

采用基因工程技术提高水稻铁营养品质的策略

刘林川 马三梅*

暨南大学生物工程学系, 广州 510632

Improving the Iron Nutrition Quality in Rice by Using Gene Engineering

LIU Lin-Chuan, MA San-Mei*

Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

摘要 文章介绍采用基因工程技术提高水稻铁营养品质的策略(包括导入铁吸收相关基因促进水稻对铁的吸收, 导入金属结合蛋白基因提高水稻中铁的贮存量, 降低稻米中铁吸收抑制因子和增加铁吸收促进因子以提高铁元素的生物有效性等)的研究进展。

关键词 水稻; 基因工程; 铁; 营养品质

人体缺铁在全世界范围内比较普遍。据世界卫生组织(WHO) 2003年报道: 在全世界人口中, 约20亿人由于缺铁而患有贫血。为解决铁营养缺乏, 一般采取如下措施: 一是改善饮食结构, 增加富含铁的食物摄入量; 二是强化食物中铁的含量; 三是补充铁剂(丁虹 2005)。但是这些方法成本相对较高, 在发展中国家很难推行。

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上主要的粮食作物之一。采用常规育种方法提高水稻铁营养品质已取得一定的进展(Zimmermann和Hurrell 2002)。但常规育种周期长, 效率低, 且受品种资源的制约。近年来, 基因工程的发展为进一步提高水稻铁营养品质提出了值得考虑的思路和方法。目前, 采用基因工程提高水稻铁营养品质的策略主要有: 第一, 以水稻吸收铁元素为出发点, 导入铁吸收的相关基因促进水稻吸收铁; 第二, 导入金属结合蛋白基因提高水稻中铁的贮存量; 第三, 从人体吸收利用铁元素的角度出发, 降低稻米中抑制铁吸收的因子和增加促进铁吸收的因子。从而提高铁元素的生物有效性(bioavailability)。

1 导入铁吸收相关基因促进水稻对铁的吸收

植物种子中铁含量是受植物根系吸收铁离子的能力影响的(Cohen等2004)。根据植物吸收铁机制的不同, 可大致分为两大类: 机理 I 包括双子叶植物和非禾本科的单子叶植物, 它们主要依靠 Fe^{3+} 还原酶的催化活动来吸收铁; 机理 II 类主要

包括禾本科植物, 它们主要通过植物铁载体吸收铁(Schmidt 2003)。水稻吸收土壤中铁主要通过后者(Inoue等2004)。目前已发现的铁载体相关基因主要有以下3类: 麦根酸类高铁载体相关基因、*Nramp* 基因家族相关基因和 *ZIP* 基因家族相关基因。

1.1 麦根酸类高铁载体相关基因 麦根酸类高铁载体(mugineic acid family phytosiderophores, MAs)是目前已从禾本科植物中分离到的主要铁载体之一。MAs 是一类低分子量的非蛋白氨基酸, 对 Fe^{3+} 有强的亲和力。在缺铁的情况下, 禾本科植物会分泌出MAs。MAs通过对 Fe^{3+} 螯合作用形成八面体螯合物[Fe^{3+} -MAs], 有效地活化难溶性的铁化合物, 从而促进对铁的吸收。这种吸收作用受土壤pH的影响较小(曹慧等2002)。

MAs的生物合成途径目前已得到初步阐述。合成MAs的前体物质是L-甲硫氨酸(L-Met), L-Met首先和ATP作用生成S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)。SAM进一步在尼克烟酰胺合成酶(nicotianamine synthase, NAS)的催化下, 形成尼克烟酰胺(nicotianamine, NA)。NA在尼克烟酰胺氨基转移酶(nicotianamine aminotrans-

收稿 2005-10-31 修定 2006-03-06

资助 暨南大学引进人才启动基金(692016和692017)。

*通讯作者(E-mail: msmwdw@163.com, Tel: 020-38897606)。

ferase, NAAT)的催化下经过一系列的中间反应形成脱氧麦根酸(2'-deoxymugineic acid, DMA)。最后DMA再转化为MAs (Takahashi 2003)。

MAs的合成主要受其合成途径中的关键酶调控(Kanazawa等1998),因此,可以将这些关键酶基因导入到植物基因组中以提高植物对铁元素的吸收。近年来,已经成功克隆了MAs合成途径中一些关键酶的基因。例如,Higuchi等(1999)通过合成*nas*探针,从缺铁胁迫的大麦(*Hordeum vulgare* L.)根系的cDNA文库中成功克隆出7个*nas*基因。Takahashi等(1999, 2001)也用类似方法从大麦中筛选到4个*naat*基因,并将其转入水稻中。转基因水稻比非转基因水稻表现出较高的NAAT活性,分泌出更多的MAs,耐低铁胁迫能力更强。

1.2 *Nramp* 基因家族相关基因 一些研究表明,植物对铁元素的吸收还与*Nramp*基因家族中的某些基因有关(戚金亮等2003)。*Nramp* (natural resistance-associated macrophage protein)基因又称天然抵抗力相关巨噬细胞蛋白基因,最初是由Cellier等(1995)在小鼠(*Mus musculus*)中发现的。*Nramp*基因家族是在小鼠受到外界病原侵染后,细胞内表现出来的一些抗性基因。这些基因通过控制巨噬细胞转运金属离子来抵抗外界病原菌的侵染。后来,人们分析序列同源性时发现,在植物体内同样也存在这类基因。例如,Beloushi等(1995)在水稻中成功地克隆出*Nramp*家族成员中的*OsNramp1*、*OsNramp2*和*OsNramp3* (*Oryza sativa* *Nramp*, *OsNramp*)。后来的研究表明,*Nramp*基因家族能够编码多种特异的金属离子转运蛋白(Gunshin等1997)。由此可以看出,进一步研究*Nramp*基因家族在金属离子转运中的作用,将会为培育高效吸收和转运铁的植物提供理论依据。

1.3 ZIP基因家族相关基因 ZIP (ZRT/IRT-like protein)是一个二价金属离子转运载体基因家族。其名字来源于从拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)中克隆到的Fe²⁺载体基因*IRT1* (iron-regulated transporter)和从酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中分离到的锌载体基因*ZRT1*和*ZRT2* (zinc-regulated transporter) (渠慎春等2004)。植物ZIP基因的表达是受缺铁胁迫诱导的。Buglio等(2002)从水稻

中克隆出ZIP基因家族中的*OsIRT1* (*Oryza sativa* *IRT1*)。它的cDNA全长为1 395 bp,包含一个374个氨基酸的开放阅读框架,其编码的多肽为铁运输载体。但是它在植物体内转运铁离子的机制尚不清楚。

此外,除上面3种铁吸收相关基因外,Kobayashi等(2005)用DNA微阵列分析(microarray analysis)方法发现,*IDE1*、*IDE2* (铁缺乏反应顺式作用元件, iron-deficiency-responsive *cis*-acting elements)也参与水稻对铁吸收的调控。

2 导入金属结合蛋白基因提高水稻的铁含量

2.1 导入铁蛋白基因 铁蛋白(ferritin, Fer)是一种广泛存在于各种生物体中的贮铁蛋白。它由24个亚基组成,分子量约为450 kDa。其亚基围绕形成一空腔,可储藏4 500个可溶性的铁原子(Briat和Lobreaux 1997)。这种铁蛋白在植物体中的主要作用是贮存铁原子,并调节细胞内自由铁(free iron)的浓度。目前,已从苜蓿(*Medicago sativa* L.)、高粱(*Sorghum vulgare* L.)、玉米(*Zea mays* L.)、大豆(*Glycine max* L.)、蚕豆(*Vicia faba* L.)等植物中克隆出*fer*基因。因此可以采用基因工程方法将外源*fer*基因导入水稻基因组,以提高水稻中的铁含量。例如Goto等(1999)将水稻种子存储蛋白启动子GluB-1和大豆*fer*基因(*soyferH-1*)连接起来,采用农杆菌介导法转入日本粳稻品种‘Kita-ake’中,免疫印迹检测的结果表明:*soyferH-1*在水稻胚乳中得到特异性表达,转基因水稻种子中的铁含量为非转基因水稻的3倍。Vasconcelos等(2003)将*soyferH-1*转入籼稻品种‘IR68144-3B-2-2-3’中的结果发现,在T₂代的铁含量为非转基因水稻的3.7倍,而且锌的含量也有增加。

徐晓晖等(2003)用农杆菌介导法将豌豆(*Pisum sativum* L.) *fer*基因转化到水稻品种‘秀水11’中。经过检测分析转基因水稻T₀代的结果表明,*fer*基因已整合到水稻基因组中,转基因水稻种子和叶组织中的铁含量明显提高。

此外,刘巧泉等(2004)用农杆菌介导法将菜豆(*Phaseolus limensis* L.)的*fer*基因导入一个高产粳稻品种‘武香粳9号’中,在GluB-1启动子的控制下,*fer*基因在转基因水稻的种子中可高效表达,其种子中的铁含量提高64%。

为研究转入 fer 基因的水稻是否能达到预期营养价值, Murray-Kolb等(2002)分别用转入 fer 基因的水稻和 $FeSO_4$ 喂饲患有贫血症的小鼠。检测小鼠体内不同部位的铁含量和其它生理指标的结果表明: 转基因水稻中的铁与 $FeSO_4$ 铁剂具有相同的生理效应。

最近, Qu等(2005)在水稻中建立了强胚乳特异性启动子G1b-1控制下的 fer 基因过表达体系, 可使 fer 基因只能在水稻胚乳中高效表达。Western印记分析表明, 转基因水稻种子中铁蛋白的表达量高出13倍, 但是铁含量仅高出30%。这就说明, 水稻中铁元素的积累并不是与铁蛋白的表达量成正比, 在水稻吸收和转运铁元素的过程中可能存在某些限制性因素影响铁元素的积累。

2.2 导入乳铁蛋白基因 乳铁蛋白(lactoferrin, LF)是一种分子量为80 kDa的糖蛋白。广泛存在于乳汁、唾液、泪液等外分泌液或血浆、中性粒细胞中。它不仅参与铁的转运, 而且还有抵抗细菌和病毒感染等功能(Nandi等2005)。目前, 外源乳铁蛋白基因已导入到水稻基因组中, 稻米中的铁含量得到提高。例如, Suzuki等(2003)用基因枪成功地将人乳铁蛋白(human lactoferrin, hLF)基因导入水稻品种中。在转基因水稻中, LF含量约占总蛋白的6%。Rachmawati等(2004)用农杆菌介导法将由玉米泛素启动子Ubiquitin 1控制的人乳铁蛋白基因转入一种粳稻品种‘Rojolele’中的结果表明: 人乳铁蛋白可以在水稻中稳定表达; 并且转基因水稻的生长状况与非转基因水稻无很大差别; 水稻中表达的人乳铁蛋白与天然人乳铁蛋白结构基本相同, 只是糖链有差异。

为解决LF在植物中表达水平低的问题, Ventria生物科技公司花费了6年的时间优化了乳铁蛋白基因在谷类作物中的表达体系, 他们引用特殊的启动子和信号肽, 使得人乳铁蛋白(hLF)在水稻中高水平的表达, 其含量可占水稻干重的0.5%(Bethell和Huang 2004)。

3 提高水稻中铁元素的生物有效性

降低稻米中铁吸收抑制因子和增加铁吸收促进因子, 可以提高铁元素的生物有效性(Grusak和DellaPenna 1999)。

3.1 降低稻米中铁吸收抑制因子的合成 植物性食

物中常常含有微量元素吸收的抑制因子, 严重的影响了人体对微量元素的吸收。植酸(phytic acid)便是其中最主要的一种抑制因子。植酸又称肌醇六磷酸(inositol hexakis-phosphate, IP6), 常常以一价或二价阳离子盐的形式存在于植物种子中。水稻中的植酸主要集中分布在种子的糊粉层。它能与人体肠道中钙、镁、铁、铜、钴、锰等金属离子形成难溶性的植酸盐。大量摄入植酸会使矿物质元素不能为人体吸收利用。因此, 降低水稻种子中的植酸含量可以提高人体对铁元素吸收(Holm等2002)。目前主要采取导入植酸酶(phytase)基因来降低水稻种子中的植酸含量。

20世纪90年代起, 国内外科学家开始致力于将植酸酶基因导入到烟草(*Nicotiana tabacum* L.)、拟南芥、油菜(*Brassica napus* L.)、大豆、苜蓿和小麦(*Triticum aestivum* L.)等植物, 并取得了初步成功(沈亚欧等2005)。例如Lucca等(2002)将菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)铁蛋白基因转入水稻, 同时将曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*)耐热植酸酶引入水稻胚乳。结果发现, 水稻种子中铁含量提高2倍, 植酸含量有所降低。但由于植酸酶活性受温度和pH的影响较大, 在水稻煮熟过程中或被人体吸收进入小肠酸性环境后, 其活性会大大下降。因此开发耐高温、耐酸的植酸酶对应用该基因来提高水稻中铁的生物有效性有重要意义。Wyss等(1998)在曲霉菌中发现一种耐热、耐酸的植酸酶。这种酶在100℃水中处理20 min后, 仍能表现出很高的活性。最近, Hong等(2004)也在原核瘤胃微生物(*Selenomonas ruminantium*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)中发现SrPf6和appA 2种植酸酶的基因, 并将其转入水稻基因组, 发现其能在水稻籽粒中高效表达, 酶活性提高40~60倍, 并表现出更加耐热和耐酸的特性, 这种高水平的表达能力还可以稳定地传递给后代。他们观察到, 此酶在转基因水稻的T₄代中也表现出很高的活性。

植酸作为人体对铁元素吸收的抑制因子, 同时也是植物生长发育阶段不可缺少的物质, 随着植酸酶的高效表达, 势必会造成植物体内植酸含量过低, 这是否会对植物的生长发育造成影响, 还有待进一步研究。

3.2 提高铁吸收促进因子的合成 饮食中的氨基酸

可以促进铁的吸收。尤其是半胱氨酸或富含半胱氨酸的多肽, 能通过其巯基基团与铁元素结合, 可促进铁的吸收。例如, Lucca 等(2001)把一个富含半胱氨酸的金属硫类似蛋白(cysteine-rich metallothionein-like protein)基因导入水稻胚乳的结果表明, 在稻米中, 可溶性蛋白中的半胱氨酸含量增加7倍。食用这种稻米可以增加人体内半胱氨酸的摄入量, 这样做也可能提高人体对铁的吸收。

此外, β -类胡萝卜素、维生素E (VE) 和维生素C (VC) 等也可以促进人体对铁元素的吸收。因此, 如采用基因工程手段提高水稻中的这些成分的含量, 也可能会提高人体对铁的吸收。目前, 这方面的研究已有一些成功的报道。例如, Ye等(2000)用农杆菌介导法将 β -类胡萝卜素合成途径中的3个关键酶基因——八氢番茄红素合成酶(phytoene synthase)基因、八氢番茄红素脱饱和酶(phytoene desaturase)基因和番茄红素 β -环化酶(lycopene- β -cyclase)基因转入水稻, 培育出富含 β -胡萝卜素的新品种。由于 β -胡萝卜素能使这种水稻呈金黄色, 所以人们称之为‘金稻’(golden rice)。**‘金稻’**的育成为解决亚洲、非洲和拉丁美洲等地人口缺乏 β -胡萝卜素的问题提供了新的途径。但**‘金稻’**是否可以增加人体铁的吸收还不清楚, 这方面的研究现在正在进行中。Shintani和DellaPenna (1998)把VE合成途径中的关键酶基因——生育酚甲基转移酶(tocopherol methyltransferase)基因导入拟南芥, 结果拟南芥种子中的VE含量增加。但利用基因工程提高水稻中VE含量的研究尚未见报道。

4 结束语

综上所述, 采用基因工程在提高水稻铁营养品质的研究已取得一定的进展, 但还有以下一些问题值得进一步思考:

第一, 目前对水稻铁吸收相关基因的研究主要建立在铁吸收机制II的基础上, 但水稻体内是否存在铁吸收机制I尚不清楚。因此, 将铁吸收机制I中的 Fe^{3+} 还原酶基因导入水稻基因组是否能促进水稻对铁的吸收, 尚待进一步研究。

第二, 在用基因工程改良水稻铁营养成分时, 还应注意在提高水稻铁含量的同时, 防止铁过量积累对水稻造成的毒害作用。

第三, 基因沉默已成为基因工程应用的瓶颈。从目前来看, 采用强启动子等已成为解决基因沉默的有效手段。另外, 基因的整合和表达调控等问题也应关注。应做到在改良水稻营养品质的同时, 对其色泽、味道及其理化特性也应关注, 这样才可以培育出既有益于人类健康, 又美味可口的新型水稻。

参考文献

- 曹慧, 韩振海, 许雪峰, 张勇(2002). 高等植物的铁营养. 植物生理学通讯, 38 (2): 180~186
- 丁虹(2005). 贫血和铁缺乏对易患人群的影响及控制措施. 中国食物与营养, (5): 49~52
- 刘巧泉, 姚泉洪, 王红梅, 顾铭洪(2004). 转基因水稻胚乳中表达铁结合蛋白提高稻米铁含量. 遗传学报, 31 (5): 518~524
- 戚金亮, 王忆, 印莉萍, 韩振海(2003). 与植物铁素营养相关的蛋白和基因. 植物生理学通讯, 39 (3): 294~299
- 渠慎春, 章镇, 乔玉山(2004). 植物ZIP基因家族铁载体蛋白基因研究进展. 西北植物学报, 24 (7): 1348~1354
- 沈亚欧, 彭焕伟, 潘光堂(2005). 转基因植物表达植酸酶研究进展. 中国生物工程杂志, 25 (1): 29~32
- 徐晓晖, 郭泽建, 程志强, 黎军英, 李德葆(2003). 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), 29 (1): 49~54
- Belouchi A, Cellier M, Kwan T, Saini HS, Leroux G, Gros P (1995). The macrophage-specific membrane protein Nramp controlling natural resistance to infections in mice has homologues expressed in the root system of plants. Plant Mol Biol, 29 (6): 1181~1196
- Bethell DR, Huang JM (2004). Recombinant human lactoferrin treatment for global health issues: iron deficiency and acute diarrhea. BioMetals, 17 (3): 337~342
- Briat JF, Lobreaux S (1997). Iron transport and storage in plants. Trends Plant Sci, 2 (5): 187~193
- Bughio N, Yamaguchi H, Nishizawa NK, Nakanishi H, Mori S (2002). Cloning an iron-regulated metal transporter from rice. J Exp Bot, 53 (374): 1677~1682
- Cellier M, Prive G, Belouchi A, Kwan T, Rodrigues V, Chia W, Gros P (1995). Nramp defines a family of membrane-proteins. Proc Natl Acad Sci USA, 92 (22): 10089~10093
- Cohen CK, Garvin DF, Kochian LV (2004). Kinetic properties of a micronutrient transporter from *Pisum sativum* indicate a primary function in Fe uptake from the soil. Planta, 218 (5): 784~792
- Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, Toki S, Takaiwa F (1999). Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. Nat Biotechnol, 17 (3): 282~286
- Grusak MA, DellaPenna D (1999). Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 50: 133~161
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA (1997).

- Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 388 (6641): 482~488
- Higuchi K, Suzuki K, Nakanishi H, Yamaguchi H, Nishizawa NK, Mori S (1999). Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores. *Plant Physiol*, 119 (2): 471~479
- Holm PB, Kristiansen KN, Pedersen HB (2002). Transgenic approaches in commonly consumed cereals to improve iron and zinc content and bioavailability. *J Nutr*, 132 (3): 514~516
- Hong CY, Cheng KJ, Tseng TH, Wang CS, Liu LF, Yu SM (2004). Production of two highly active bacterial phytases with broad pH optima in germinated transgenic rice seeds. *Transgenic Res*, 13 (1): 29~39
- Inoue H, Suzuki M, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2004). Rice nicotianamine aminotransferase gene (NAAT1) is expressed in cells involved in long-distance transport of iron. In: Abstracts of the XII International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants. Tokyo, Japan: Japan Science and Technology Agency, 204
- Kanazawa K, Higuchi K, Nakanishi H, Kishi-Nishizawa N, Mori S (1998). Characterizing nicotianamine aminotransferase: improving its assay system and details of the regulation of its activity by Fe nutrition status. *Soil Sci Plant Nutr*, 44 (4): 717~721
- Kobayashi T, Suzuki M, Inoue H, Itai RN, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2005). Expression of iron-acquisition-related genes in iron-deficient rice is co-ordinately induced by partially conserved iron-deficiency-responsive elements. *J Exp Bot*, 56 (415): 1305~1316
- Lucca P, Hurrell R, Potrykus I (2001). Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. *Theor Appl Genet*, 102 (2~3): 392~397
- Lucca P, Hurrell R, Potrykus I (2002). Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice. *J Am Coll Nutr*, 21 (3): 184~190
- Murray-Kolb LE, Takaiwa F, Goto F, Yoshihara T, Theil EC, Beard JL (2002). Transgenic rice is a source of iron for iron-depleted rats. *J Nutr*, 132 (5): 957~960
- Nandi S, Yalda D, Lu S, Nikolov Z, Misaki R, Fujiyama K, Huang N (2005). Process development and economic evaluation of recombinant human lactoferrin expressed in rice grain. *Transgenic Res*, 14 (3): 237~249
- Qu LQ, Yoshihara T, Ooyama A, Goto F, Takaiwa F (2005). Iron accumulation does not parallel the high expression level of ferritin in transgenic rice seeds. *Planta*, 222 (2): 225~233
- Rachmawati D, Mori T, Hosaka T, Takaiwa F, Inoue E, Anzai H (2004). Production and characterization of recombinant human lactoferrin in transgenic Javanica rice cv Rojolele. 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia
- Schmidt W (2003). Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Trends Plant Sci*, 8 (4): 188~193
- Shintani D, DellaPenna D (1998). Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science*, 282 (5396): 2098~2100
- Suzuki YA, Kelleher SL, Yalda D, Wu LY, Huang JM, Huang N, Lonnerdal B (2003). Expression, characterization, and biologic activity of recombinant human lactoferrin in rice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 36 (2): 190~199
- Takahashi M (2003). Overcoming Fe deficiency by a transgenic approach in rice. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 72 (3): 211~220
- Takahashi M, Nakanishi H, Kawasaki S, Nishizawa NK, Mori S (2001). Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nat Biotechnol*, 19 (5): 466~469
- Takahashi M, Yamaguchi H, Nakanishi H, Shioiri T, Nishizawa NK, Mori S (1999). Cloning two genes for nicotianamine aminotransferase, a critical enzyme in iron acquisition (strategy II) in graminaceous plants. *Plant Physiol*, 121 (3): 947~956
- Vasconcelos M, Datta K, Oliva N, Khalekuzzaman M, Torrizo L, Krishnan S, Oliveira M, Goto F, Datta SK (2003). Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene. *Plant Sci*, 164 (3): 371~378
- Wyss M, Pasamontes L, Remy R, Kohler J, Kuszniir E, Gadiant M, Muller F, van Loon APGM (1998). Comparison of the thermostability properties of three acid phosphatases from molds: *Aspergillus fumigatus* phytase, *A. niger* phytase, and *A. niger* pH 2.5 acid phosphatase. *Appl Environ Microbiol*, 64 (11): 4446~4451
- Ye XD, Al-Babili S, Klott A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I (2000). Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287 (5451): 303~305
- Zimmermann MB, Hurrell RF (2002). Improving iron, zinc and vitamin A nutrition through plant biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 13 (2): 142~145