

郭启平, 张珊, 刘媛媛, 田书军, 李春莲, 闻珊珊. 小麦维生素 E 基因 *TaHGGT-7AL* 的克隆与表达分析 [J]. 植物科学学报, 2019, 37(3): 374~381

Guo QP, Zhang S, Liu YY, Tian SJ, Li CL, Wen SS. Cloning and expression analysis of *Triticum aestivum* vitamin E gene *TaHGGT-7AL* [J]. *Plant Science Journal*, 2019, 37(3): 374~381

小麦维生素 E 基因 *TaHGGT-7AL* 的克隆与表达分析

郭启平, 张珊, 刘媛媛, 田书军, 李春莲*, 闻珊珊*

(西北农林科技大学农学院, 作物分子生物学实验室, 陕西杨凌 712100)

摘要: 从小麦 (*Triticum aestivum* L.) 品种‘科农 199’籽粒中克隆出维生素 E 基因 *TaHGGT-7AL* 及其另外两个拷贝, 通过生物信息学分析, 对其序列结构特征及蛋白序列的系统发育关系进行了初步研究。结果显示: *TaHGGT-7AL* 基因编码区长 1227 bp, 共编码 408 个氨基酸; *TaHGGT-7AL* 与另外两个拷贝的序列一致性为 95.45%。*TaHGGT-7AL* 蛋白序列具有 9 个 α -螺旋, 该序列与禾本科 HGGT 蛋白的同源性在 58.7% ~ 98.5% 之间。3 个 *TaHGGT* 基因分别位于小麦基因组的 7AL、7BL 和 7DL 染色体上, 均具有与膜相关的 UbiA 异戊烯基转移酶家族的保守结构域和一个转运肽。系统进化分析结果表明, *TaHGGT-7AL* 与禾本科植物的亲缘关系较近。qRT-PCR 分析结果显示, *TaHGGT-7AL* 只在小麦颖壳和籽粒中表达, 且在花后 13 d 籽粒的表达量最高。在 ABA、4°C 低温、干旱及黑暗胁迫处理下, *TaHGGT-7AL* 表达量上调; NaCl 处理 24 h 后, 该基因表达量升高, 表明 *TaHGGT-7AL* 可以对非生物胁迫产生响应。

关键词: 小麦; *TaHGGT-7AL* 基因; 生物信息学; 胁迫; 表达分析

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2019)03-0374-08

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2019.30374

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Cloning and expression analysis of *Triticum aestivum* vitamin E gene *TaHGGT-7AL*

Guo Qi-Ping, Zhang Shan, Liu Yuan-Yuan, Tian Shu-Jun, Li Chun-Lian*, Wen Shan-Shan*

(Crop Molecular Biology Laboratory, College of Agronomy Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The vitamin E gene *TaHGGT-7AL* and two other copies were cloned from *Triticum aestivum* L. variety ‘Kenong 199’ and the sequence structure and phylogenetic relationship of the protein sequence were analyzed by bioinformatics. Results showed that the coding region of the *TaHGGT-7AL* gene was 1227 bp in length, encoding a total of 408 amino acids; the sequence identity of *TaHGGT-7AL* with the two other copies was 95.45%. The *TaHGGT-7AL* protein sequence had nine α -helices and showed the sequence homology with grass HGGT protein of between 58.7% and 98.5%. The three *TaHGGT* genes were located on the 7AL, 7BL, and 7DL chromosomes of the genome, each having a conserved domain of the UbiA prenyltransferase family associated with the membrane and a transit peptide. Phylogenetic analysis showed that *TaHGGT-7AL* was closely related to gramineous plants. The qRT-PCR analysis results showed that *TaHGGT-7AL* was only expressed in *T. aestivum* hulls and grains, and the highest expression was observed 13 d after flowering. Under ABA,

收稿日期: 2018-12-03, 退修日期: 2019-01-11。

基金项目: 旱区作物逆境生物学国家重点实验室小麦生物学基础研究项目。

This work was supported by a grant from the State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas.

作者简介: 郭启平(1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向作物遗传改良与种质创新(E-mail: 1453008625@qq.com)。

* 通讯作者(Authors for correspondence. E-mail: lclian@163.com; sswen@nwsuaf.edu.cn)。

low temperature (4°C), drought, and dark stress treatments, the expression of *TaHGGT-7AL* was up-regulated compared with the control; after 24 h of NaCl treatment, the expression increased, indicating that *TaHGGT-7AL* responds to abiotic stress.

Key words: *Triticum aestivum*; *TaHGGT-7AL* gene; Bioinformatics; Stress; Expression analysis

小麦(*Triticum aestivum* L.)属于禾本科小麦属,是世界上三大谷物之一。据联合国粮农组织(FAO)统计,2017年全球小麦产量为 7.548×10^{11} kg,仅次于玉米(*Zea mays* L.)(1.371×10^{12} kg)。

维生素E(V_E)是由一个极性的苯并二氢吡喃酚环围绕酚羟基化合物尿黑酸(亲水)和一个异戊二烯侧链(疏水)组成的两性分子^[1],也是植物体内重要的抗氧化物质^[2]。牻牛儿基牻牛儿基二磷酸(Geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP)和尿黑酸(Homogentisate acid, HGA)在尿黑酸牻牛儿基牻牛儿基转移酶(Homogentisate geranylgeranyltransferase, HGGT)的催化下缩合,再经过甲基转移酶(Methyltransferase, MT)甲基化、生育酚环化酶(Tocopherol cyclase, TC)环化和 γ -生育酚甲基转移酶(γ -tocopherol methyltransferase, γ -TMT)进一步甲基化,形成 α 、 β 、 γ 、 δ 等不同形式的生育三烯酚。生育三烯酚的侧链具有3个不饱和双键^[3]。

V_E 只能在进行光合作用的植物和某些藻类中合成,人体自身不能合成,只能从食物或药物中获取^[4]。生育三烯酚是大多数单子叶植物种子中 V_E 的主要组分^[5],而HGGT是控制生育三烯酚合成的上游限速基因,调节整个代谢通路流量的大小,具有限制性作用,很大程度上决定了 V_E 的合成和产量^[6]。随着基因组、转录组^[7]和生物信息学的发展,根据HGGT基因在植物中的高度保守性^[8],可以利用HGGT基因控制 V_E 的合成,以补冲饮食和医疗中 V_E 的缺乏。

研究表明,过表达HGGT可使烟草(*Nicotiana tabacum* L.)叶片中 V_E 含量增加5倍^[9];过表达HGGT的拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)阳性后代中,叶片 V_E 含量提高了15倍^[9];使用强胚乳特异性启动子过表达HGGT的玉米籽粒中,生育三烯酚含量增加了20倍, V_E 含量增加了6倍^[10];在D-麦醇溶蛋白基因启动子的调控下,获得过表达*HvHGGT*的转基因大麦(*Hordeum vulgare* L.)。

其种子中生育三烯酚的含量增加了10%~15%^[11]。以上研究为明确HGGT在 V_E 合成代谢中的作用并为通过基因工程手段提高植物 V_E 含量提供了理论基础。

生育三烯酚约占 V_E 组分的一半,但有关HGGT的研究却开展较少。Kong等^[12]获得了油棕(*Elaeis guineensis* Jacq.)HGGT上游1.5 kb的序列,从中鉴定出许多与激素、光和非生物逆境响应相关的重要顺式元件,发现他们可能参与协调HGGT的表达。而在小麦中有关该基因的表达特性及抗逆性研究尚未见报道。本研究以基因转化效率较高的小麦品种‘科农199’为材料^[13, 14],克隆获得TaHGGT的3个拷贝,通过生物信息学方法,对其序列组成、结构、理化性质及系统发育关系进行了研究;并采用qRT-PCR方法对小麦不同组织、花后不同天数及其在不同逆境胁迫条件下基因的表达特征进行了分析,以期为进一步解析TaHGGT-7AL基因的抗逆调控机制研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

选取小麦品种‘科农199’为实验材料。‘科农199’属于半冬性品种,种植于西北农林科技大学科研温室中(34°15'50.03"N, 108°03'46.34"E)。将种子置于培养皿中催芽2 d,移入土中(营养土:蛭石为3:1)。放入人工气候箱生长4 d,每天浇水1次;最后放入春化柜28 d,每5天浇水1次。春化后的植株移栽到温度23°C、湿度45%的温室中培养(16 h光照/8 h黑暗)。采用Hoagland's(霍格兰氏)营养液与水交替灌溉。

1.2 方法

1.2.1 实验材料的处理

参照刘燕等^[15]的方法,在‘科农199’灌浆期进行胁迫处理:(1)分别置于含有ABA(100 μmol/L)、PEG6000(20%)和NaCl(200 mmol/L)的水溶液中,对小麦进行ABA、干旱和盐胁迫处理;(2)将小麦置于春化柜中进行低温(4°C)胁迫处理;(3)

将小麦置于培养箱黑暗处理 24 h。以上处理分别于 0、3、6、9、12、24 h 时取小麦籽粒，保存于 -80℃ 备用。

1.2.3 小麦籽粒总 RNA 提取及 cDNA 合成

采用 RNA 提取试剂盒提取‘科农 199’籽粒总 RNA 并反转录成 cDNA，将 cDNA 稀释至 100 ng/μL，于 -4℃ 保存、备用。

1.2.4 小麦 *TaHGGT-7AL* 基因的克隆

在小麦基因组数据库 (<https://wheat-urgi.versailles.inra.fr>) 进行 *TaHGGT-7AL* 基因序列 (登录号: AY222861) 的 BLAST 搜索，得到 3 条相似性最高的序列，分别位于小麦的 7AL、7BL、7DL 染色体上。利用 Primer 5.0 软件对 3 条序列设计特异性引物 (表 1)，克隆‘科农 199’的 *HGGT* 基因。以‘科农 199’cDNA 为模板，利用高保真 DNA 聚合酶 PrimeSTAR 进行 PCR 扩增，反应体系为：DNA Polymerase (1.25 U/μL) 1 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μL, 5 × PrimeSTAR GXL Buffer (Mg²⁺ plus) *² 10 μL，正、反向引物 (0.2 μmmol/L) 各 2.5 μL, cDNA (100 ng) 2 μL。PCR 程序为：98℃ 预变性 10 min；98℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 15 s, 68℃ 延伸 90 s；共 34 个循环；最后 68℃ 延伸 10 min。扩增产物经回收后转化至感受态细胞 DH5 α ，阳性克隆经鉴定后送测序。

1.2.5 *TaHGGT-7AL* 基因的生物信息学分析

采用 ExPASy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线工具对‘科农 199’*TaHGGT-7AL* 基因编码蛋白的理化性质进行预测；利用 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 和 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 数据库对蛋白的信号肽及跨膜区进行预测；采用 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 数据库分析启动子顺式作用元件；采用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 和 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 在线工具预测蛋白质二级和三级结构。利用 MEGA7.0 软件的 Neighbor-joining (bootstrap 值为 1000) 方法构建蛋白序列的系统发育树。

1.2.6 *TaHGGT-7AL* 基因的表达分析

采用 Primer 5.0 软件和 Primer-BLAST 在线工

具，设计 *TaHGGT-7AL* 基因的荧光定量特异性引物 RT-F 和 RT-R (表 1)，以 *Actin* 基因为内参，采用罗氏荧光定量仪 Lightcycler 480，对‘科农 199’不同部位、花后不同发育时期、不同胁迫处理后植株 *TaHGGT-7AL* 的表达量进行分析。每个样品重复 3 次。

表 1 引物信息
Table 1 Primers used in this experiment

名称 Name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
HGGT-F	CGAGGATGCAAGCCACAC
HGGT-R	TCACATCGCTGGCCCTTGT
7BL-F	CATTACGCACGCACGACAC
7BL-R	TTTGCCCTTTCTAGATCATGG
RT-F	CCTATGGGGCTGCCACTGTAA
RT-R	GCTTGACACTTGGCA GAGGT
Actin-F	TAGATGCAGTAAAGAACCTGAC
Actin-R	GCCGTGGAGAAGAAGGATC

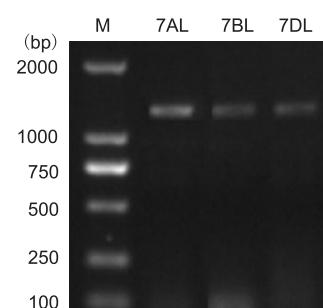
1.2.7 数据分析及作图

采用 Excel 2010 软件进行数据分析，采用 Photoshop CS6 软件作图。

2 结果与分析

2.1 ‘科农 199’*TaHGGT* 的克隆

根据小麦 *TaHGGT-7AL* 基因序列设计引物，对‘科农 199’籽粒 cDNA 进行 PCR 扩增，结果显示共扩增出 3 条带。将目的条带的测序结果与小麦全基因组网站进行序列比对，获得了‘科农 199’的 3 个同源基因 *TaHGGT-7AL*、*TaHGGT-7BL* 和 *TaHGGT-7DL* (图 1)。



M: Marker; 7AL: *TaHGGT-7AL*; 7BL: *TaHGGT-7BL*; 7DL: *TaHGGT-7DL*。

图 1 ‘科农 199’*TaHGGT* 基因的克隆
Fig. 1 Cloning of the ‘Kenong 199’ *TaHGGT* gene

2.2 *TaHGGT-7AL* 编码蛋白的生物信息学分析

2.2.1 *TaHGGT-7AL* 基因编码蛋白的理化性质

研究结果显示, ‘科农 199’的 3 个 *TaHGGT* 基因分别位于小麦基因组的 7AL、7BL 和 7DL 染色体上。3 个基因的蛋白序列同源性达到 95.45% (图 2)。其中, *TaHGGT-7AL* 编码区全长 1227 bp, 共编码 408 个氨基酸; 蛋白的分子量为 45.13 kD, 理论等电点为 9.57, 亲水性为 0.368, 因此 *TaHGGT-7AL* 为疏水蛋白。

2.2.2 *TaHGGT-7AL* 蛋白的保守结构域、转运肽及亚细胞定位

在 Pfam 数据库中, 本研究预测 *TaHGGT-7AL* 蛋白具有与膜相关的异戊烯基转移酶家族 (Ubi

prenyltransferase family, UbiA) 的保守结构域和一个转运肽 (Transit peptide)。这些特征均与大麦和水稻 (*Oryza sativa* L.) 的 HGGT 蛋白相似。亚细胞定位预测结果显示, 该蛋白定位于细胞质体。

2.2.3 *TaHGGT-7AL* 蛋白的二级和三级结构预测

TaHGGT-7AL 蛋白的二级结构预测结果显示, 该蛋白含有 47.55% 的 α -螺旋 (Alpha helix)、14.22% 的延伸直链 (Extended strand)、2.45% 的 β 转角 (Beta turn) 和 35.78% 的不规则卷曲 (Random coil)。蛋白的 3D 模型预测结果表明, 该蛋白有 66% 的 (271 个) 氨基酸残基结构置信度达到 100% (图 3), 该蛋白由 9 个 α -螺旋组成, 与 TMHMM 和 Uniprot 数据库的预测结果一致。

TaHGGT-7AL	MQATTA AAAAAA Q L ITDTR R GPRCS R AR G AT R LSWPGRFAVEAFAGRCQ S A T ATVTHRFSAISQATSP R K A R R Q C S D D Q S A L Q	83
TaHGGT-7BL	MQATTA AAAAAA A C ITDTR R GPRCS R AR G AT R LSWPGRFAVEAFAGRCQ S A T ATVTHRFSAISQATSP R N T R R Q C S D D Q S A L Q	83
TaHGGT-7DL	MQATTA AAAAAA Q L ITDTR R R P RY S R A R G AT R LSWPGRFAVQ A FAGRCQ S A T ATVTHRFSAISQATSP R N T R R Q C S D D Q S A L Q	83
TaHGGT-7AL	AGC S EVN R DQ H GYDV N F E E I S C E V S K K I R A F Y Q F CR P H I F G T I I G I T S V S L L E M K S I D D F T AT V L K G Y L E A I L A L C M N I Y	166
TaHGGT-7BL	AGC S EVN R DQ H GYDV N F E E I S C E V S K K I R A F Y Q F CR P H I F G T I I G I T S V S L L E M K S I D D F T AT V L K G Y L E A I L A L C M N I Y	166
TaHGGT-7DL	AGC S EVN R DQ H GYDV N F E E I S C I D V S K K I C A F Y Q CR P H I F G T I I G I T S V S L L E M K S I D D F T AT V L K G Y L E A I L A L C M N I Y	166
TaHGGT-7AL	VVGLNQ L YD I Q I D K I N K P G L PL A G E F S V A T G V E L V V T F L I M S F S I G I E S G S V P L M Y A L V V S F L L G S A Y S I E A P L L R W K R H A L	249
TaHGGT-7BL	VVGLNQ L YD I Q I D K I N K P G L PL A G E F S V A T G V E L V V T F L I M S F S I G I E S G S V P L M Y A L V V S F L L G S A Y S I E A P L L R W K R H A L	249
TaHGGT-7DL	VVGLNQ L YD I Q I D K I N K P G L PL A G E F S V A T G V E L V V T F L I M S F S I G I E S G S V P L M Y A L V V S F L L G S A Y S I E A P L L R W K R H A L	249
TaHGGT-7AL	LAASCIL F V R A I L V Q L A F F A H M QQ H V I E R P L A T K S L V F A T L F M C C F S A V I A L F K D I P D V D G D R F G I Q S L S V R L G P Q R V Y Q L	332
TaHGGT-7BL	LAASCIL F V R A I L V Q L A F F A H M QQ H V I E R P L A T K S L V F A T L F M C C F S A V I A L F K D I P D V D G D R F G I Q S L S V R L G P Q R V Y Q L	332
TaHGGT-7DL	LAASCIL F V R A I L V Q L A F F A H M QQ H V I E R P L A T K S L V F A T L F M C C F S A V I A L F K D I P D V D G D R F G I Q S L S V R L G P Q R V Y Q L	332
TaHGGT-7AL	C I S I L T A Y A A T V V G A S S T I L Q K I I T V S G H G L L A T L T W Q R A R E L E V E N Q A R V T S F Y M F I W K L F Y A E Y F L I P F V Q L	408
TaHGGT-7BL	C I S I L T A Y A A T V V G A S S T I L Q K I I T V S G H G L L A T L T W Q R A R E L E V E N Q A R V T S F Y M F I W K L F Y A E Y F L I P F V Q L	408
TaHGGT-7DL	C I S I L T A Y A A T V V G A S S T I L Q K I I T V S G H G L L A T L T W Q R A R E L E V E N Q A R V T S F Y M F I W K L F Y A E Y F L I P F V Q L	408

图 2 ‘科农 199’3 条 HGGT 蛋白的序列比对
Fig. 2 Amino acid alignment of ‘Kenong 199’ HGGT



图 3 *TaHGGT-7AL* 蛋白的三级结构
Fig. 3 Prediction of tertiary structure of *TaHGGT-7AL* protein

2.2.4 TaHGGT-7AL 蛋白序列的系统发育分析

系统发育分析结果显示(图4), HGGT蛋白系统进化树中分为单子叶与双子叶植物两大分支, TaHGGT-7AL 属于单子叶植物分支, 该蛋白与节节麦(*Aegilops tauschii* Coss.)、大麦、二穗短柄草(*Brachypodium distachyon* (L.) Beauv.)、玉米和水稻等禾本科植物的亲缘关系较近; 与野生烟草(*Nicotiana attenuata* L.)、莲(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)、菠菜(*Spinacia oleracea* Gen.)、甜菜(*Beta vulgaris* L.)、藜麦(*Chenopodium quinoa* Willd.)等双子叶植物的亲缘关系较远。

2.2.5 TaHGGT-7AL 启动子分析

本研究利用小麦基因组数据库的序列信息, 获取 *TaHGGT-7AL* 起始密码子上游 2000 bp 的核苷酸序列, 通过启动子分析网站预测到该基因启动子具有低温响应元件(LTR)、茉莉酸甲酯响应元件(CGTCA-motif 和 TGACG-motif)、脱落酸响应元件(ABRE)、启动子和增强子区元件(CAAT-box 和 TATA-box)、光响应元件(Sp1)等顺式作用元件(表2)。

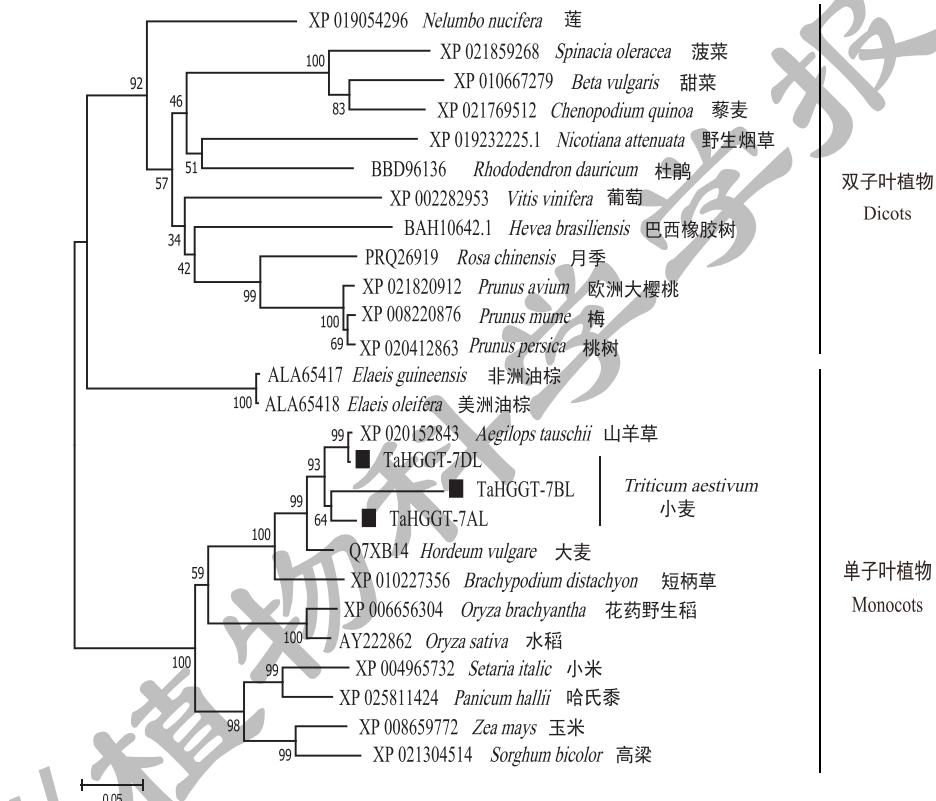


图4 ‘科农 199’与其他物种 HGGT 蛋白的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of HGGT protein among ‘Kenong 199’ and other plants

表2 *TaHGGT-7AL* 启动子区的调控元件
Table 2 Prediction of *TaHGGT-7AL* promoter cis-elements

编号 No.	元件名称 Element name	核心序列 Core sequence	数量 Number	功能 Function
1	LTR	CCGAAA	4	低温响应元件
2	TGACG-motif	TGACG	1	茉莉酸甲酯响应元件
3	CGTCA-motif	CGTCA	1	
4	ABRE	ACGTG	1	脱落酸响应元件
5	CAAT-box	CAAT	26	启动子和增强子区元件
6	TATA-box	TATATAA	15	
7	Sp1	GGGCGG	1	光响应元件

2.3 *TaHGGT-7AL* 的基因表达分析

2.3.1 不同组织、花后不同天数的基因表达

本研究选取‘科农 199’的根、茎、叶、颖壳及籽粒 5 个组织, 检测 *TaHGGT-7AL* 的表达量, 实验结果显示(图 5), *TaHGGT-7AL* 仅在颖壳和籽粒中表达, 且在籽粒中表达量最高, 是颖壳中的 4 倍。分别在植株花后的 7、9、11、13、15 d 及花后 17 d 分析籽粒 *TaHGGT-7AL* 基因的表达量, 发现该基因在花后 7 ~ 13 d 相对表达量呈上升趋势, 在 13 d 时表达量最高, 是对照(花后 7 d)的 5 倍; 在 15 d 后该基因的表达量呈下降趋势。

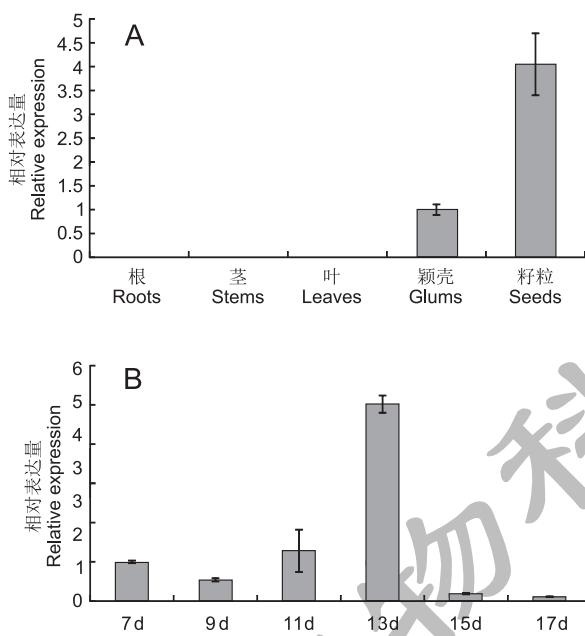


图 5 *TaHGGT-7AL* 在不同组织(A)及花后不同时期(B)的基因表达量

Fig. 5 Expression patterns of *TaHGGT-7AL* gene in different tissues (A) and different days after flowering (B)

2.3.2 不同胁迫处理下 *TaHGGT-7AL* 基因的表达

胁迫处理实验结果显示: 在 PEG 处理下, *TaHGGT-7AL* 在处理后 2 h 和 4 h 的相对表达量达到最大值, 分别为处理前的 3 倍和 2.7 倍, 在处理的 8 ~ 24 h 相对表达量与对照相比差异不明显(图 6: A); 在 ABA 处理下, 基因相对表达量在 0 ~ 24 h 内呈上升趋势, 在 24 h 时达到最大值, 是对照的 2.7 倍(图 6: B); 在盐胁迫处理下, 该基因在 0 ~ 12 h 内相对表达量基本没有变化, 但在 24 h 时达到最大值, 是对照的 2.3 倍(图 6: C);

在低温处理下, 该基因的表达量也呈上升趋势, 分别在 2、12、24 h 时表达量最大, 为对照的 4.5、3.5 和 3 倍(图 6: D); 在黑暗处理下, 该基因在 2 h 时表达量最大, 是对照的 35.4 倍, 在处理 4 h 后呈下降趋势, 但其表达量均比对照高约 2 ~ 3 倍(图 6: E)。由此可知, *TaHGGT-7AL* 的表达受到外界胁迫的影响, 推测该基因参与了植物某些抗逆信号的传导。

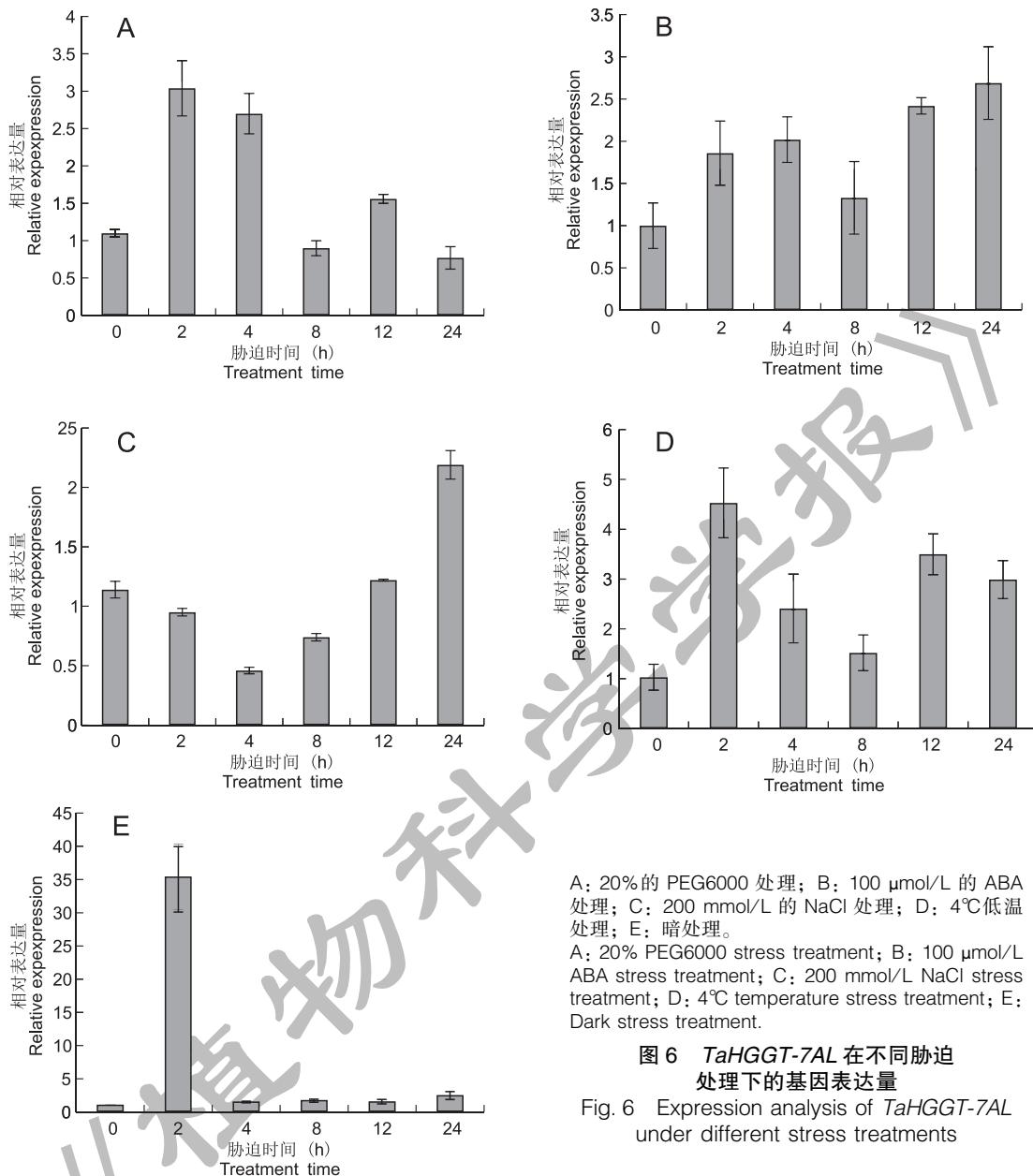
3 讨论

本研究从小麦品种‘科农 199’中克隆获得 *TaHGGT* 基因的 3 条同源序列, 且 3 条序列的相似性较高, 说明 V_E 在植物中功能较为保守。本研究仅在小麦籽粒和颖壳中检测到 *TaHGGT-7AL* 的表达, 而在根、茎、叶均没有发现, 且 *TaHGGT-7AL* 在小麦花后 13 d 的表达量最高, 与同为单子叶植物的棕榈(*Trachycarpus fortunei* (Hook.) H. Wendl.) *HGGT* 在果皮和核仁中表达的研究结果不同^[12]。

系统发育分析结果表明, *TaHGGT-7AL* 蛋白在亲缘关系上与禾本科植物较近, 且 *TaHGGT-7AL* 与 *TaHGGT-7BL* 聚为一支, *TaHGGT-7DL* 与 *AeHGGT* 聚为一支。Cahoon 等^[10] 的研究从小麦中克隆出世界上第一个 *HGGT* 基因, 发现其定位在 7AL 染色体。且该蛋白与 HPT 蛋白的结构一样, 都具有与膜相关的 UbiA 家族的保守结构域和一个转运肽, 推测这种进化上的分化与 HPT 结构域的相似性存在一定联系, 但具体作用机制仍需进一步研究^[16]。

本研究发现, 各种非生物胁迫处理后, *TaHGGT-7AL* 的基因表达量呈上升趋势, 这与贾会丽等^[17] 在紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)中发现 V_E 下游合成基因 γ -TMT 在各种胁迫下, 基因相对表达量均上升的研究结果一致。本研究将 *TaHGGT-7AL* 基因序列在小麦表达量数据库进行查询, 结果显示其在 A 基因组上表达量最高。

研究表明, *HGGT* 是 V_E 合成的第一个分支点, 可催化合成生育三烯酚, 对改变 V_E 的组分具有重要作用^[18]。许多 V_E 代谢通路基因都参与了逆境胁迫的响应, 如过表达 *VTE1* 的拟南芥, 植株生育酚含量显著增加, 这对维持植物体内氧化还原动态平



A: 20%的PEG6000处理; B: 100 μ mol/L的ABA处理; C: 200 mmol/L的NaCl处理; D: 4°C低温处理; E: 暗处理。

A: 20% PEG6000 stress treatment; B: 100 μ mol/L ABA stress treatment; C: 200 mmol/L NaCl stress treatment; D: 4°C temperature stress treatment; E: Dark stress treatment.

图6 *TaHGGT-7AL*在不同胁迫处理下的基因表达量

Fig. 6 Expression analysis of *TaHGGT-7AL* under different stress treatments

衡具有重要意义^[19]。 γ -TMT的沉默会使植物对NaCl的耐受性降低^[20]，而过表达 γ -TMT可以增加植物对NaCl的耐受能力^[21]。这些结果说明， V_E 相关基因在各种逆境胁迫时起重要作用。生育三烯酚比生育酚抗氧化能力更强^[22]。有报道指出，生育三烯酚抵制过氧化的能力是生育酚的60倍^[23]。在大麦中，*HvHGGT*的过表达可以增强其胁迫耐受性，植株丙二醛含量显著低于普通未转化的大麦^[11]。将水稻*HGGT*基因沉默后，发现种皮中的生育三烯酚有助于降低其代谢活性^[24]。小麦作为世界上重要的粮食作物之一，目前几乎没有

通过基因工程手段提高 V_E 含量的报道，也缺乏小麦*HGGT*的相关研究。在克隆小麦*HGGT*基因基础上，下一步本研究将对该基因的功能进行深入分析。

参考文献：

- [1] Mène-Saffrané L. Vitamin E biosynthesis and its regulation in plants [J]. *Antioxidants*, 2017, 7(1): 2.
- [2] Kim YH, Lee YY, Kim YH, Choi MS, Jeong KH, et al. Antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation in germinating seeds of transgenic soybean expressing *OsHGGT* [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(2): 584-591.
- [3] Matringe M, Ksas B, Rey P, Havaux M. Tocotrienols, the

- unsaturated forms of vitamin E, can function as antioxidants and lipid protectors in tobacco leaves [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147(2): 764–778.
- [4] Hunter SC, Cahoon EB. Enhancing vitamin E in oilseeds: unraveling tocopherol and tocotrienol biosynthesis [J]. *Lipids*, 2007, 42(2): 97–108.
- [5] Horvath G, Wessjohann L, Bigirimana J, Jansen M, Guisez Y, et al. Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues [J]. *Phytochem Lett*, 2006, 67(12): 1185–1195.
- [6] 张桂云. 水稻维生素E、C代谢调控研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2012.
- [7] Brenchley R, Spannagl M, Pfeifer M, Barker GL, D'Amore R, et al. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing [J]. *Nature*, 2012, 491(7426): 705–710.
- [8] Gutierrez-Gonzalez JJ, Garvin DF. Subgenome-specific assembly of vitamin E biosynthesis genes and expression patterns during seed development provide insight into the evolution of oat genome [J]. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(11): 2147–2157.
- [9] Hiroyuki T, Yukinori Y, Masahiro T, Noriaki T, Shigeru S, et al. Generation of transgenic tobacco plants with enhanced tocotrienol levels through the ectopic expression of rice homogentisate geranylgeranyl transferase [J]. *Plant Biotechnol*, 2015, 32(3): 233–238.
- [10] Cahoon EB, Hall SE, Ripp KG, Ganzke TS, Hitz WD, et al. Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(9): 1082–1087.
- [11] Chen J, Liu C, Shi B, Chai Y, Han N, et al. Overexpression of HvHGGT enhances tocotrienol levels and antioxidant activity in barley [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(25): 5181–5187.
- [12] Kong SL, Abdullah SNA, Chai LH. Molecular cloning, gene expression profiling and in silico sequence analysis of vitamin E biosynthetic genes from the oil palm [J]. *Plant Gene*, 2016, 5(C): 100–108.
- [13] 谈晶晶. 小麦转基因技术优化的探索[D]. 扬州: 扬州大学, 2018.
- [14] 田文, 郭启平, 李梓彭, 张珊, 闻珊珊, 等. 普通小麦DREB基因家族的全基因组鉴定及热胁迫下的表达模式分析[J]. 麦类作物学报, 2018, 38(10): 1146–1156.
- Tian W, Guo QP, Li ZZ, Zhang S, Wen SS, et al. Genome-wide identification and expression analysis under heat stress of the DREB transcription factor family in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2018, 38(10): 1146–1156.
- [15] 刘燕, 赵毅, 吕千, 张丽, 李立群, 等. 小麦TaHTAS-5A基因的克隆、表达分析及亚细胞定位 [J]. 麦类作物学报, 2018, 38(10): 1137–1145.
- Liu Y, Zhao Y, Lü Q, Zhang L, Li LQ, et al. Cloning, expression analysis and subcellular localization of TaHTAS-5A gene from wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2018, 38(10): 1137–1145.
- [16] Yang W, Cahoon RE, Hunter SC, Zhang C, Han J, et al. Vitamin E biosynthesis: functional characterization of the monocot homogentisate geranylgeranyl transferase [J]. *Plant J*, 2011, 65(2): 206–217.
- [17] 贾会丽, 王学敏, 高洪文, 董洁, 王运琦, 等. 紫花苜蓿 γ -生育酚甲基转移酶(γ -TMT)基因的克隆与逆境下的表达分析 [J]. 草业学报, 2012, 21(6): 198–206.
- Jia HL, Wang XM, Gao HW, Dong J, Wang YQ, et al. Cloning of γ -tocopherol methyltransferase (γ -TMT) gene from alfalfa and its expression analysis under stress [J]. *Journal of Grass Industry*, 2012, 21(6): 198–206.
- [18] Mène-Saffrané L, Pellaud S. Current strategies for vitamin E biofortification of crops [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2017, 44: 189–197.
- [19] Li Y, Zhou Y, Wang Z, Xiao FS, Ke XT, et al. Engineering tocopherol biosynthetic pathway in *Arabidopsis*, leaves and its effect on antioxidant metabolism [J]. *Plant Sci*, 2010, 178(3): 312–320.
- [20] Abbasi AR, Hajirezaei M, Hofius D, Daniel H, Uwe S, Lars MV, et al. Specific Roles of -and tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143(4): 1720–1738.
- [21] Yusuf MA, Kumar D, Rajwanshi R, Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, et al. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements [J]. *BBA-Bioenergetics*, 2010, 1797(8): 1428–1438.
- [22] Zhang C, Cahoon RE, Hunter SC, Chen M, Han J, et al. Genetic and biochemical basis for alternative routes of tocotrienol biosynthesis for enhanced vitamin E antioxidant production [J]. *Plant J*, 2013, 73(4): 628–639.
- [23] Suzuki YJ, Tsuchiya M, Wassall SR, Choo YM, Govil G, et al. Structural and dynamic membrane properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol: Implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency [J]. *Biochemistry*, 1993, 32(40): 10692–10699.
- [24] Chen D, Li Y, Fang T, Shi X, Chen X, et al. Specific roles of tocopherols and tocotrienols in seed longevity and germination tolerance to abiotic stress in transgenic rice [J]. *Plant Sci*, 2015, 244: 31–39.