

DOI: 10.13376/j.cbls/2015143

文章编号: 1004-0374(2015)08-1037-10



寿惠霞, 博士, 浙江大学“求是”特聘教授、生物技术系主任, 植物研究所副所长, 教育部“新世纪优秀人才”。博士毕业于美国爱荷华州立大学植物转基因研究中心, 2004年回国。多年来, 她从事植物转基因和植物功能基因组方面研究, 在作物养分吸收、抗逆等功能基因克隆、作物转基因技术体系研究等方面发表SCI 研究论文40余篇。近年来在 *BMC Plant Biol*、*Plant Cell & Envir*、*New Phytol* 等杂志上发表多篇代表性论文。

## 作物铁生物强化

李 林, 寿惠霞\*

(浙江大学生命科学学院, 杭州 310058)

**摘 要:** 铁是植物必需的微量元素。缺铁不仅影响植物的生长, 更影响作物的营养品质。铁营养摄入不足是导致人体缺铁性贫血的主要原因。在膳食结构中, 以谷物为主食, 特别是发展中国家的人群, 缺铁性贫血更为严重。因此, 以提高作物食用部分铁含量为目标的“铁生物强化”意义重大。首先, 介绍了植物铁吸收、转运和储存的分子机制; 其次, 总结了提高作物铁含量和生物有效性的方法; 最后, 对未来作物铁生物强化的研究方向提出了展望。

**关键词:** 作物; 铁; 吸收; 铁含量; 生物强化; 生物有效性

**中图分类号:** Q58; Q945; S51      **文献标志码:** A

## Iron biofortification of crop plants

LI Lin, SHOU Hui-Xia\*

(College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** Iron (Fe) is an essential microelement affecting plant growth and nutrient values of the plant-based food. Inefficient Fe intake from diets is the main cause of iron deficiency anemia. Fe deficiency anemia is especially severe in developing countries where cereals are major staple crops. Therefore, it is particularly important to increase iron content and bioavailability in the edible parts of crops. This review firstly introduced molecular mechanisms of iron uptake, transport and storage, and then on this basis summarized approaches for increasing Fe content and bioavailability in crops. Finally, the future research directions were proposed.

**Key words:** crop; iron; uptake; iron content; biofortification; bioavailability

铁是植物生长发育所必需的微量元素, 在植物的生命活动中发挥极其重要的作用。作为许多功能蛋白质的辅助因子, 铁参与了植物的光合作用、呼吸作用、叶绿素的合成以及生物固氮等过程<sup>[1]</sup>。

收稿日期: 2014-12-22; 修回日期: 2015-01-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172024); Harvest-Plus-China(2014H8399)

\*通信作者: E-mail: huixia@zju.edu.cn; Tel: 0571-88206146

地壳中的铁含量非常丰富,但铁在中性和碱性土壤中溶解度极低,远远不能满足植物生长所需。特别是在 pH 较高的石灰质土壤中,植物缺铁更为严重<sup>[2]</sup>。缺铁会造成植物叶片失绿、生长受阻、产量降低等生理现象,从而影响植物的健康生长<sup>[3]</sup>。另一方面,人类膳食中的铁营养摄入不足是导致贫血的一个重要原因。根据世界卫生组织 WHO 的统计 (<http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/index.html>),铁营养失调已经成为目前最为严重的营养缺乏症之一,危及全球超过 30% 人口的身体健康。在以植物性食物为主要膳食成分的发展中国家,妇女及儿童人群的缺铁性贫血程度更为严重。因此,通过现代生物学手段改变作物中铁的吸收和积累模式,培育铁高效作物新品种,特别是通过生物强化的方法提高作物食用部分的铁含量及生物有效性(以下简称铁生物强化),对于改善人体铁营养状况具有重要意义。

## 1 植物铁吸收、转运和储存

### 1.1 植物铁的吸收机制

植物铁吸收包括以下两种机制。机制 I 存在于双子叶植物和非禾本科的大部分单子叶植物中。以拟南芥为例,在缺铁环境下,植物通过根际质膜上的 H<sup>+</sup>-ATP 酶向土壤分泌质子,酸化土壤,提高土壤中 Fe<sup>3+</sup> 的可溶性。H<sup>+</sup>-ATP 酶由 *AHA* 基因编码,拟南芥的 *AHA2* 受缺铁诱导并主要负责这一过程<sup>[4]</sup>。随着土壤中 Fe<sup>3+</sup> 的溶解度增加,这部分 Fe<sup>3+</sup> 通过根系细胞膜上的三价铁还原酶 (ferric-chelate reductase, FRO) 被还原成 Fe<sup>2+</sup>。拟南芥中存在 8 个 *FRO* 基因, *AtFRO2* 是参与这一过程的最重要的还原酶基因<sup>[5-7]</sup>。Fe<sup>3+</sup> 还原后通过二价金属转运体 IRT (iron-regulated transporter) 转运至植物体内<sup>[8]</sup>。IRT 属于 ZIP (zinc-regulated transporter, iron-regulated transporter-like protein) 蛋白家族。拟南芥 *AtIRT1* 参与 Fe<sup>2+</sup> 的转运, *irt1* 突变体因缺铁出现严重失绿,生长受阻,甚至苗期致死的表型,因此,它的存在对于植物 Fe<sup>2+</sup> 的吸收至关重要<sup>[9-10]</sup>。

禾本科植物,如玉米和小麦利用机制 II 吸收铁。它们受到缺铁胁迫时能在根部合成铁载体蛋白 (phytosiderophores, PS),并分泌到土壤中。PS 属于麦根酸家族 (mugineic acids, MAs),与 Fe<sup>3+</sup> 有很高的亲和性。麦根酸的生物合成途径分为以下 3 个过程:首先,在 S-腺苷甲硫氨酸合成酶 (S-adenosyl-L-methionine synthetase, SAMs) 的作用下,植物将

蛋氨酸合成 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl-L-methionine, SAM);其次,3 分子的 SAM 通过尼克酰胺合成酶 (nicotianamine synthase, NAS) 合成尼克酰胺 (nicotianamin, NA);最后,NA 在尼克酰胺氨基转移酶 (nicotianamine aminotransferase, NAAT) 和脱氧麦根酸合成酶 (2'-deoxymugeneic acid synthase, DMAS) 的作用下,合成麦根酸的前体——2'-脱氧麦根酸 (2'-deoxymugeneic acid, DMA)<sup>[11-13]</sup>。虽然所有的植物都能合成 NA,但只有禾本科植物才能将 NA 转化成麦根酸<sup>[14]</sup>。不同的禾本科植物分泌的麦根酸种类也不同,水稻、玉米和小麦只能分泌 2-脱氧麦根酸。而大麦中的 2-脱氧麦根酸还能被羟基化形成其他多种形式的麦根酸<sup>[11]</sup>。禾本科植物合成麦根酸之后通过 TOM1 (transporter of mugineic acid family phytosiderophores 1) 转运体将其分泌至根际土壤中<sup>[15]</sup>。分泌至土壤中的 PS 与 Fe<sup>3+</sup> 螯合后形成的 Fe<sup>3+</sup>-PS 复合物通过 YS (yellow stripe)/YSL (yellow stripe-like) 家族转运体转运至植物体内。YS 转运体最初在玉米中被发现,缺失 *YS1* 基因后,植物出现黄色斑条纹状缺铁表型,失去了转运 Fe<sup>3+</sup>-PS 的能力<sup>[16]</sup>。水稻有 18 个 *YSL* 基因,其中 *OsYSL15* 主要负责 Fe<sup>3+</sup>-PS 的转运<sup>[17-18]</sup>。

水稻作为禾本科植物也存在机制 I 的铁吸收系统,既能通过分泌 PS 螯合并吸收土壤中的 Fe<sup>3+</sup>,也能通过自身的二价铁离子转运体 *OsIRT1* 直接吸收 Fe<sup>2+</sup><sup>[19]</sup>。和机制 I 植物不同的是,在水稻根部并没有检测到 FRO 活性,说明水稻更倾向于直接吸收 Fe<sup>2+</sup><sup>[20]</sup>。

### 1.2 铁的转运

铁在植物体内的溶解度也很低,因此,其在植物体内的运输主要以螯合物的形式,并以此来维持稳定的氧化还原状态<sup>[21]</sup>。铁在植物体内的长距离运输包括 3 个部分,即根部的径向运输、木质部和韧皮部的转运以及在各组织和器官中的共质体运输。此外,在一些源器官和凋亡的组织中还存在铁的再分配<sup>[22]</sup>。研究表明,植物体内运输铁的螯合剂主要有柠檬酸<sup>[23-24]</sup>、尼克酰胺<sup>[21,25]</sup>和麦根酸类物质<sup>[26-27]</sup>。

柠檬酸一直被认为是铁在木质部中运输的主要螯合剂<sup>[23]</sup>。*AtFRD3* (ferric reductase defective 3) 编码一柠檬酸转运体,它属于拟南芥 MATE (multidrug and toxin efflux) 家族成员,负责将柠檬酸转运至木质部。对拟南芥 *frd3* 突变体的研究发现,由于铁无法正常转运至木质部,因而在根部维管束中大量积累,造成叶片中的铁含量显著下降,出现失绿的缺铁

表型, 由此产生的缺铁信号激活了根部的缺铁响应机制, 造成多种金属元素的吸收和分配出现异常<sup>[28]</sup>。*AtFRD3* 在水稻中的同源基因 *OsFRDL1* 也编码一柠檬酸转运体, 它在根部中柱鞘细胞中特异表达。该基因敲除后植物也出现缺铁表型, 但没有拟南芥突变体那么严重, 说明柠檬酸在木质部铁的转运中具有重要作用, 同时也表明水稻还具有其他螯合剂来帮助铁在木质部的运输<sup>[29]</sup>。

植物会分泌一些酚类物质, 如原儿茶酸 (protocatechuic acid, PCA)、咖啡酸 (caffeic acid, CA) 等来螯合  $\text{Fe}^{3+}$ , 提高  $\text{Fe}^{3+}$  的溶解度并将其还原成  $\text{Fe}^{2+}$ , 使质外体中沉积的铁能被植物有效地吸收<sup>[30]</sup>。已有研究表明, 水稻 *OsPEZ1* (phenolics efflux zero 1) 基因突变后, 木质部中的 PCA 和 CA 的含量都显著降低, 而根部质外体中沉积的铁含量反而上升了, 说明 *OsPEZ1* 负责转运 PCA 至木质部, 有助于质外体中沉积的铁的再利用<sup>[31]</sup>。

铁进入根部共质体后与相应的螯合剂结合形成螯合物, 再从共质体中流出进入质外体, 接着转运至木质部。已报道的 *FRD3*、*FRDL1* 和 *PEZ1* 主要负责运输铁螯合物至木质部, 但铁的流出机制至今还未解释清楚。拟南芥 *AtFPN1/AtIREG1* (ferroportin1/iron regulated 1) 是目前发现的最有可能参与上述过程的外运体。虽然 *AtFPN1* 的转运体活性还未得到证实, 但从它在根部中柱中表达以及突变体出现黄化现象这两方面来看, *AtFPN1* 很有可能参与将铁运输至木质部这一过程<sup>[32]</sup>。

铁进入木质部后除了向上运输至植物各处细胞外, 还可以通过木质部转运至韧皮部, 在这一过程中 YSL 家族发挥了重要的作用。YSL 家族不仅存在于禾本科植物中, 也存在于非禾本科植物中, 既负责转运  $\text{Fe}^{3+}$ -PS 复合物, 也参与  $\text{Fe}^{2+}$ -NA 复合物在植物体内的长距离运输。玉米的 *ZmYSL1* 负责根部吸收的  $\text{Fe}^{3+}$ -PS 复合物的转运, 但在缺铁条件下, 根和叶中的 *YSL* 基因都出现表达上调的情况<sup>[16]</sup>。水稻 *OsYSL15* 在维管组织中特异表达, 不仅转运根部吸收的  $\text{Fe}^{3+}$ -PS 复合物, 还参与其在植物体内的运输<sup>[17-18]</sup>。*OsYSL18* 在花粉、花粉管以及韧皮部伴细胞中特异表达, 说明它参与水稻的生殖发育及铁在韧皮部的转运<sup>[26]</sup>。*OsYSL2* 负责将  $\text{Fe}^{2+}$ -NA 和  $\text{Mn}^{2+}$ -NA 复合物运输至植物所需部位, 如叶和种子中, 但它并不参与  $\text{Fe}^{3+}$ -PS 复合物的转运<sup>[33-34]</sup>。拟南芥 *AtYSL1* 和 *AtYSL3* 存在功能冗余, 负责铁和其他金属元素与 NA 螯合物的转运<sup>[35-37]</sup>。*AtYSL2*

定位在质膜上, 参与  $\text{Fe}^{2+}$ -NA 和  $\text{Cu}^{2+}$ -NA 复合物在维管组织中的横向运输<sup>[38-39]</sup>。此外, 在水稻中还存在 2 个尼克酰胺外运体 *ENA1* (efflux transporter of nicotianamine 1) 和 *ENA2*, 它们可能也参与铁与 NA 螯合物在植物体内的运输<sup>[15]</sup>。

### 1.3 铁在亚细胞中的转运及储存

铁进入植物细胞后需要分配至合适的细胞器以行使功能, 或者储存在液泡中, 以防止过量的铁积累对细胞造成毒害。植物通过这种调控方式来维持细胞内的铁平衡。

细胞中 80%~90% 的铁存在于叶绿体中, 因此, 叶绿体是植物细胞中最大的铁库。已有研究表明, 拟南芥叶绿体透性酶 *AtPIC1* (permease in chloroplasts 1) 负责将铁转运至叶绿体中, *AtPIC1* 定位在叶绿体内膜上, 在酵母铁吸收突变体中表达后可恢复其吸收铁的能力。*pic1* 突变体出现严重的叶片黄化和生长矮小的表型, 体内的铁平衡也遭到破坏, 说明 *PIC1* 对于维持细胞内的铁平衡是必需的<sup>[40-41]</sup>。拟南芥 *AtFRO7* 的定位模式与 *AtPIC1* 类似, *fro7* 突变体叶绿体中的铁含量降低, 光合作用也受到影响, 在碱性土壤中出现严重的失绿现象, 这些结果都表明 *AtFRO7* 在将铁转运至叶绿体中发挥了重要的作用<sup>[42]</sup>。

叶绿体中过量的铁也需要及时运出以防止铁中毒。在拟南芥中负责这一过程的是 *AtYSL4/6*。*AtYSL6* 定位在叶绿体膜上, *ysl4:ysl6* 双突变体在高铁条件下, 生长受到抑制且叶绿体中的铁含量显著升高, 超表达 *AtYSL4* 或 *AtYSL6* 的转基因材料对缺铁更敏感<sup>[43]</sup>。

线粒体是真核生物氧化代谢的主要场所, 也是血红素以及铁硫蛋白簇的合成部位。铁作为辅助因子, 在上述过程中发挥了重要的作用。细胞必须通过严密的调控机制来维持线粒体内的铁平衡, 一方面要满足各种生理活动对铁的需要; 另一方面要及时将多余的铁运出以免积累过多, 对细胞造成氧化应激损伤<sup>[44]</sup>。植物中第一个发现的参与调控线粒体内铁平衡的基因是 *OsMIR* (mitochondrial iron-regulated)。*OsMIR* 定位在线粒体中, 在其他物种中并没有发现同源基因。不论在根中还是地上部分, *OsMIR* 的表达都受缺铁强烈诱导。与野生型相比, *mir* 突变体生长矮小, 根、地上部分和种子中积累更多的铁。一些缺铁响应基因在突变体中的表达上调, 说明它在维持水稻线粒体铁平衡中具有重要的功能<sup>[45]</sup>。*OsMIT* (mitochondrial iron transporter, MIT)

是水稻线粒体的铁转运蛋白。OsMIT 在根和叶中的表达受缺铁抑制, 受高铁诱导。纯合的 *mit* 突变体出现致死的表型, 杂合体和干涉材料生长受阻, 地上部分铁含量增加, 但线粒体中的铁却降低了。OsMIT 是酵母 *Mrs3* 和 *Mrs4* 的同源基因, 能回复酵母线粒体铁转运体缺失突变体  $\Delta mrs3\Delta mrs4$ 。这些研究结果表明, OsMIT 负责将铁运输至线粒体, 它的存在对于水稻的生长发育至关重要<sup>[46-47]</sup>。

液泡也是维持细胞内铁平衡的一个不可或缺的细胞器。它作为细胞内重要的物质储藏库, 可将多余的矿质元素储存起来, 避免元素过量造成的毒害作用。拟南芥 *AtNRAMP3* 和 *AtNRAMP4* 负责在种子萌发过程中将液泡中的铁运输至胞质中。*AtNRAMP3* 和 *AtNRAMP4* 属于 NRAMP 家族 (natural resistance-associated macrophage proteins, NRAMPs), 它们定位在液泡中, 表达受缺铁诱导。*nramp3: nramp4* 双突变体在低铁条件下, 种子萌发受阻, 无法从液泡中获取铁元素<sup>[48]</sup>。而拟南芥 *AtVIT1* (vacuolar iron transporter 1) 则参与铁从胞质向液泡中的运输。*vit1* 突变体种子中的铁分布发生异常, 在碱性土壤中萌发受到抑制<sup>[49]</sup>。水稻 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 是 *AtVIT1* 的同源基因, *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 定位在液泡膜上, 在剑叶叶片和叶鞘中表达较高。酵母互补实验表明, *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 具有将  $Fe^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  转运至液泡的能力。*vit1* 和 *vit2* 突变体剑叶中铁和锌含量降低, 而胚中的含量反而升高, 说明胞质和液泡中铁的双向运输对于维持细胞内的铁平衡以及调节铁在植物体内的分配非常重要<sup>[50]</sup>。

## 2 提高作物铁含量的方法

世界上大部分人口以谷物, 如小麦、玉米和水稻等作为主食。其中水稻作为最重要的粮食作物, 为全世界近一半以上的人口提供营养和能量。稻米中的铁含量较低, 不同水稻基因型之间差异较大, 铁含量在 7.5~24.4 mg/kg 范围之内, 远远低于营养学推荐的膳食标准<sup>[51]</sup>。因此, 提高作物可食用部分的铁含量将有利于改善人类铁营养缺乏的状况。

生物强化是指通过育种手段提高作物中可被人体吸收利用的微量营养元素的含量, 可以通过传统育种和基因工程技术而获得。其中, 转基因技术被认为是提高作物铁含量最有效的方法<sup>[52]</sup>。特别是近年来成功克隆了许多植物铁营养代谢中的基因, 为培育富铁作物品种打下了良好的基础。

### 2.1 铁结合蛋白基因的导入

已有研究表明, 通过导入一些铁结合蛋白可提高水稻胚乳中的铁含量。乳铁蛋白 (lactoferrin) 是在乳汁中含量较高的一种铁结合糖蛋白, 属于转铁蛋白家族。Nandi 等<sup>[53]</sup>发现, 将人乳铁蛋白在水稻胚乳中表达后能提高种子中的铁含量。

铁蛋白 (ferritin) 是一类存在于动植物以及细菌中的金属离子载体, 每个铁蛋白分子可贮存 4 500 个铁原子。它能释放铁元素用于体内合成含铁的蛋白质, 如铁氧化蛋白、细胞色素等; 还能保护细胞免受铁过量引起的氧化损伤, 防止自由基的产生<sup>[54]</sup>。因此, 通过转基因技术增加作物中的铁蛋白含量, 将有助于解决膳食中铁营养缺乏的问题。Goto 等<sup>[55]</sup>用胚乳特异启动子 *OsGluB1* 在水稻胚乳中表达大豆铁蛋白基因 *SoyferH1* 后获得的  $T_1$  代种子中的铁含量是未转基因水稻的 3 倍, 胚乳中的铁含量比原来增加了 1 倍。随后, *SoyferH1* 被应用于在不同水稻品种的胚乳中特异表达。Lucca 等<sup>[56]</sup>将 *SoyferH1* 导入水稻胚乳后发现糙米中的铁含量上升为原来的 2 倍。Vasconcelos 等<sup>[57]</sup>发现, *SoyferH1* 在水稻胚乳中表达后均能提高糙米和精米中的铁含量。水稻有 2 个 *ferritin* 基因: *Osfer1* 和 *Osfer2*。Paul 等<sup>[58]</sup>将 *Osfer2* 在水稻胚乳中超表达后发现, 精米中的铁、锌含量均有明显的提高。Qu 等<sup>[59]</sup>发现, 用两个胚乳特异启动子 *OsGlb1* 和 *OsGluB1* 表达 *SoyferH1* 后, 水稻种子中的铁含量仅提高了 30%, 说明水稻种子中的铁含量并不完全随着外源铁蛋白表达的升高而增加。提高铁蛋白的表达并不足以增加种子中的铁含量, 这可能是由于在植物中存在一套严密的调控机制来维持体内的铁平衡, 铁含量的变化还受到吸收和转运的限制。因此, 还需要通过增强植物对土壤中吸收以及铁在其体内的转运这两方面来提高作物中的铁含量。

### 2.2 铁载体合成相关基因的导入

通过 SAM 和 NAS 的作用, 植物能将蛋氨酸合成尼克酰胺并用于转运铁和其他金属离子。番茄突变体 *chloronerva* 因 *NAS* 基因的缺失突变而出现缺铁症状<sup>[60]</sup>。将拟南芥 *AtNAS1* 基因在烟草中超表达后不仅能提高 NA 含量, 铁和锌含量也显著增加<sup>[61]</sup>。超表达大麦尼克酰胺合成酶基因 (*HvNAS*) 的转基因大豆和水稻种子中的 NA 和铁含量也明显上升<sup>[62-63]</sup>。

水稻有 3 个 *NAS* 基因: *OsNAS1*、*OsNAS2* 和 *OsNAS3*。*OsNAS1* 和 *OsNAS2* 在根和叶中的表达受缺铁正调控, *OsNAS3* 在根中的表达受到缺铁诱导, 叶

中的表达反而受到缺铁抑制<sup>[64]</sup>。将 *OsNAS1* 在水稻胚乳中特异表达后能提高糙米和精米中的 NA 含量<sup>[65]</sup>。超表达 *OsNAS2* 的转基因水稻种子中的铁含量显著增加, 种植在碱性土壤中也具有明显的耐受性<sup>[66]</sup>。*OsNAS3* 在水稻中超表达后能提高铁和锌含量, 将该转基因水稻的糙米喂养患有贫血症的实验鼠 2 周后, 其血液内的血红蛋白浓度便恢复到正常水平<sup>[66]</sup>。

在 NAAT 和 DMAS 作用下, 水稻能将 NA 合成 DMA, 而大麦还能在 IDS2 (iron deficiency specific clone no. 2) 和 IDS3 (iron deficiency specific clone no. 3) 的作用下, 将 DMA 合成其他种类的 MA<sup>[67]</sup>。在缺铁条件下, 大麦根部的 HvNAS1、HvNAAT-A、HvNAAT-B、HvDMAS、IDS2 和 IDS3 的表达上调。水稻缺乏 *IDS2* 和 *IDS3* 基因, 只能分泌 DMA, 因此, 大麦对缺铁具有较强的耐受性<sup>[11]</sup>。超表达大麦 HvNAAT-A 和 HvNAAT-B 的转基因水稻更耐缺铁的环境, 将大麦 *IDS3* 在水稻中超表达后能使其具备分泌 MA 的能力<sup>[68]</sup>。由此可见, 提高 MA 合成途径中一些关键酶基因的表达是提高植物体内铁含量的有效方法。

### 2.3 铁转运蛋白的应用

水稻 OsIRT1 负责从土壤中直接吸收  $Fe^{2+}$ 。Lee 和 An<sup>[69]</sup> 在水稻中超表达 OsIRT1 后能增加叶片、根部和种子中的铁、锌含量, 但该转基因材料在生殖生长期表现出植株矮小、分蘖减少的表型。水稻 OsYSL15 不仅参与  $Fe^{3+}$ -PS 复合物的转运, 还参与其在植物体内的长距离运输。超表达 OsYSL15 的转基因水稻叶片和种子的铁含量也增加, *ysl15* 突变体在缺铁条件下, 出现严重的萎黄现象, 并造成叶片、根部和种子中的铁含量下降<sup>[17-18]</sup>。OsYSL2 负责运输  $Fe^{2+}$ -NA 和  $Mn^{2+}$ -NA 复合物。水稻 *OsYSL2* 的干涉株系中铁由根部向地上部分的转运及在结实过程中向种子中的转运都减少, 而在超表达株系中根部的铁含量增加, 但种子中的铁含量并没有升高<sup>[33]</sup>。此外, Gómez-Galera 等<sup>[70]</sup> 发现, 在水稻中超表达大麦 HvYS1 后也能提高叶片中的铁含量, 但种子中的铁含量并没有明显变化。

水稻 OsVIT1 和 OsVIT2 负责将胞质中多余的  $Fe^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  转运至液泡中储存。将这两个基因突变后会造成剑叶中铁含量降低, 而种子中的铁含量升高, 表明 OsVIT1 和 OsVIT2 在铁和锌从源器官向库器官的转运中发挥重要作用<sup>[50,71-72]</sup>。

### 2.4 铁代谢相关转录因子的导入

水稻 bHLH (basic helix-loop-helix) 蛋白 OsIRO2

(iron-related transcription factor 2, IRO2) 是缺铁条件下调控铁吸收和转运的一个关键因子, 它的表达受缺铁强烈诱导。参与 MA 合成和分泌过程的一些基因, 如 OsNAS1、OsNAS2、OsNAAT1、OsDMAS1、OsTOM1 以及三价铁转运体 OsYSL15 的表达都受到 OsIRO2 的调控。超表达 OsIRO2 的转基因水稻能够分泌更多的 DMA, 同时种子中的铁含量也增加了<sup>[73]</sup>。

NAC (N-terminal region and a divergent C terminal activation domain) 蛋白家族是另一类与铁吸收相关的转录因子。TtNAM-B1 (no apical meristem B1) 属于 NAC 家族, 在野生小麦中该基因能促进叶片的凋亡, 增加铁、锌等营养元素向发育中的种子中的运输。而在栽培小麦中, TtNAM-B1 没有上述功能。研究表明, 敲除栽培小麦中的同源基因后能够延缓叶片的衰老, 但种子中蛋白质、铁和锌含量却降低了, 说明 TtNAM-B1 可能通过调控叶片凋亡过程中营养元素的转运来增加种子内的铁和锌含量<sup>[74]</sup>。在水稻中还未克隆到 TtNAM-B1 的同源基因, 但发现了另一个 NAC 家族成员 OsNAC5。已知剑叶中的 OsNAC5 在灌浆期的表达上调, 表明它可能参与铁、锌和氨基酸从绿色组织向种子的转运<sup>[75]</sup>。

## 3 提高作物铁生物有效性的方法

改善人类铁营养状况主要包含两个方面: 一是提高铁的摄入量, 即食物中的铁含量; 二是提高铁的生物有效性。铁生物有效性指的是膳食中能被人体肠道直接吸收的铁量, 通常以直接吸收的铁量占膳食中总铁量的百分比来计算<sup>[76]</sup>。膳食中的铁主要以两种形式存在: 血红素铁和非血红素铁。动物性食物中血红素铁占总铁量的 50%~60%, 而植物性食物中的铁主要以非血红素铁的形式存在。血红素铁的生物有效性一般在 15%~35% 之间, 非血红素铁的生物有效性较低, 通常只有 1%~22%。谷类食物中的非血红素铁的生物有效性更低, 只有 2%~3%<sup>[77]</sup>。血红素铁和非血红素铁的吸收机制大不相同。在植物性食物中存在抗坏血酸、柠檬酸、 $\beta$ -胡萝卜素、半胱氨酸等铁吸收促进因子, 而植酸 (phytic acid)、单宁、多酚类物质等抗营养因子则会抑制铁的吸收。血红素铁的吸收不会受到上述因子的影响, 因此, 这也是非血红素铁生物有效性低的重要原因<sup>[78-80]</sup>。目前提高作物铁生物有效性的研究主要集中在两个方面: 降低作物中的抗营养因子以

及提高铁吸收促进因子的含量。

### 3.1 低植酸作物的培育

植酸又名肌醇六磷酸,广泛存在于水稻、玉米和小麦等作物中。大部分禾谷类作物籽粒中的磷酸和肌醇主要以植酸的形式与蛋白质结合,沉积在糊粉层的贮藏液泡中。而在成熟的玉米籽粒中,植酸主要贮存在胚和盾片中。植酸能与 $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 和 $Fe^{2+}$ 等金属元素络合形成不容易被人体吸收的植酸盐沉淀,从而降低这些营养元素的生物有效性<sup>[81-82]</sup>。植酸酶(phytase)是在种子萌发过程中催化植酸水解为无机磷和肌醇的一类酶的总称。在干燥的种子以及非反刍类动物,包括人的消化道中缺乏植酸酶。未经消化的植酸随粪便排出体外,既造成了磷资源的浪费,又加重了生态环境的负担。因此,培育低植酸作物品种对于提高微量元素的生物有效性以及保护生态环境均具有重要的意义<sup>[83]</sup>。

通过诱变的方法筛选低植酸突变体是培育低植酸作物的有效措施。该方法率先在玉米中得到应用,采用化学诱变获得的玉米低植酸突变体*lpa1-1*和*lpa2-1*籽粒中的植酸含量分别下降了66%和50%<sup>[84]</sup>。近些年来通过该种方式还获得了水稻、大麦和大豆等作物的低植酸突变体<sup>[85-87]</sup>。此外,还可以通过转基因技术降低植酸合成途径中关键酶基因的表达,或者导入植酸酶基因来降低种子中的植酸含量。Nunes等<sup>[88]</sup>通过RNA干涉技术降低大豆肌醇-1-磷酸合成酶基因*GmMIPSI*(myo-inositol-1-phosphate synthase)的表达,得到的转基因大豆中植酸含量明显下降。Ali等<sup>[89]</sup>通过RNA干涉技术降低水稻肌醇-3-磷酸合成酶基因*OsMIPS*(myo-inositol-3-phosphate synthase)的表达后发现,该转基因材料中的植酸含量降低了58.43%。

已有研究报道,外源的植酸酶可在多种双子叶植物中表达,如烟草、拟南芥、苜蓿、油菜、大豆等<sup>[90]</sup>。Lucca等<sup>[56]</sup>将曲霉菌耐热植酸酶基因在水稻胚乳中表达后能使植酸酶的活性提高130倍;在人体胃酸条件下,该植酸酶的活性并未受到影响,但经高温处理后该酶活性仅为原来的8%。Brinch-Pedersen等<sup>[91]</sup>将曲霉菌植酸酶基因在小麦胚乳中特异表达后也能提高种子中的植酸酶活性。Drakakaki等<sup>[92]</sup>发现,共表达大豆铁蛋白和曲霉菌植酸酶基因的转基因玉米籽粒中铁含量和植酸酶活性都升高了;随后通过人结肠癌细胞系(human colon adenocarcinoma cell line, Caco-2)细胞模型研究植酸对铁生物有效性的影响表明,铁的吸收与植

酸酶的活性存在正相关。

### 3.2 尼克酰胺提高水稻种子中铁素有效性

利用基因工程技术与铁生物有效性评价的细胞模型筛选并发现了一种新的能够促进铁吸收的成分物质——尼克酰胺(nicotianamine, NA)<sup>[93]</sup>。水稻种子中特异超表达NA合成酶基因*OsNAS1*后获得的NA高积累的转基因水稻,在Caco-2细胞模型评价体系中,其籽粒的铁吸收效价较原始品种提高了一倍。用化学合成的NA添加到米粉中,同样能够显著地提高米粉中铁的有效性;NA与抗坏血酸(AA)添加至 $FeSO_4$ 与 $FeCl_3$ 中的对比实验表明,NA对铁有效性的促进作用高于AA。

韩国、日本和丹麦联合研究小组得到了相类似的实验结果<sup>[94]</sup>。他们利用激活标签插入水稻突变体库,筛选获得了*OsNAS3*基因上调表达的水稻突变体,其尼克酰胺含量增加到普通水稻的9.6倍,大大提高了水稻对铁的吸收能力和运输能力,植株及种子中铁含量显著提高。用该突变体制成的糙米样品喂食贫血小鼠发现,喂食2周后小鼠的铁血红蛋白和红细胞比容恢复正常。

### 3.3 高半胱氨酸作物的培育

半胱氨酸以及富含半胱氨酸的多肽通过巯基团能够与铁结合,进而促进非血红素铁的吸收。已有研究表明,在玉米粉中加入210 mg的半胱氨酸后,铁的吸收是原来的2倍<sup>[95-96]</sup>。金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类广泛存在于微生物和动植物中的富含半胱氨酸的一类金属结合蛋白。每个金属硫蛋白分子含有12个半胱氨酸<sup>[97]</sup>。Lucca等<sup>[56]</sup>在水稻胚乳中特异表达金属硫蛋白后,可使种子可溶性蛋白中半胱氨酸残基的含量增加7倍,但目前关于这方面的报道不是很多,因此,研究还需要进一步深入。

### 3.4 农艺措施的应用

通过施用土壤改良剂、种子引发技术、喷施铁肥等农艺措施能够改善作物的营养状况<sup>[98]</sup>。其中,喷施铁肥能够快速、有效地提高作物中的铁含量及其生物有效性。Wei等<sup>[99]</sup>通过叶片喷施3种不同的 $FeSO_4$ 溶液,使水稻种子中的铁含量分别增加了16.97%、29.9%和27.08%,铁生物有效性也分别提高了12.63%、20.86%和18.75%。He等<sup>[100]</sup>将几种不同的螯合剂与 $FeSO_4$ 制成不同的铁肥喷施于水稻叶片,发现施用不同的铁肥均能提高精米中的铁含量和生物有效性,其中以DTPA-Fe效果最为显著。

## 4 展望

膳食中植物性食物是发展中国家民众获取铁元素的主要来源。通过生物强化改善作物中的铁营养已成为目前作物育种的研究热点, 并取得了显著进展, 但还存在一些问题尚未解决: (1) 还不清楚植物如何感知自身的铁状况及调控缺铁响应的信号分子, 对这部分内容的研究将有助于阐释植物铁信号转导机制, 从而为培育富铁作物品种提供新思路和新方法; (2) 通过转基因技术已获得了低植酸的作物, 但是否提高了铁生物有效性有待评估; (3) 金属硫蛋白影响铁吸收的分子机制有待研究。随着研究工作的深入, 生物强化必将成为改善人类铁营养缺乏的根本途径。

### [参 考 文 献]

- [1] Kobayashi T, Nishizawa NK. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annual Rev Plant Biol*, 2012, 63: 131-52
- [2] Mori S. Iron acquisition by plants. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, 2(3): 250-3
- [3] Guerinot ML, Yi Y. Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol*, 1994, 104(3): 815-20
- [4] Santi S, Schmidt W. Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. *New Phytol*, 2009, 183(4): 1072-84
- [5] Connolly EL, Campbell NH, Grotz N, et al. Overexpression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. *Plant Physiol*, 2003, 133(3): 1102-10
- [6] Mukherjee I, Campbell N, Ash J, et al. Expression profiling of the *Arabidopsis* ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta*, 2006, 223(6): 1178-90
- [7] Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, et al. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*, 1999, 397(6721): 694-7
- [8] Eide D, Broderius M, Fett J, et al. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(11): 5624-8
- [9] Varotto C, Maiwald D, Pesaresi P, et al. The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2002, 31(5): 589-99
- [10] Vert G, Grotz N, Dédaldéchamp F, et al. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell*, 2002, 14(6): 1223-33
- [11] Bashir K, Inoue H, Nagasaka S, et al. Cloning and characterization of deoxymugineic acid synthase genes from graminaceous plants. *J Biol Chem*, 2006, 281(43): 32395-402
- [12] Takahashi M, Yamaguchi H, Nakanishi H, et al. Cloning two genes for nicotianamine aminotransferase, a critical enzyme in iron acquisition (strategy II) in graminaceous plants. *Plant Physiol*, 1999, 121(3): 947-56
- [13] Higuchi K, Suzuki K, Nakanishi H, et al. Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores. *Plant Physiol*, 1999, 119(2): 471-80
- [14] Hindt MN, Guerinot ML. Getting a sense for signals: regulation of the plant iron deficiency response. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(9): 1521-30
- [15] Nozoye T, Nagasaka S, Kobayashi T, et al. Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *J Biol Chem*, 2011, 286(7): 5446-54
- [16] Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, et al. Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature*, 2001, 409(6818): 346-9
- [17] Inoue H, Kobayashi T, Nozoye T, et al. Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron(III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. *J Biol Chem*, 2009, 284(6): 3470-9
- [18] Lee S, Chiecko JC, Kim SA, et al. Disruption of OsYSL15 leads to iron inefficiency in rice plants. *Plant Physiol*, 2009, 150(2): 786-800
- [19] Bughio N, Yamaguchi H, Nishizawa NK, et al. Cloning an iron-regulated metal transporter from rice. *J Exp Bot*, 2002, 53(374): 1677-82
- [20] Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, et al. Rice plants take up iron as an Fe<sup>3+</sup>-phytosiderophore and as Fe<sup>2+</sup>. *Plant J* 2006, 45(3): 335-46
- [21] Hell R, Stephan U. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta*, 2003, 216(4): 541-51
- [22] Kim SA, Guerinot ML. Mining iron: iron uptake and transport in plants. *FEBS Lett*, 2007, 581(12): 2273-80
- [23] Brown JC, Chaney RL. Effect of iron on the transport of citrate into the xylem of soybeans and tomatoes. *Plant Physiol*, 1971, 47(6): 836-40
- [24] Tiffin LO. Iron translocation II. Citrate/iron ratios in plant stem exudates. *Plant Physiol*, 1966, 41(3): 515-8
- [25] Takahashi M, Terada Y, Nakai I, et al. Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell*, 2003, 15(6): 1263-80
- [26] Aoyama T, Kobayashi T, Takahashi M, et al. OsYSL18 is a rice iron(III)-deoxymugineic acid transporter specifically expressed in reproductive organs and phloem of lamina joints. *Plant Mol Biol*, 2009, 70(6): 681-92
- [27] Kakei Y, Yamaguchi I, Kobayashi T, et al. A highly sensitive, quick and simple quantification method for nicotianamine and 2'-deoxymugineic acid from minimum samples using LC/ESI-TOF-MS achieves functional analysis of these components in plants. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(11): 1988-93
- [28] Durrett TP, Gassmann W, Rogers EE. The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for

- efficient iron translocation. *Plant Physiol*, 2007, 144(1): 197-205
- [29] Yokosho K, Yamaji N, Ueno D, et al. OsFRDL1 is a citrate transporter required for efficient translocation of iron in rice. *Plant Physiol*, 2009, 149(1): 297-305
- [30] Yoshino M, Murakami K. Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Anal Biochem*, 1998, 257(1): 40-4
- [31] Ishimaru Y, Kakei Y, Shimo H, et al. A rice phenolic efflux transporter is essential for solubilizing precipitated apoplasmic iron in the plant stele. *J Biol Chem*, 2011, 286(28): 24649-55
- [32] Morrissey J, Baxter IR, Lee J, et al. The ferroportin metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009, 21(10): 3326-38
- [33] Koike S, Inoue H, Mizuno D, et al. OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *Plant J*, 2004, 39(3): 415-24
- [34] Ishimaru Y, Masuda H, Bashir K, et al. Rice metal-nicotianamine transporter, OsYSL2, is required for the long-distance transport of iron and manganese. *Plant J*, 2010, 62(3): 379-90
- [35] Jean ML, Schikora A, Mari S, et al. A loss-of-function mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. *Plant J*, 2005, 44(5): 769-82
- [36] Waters BM, Chu HH, DiDonato RJ, et al. Mutations in *Arabidopsis* yellow stripe-like1 and yellow stripe-like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. *Plant Physiol*, 2006, 141(4): 1446-58
- [37] Chu HH, Chiecko J, Punshon T, et al. Successful reproduction requires the function of *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like and Yellow Stripe-Like3 metal-nicotianamine transporters in both vegetative and reproductive structures. *Plant Physiol*, 2010, 154(1): 197-210
- [38] DiDonato RJ, Roberts LA, Sanderson T, et al. *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *Plant J*, 2004, 39(3): 403-14
- [39] Schaaf G, Schikora A, Häberle J, et al. A putative function for the *Arabidopsis* Fe-phytosiderophore transporter homolog AtYSL2 in Fe and Zn homeostasis. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(5): 762-74
- [40] Duy D, Wanner G, Meda AR, et al. PIC1, an ancient permease in *Arabidopsis* chloroplasts, mediates iron transport. *Plant Cell*, 2007, 19(3): 986-1006
- [41] Duy D, Stübe R, Wanner G, et al. The chloroplast permease PIC1 regulates plant growth and development by directing homeostasis and transport of iron. *Plant Physiol*, 2011, 155(4): 1709-22
- [42] Jeong J, Cohu C, Kerkeb L, et al. Chloroplast Fe(III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30): 10619-24
- [43] Divol F, Couch D, Conéjéro G, et al. The *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like4 and 6 transporters control iron release from the chloroplast. *Plant Cell*, 2013, 25(3): 1040-55
- [44] Napier I, Ponka P, Richardson DR. Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. *Blood*, 2004, 105(5): 1867-74
- [45] Ishimaru Y, Bashir K, Fujimoto M, et al. Rice-specific mitochondrial iron-regulated gene (MIR) plays an important role in iron homeostasis. *Mol Plant*, 2009, 2(5): 1059-66
- [46] Mühlenhoff U, Stadler JA, Richhardt N, et al. A specific role of the yeast mitochondrial carriers Mrs3/4p in mitochondrial iron acquisition under iron-limiting conditions. *J Biol Chem*, 2003, 278(42): 40612-20
- [47] Bashir K, Ishimaru Y, Shimo H, et al. The rice mitochondrial iron transporter is essential for plant growth. *Nat Commun*, 2011, 2: 322
- [48] Lanquar V, Lelièvre F, Bolte S, et al. Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J*, 2005, 24(23): 4041-51
- [49] Kim SA, Punshon T, Lanzirotti A, et al. Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuola membrane transporter VIT1. *Science*, 2006, 314: 1295-8
- [50] Zhang Y, Xu YH, Yi HY, et al. Vacuolar membrane transporters OsVIT1 and OsVIT2 modulate iron translocation between flag leaves and seeds in rice. *Plant J*, 2012, 72(3): 400-10
- [51] Fitzgerald MA, McCouch SR, Hall RD. Not just a grain of rice: the quest for quality. *Trends Plant Sci*, 2009, 14(3): 133-9
- [52] Masuda H, Aung MS, Nishizawa NK. Iron biofortification of rice using different transgenic approaches. *Rice*, 2013, 6(1): 40
- [53] Nandi S, Suzuki YA, Huang JM, et al. Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula. *Plant Sci*, 2002, 163: 713-22
- [54] Theil EC. Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu Rev Biochem*, 1987, 56(1): 289-315
- [55] Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, et al. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nat Biotech*, 1999, 17(3): 282-6
- [56] Lucca P, Hurrell R, Potrykus I. Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 392-7
- [57] Vasconcelos M, Datta K, Oliva N, et al. Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene. *Plant Sci*, 2003, 164: 371-8
- [58] Paul S, Ali N, Gayen D, et al. Molecular breeding of *Osferr2* gene to increase iron nutrition in rice grain. *GM Crops Food*, 2012, 3(4): 310-6
- [59] Qu L, Yoshihara T, Ooyama A, et al. Iron accumulation does not parallel the high expression level of ferritin in transgenic rice seeds. *Planta*, 2005, 222(2): 225-33
- [60] Higuchi K, Nishizawa N, Römheld V, et al. Absence of nicotianamine synthase activity in the tomato mutant 'chloronerva'. *J Plant Nutr*, 1996, 19: 1235-9
- [61] Douchkov D, Gryczka C, Stephan UW, et al. Ectopic expression of nicotianamine synthase genes results in



- improved iron accumulation and increased nickel tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Environ*, 2005, 28: 365-74
- [62] Usuda K, Wada Y, Ishimaru Y, et al. Genetically engineered rice containing larger amounts of nicotianamine to enhance the antihypertensive effect. *Plant Biotechnol J*, 2009, 7(1): 87-95
- [63] Nozoye T, Kim S, Kakei Y, et al. Enhanced levels of nicotianamine promote iron accumulation and tolerance to calcareous soil in soybean. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, 78(10): 1677-84
- [64] Lee S, Jeon US, Lee SJ, et al. Iron fortification of rice seeds through activation of the nicotianamine synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(51): 22014-9
- [65] Zheng L, Cheng Z, Ai C, et al. Nicotianamine, a novel enhancer of rice iron bioavailability to humans. *PLoS One*, 2010, 5(4): e10190
- [66] Lee S, Kim YS, Jeon US, et al. Activation of rice nicotianamine synthase 2 (OsNAS2) enhances iron availability for biofortification. *Mol Cell*, 2012, 33(3): 269-75
- [67] Nakanishi H, Yamaguchi H, Sasakuma T, et al. Two dioxygenase genes, *Ids3* and *Ids2*, from *Hordeum vulgare* are involved in the biosynthesis of mugineic acid family phytosiderophores. *Plant Mol Biol*, 2000, 44(2): 199-207
- [68] Masuda H, Kobayashi T, Ishimaru Y, et al. Iron-biofortification in rice by the introduction of three barley genes participated in mugineic acid biosynthesis with soybean ferritin gene. *Front Plant Sci*, 2013, 4: 132
- [69] Lee S, An G. Over-expression of OsIRT1 leads to increased iron and zinc accumulations in rice. *Plant Cell Environ*, 2009, 32(4): 408-16
- [70] Gómez-Galera S, Sudhakar D, Pelacho AM, et al. Constitutive expression of a barley Fe phytosiderophore transporter increases alkaline soil tolerance and results in iron partitioning between vegetative and storage tissues under stress. *Plant Physiol Biochem*, 2012, 53: 46-53
- [71] Bashir K, Takahashi R, Akhtar S, et al. The knockdown of OsVIT2 and MIT affects iron localization in rice seed. *Rice*, 2013, 6(1): 31
- [72] Ogo Y, Itai RN, Nakanishi H, et al. Isolation and characterization of IRO2, a novel iron-regulated bHLH transcription factor in graminaceous plants. *J Exp Bot*, 2006, 57(11): 2867-78
- [73] Ogo Y, Nakanishi Itai R, Nakanishi H, et al. The rice bHLH protein OsIRO2 is an essential regulator of the genes involved in Fe uptake under Fe-deficient conditions. *Plant J*, 2007, 51(3): 366-77
- [74] Uauy C, Distelfeld A, Fahima T, et al. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science*, 2006, 314(5803): 1298-301
- [75] Sperotto R, Ricachenevsky F, Duarte G, et al. Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. *Planta*, 2009, 230(5): 985-1002
- [76] Moretti D, Biebinger R, Bruins MJ, et al. Bioavailability of iron, zinc, folic acid, and vitamin A from fortified maize. *Ann New York Acad Sci*, 2014, 1312(1): 54-65
- [77] Nielsen AV, Tetens I, Meyer AS. Potential of phytase-mediated iron release from cereal-based foods: A quantitative view. *Nutrients*, 2013, 5(8): 3074-98
- [78] García-Casal MaN, Layrisse M, Solano L, et al. Vitamin A and  $\beta$ -carotenecan improve nonheme iron absorption from rice, wheat and corn by humans. *J Nutr*, 1998, 128(3): 646-50
- [79] Layrisse M, García-Casal MN, Solano L, et al. New property of vitamin A and  $\beta$ -carotene on human iron absorption: effect on phytate and polyphenols as inhibitors of iron absorption. *Nutrients*, 2000, 50: 243-8
- [80] Petry N, Egli I, Zeder C, et al. Polyphenols and phytic acid contribute to the low iron bioavailability from common beans in young women. *J Nutr*, 2010, 140(11): 1977-82
- [81] Cheryan M, Rackis JJ. Phytic acid interactions in food systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1980, 13(4): 297-335
- [82] Ravindran V, Bryden WL, Kornegay ET. Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Avian Poult Biol Rev*, 1995, 6: 125-43
- [83] Lei XG, Weaver JD, Mullaney E, et al. Phytase, a new life for an "old" enzyme. *Annu Rev Anim Biosci*, 2013, 1: 283-309
- [84] Raboy V, Gerbasi PF, Young KA, et al. Origin and seed phenotype of maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. *Plant Physiol* 2000, 124(1): 355-68
- [85] Wilcox J, Premachandra GS, Young KA. Isolation of high seed inorganic P, low-phytate soybean mutants. *Crop Sci*, 2000, 40: 1601-15
- [86] Larson S, Rutger J, Young K, et al. Isolation and genetic mapping of a non-lethal rice (*Oryza sativa* L.) low phytic acid 1 mutation. *Crop Sci*, 2000, 40: 1397-405
- [87] Guttieri M, Bowen D, Dorsch J, et al. Identification and characterization of a low phytic acid wheat. *Crop Sci*, 2004, 44: 418-24
- [88] Nunes AS, Vianna G, Cuneo F, et al. RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (GmMIPS1) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta*, 2006, 224(1): 125-32
- [89] Ali N, Paul S, Gayen D, et al. RNAi mediated down regulation of myo-inositol-3-phosphate synthase to generate low phytate rice. *Rice*, 2013, 6(1): 12
- [90] Rao DE, Rao KV, Reddy TP, et al. Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: an overview. *Crit Rev Biotechnol*, 2009, 29(2): 182-98
- [91] Brinch-Pedersen H, Hatzack F, Sørensen L, et al. Concerted action of endogenous and heterologous phytase on phytic acid degradation in seed of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Transgenic Res*, 2003, 12(6): 649-59
- [92] Drakakaki G, Marcel S, Glahn R, et al. Endosperm-specific co-expression of recombinant soybean ferritin and

- aspergillus phytase in maize results in significant increases in the levels of bioavailable iron. *Plant Mol Biol*, 2005, 59(6): 869-80
- [93] Zheng LQ, Cheng ZQ, Ai CX, et al. Nicotianamine, a novel enhancer of iron bioavailability to humans in rice grain. *PLoS One*, 2010, 5: e10190
- [94] Lee S, Jeon US, Lee SJ, et al. Iron fortification of rice seeds through activation of the nicotianamine synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(51): 22014-9
- [95] Layrisse M, Martínez-Torres C, Leets I, et al. Effect of histidine, cysteine, glutathione or beef on iron absorption in humans. *J Nutr*, 1984, 114(1): 217-23
- [96] Taylor PG, Martínez-Torres C, Romano EL, et al. The effect of cysteine-containing peptides released during meat digestion on iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr*, 1986, 43(1): 68-71
- [97] Hsieh HM, Liu WK, Huang PC. A novel stress-inducible metallothionein-like gene from rice. *Plant Mol Biol*, 1995, 28: 381-9
- [98] Khoshgoftarmanesh AH, Schulin R, Chaney RL, et al. Micronutrient-efficient genotypes for crop yield and nutritional quality in sustainable agriculture. A review. *Agron Sustain Dev*, 2009, 30: 83-107
- [99] Wei Y, Shohag MJ, Yang X, et al. Effects of foliar iron application on iron concentration in polished rice grain and its bioavailability. *J Agri Food Chem*, 2012, 60(45): 11433-9
- [100] He W, Shohag MJ, Wei Y, et al. Iron concentration, bioavailability, and nutritional quality of polished rice affected by different forms of foliar iron fertilizer. *Food Chem*, 2013, 141(4): 4122-6