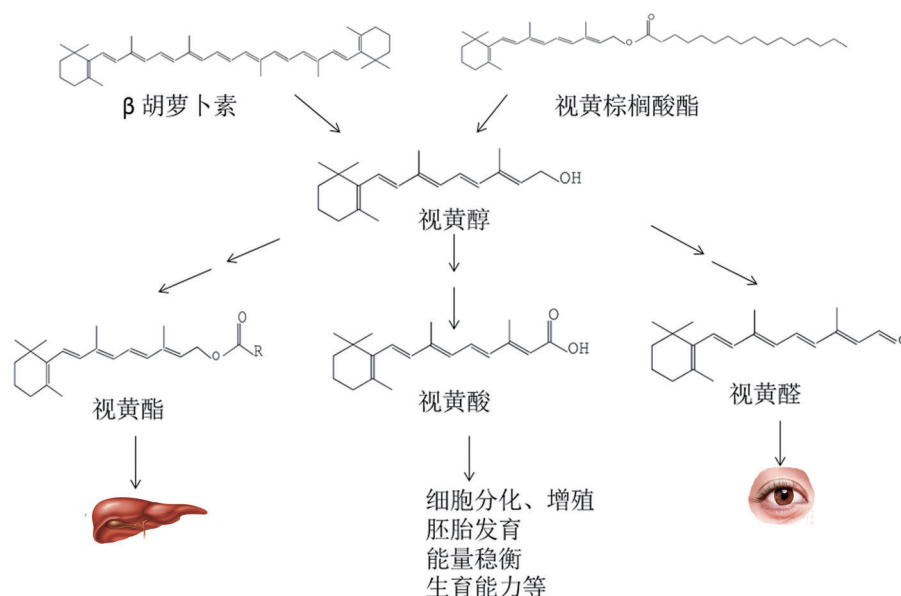


图1 维生素A的多种形式及功能^[4-5]

维生素A缺乏和过量都会对人体健康造成损害。维生素A缺乏会造成干眼症、夜盲症、皮肤毛囊角质化,同时免疫力降低,容易感染疾病,严重时可导致死亡^[8]。另一方面,过量摄入维生素A会引起中毒^[2],产生胡萝卜素血症,皮肤变黄。适量维生素A的摄入对人体非常重要。

1.2 维生素A缺乏是全球面临的巨大挑战

维生素A缺乏是世界五大微量营养素缺乏问题之一。婴儿、儿童和孕妇是维生素A缺乏的高危人群。2009年,世界卫生组织(WHO)数据显示有520万学前儿童患有夜盲症,同时低血清维生素A浓度,即 $<0.7 \mu\text{mol/L}$ 的学前儿童为19亿,相当于世界人口的三分之一,血清维生素A浓度 $<0.7 \mu\text{mol/L}$ 意味着可能面临维生素A缺乏症。除此之外,还有980万孕妇患有夜盲症,1.9亿为低血清维生素A含量^[8-9](图2)。这些人口主要集中在发展中国家,

由于经济不发达,人们很难消费得起蛋奶制品,大多只能从蔬菜和主食中补充维生素A原。根据世界卫生组织的调查数据显示,中国是维生素A中等缺乏的国家(图2),在云、贵、川等边远地区可能有50%的学前儿童维生素A缺乏或者边际缺乏。因此,消除维生素A缺乏也是我国亟待解决的问题之一^[9]。

传统的营养干预方法有3种:第一,药剂补充,通过服用含有维生素A的药丸进行补充;第二,食品强化,通过在食品中添加维生素A进行补充。2004年,联合国粮食与农业组织(FAO)第一次提出采用这种方法在小麦粉和玉米粉中添加多种微量营养素,包括维生素A;第三,饮食多样化。前两种方法都属于外源强化,但受经济水平和饮食习惯的制约,或者缺乏稳定的社会政策、配套的基础设施及持久的资金支持,人们很难持久获得维生素A补充品,且很多地区饮食单一,除主食外,无能力消

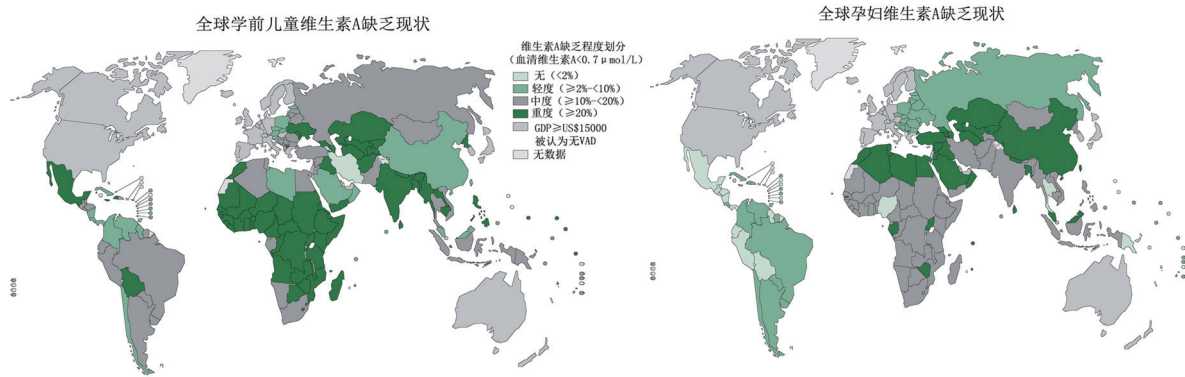


图2 全世界各国学前儿童与孕妇维生素A缺乏现状(WHO 2009)

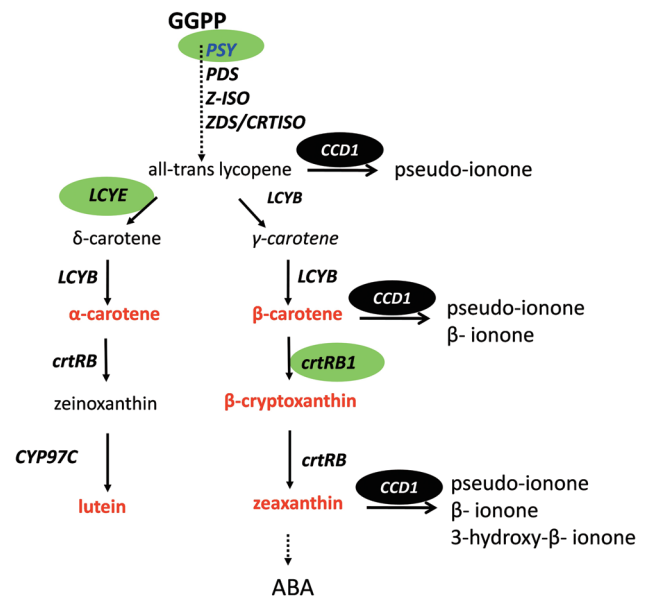
费多样化食品补充维生素 A。因此,这 3 种方法在欠发达地区难以取得广泛的应用^[10]。

1.3 植物中类胡萝卜素的代谢途径

类胡萝卜素合成途径的第一步,由八氢番茄红素合成酶(phytoene synthase, PSY)催化将两分子的牻牛儿牻牛儿焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGDP)转化为八氢番茄红素,而后经过两种植物脱饱和酶八氢番茄红素去饱和酶(phytoene desaturase, PDS)和 ζ -胡萝卜素去饱和酶(ζ -carotene desaturase, ZDS)及两种异构酶 ζ -胡萝卜素异构酶(ζ -carotene isomerase, Z-ISO)和类胡萝卜素异构酶(carotenoid isomerase, CRTISO)催化形成 4 个双键的全反式番茄红素。番茄红素形成后有两大主要的代谢分支,一个是 β, β 途径,在 β -番茄红素环化酶(β -cyclase, LCYB)作用下,形成两个 β 环的 β -胡萝卜素,其中 β -胡萝卜素两个 β 紫罗酮环化会形成 β -隐黄质,继续发生羟化反应,即可产生玉米黄素;另一个分支是 β, ϵ 途径,在 ϵ -番茄红素环化酶(ϵ -cyclase, LCYE)和 LCYB 作用下形成 α -胡萝卜素, α -胡萝卜素的 β 环和 ϵ 环的羟化会产生玉米黄质和 α -隐黄质,继续发生羟化反应,即可产生叶黄素。 α -胡萝卜素的 ϵ 环羟化是由 ϵ 羟基化酶(cytochrome P450-type monooxygenase, CYP97C)催化,是一种细胞色素单加氧酶。而 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素的 β 环是由细胞色素 P450 型 β -羟化酶(cytochrome P450-type β -hydroxylase, CYP97A)和铁氧化还原蛋白依赖的双铁单加氧酶(ferredoxin-dependent di-iron monooxygenase, HYD)催化进行羟基化反应^[11-12](图 3)。

α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素和 β -隐黄质在人体中都能转化为维生素 A,但 β -胡萝卜素效率最高,一分子的 β -胡萝卜素能转化为两分子的维生素 A,所以提高 β -胡萝卜素含量就成为关键育种目标。

类胡萝卜素代谢产生的一些中间物质同时也可以被裂解双加氧酶(carotenoid cleavage dioxygenases, CCDs)和环氧类胡萝卜素(9-cis-epoxycarotenoid dioxygenases, NCEDs)催化形成脱辅基类胡萝卜素。目前,玉米中详细报道过的一个裂解双加氧酶就是 CCD1,其中控制类胡萝卜素代谢流的番茄红素和维生素 A 原 β -胡萝卜素可被其降解^[11](图 3)。维生素 A 的合成和分解途径研究已经相对比较清楚,这对培育高维生素 A 原作物品种提供了理论基础。



注: GGDP, 牻牛儿牻牛儿焦磷酸; all-trans lycopene, 全反式番茄红素; zeinoxanthin, 玉米黄质; β -cryptoxanthin, β -隐黄质; lutein, 叶黄素; zeaxanthin, 玉米黄素; pseudo-ionone, 类紫罗酮; β -ionone, β -紫罗酮; 3-hydroxy- β -ionone, 3-羟基- β -紫罗酮; ABA, 脱落酸。图中斜体为编码相应酶的基因,绿色阴影的三个基因为代谢途径中的关键基因,黑色阴影基因为分解代谢途径基因

图3 类胡萝卜素代谢途径^[11,19]

基于对代谢途径的认识通过转基因可提高 β -胡萝卜素含量,“黄金大米”即是如此。由于野生型水稻胚乳中含有维生素A原合成代谢途径上游的GGDP,可以产生类胡萝卜素的一种:八氢番茄红素,但是下游途径没有酶可以催化合成 β -胡萝卜素,因此,需要一种外源基因的补充,细菌中去饱和酶CRTI与植物的PSY基因完善了水稻中 β -胡萝卜素的合成。2004年,第一代黄金大米进行了第一次田间试验,类胡萝卜含量显著提高,达到6 $\mu\text{g/g}$ 。由于不同转基因事件基因的表达量可能并不相同,因此,得到的类胡萝卜素的含量会有所波动,但得到的类胡萝卜素的含量仍不能让人满意,最终先正达的科学家发现将玉米的PSY1基因转入水稻使得类胡萝卜素总含量提高至37 $\mu\text{g/g}$,而其中84%为 β -胡萝卜素,称为第二代黄金大米。每人每天食用60g由该大米制成的米饭即可满足一天对维生素A的需求,为发展中国家维生素A缺乏提供了经济有效的解决方案^[13]。但因为目前社会对转基因产品的错误认识以及其他社会、经济等诸多复杂原因,“黄金大米”这一革命性产品尚未能商业化推广。

除了高表达外源基因外,还可以通过抑制一些内源基因的表达来提高作物中维生素A原的含量。在土豆中,通过反义RNA的方法使类胡萝卜素代谢途径中的IcyE基因表达沉默,从而使突变体块茎中 β -胡萝卜素含量比野生型高14倍,同时代谢上游基因过表达使总类胡萝卜素含量升高,因此,下游代谢途径中具有抗氧化功能的叶黄素含量并没有降低,总类胡萝卜素提高2.5倍^[14]。同样,利用RNA干扰的方法也使得油菜籽中 β -胡萝卜素、叶黄素和玉米黄素均大幅度升高^[15]。这些技术的应用可以避免代谢中出现的反馈抑制,不仅能使维生素A原提高,同时其他对人体有益的营养物质也能提高。

1.4 生物强化是最经济有效的方法之一

2004年,世界农业研究磋商组织(the Consultative Group for International Agricultural Research, CGIAR)启动HavestPlus项目,旨在通过生物强化(biofortification)的方法消除隐性饥饿——营养不良。所谓生物强化就是通过育种手段提高现有农作物中为人体吸收利用的微量营养元素的含量。对发展中国家来说,生物强化是一种健康的、可持续的、切实可行的方法。生物强化有4大优点:第一,与其他的营养干预相比,这种方法覆盖面更广,可以直达农村,而发展中国家多是维生素A等微量营养素缺乏的群体;第二,与其他方法,如政府国家提供

的药剂补给或食品强化相比,成本更低;第三,这种方法具有可持续性,由于改良的作物也是人们的主食,一旦育成高维生素A原品种,农民只需种下该种子,然后通过简单的制种方法即可持续使用该种子^[10];第四,通过正常食用作物摄入类胡萝卜素将不用担心维生素A中毒的问题。

水稻、小麦和玉米是世界三大主要粮食作物,但对水稻来说,类胡萝卜素只存在于叶中,籽粒中没有。小麦中含有的类胡萝卜素主要是叶黄素和玉米黄素,其中以叶黄素为主,而 β -胡萝卜素的含量则很少。玉米是世界上多样性最大的物种之一,从DNA序列水平上看,两个玉米品种间的平均差异,甚至大于人与大猩猩之间的差异^[16],同时,玉米籽粒中类胡萝卜素含量也存在很大的差异。有研究对87个玉米优良自交系的营养成分进行分析,发现其主要含有非维生素A原的叶黄素和玉米黄素,但也有中等含量的 β -胡萝卜素、 α -胡萝卜素和 β -隐黄质,并且这些组分的遗传力很高,变异广泛^[17]。Harjes等^[18]测定了204份黄色玉米发现,平均总类胡萝卜素含量高达23 $\mu\text{g/g}$ (范围5.5~66 $\mu\text{g/g}$)、 β -胡萝卜素1.7 $\mu\text{g/g}$ (范围0.06~13.6 $\mu\text{g/g}$),变异范围可达上百倍。Yan等^[19]对接近400份有色玉米中多种类胡萝卜素含量测定,总类胡萝卜素可达到38 $\mu\text{g/g}$,各组分变异范围可达数十倍(图4)。

玉米籽粒中其他主要营养成分,如叶黄素和玉米黄素也是人体必需的营养物质,叶黄素和玉米黄素在视网膜上积累可避免这些组织发生光降解,同时也可减少老年黄斑变性的产生^[21]。玉米是撒哈拉以南的非洲及拉丁美洲人们的主食,是我国目前种植面积和产量均为第一的粮食作物,也是我国北方及西南山区等地人们的主要口粮之一。玉米种质资源存在广泛的遗传和表型变异,使其成为一种理想的营养改良的模式植物,HarvestPlus项目将玉米作为高维生素A原改良的首选目标(<http://www.harvestplus.org/>)。

2 类胡萝卜素的遗传特点

2.1 类胡萝卜素含量的自然变异仅受少数基因控制

连锁分析是数量性状位点研究的经典方法,以不同的分离群体为材料,类胡萝卜素的组分为表型,多个研究小组定位了控制玉米类胡萝卜素组分的数量性状位点(quantitative trait locus, QTL)。Wong等^[22]利用W64a \times A632 F_{2,3}群体对类胡萝卜素成分和总含量进行遗传分析,鉴定了4个具有一因多效的QTL

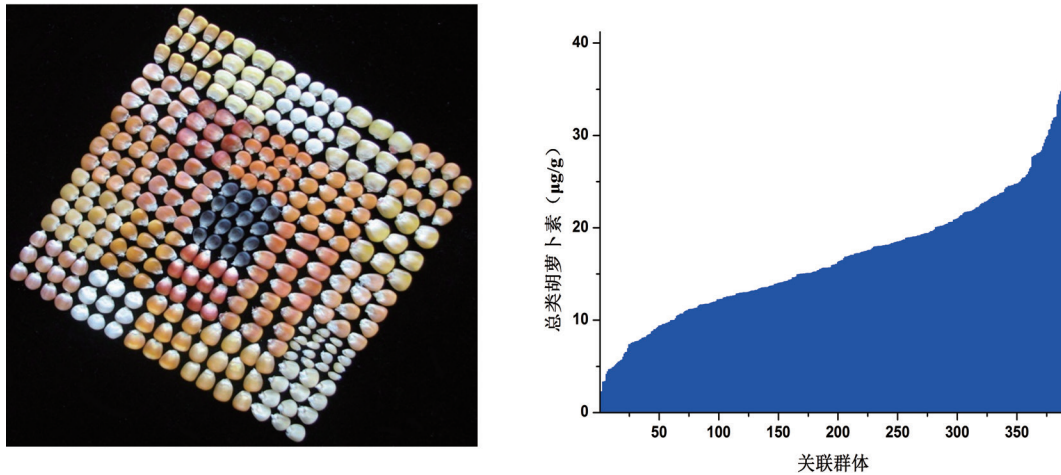
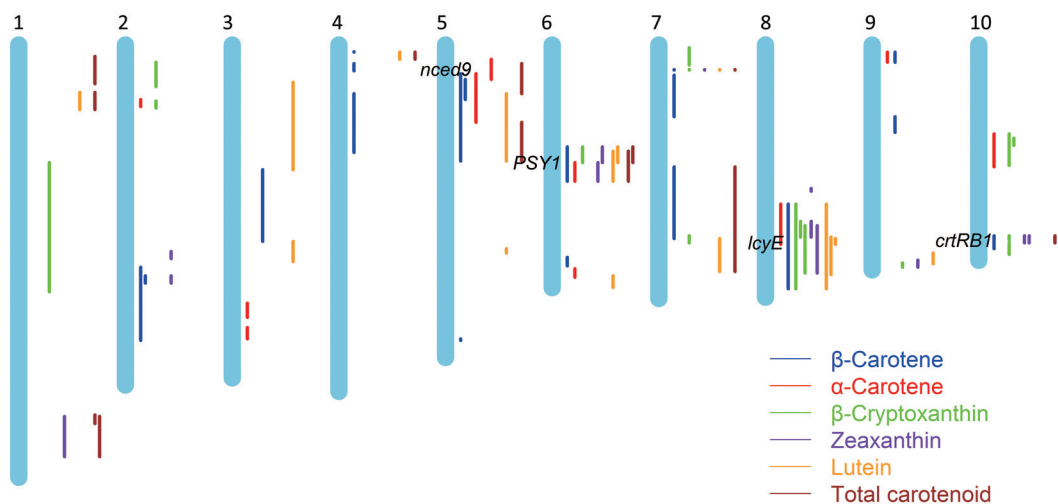


图4 一个玉米关联群体籽粒表型(左图^[20])及籽粒中总类胡萝卜素含量分布(右图^[19])

控制多种类胡萝卜素组分的合成, 其中 *PSY1* 和 *ZDS* 可能是两个关键候选基因。Chander 等^[23] 对 B73×By804 重组自交系群体类胡萝卜素含量进行连锁分析, 发现 31 个 QTL 可能控制类胡萝卜素的成分和总含量, 其中 *PSY1* 和 *y9* 两个基因位点很大程度上解释了该群体中类胡萝卜素含量的表型变异。不同遗传背景群体都检测到 *PSY1*, 暗示了 *PSY1* 基因对控制类胡萝卜素含量具有重要作用。Kandianis 等^[24] 利用 DEexp × CI7 和 A619 × SC55 两个 F_{2:3} 群体鉴定了控制类胡萝卜素组分合成的主效 QTL: DEexp × CI7 群体中, 2~8 个 QTL 可以解释 20%~50% 类胡萝卜素各成分变异; A619 × SC55 群体中, 3~6 个 QTL 可以解释 22%~56% 的表型变异。对已发表的玉米籽粒类胡萝卜素含量 QTL 定位结果的

整合分析表明: QTL 分布在所有 10 条染色体上, 但在染色体 5、6、8 和 10 存在明显的 4 个热点区域, 这些热点区域存在相应代谢途径中的候选基因 *nced9*、*PSY1*、*lcyE*、*crtRB1* (图 5)。

全基因组关联分析因定位精度高, 且能够同时检测多个等位基因等优点而被广泛应用。Owens 等^[25] 利用全基因组关联分析对颜色广泛变异的玉米自交系群体类胡萝卜素成分进行了分析, 鉴定了 58 个可能与类胡萝卜素合成与维持相关的基因, 其中最显著的 4 个基因为 *zep1*、*lut1*、*lcyE* 和 *crtRB1*。该研究提出利用新鉴定的 2 个基因 *lut1* 和 *zep1* 及前人报道的 6 个基因 *PSY1*、*ZDS1*、*lcyE*、*crtRB3*、*crtRB1* 和 *CCD1* 共 8 个关键基因进行选择, 将会高效快速地培育富含类胡萝卜素的适应性好的热带玉



图中 *nced9*、*PSY1*、*lcyE*、*crtRB1* 标示的位置为该基因的物理位置

图5 类胡萝卜素总含量和各成分 meta-QTLs^[22-24]

米品种。

综合上述连锁分析与关联分析结果, 我们发现不同遗传背景玉米材料的类胡萝卜素成分和比例由少数主效 QTL 控制, 且多个 QTL 存在一因多效的特点。

2.2 代谢途径驱动的候选基因关联分析为功能分子标记开发提供了基础

连锁分析尽管能定位到关键的 QTL, 也能推测出一些相应的候选基因, 但尚不能明确关键的功能位点。由于玉米遗传和表型变异丰富, 连锁不平衡的衰退距离快, 且维生素 A 的代谢途径相对清楚和简单, 这些有利条件为类胡萝卜素候选基因关联分析提供了契机^[26-27]。该方法在玉米中已被成功运用, 深入分析了 *lcyE*、*crtRB*、*PSYI* 和 *crtRB3* 等多个基因对玉米籽粒中类胡萝卜素含量的影响^[18-19, 28-29]。

lcyE 是类胡萝卜素代谢途径中的关键基因, 基于 204 份变异广泛的黄色玉米进行候选基因关联分析发现其能够调控 α -胡萝卜素分支和 β -胡萝卜素分支的比例。该基因与之前连锁分析的一个主效 QTL 共定位, 可解释 54% 的 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素分支含量比例的变异。授粉后 15~20 d, 该基因表达量与两分支含量比例显著相关。利用 EMS 诱变 Qx47 自交系, 发现后代籽粒由黄色变为橙色, 玉米黄素和叶黄素比例增大, 因此, 从关联分析、连锁分析、表达分析和突变体 4 个角度确定了 *lcyE* 是调控 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素比例的关键基因。对 *lcyE* 基因多态性位点进行候选基因关联分析以寻找功能位点, 启动子区一个大的插入和第一外显子氨基酸的替换能解释最大表型变异 ($R^2=36\%$), 同时也鉴定出一个最有利的单倍型 (启动子区大的插入和 3' 端 8 bp 插入) 可产生更高的 β -胡萝卜素。作者进一步开发了基于 PCR 的分子标记, 认为利用这些标记进行高维生素 A 原的玉米培育, 能大大降低成本, 每个样本的花费是基于传统的高压液相色谱 (HPLC) 测定成本的 1/1000^[18]。

另一个重要基因为 *crtRB1*, 其编码酶能够催化 β -胡萝卜素转化为 β -隐黄质。虽然两者都是维生素 A 原, 但是一分子 β -胡萝卜素能够转化为两分子维生素 A, 效率更高, 富集更多的 β -胡萝卜素就成了重要的育种目标。结合关联分析、连锁分析、表达分析和大肠杆菌体外表达等多种手段证明 *crtRB1* 是影响 β -胡萝卜素的关键功能基因, 其 3 个功能多态性标记 5'TE、3'TE 和 InDel4 可解释 β -胡萝卜素表型变异的 40%。更为重要的是, 其优良

等位基因的分布频率在热带和温带材料中截然不同, 在热带材料中几乎不存在, 这为利用温带材料作为供体提高热带材料的 β -胡萝卜素含量提供了理论基础^[19]。

在类胡萝卜素合成途径中, 第一步反应是控制类胡萝卜素合成的限速步骤。早在 20 世纪 40 年代, 发现 *yl* 基因位点对籽粒类胡萝卜素含量有剂量效应, 后来克隆该基因发现其编码八氢番茄红素合成酶 (PSY), 因此, 也被称为 *PSYI*, 3 个拷贝的显性 *PSYI* 能使胚乳黄色着色最深^[30]。早期研究表明, 该基因是从白色玉米到黄色玉米改良过程中的关键基因^[31], 经历了一个很强的正选择, 该区域的连锁不平衡衰退距离高达 1 Mb, 在黄色玉米中只有一个单倍体型, 几乎不存在变异^[32]。最新的研究发现, 尽管黄色玉米变异比较小, 但仍然存在变异, 部分变异和籽粒的总类胡萝卜素的含量相关^[28], 但其优良等位基因的频率在热带和温带材料中的比例都非常高 (表 1)。后续研究还发现 *PSYI* 的表达量与类胡萝卜素的总含量呈正相关^[11]。

表1 类胡萝卜素合成关键基因最优等位基因频率

	N	<i>PSYI</i>	<i>lcyE</i>	<i>crtRB1</i>
热带/亚热带材料	278	>95%	>50%	0
温带材料	226	>80%	<10%	>6%

3 分子标记辅助选择选育高维生素A原玉米品种

不同于产量等其他农艺性状, 籽粒类胡萝卜素含量的选择很难基于田间的表型观察。尽管有报道说籽粒的颜色可能和籽粒的总类胡萝卜素含量呈正相关, 但这种相关性比较低^[18]。传统的高维生素 A 原玉米选育时表型测定主要依赖于 HPLC, 该方法有两个明显的缺点: 一是破坏性, 破坏籽粒对后期的选择带来影响; 二是价格昂贵, 在国际玉米小麦改良中心 (CIMMYT), 测定一个样本的成本是 50~70 美元。因为玉米籽粒中不同类胡萝卜素含量由主效基因控制, 利用分子标记辅助选择不但可以实现早期选择, 而且更加经济有效^[18]。中国农科院和 CIMMYT 等单位的遗传学家和统计学家合作, 通过模拟的方法专门评估了类胡萝卜素相关分子标记在实际育种中的价值。他们的分析结果表明, 如果利用这些功能标记进行分子育种研究, 不管采取哪种育种策略, 其成本都能降低一半以上。以 CIMMYT 育种程序为例, 如果每年组配 40 个组合,

每个组合 600 个单株的规模, 利用分子标记与表型鉴定结合的手段, 比传统的仅仅依靠表型鉴定的方法, 最多可以节省 24 万美元^[33]。而目前已鉴定了类胡萝卜素代谢途径中 3 个关键基因 *PSYI*、*lcyE* 和 *crtRBI* 的多态性位点, 其中 *PSYI* 鉴定了 2 个多态性位点, 可以解释 7%~8% 的总类胡萝卜素含量的变异^[27], *lcyE* 基因有四个多态性位点影响 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素两分支的比例, 可解释 58% 的表型变异, 同时使维生素 A 原增加 3 倍^[18], 而 *crtRBI* 存在 3 个多态性标记可解释 40% β -胡萝卜素的含量变异^[19]。这些功能位点已被开发为简单好用的以 PCR 为基础的分子标记应用于分子标记辅助选择。

比较分析热带和温带玉米中 3 个基因的有利等位基因在温带玉米和热带玉米中的分布频率(表 1), 可以看出 *PSYI* 优良等位基因频率很高, 因此, 在实际应用中, 该基因可能不需要太多考虑。*crtRBI* 优良等位基因频率在热带材料中较低, 而 *lcyE* 在温带材料中的基因频率较低, 温热带关键等位基因频率的不同要求育种家从更广泛的材料中选择最优等位基因供体材料, 促进温热带材料优良基因的交流, 使选择更加有效, 而这是之前育种很少考虑到的。

结合关联分析和连锁分析鉴定了 *lcyE* 和 *crtRBI* 两个主效基因及其优良等位基因。通过这两个基因的研究说明: 连锁分析是发现目标 QTL 的有效方法, 而关联分析则可以鉴定出最优良的等位基因, 为分子育种提供功能标记。

另外, 对这两个关键基因的多种等位基因在不同育种材料中的实际效果也进行了很多研究。Babu 等^[34] 不建议在育种中将 *lcyE* 和 *crtRBI* 的有利等位基因组合在一起, 因为胡萝卜素代谢途径受到反馈抑制的调控。当 *lcyE* 非有利等位基因纯合或杂合状态时, 维生素 A 原的含量才能达到最大。Azmach 等^[35] 对热带黄色玉米分析发现, *lcyE* 和 *crtRBI* 两个基因的效应要比单独基因的效应更大, 而 *crtRBI* 对维生素 A 原变异具有更大的效应, 5'TE 和 3'TE 两个有利等位基因组合的单倍型可使 β -胡萝卜素增加 7.2 $\mu\text{g/g}$, 提高 3.22 倍, 且该单倍型在热带材料中基因频率仅为 18%~19%, 因此, 该功能标记将可能很大程度上提高热带玉米中维生素 A 原的含量。

当然, 培育高维生素 A 原玉米品种同时也要保证其农艺性状的优良性, 只有这样才能更好地被农民接受且更大程度上缓解维生素 A 缺乏的现状。

Menkir 等^[36] 通过将来自两个杂种优势群的黄色与橙黄色胚乳的玉米自交系进行杂交, 评估杂交种中类胡萝卜素含量与农艺性状, 发现一些高维生素 A 原的杂交种在产量和其他农艺性状方面并不输于商业杂交种, 这将为高维生素 A 原杂交种的推广应用奠定基础。

2012 年, CIMMYT 等机构已经在赞比亚、尼泊尔和加纳等国家释放了 5 个高维生素 A 原的杂交种和 3 个开放玉米品种, 他们都携带 *crtRBI* 优良等位基因, 使维生素 A 原至少增加 6~8 $\mu\text{g/g}$; 除此以外, 这些玉米品种还具有高产、抗病和抗干旱的优良性状。这些品种的推广应用, 将逐步解决以玉米为主粮的贫困地区维生素 A 缺乏的现状。严建兵等在前期 CIMMYT 工作的基础上, 将获得的高维生素 A 原材料引进中国, 并分发给云南农业科学院、湖北农业科学院、华南农业大学等单位, 他们已经开始利用这些材料和标记开展高维生素 A 原玉米的选育工作。其中, 云南农业科学院番兴明和中国农业大学李建生等合作已经选育了一些高维生素 A 原的玉米品种, 并已经开始示范性种植(私人交流)。

4 问题与展望

长期以来, 我们关注的是大量营养摄入不足的贫困问题, 而对微量营养缺乏关注不够。微量营养缺乏被称为“隐形饥饿”, 估计全球的一半以上的人口都存在这个问题, 应该引起足够的重视。通过生物强化增加主粮中微量营养素含量, 利用该思路解决这个问题最为经济有效。但对于主粮长期关注的是产量, 对微量营养素的含量一直关注不够, 研究甚少, 国家层面缺乏有效政策支持。我们认为, 尤其在经济水平发展到一定阶段后, 更应该关注微量营养健康的问题。

虽然类胡萝卜素代谢途径和遗传机理的研究相对比较清楚, 但目前发现的一些基因都是编码关键酶, 尚未发现一些起调控作用的转录因子, 且该代谢途径中酶的亚细胞定位及翻译后的酶活性调控研究也很少^[37]。随着技术的发展, 通过系统生物学方法分析转录组和代谢组数据, 或许可找到一些起调控作用的关键基因, 这将有利于人们更好地理解 and 利用这个代谢途径。

分子标记辅助选择高维生素 A 原的玉米是目前 CIMMYT 玉米分子育种史上最成功的例子之一, 1~2 个基因的导入能大幅度提高维生素 A 原的含量。但也要认识到在长期轮回选择中可能会忽略一些微

效基因, 目前全基因组选择的方法在植物育种中应用已经提出, 该方法不需要寻找 QTL 相关的标记。根据已知群体建立预测模型而后应用到目标群体, 从而估计出全基因组每个标记的效应值包括微效基因, 用于育种选择^[38]。如果这种方法应用于高维生素 A 原品种的培育, 有可能会进一步提高维生素 A 原的含量。

除类胡萝卜素外, 玉米籽粒中还含有其他丰富的营养物质, 平均蛋白质含量为 12.3%, 淀粉为 64.5%, 油份为 3.6%, 微量营养成分中总类胡萝卜素含量为 10.3 $\mu\text{g/g}$, 维生素 E 总含量为 59.6 $\mu\text{g/g}$ ^[17]。通过基因组学和遗传学的研究, 已鉴定到多个影响维生素 E^[39-41] 和脂肪酸^[42] 含量的关键基因。如果我们能综合利用这些进展, 通过分子标记聚合, 选育高维生素 A 原、高维生素 E 和高不饱和脂肪酸的“三高”玉米, 就可以满足人们的多样化需求。同时, 如果把这些优良等位基因导入甜玉米和糯玉米中, 也能显著提高这些特用玉米的营养品质, 提高附加值, 增产增收。

[参 考 文 献]

- [1] Sherry AT. Vitamin A: biomarkers of nutrition for development. *Am J Clin Nutr*, 2011, 94(2): 658S-665S
- [2] Zhong M, Kawaguchi R, Kassai M, et al. Retina, retinol, retinal and the natural history of vitamin A as a light sensor. *Nutrients*, 2012, 4(12): 2069-96
- [3] Clagett-Dame M, Knutson D. Vitamin A in reproduction and development. *Nutrients*, 2011, 3(4): 385-428
- [4] Al Tanoury Z, Piskunov A, Rochette-Egly C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. *J Lipid Res*, 2013, 54(7): 1761-75
- [5] O'Byrne SM, Blaner WS. Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology. *J Lipid Res*, 2013, 54(7): 1731-43
- [6] Von Lintig J. Provitamin A metabolism and functions in mammalian biology. *Am J Clin Nutr*, 2012, 96(5): 1234S-44S
- [7] Tang G. Bioconversion of dietary provitamin A carotenoids to vitamin A in humans. *Am J Clin Nutr*, 2010, 91(5): 1468S-73S
- [8] Sherwin JC, Reacher MH, Dean WH, et al. Epidemiology of vitamin A deficiency and xerophthalmia in at-risk populations. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2012, 106(4): 205-14
- [9] WHO. Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995-2005[R]//WHO Global Database on Vitamin A Deficiency. Geneva: World Health Organization, 2009:1-5
- [10] White PJ, Broadley MR. Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(12): 586-93
- [11] Da Silva Messias R, Galli V, Dos Anjos E Silva SD, et al. Carotenoid biosynthetic and catabolic pathways: gene expression and carotenoid content in grains of maize landraces. *Nutrients*, 2014, 6(2): 546-63
- [12] DellaPenna D, Pogson BJ. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 711-38
- [13] Al-Babili S, Beyer P. Golden Rice--five years on the road--five years to go? *Trends Plant Sci*, 2005, 10(12): 565-73
- [14] Diretto G, Tavazza R, Welsch R, et al. Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene epsilon cyclase. *BMC Plant Biol*, 2006, 6: 13
- [15] Yu B, Lydiate DJ, Young LW, et al. Enhancing the carotenoid content of *Brassica napus* seeds by downregulating lycopene epsilon cyclase. *Transgenic Res*, 2008, 17(4): 573-85
- [16] Buckler ES, Gaut BS, McMullen MD. Molecular and functional diversity of maize. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9(2): 172-6
- [17] Chander S, Meng Y, Zhang Y, et al. Comparison of nutritional traits variability in selected eighty-seven inbreds from Chinese maize (*Zea mays* L.) germplasm. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(15): 6506-11
- [18] Harjes CE, Rocheford TR, Bai L, et al. Natural genetic variation in *lycopene epsilon cyclase* tapped for maize biofortification. *Science*, 2008, 319(5861): 330-3
- [19] Yan J, Kandianis CB, Harjes CE, et al. Rare genetic variation at *Zea mays crtRB1* increases β -carotene in maize grain. *Nat Genet*, 2010, 42(4): 322-7
- [20] Yang X, Gao S, Xu S, et al. Characterization of a global germplasm collection and its potential utilization for analysis of complex quantitative traits in maize. *Mol Breed*, 2011, 28(4): 511-26
- [21] Farré G, Bai C, Twyman RM, et al. Nutritious crops producing multiple carotenoids--a metabolic balancing act. *Trends Plant Sci*, 2011, 6(10): 532-40
- [22] Wong JC, Lambert RJ, Wurtzel ET, et al. QTL and candidate genes phytoene synthase and zeta-carotene desaturase associated with the accumulation of carotenoids in maize. *Theor Appl Genet*, 2004, 108(2): 349-59
- [23] Chander S, Guo YQ, Yang XH, et al. Using molecular markers to identify two major loci controlling carotenoid contents in maize grain. *Theor Appl Genet*, 2008, 116(2): 223-33
- [24] Kandianis CB, Stevens R, Liu W, et al. Genetic architecture controlling variation in grain carotenoid composition and concentrations in two maize populations. *Theor Appl Genet*, 2013, 126(11): 2879-95
- [25] Owens BF, Lipka AE, Magallanes-Lundback M, et al. A foundation for provitamin a biofortification of maize: genome-wide association and genomic prediction models of carotenoid levels. *Genetics*, 2014, 198: 1699-716
- [26] Yan J, Warburton ML, Crouch J. Association mapping for enhancing maize (*Zea mays* L.) genetic improvement. *Crop Sci*, 2010, 51(2): 433-49
- [27] Yan J, Shah T, Warburton ML, et al. Genetic characterization and linkage disequilibrium estimation of a

- global maize collection using SNP markers. *PLoS One*, 2009, 4(12): e8451
- [28] Fu Z, Chai Y, Zhou Y, et al. Natural variation in the sequence of *PSY1* and frequency of favorable polymorphisms among tropical and temperate maize germplasm. *Theor Appl Genet*, 2013, 126(4): 923-35
- [29] Zhou Y, Han Y, Li Z, et al. *Zm crtRB3* encodes a carotenoid hydroxylase that affects the accumulation of α -carotene in maize kernel. *J Integr Plant Biol*, 2012, 54(4): 260-9
- [30] Buckner B, Kelson TL, Robertson DS. Cloning of the *yl* locus of maize, a gene involved in the biosynthesis of carotenoids. *Plant Cell*, 1990, 2(9): 867-76
- [31] Palaisa KA, Morgante M, Williams M, et al. Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci. *Plant Cell*, 2003, 15(8): 1795-806
- [32] Fu Z, Yan J, Zheng Y, et al. Nucleotide diversity and molecular evolution of the *PSY1* gene in *Zea mays* compared to some other grass species. *Theor Appl Genet*, 2010, 120(4): 709-20
- [33] Zhang X, Pfeiffer WH, Palacios-Rojas N, et al. Probability of success of breeding strategies for improving provitamin A content in maize. *Theor Appl Genet*, 2012, 125(2): 235-46
- [34] Babu R, Rojas NP, Gao S, et al. Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in *LcyE* and *CrtRB1* on provitamin A concentrations for 26 tropical maize populations. *Theor Appl Genet*, 2013, 126(2): 389-99
- [35] Azmach G, Gedil M, Menkir A, et al. Marker-trait association analysis of functional gene markers for provitamin A levels across diverse tropical yellow maize inbred lines. *BMC Plant Biol*, 2013, 13: 227
- [36] Menkir A, Gedil M, Tanumihardjo S, et al. Carotenoid accumulation and agronomic performance of maize hybrids involving parental combinations from different marker-based groups. *Food Chem*, 2014, 148: 131-7
- [37] Wurtzel ET, Cuttriss A, Vallabhaneni R. Maize provitamin A carotenoids, current resources, and future metabolic engineering challenges. *Front Plant Sci*, 2012, 3: 29
- [38] Desta ZA, Ortiz R. Genomic selection: genome-wide prediction in plant improvement. *Trends Plant Sci*, 2014, 19(9): 592-601
- [39] Li Q, Yang X, Xu S, et al. Genome-wide association studies identified three independent polymorphisms associated with α -tocopherol content in maize kernels. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36807
- [40] Valentin HE, Lincoln K, Moshiri F, et al. The *Arabidopsis vitamin E pathway gene5-1* mutant reveals a critical role for phytol kinase in seed tocopherol biosynthesis. *Plant Cell*, 2006, 18(1): 212-24
- [41] Yang W, Cahoon RE, Hunter SC, et al. Vitamin E biosynthesis: functional characterization of the monocot homogentisate geranylgeranyl transferase. *Plant J*, 2011, 65(2): 206-17
- [42] Li H, Peng Z, Yang X, et al. Genome-wide association study dissects the genetic architecture of oil biosynthesis in maize kernels. *Nat Genet*, 2013, 45(1): 43-50