

DOI: 10.13376/j.cbls/2015145

文章编号: 1004-0374(2015)08-1055-06



张春义, 中国农业科学院生物技术研究所研究员, 博士生导师, 农业部农业基因组学重点实验室副主任, 中国生物强化项目副主任, 中国农业生物技术学会常务理事, 中国作物学会常务理事, 《中国农业科技导报》执行主编, *American Journal of Experimental Biology* 编委, 美国植物生理学会会员。主要从事植物微量营养素代谢及玉米株型建成分子机制研究, 对叶酸代谢与氮代谢相关性的研究填补了国际植物叶酸代谢领域基础理论研究的空白; 同时, 在玉米籽粒叶酸代谢关键基因的等位变异研究方面取得了突破。近年来, 在 *Plant Cell*、*Plant Physiology* 等杂志发表论文多篇, 获 2001 年国家科学技术进步奖二等奖, 获授权专利 2 项, 主编专著 1 部, 参编专著 1 部。自 2004 年以来, 主持国家级课题 9 项, 包括“973”计划项目、国家“转基因生物新品种培育重大专项”以及国家自然科学基金的面上项目和重大研究计划等, 主持国际合作项目 1 项。

作物叶酸生物强化

姜 凌, 张春义*

(中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要: 叶酸 (folates) 是一类水溶性 B 族维生素, 包括四氢叶酸 (tetrahydrofolate, THF) 及其衍生物, 是动植物体中参与 C1 转移反应的重要辅酶, 在嘌呤、胸苷酸、DNA、氨基酸和蛋白质的生物合成以及甲基循环中发挥重要作用, 也是动植物体生长发育所必需的微量营养素。由于人类不具备自身合成叶酸的能力, 因此, 需要从植物和微生物中摄取。人类缺乏叶酸会增加许多疾病风险, 全球叶酸缺乏的人群仍比较普遍, 利用生物强化提高作物的叶酸含量是一个解决全球性叶酸缺乏问题的有效方法, 对人类生存与健康具有重要意义。现综述了近年来国内外叶酸代谢和作物叶酸生物强化的主要研究成果, 并对叶酸生物强化分子设计育种的未来发展方向进行了展望。

关键词: 叶酸代谢; 人类健康; 作物; 生物强化

中图分类号: Q946; R151 **文献标志码:** A

Folate fortification in crops

JIANG Ling, ZHANG Chun-Yi*

(Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Folates are a group of water-soluble Vitamin B, including tetrahydrofolate (THF) and its derivatives. Folates are central cofactors in C1 transfer reaction and play important roles in the biosynthesis of DNA, amino acids, and protein as well as in the methyl cycle, thus being essential for growth and development of animals and plants. Folates are essential for human health as humans are unable to synthesize folates *de novo* and have to take

收稿日期: 2014-12-16; 修回日期: 2015-01-07

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)(2013CB127003)

*通信作者: E-mail: zhangchunyi@caas.cn; Tel: 010-82106403

up from plants and microbes. Folate deficiency is closely associated with increasing risks of diseases and is prevalent in large population across the world. Enhancement of folates in food crops through biofortification is a cost-effective strategy to tackle the global problem of folate deficiency in human. This review summarizes the research achievements of folate metabolism and folate fortification in crops, and sheds light on the trends in molecular design breeding for crops rich in folates.

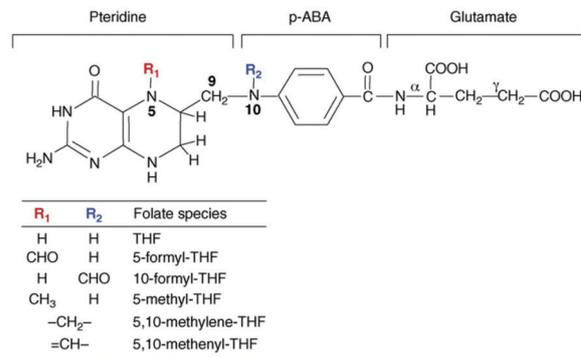
Key words: folate metabolism; human health; crops; biofortification

1 叶酸代谢

1.1 叶酸的生物合成

叶酸 (folates) 作为一种水溶性维生素, 是四氢叶酸 (tetrahydrofolate, THF) 及其各类衍生物的总称, 因其最初是从菠菜叶中提取纯化的, 故而命名为叶酸。叶酸对细胞的分裂生长及核酸、氨基酸、蛋白质的合成起着重要的作用, 也是介导一碳单位转移的重要辅助因子^[1-3]。细胞的一碳转移反应, 包括嘌呤和嘧啶的合成、氨基酸代谢、泛酸合成、线粒体和叶绿体蛋白质合成以及甲硫氨酸的合成, 都以叶酸作为辅酶。

叶酸由 3 部分组成, 分别为蝶啶环、对氨基苯甲酸环和谷氨酸尾。不同氧化水平的一碳单位连接在蝶啶部分的 N⁵ 位, 或对氨基苯甲酸环的 N¹⁰ 位, 或两者之间^[3](图 1)。不同物种中的叶酸合成代谢途径都很保守, 组成叶酸的 3 种化合物先分别合成, 再合成完整的叶酸分子。细菌中所有这些步骤都在细胞质中完成, 动物中是在线粒体和细胞质中分别进行, 但是在植物中则涉及 3 个不同的亚细胞结构, 即质体、线粒体和细胞质^[2]。在植物中, 蝶啶和对氨基苯甲酸分别在细胞质和叶绿体中合成, 然后转运至线粒体中, 还原成单谷氨酸的四氢叶酸, 最后通过多聚谷氨酸合成酶催化将谷氨酸逐一连接到谷氨酸的 γ 位, 成为具有多聚谷氨酸尾的叶酸。活体中的叶酸分子主要以多谷氨酸形式存在, 并且这种形式也是参与一碳代谢的叶酸依赖型酶所偏爱的形式^[4]。植物细胞的液泡、细胞质、线粒体和质体中都有叶酸, 并且植物可以从培养基中吸收叶酸^[5-6]。在动物中, 多谷氨酸形式的叶酸多倾向于与蛋白质结合, 因此, 在多谷氨酸化和叶酸稳定性之间存在正相关, 与蛋白质结合还能使多谷氨酸叶酸免于被 γ -谷氨酰基水解酶水解^[7]。在植物中, 谷氨酸尾的长度越长, 与其结合的酶的活性越高, 如甘氨酸脱羧酶、丝氨酸羟甲基转移酶、甲硫氨酸合成酶等^[8-10]。总体来说, 叶酸和一碳单位的代谢在各物种中了解得比较清楚。



TRENDS in Plant Science

叶酸分子由 3 部分组成: 蝶啶、对氨基苯甲酸环和谷氨酸尾。图中所展示的四氢叶酸为单谷氨酸形式, 动植物中的叶酸在第一个谷氨酸的 γ 位可以连上多个谷氨酸残基。不同氧化水平的一碳单位可以连到 N⁵ 和(或) N¹⁰ 上, 如图中 R₁ 和 R₂ 所表示的位置。在结构式下列出了一碳单位的自然形式^[3]。

图1 叶酸的化学结构

1.2 叶酸的生物学功能

叶酸的重要生物学功能之一是参与一碳单位代谢。通过增加或去除一碳单位可以调节大量生物复合物的合成与降解。四氢叶酸以其不同的氧化形式(甲基、亚甲基、次甲基或甲酰基)去结合、转运和提供一碳单位^[2,11]。在生物体中, 一碳代谢的实质是丝氨酸、甘氨酸、甲酸盐和其他分子产生特定的四氢叶酸一碳衍生物, 在不同的氧化形式间转换。其中, 最主要的合成代谢流是利用 5-甲基四氢叶酸将同型半胱氨酸转化成甲硫氨酸, 甲硫氨酸可以转化为甲基化反应的供体——腺苷甲硫氨酸, 进而参与蛋白质、DNA 及各类化合物的甲基化过程^[10]。另外, 嘌呤合成需要 10-甲酰四氢叶酸的参与, 甲酰甲硫氨酰-tRNA 利用 5, 10-亚甲基四氢叶酸合成胸苷酸和泛酸。此外, 不依赖叶酸的一碳单位反应簇主要集中在甲醇、甲醛和甲酸的代谢^[1]。叶酸这种小分子在厚壁菌中还可通过与核糖开关结合来调控基因的表达^[12]。在动物中, 叶酸缺乏会导致高同型半胱氨酸血症, 肝脏的 DNA 甲基化水平会明显

降低, 发育也出现异常^[13]。植物的光呼吸活性依赖于四氢叶酸, 进一步影响植物的低氮胁迫反应^[14-15]。同时, 在植物中叶酸还参与其他多种生物学过程, 如苯丙氨酸向酪氨酸转化^[16]、光裂合酶活性^[17]、叶绿素生物合成^[18]以及种子抗氧化胁迫等^[19]。另外, 拟南芥中多聚谷氨酸合成酶的失活也会导致暗形态建成异常^[20], 水稻叶酸生物强化导致种子代谢谱发生明显变化^[21], 玉米亚甲基四氢叶酸还原酶基因的功能丧失导致木质素合成水平降低^[22]。

2 叶酸与人类健康的关系

2.1 人类对叶酸的利用方式

人类自身不能合成叶酸, 只能从膳食中摄取。叶酸从食物中释放出来, 在空肠黏膜刷状缘处被吸收到体内, 进一步被肠道中的 γ 谷氨酰羧基肽酶水解去谷氨酸后才能有效转运到肠黏膜被吸收。接下来, 各类叶酸在肠细胞中都被转化为5-甲基四氢叶酸才能被运输到血液循环系统和其他组织器官中, 最后在体内再次形成多聚谷氨酸叶酸后参与人体各类代谢反应^[23]。天然食物中叶酸衍生物的单谷氨酸和多谷氨酸比例对叶酸的肠道吸收并没有显著影响, 说明肠道中用来水解谷氨酸尾的 γ 谷氨酰羧基肽酶的数量是十分充足的, 只要膳食中有充足的叶酸, 不管哪种形式都可以被人类大量吸收^[24]。

2.2 人群叶酸缺乏现状

成年人每天需要至少摄入400 μg 叶酸以满足生命活动的需求。叶酸摄入水平不足会导致巨幼红细胞贫血和高同型半胱氨酸血症, 也会增加患老年痴呆症、冠状动脉硬化、中风和癌症的风险, 孕妇缺乏叶酸有可能导致胎儿出生时低体重、唇腭裂、心脏病和神经管缺陷等^[25-28]。虽然几乎所有人类的膳食中都含有叶酸, 但叶酸摄入量在世界很多地方都在最适度(400 $\mu\text{g}/\text{d}$)以下, 因而叶酸缺乏症成为一个全球性的健康问题。2011年, 全球死亡的5岁儿童中有1/3是由于营养素摄入不足造成的, 铁、锌、叶酸和维生素A的缺乏造成了贫困和疾病^[29]。叶酸缺乏不仅在贫困人口中普遍存在, 而且在食物数量和品种都很丰富的发达国家中也较为常见^[1,29]。因为叶酸主要在豆类、绿叶植物和一些水果中大量存在, 如果人们的主食是普通的小麦、玉米和稻米, 缺少高叶酸蔬果的摄入时, 叶酸缺乏也时有发生; 在怀孕和哺乳的妇女中, 叶酸缺乏症更容易加剧^[30]。目前, 我国评价人体叶酸营养状况最常用的指标是红细胞叶酸及血清或血浆中叶酸的含量^[31]。近几年

的研究表明, 中国的叶酸营养状况出现了地域上的明显差异。例如, 65岁至74岁的老年人群中, 南方老年人群红细胞叶酸水平为北方的2.2倍, 叶酸缺乏率为1.0%, 而北方老年人群叶酸缺乏率为28.9%^[32]; 新疆新源县哈萨克族居民叶酸的摄入量只有正常值的7.53%, 血清叶酸水平低时, 患食道癌的风险高^[33]。中国儿童的叶酸营养状况也亟待改进。例如, 针对天津市儿童的叶酸营养状况调查发现, 叶酸缺乏高发区多集中于郊县经济不发达地区^[34]。因此, 改善全球, 特别是中国人群叶酸营养状况, 是中国科学家一项必要而紧迫的任务。

3 作物叶酸生物强化策略和进展

3.1 叶酸的食品强化

作物、蔬果是人类和动物获取叶酸的主要来源。然而, 只有豆类和绿叶蔬菜中的叶酸含量较高, 在粮食作物中叶酸含量通常较低, 尤其是禾谷类^[3]。因此, 在谷物中添加人工合成的叶酸或者食用叶酸片来提高人体对叶酸的摄入是国际上的通行做法^[35]。然而, 过量摄入人工合成叶酸会导致人体DNA甲基化水平的变化^[36-37], 加速结肠癌和前列腺癌的发展和癌前期病变的发生^[38-39], 也会导致维生素B₁₂缺乏的人群出现认知功能障碍^[40]。另外, 这种食品强化措施也仅适用于城市, 对于偏远贫穷地区较少能普及。因此, 作物叶酸生物强化可以通过一次性投入, 使众多的农村和城市人口受益, 增加叶酸的摄入量, 并与其他营养干预手段互为补充^[41]。

3.2 叶酸生物强化的策略

基于对植物叶酸代谢途径的了解, 科学家可以设计不同的策略来有效提高作物中的叶酸含量, 包括加强叶酸合成代谢、促进叶酸稳定性以及回收利用降解产物^[3,42]。在加强叶酸生物合成方面, 可以分别或者共同提高叶酸合成支路GTPCHI和ADCS以及叶酸合成主干途径中的DHFS的基因转录水平, 或者降低 γ -谷氨酰基水解酶的活性^[43-50]。由于种子中储存的叶酸形式主要是5-甲酰四氢叶酸, 因此, 通过提高5-甲酰四氢叶酸的含量可以提高叶酸的总量。但是, 5-甲酰四氢叶酸的过量积累或许会抑制叶酸依赖性酶的活性, 进而干扰一碳代谢反应^[51]。因此, 在增加叶酸稳定性方面, 理论上可以通过提高叶酸结合蛋白的活性来促进食物中叶酸的生物利用率, 而不是单一增加种子中的叶酸含量^[52]。在增加叶酸利用率方面, 可以引入外源的蝶啶还原酶以促进蝶啶的还原再利用^[53]。除了上述这些转基

因策略以外, 还可以通过鉴定叶酸积累关键调控基因及其优良等位变异, 进而通过基因聚合实现作物叶酸生物强化之目的, 但这方面尚未有报道。

3.3 作物叶酸生物强化研究进展

作物叶酸强化从 20 世纪初就开始了大量尝试, 在增加叶酸合成方面有大量报道。首先使用的相关基因是来源于大肠杆菌的 GTP 环化水解酶 (GTP cyclohydrolase I, *GCHI*, *folE*)、二氢叶酸合成酶 (DHFS, *folC*)、二氢蝶呤合成酶 (DHPS, *folP*)。当时使用的启动子为 CaMV35S, 转基因受体植物为拟南芥。过表达 *folE* 使得叶酸合成途径中的蝶呤含量较对照组提高了 1 250 倍, 叶酸含量增加 2~4 倍; *folC* 和 *folP* 的过表达使转基因植物中的叶酸含量增加了 1~2 倍^[43-44]。之后在番茄中的研究表明, 同时增强两条支路中的 *GCHI* 和 *ADCS* 的酶学活性比单独提高任一支路的活性对叶酸含量的提高效果要好很多^[45-46]。在番茄中过表达来源于哺乳动物的 *folE* 基因, 使得蝶呤类化合物增加了 3~140 倍, 叶酸含量增加了 2 倍^[45]; 与过表达拟南芥 *ADCS* 基因的转基因番茄杂交后, 果实中叶酸含量比对照高出 25 倍^[46]。在水稻中, 这个策略的应用十分成功^[47]。将拟南芥的 *ADCS* 和 *GCHI* 基因分别由胚乳特异性启动子 *gluB1* 和 *glb-1* 驱动并转化水稻, 结果转基因水稻中对氨基苯甲酸和蝶呤两个支路的代谢活性分别得到加强, 籽粒中叶酸提高了 100 多倍, 最高为 38.3 nmol/g, 相当于每百克鲜重含有近 2 mg 的叶酸, 远超正常人群每日推荐摄入量。其后, 还有叶酸、抗坏血酸和胡萝卜素合成途径同时强化的转基因玉米的报道, 所使用的叶酸相关基因是来源于大肠杆菌的 *folE*, 叶酸含量提高了 2 倍^[48]。此外, 当拟南芥 γ -谷氨酰基水解酶的活性降低 99% 时, 其叶酸含量可以提高 34%^[49]。最新的报道显示, 在马铃薯块茎中同时提高对氨基苯甲酸和蝶呤支路使得叶酸含量提高 2 倍^[50]。

上述叶酸生物强化作物都出现了一个共同的现象: 或者植物体内的对氨基苯甲酸提前耗尽, 或者蝶呤及其中间代谢物过量积累, 由此导致转基因植物种子的代谢谱也发生了变化^[21,45-47], 而且上述的代谢扰动很难通过现有遗传转化技术得到恢复。其内源叶酸相关基因的转录水平在不同物种的转化事件中也不同: 转基因番茄内源叶酸代谢会由于外源叶酸基因的转录而明显活跃, 但在水稻、拟南芥和马铃薯中, 内源叶酸相关基因的转录水平并未发生明显变化^[21,50,54]。此外, 这些策略在一些特定的物

种中都遇到了瓶颈, 例如拟南芥和马铃薯的叶酸提高幅度都不大, 其原因可能是对氨基苯甲酸和蝶呤向线粒体的转运成为一个限速步骤^[50]。

在增加回收利用降解产物方面, 向植物引入外源蝶呤还原酶可能通过提高还原态蝶呤含量而提高植物叶酸含量^[55]。在叶酸合成的胞质分支途径上, 蝶呤复合物由于被氧化而没有完全用于叶酸的合成, 同时, 氧化态蝶呤还可能抑制叶酸合成^[56]。鉴于此, 鹿晔等^[53]将原生动物的 (利什曼原虫) 中发现的具有还原蝶呤芳香环功能的蝶呤还原酶转入拟南芥, 转基因植物相对于野生型的 5-甲酰四氢叶酸含量仅提高 45%, 总体效果远不如增强叶酸合成代谢的策略。

近年来, 作物叶酸生物强化的研究说明植物体内叶酸合成途径很复杂, 虽然在番茄中发现叶酸调控机制可能包括翻译后水平和转录水平的前馈调控及反馈调控, 但这种情况并非在每个物种都出现, 说明可能还存在影响叶酸代谢的其他因素^[50,57]。

4 结语和展望

为了更有效开展作物叶酸生物强化研究, 首先, 需要继续加深对植物体内叶酸代谢及其调控机制的了解。目前, 叶酸合成代谢途径已经基本阐述清楚, 然而, 叶酸合成代谢的调控机理方面的研究还鲜有报道。在转录水平, 调控叶酸代谢的关键转录因子基因尚未分离, 也不知道是否有 miRNA 参与叶酸代谢调控; 在翻译及翻译后水平上, 叶酸关键合成酶是否存在甲基化或磷酸化修饰; 在代谢物水平上, 叶酸代谢是否还有旁支, 叶酸各类衍生物如何转运。上述问题的回答将有助于准确找到叶酸生物强化的突破点 (候选基因), 采取科学合理的分子设计育种策略, 最终实现作物叶酸生物强化之目标。其次, 应加强对现有作物种质资源的挖掘, 通过全基因组关联分析和候选基因的连锁分析, 挖掘调控种子叶酸积累水平的新基因, 再结合分子标记辅助选择育种, 将优良等位变异快速导入具有其他优良农艺性状的亲本中, 缩短育种周期、提高育种效率。另外, 基于此可以快速鉴定种质资源 (亲本) 的遗传多样性, 有效地选配亲本, 最后利用 F₂ 群体及衍生群体、回交群体、重组自交系群体、双单倍体群体及同时应用多种群体筛选聚合株系, 有可能实现作物叶酸生物强化的突破^[58]。最后, 应将叶酸生物强化育种与医学及营养学相关学科紧密融合, 明确不同叶酸衍生物对动物或人体发育的影响, 在分子水平上揭

示植物来源的叶酸与化学合成叶酸的生物有效性有何区别。上述问题的阐明将大大促进叶酸生物强化育种工作的开展,并最终对人类的营养健康产生积极的影响。

[参 考 文 献]

- [1] Hanson AD, Roje S. One carbon metabolism in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol*, 2001, 52: 119-37
- [2] Jabrin S, Ravanel S, Gambonnet B, et al. One carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. *Plant Physiol*, 2003, 131: 1431-9
- [3] Bekaert S, Storozhenko S, Mehrshahi P, et al. Folate biofortification in food plants. *Trends Plant Sci*, 2008, 13: 28-35
- [4] Shane B. Folylpolylglutamate synthesis and role in the regulation of one carbon metabolism. *Vitam Horm*, 1989, 45: 263-335
- [5] Crosti P, Malerba M, Bianchetti R. Growth-dependent changes of folate metabolism and biosynthesis in cultured *Daucus carota* cells. *Plant Sci*, 1993, 88: 97-106
- [6] Orsomando G, de la Garza RD, Green BJ, et al. Plant gamma glutamyl hydrolases and folate polyglutamates: characterization, compartmentation, and co-occurrence in vacuoles. *J Biol Chem*, 2005, 280: 28877-84
- [7] Wang YN, Imec Z, Ryan TJ, et al. The properties of the secreted gamma glutamyl hydrolases from H35 hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1164: 227-35
- [8] Besson V, Rébeillé F, Neuburger M, et al. Effects of tetrahydrofolate polyglutamates on the kinetic parameters of serine hydroxymethyltransferase and glycine decarboxylase from pea leaf mitochondria. *Biochem J*, 1993, 292: 425-30
- [9] Rébeillé F, Neuburger M, Douce R. Interaction between glycine decarboxylase, serine hydroxymethyltransferase and tetrahydrofolate polyglutamates in pea leaf mitochondria. *Biochem J*, 1994, 302: 223-8
- [10] Ravanel SP, Block MA, Rippert P, et al. Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for *de novo* methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol. *J Biol Chem*, 2004, 279: 22548-57
- [11] Blancquaert D, Storozhenko S, Loizeau K, et al. Foliates and folic acid: from fundamental research toward sustainable health. *Crit Rev Plant Sci*, 2010, 29: 14-35
- [12] Ames TD, Rodionov DA, Weinberg Z, et al. A eubacterial riboswitch class that senses the coenzyme tetrahydrofolate. *Chem Biol*, 2010, 17: 681-5
- [13] Padmanabhan N, Jia D, Geary-Joo C, et al. Mutation in folate metabolism causes epigenetic instability and transgenerational effects on development. *Cell*, 2013, 155: 81-93
- [14] Douce R, Bourguignon J, Neuburger M, et al. The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends Plant Sci*, 2001, 6: 167-76
- [15] Jiang L, Liu Y, Sun H, et al. The mitochondrial folylpolyglutamate synthetase gene is required for nitrogen utilization during early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2013, 161: 971-89
- [16] Pribat A, Noiriél A, Morse AM, et al. Nonflowering plants possess a unique folate-dependent phenylalanine hydroxylase that is localized in chloroplasts. *Plant Cell*, 2010, 22: 3410-22
- [17] Malhotra K, Kim ST, Sancar A. Characterization of a medium wavelength type DNA photolyase: purification and properties of photolyase from *Bacillus firmus*. *Biochemistry*, 1994, 33: 8712-8
- [18] Van Wilder V, De Brouwer V, Loizeau K, et al. C1 metabolism and chlorophyll synthesis: the Mg-protoporphyrin IX methyltransferase activity is dependent on the folate status. *New Phytol*, 2009, 182: 137-45
- [19] Storozhenko S, Navarrete O, Ravanel S, et al. Cytosolic hydroxymethyl-dihydropterin pyrophosphokinase/dihydropteroyl synthase from *Arabidopsis thaliana*: a specific role in early development and stress response. *J Biol Chem*, 2007, 282: 10749-61
- [20] Meng H, Jiang L, Xu B, et al. *Arabidopsis* plastidial folylpolyglutamate synthetase is required for seed reserve accumulation and seedling establishment in darkness. *PLoS One*, 2014, 9: e101905
- [21] Blancquaert D, Van Daele J, Storozhenko S, et al. Rice folate enhancement through metabolic engineering has an impact on rice seed metabolism, but does not affect the expression of the endogenous folate biosynthesis genes. *Plant Mol Biol*, 2013, 83: 329-49
- [22] Tang HM, Liu S, Hill-Skinner S, et al. The maize *brown midrib2 (bm2)* gene encodes a methylenetetrahydrofolate reductase that contributes to lignin accumulation. *Plant J*, 2014, 77: 380-92
- [23] Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene*, 2014, 533: 11-20
- [24] Rébeillé F, Ravanel S, Jabrin S, et al. Foliates in plants: biosynthesis, distribution, and enhancement. *Physiol Planta*, 2006, 126: 330-42
- [25] Seshadri S, Beiser A, Selhub J, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 2002, 346: 476-83
- [26] Stanger O. The potential role of homocysteine in percutaneous coronary interventions (PCI): review of current evidence and plausibility of action. *Cell Mol Biol*, 2004, 50: 953-88
- [27] Choi SW, Friso S. Interactions between folate and aging for carcinogenesis. *Clin Chem Lab Med*, 2005, 43: 1151-7
- [28] Rader JI, Schneeman BO. Prevalence of neural tube defects, folate status, and folate fortification of enriched cereal-grain products in the United States. *Pediatrics*, 2006, 117: 1394-9
- [29] Bhutta ZA, Salam RA. Global nutrition epidemiology and trends. *Ann Nutr Metab*, 2012, 61: 19-27
- [30] de Benoist B. Conclusions of a WHO technical

- consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food Nutr Bull*, 2008, 29: S238-44
- [31] 王多全, 朴建华. 不同人群叶酸营养状况的研究进展. *卫生研究*, 2004, 33: 774-6
- [32] 周媛, 王琳琳, 曲全冈, 等. 中国南北两县810名老年人红细胞叶酸营养状况及其地区差异调查. *中华流行病学杂志*, 2012, 33: 360-3
- [33] 郝婷, 吐尔逊江·买买提明, 王艳萍, 等. 新疆新源县234名哈萨克族居民营养状况及叶酸水平与食管癌关系的研究. *新疆医科大学学报*, 2011, 34: 429-31
- [34] 田祯, 刘功妹, 叶涛, 等. 天津市17105名儿童叶酸营养状况调查. *中国儿童保健杂志*, 2008, 16: 310-1
- [35] Lorenzo DB, Alessandra L, Elisabeth RG, et al. International retrospective cohort study of neural tube defects in relation to folic acid recommendations are the recommendations working? *BMJ*, 2005, 330: 571-3
- [36] Bae S, Ulrich CM, Bailey LB, et al. Impact of folic acid fortification on global DNA methylation and one-carbon biomarkers in the Women's Health Initiative Observational Study cohort. *Epigenetics*, 2014, 9: 396-403
- [37] Badiga S, Johanning GL, Macaluso M, et al. A lower degree of PBMC L1 methylation in women with lower folate status may explain the MTHFR C677T polymorphism associated higher risk of CIN in the US post folic acid fortification era. *PLoS One*, 2014, 9: e110093
- [38] Cole BF, Baron JA, Sandler RS, et al. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: A randomized clinical trial. *J Am Med Assoc*, 2007, 297: 2351-9
- [39] Figueiredo JC, Grau MV, Haile RW, et al. Folic acid and risk of prostate cancer: results from a randomized clinical trial. *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101: 432-5
- [40] Moore EM, Ames D, Mander AG, et al. Among vitamin B12 deficient older people, high folate levels are associated with worse cognitive function: combined data from three cohorts. *J Alzheimers Dis*, 2014, 39: 661-8
- [41] Datta S, Bouis HE. Application of biotechnology to improving the nutritional quality of rice. *Food Nutr Bull*, 2000, 21: 451-6
- [42] Gregory JF, Quinlivan EP, Davis SR. Integrating the issues of folate bioavailability, intake and metabolism in the era of fortification. *Trends Food Sci Technol*, 2005, 16: 229-40
- [43] Hossain T, Rosenberg I, Selhub J, et al. Enhancement of folates in plants through metabolic engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 5158-63
- [44] 梁业红, Bovy A, 范云六. 异源表达细菌二氢喋呤合成酶基因提高拟南芥叶酸含量的研究. *作物学报*, 2006, 32: 164-8
- [45] de la Garza RD, Quinlivan EP, Klaus SM, et al. Folate biofortification in tomatoes by engineering the p teridine branch of folates synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 13720-5
- [46] de la Garza RD, Gregory III JF, Hanson AD. Folate biofortification of tomato fruit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 4218-22
- [47] Storozhenko S, De Brouwer V, Volckaert M, et al. Folate fortification of rice by metabolic engineering. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 1277-9
- [48] Naqi S, Zhu C, Farre F, et al. Transgenic multivitamin in corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 7762-7
- [49] Akhtar TA, Orsomando G, Mehrshahi P, et al. A central role for gamma-glutamyl hydrolases in plant folate homeostasis. *Plant J*, 2010, 64: 256-66
- [50] Blancquaert D, Storozhenko S, Van Daele J, et al. Enhancing pterin and para-aminobenzoate content is not sufficient to successfully biofortify potato tubers and *Arabidopsis thaliana* plants with folate. *J Exp Bot*, 2013, 64: 3899-909
- [51] Goyer A, Collakova E, de la Garza RD, et al. 5-Formyltetrahydrofolate is an inhibitory but well tolerated metabolite in *Arabidopsis* leaves. *J Biol Chem*, 2005, 280: 26137-42
- [52] Picciano MF, West SG, Ruch AL, et al. Effect of cow milk on food folate bioavailability in young women. *Am J Clin Nutr*, 2004, 80: 1565-9
- [53] 鹿晔, 刘晓宁, 姜凌, 等. 过表达蝶呤还原酶PTR1基因促进植物叶酸合成的研究. *中国农业科技导报*, 2012, 14: 49-56
- [54] Waller JC, Akhtar TA, Lara-Nunez A, et al. Developmental and feedforward control of the expression of folate biosynthesis genes in tomato fruit. *Mol Plant*, 2010, 3: 66-77
- [55] Noiriell A, Naponelli V, Gregory III JF, et al. Pterin and folate salvage: plants and *Escherichia coli* lack capacity to reduce oxidized pterins. *Plant Physiol*, 2007, 143: 1101-9
- [56] Brown GM, Weisman RA, Molnar DA. Biosynthesis of folic acid. I. Substrate and cofactor requirements for enzymatic synthesis by cell-free extracts of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1961, 236: 2534-43
- [57] Hanson AD, Gregory JF 3rd. Folate biosynthesis, turnover, and transport in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2011, 62: 105-25
- [58] 徐小万, 雷建军, 罗少波, 等. 作物基因聚合分子育种. *植物遗传资源学报*, 2010, 11: 364-8