

过表达 *AtHPT* 和 *AtTC* 对小麦籽粒生育酚含量和产量性状的影响

王丹, 郭雅洁, 刘梦甜, 韩雪莹, 李慧芳, 姬祥, 刘会云

(河南农业大学农学院, 河南郑州 450046)

摘要: 小麦作为主要的粮食作物之一, 是人类膳食营养的主要来源, 通过生物育种手段可以提高小麦籽粒中维生素 E 特别是 α -生育酚的含量。本研究利用农杆菌介导的遗传转化方法将拟南芥 *AtHPT* 和 *AtTC* 基因分别转入六倍体小麦 Fielder 中, 通过 qRT-PCR 选择 *AtHPT* 和 *AtTC* 基因在籽粒中表达量较高的转基因株系, 对其生育酚含量进行 HPLC 检测, 并对其株高、粒长、粒宽、千粒重、小穗数和穗粒数进行考种分析。结果发现, 过表达 *AtTC* 的转基因小麦株系的籽粒中未检测到 β -生育酚, δ -生育酚含量与小麦 Fielder 相比无明显差异, α -生育酚的含量显著提高; 转基因株系后代的穗长、小穗数和穗粒数均显著增加。过表达 *AtHPT* 的转基因小麦株系的籽粒中未检测到 α -生育酚, β -和 δ -生育酚含量与小麦 Fielder 相比均无明显差异。转基因株系均未检测出 γ -生育酚。以上结果表明, 过表达 *AtTC* 可以显著提高小麦籽粒中 α -生育酚的含量, 并对产量性状无负面影响。

关键词: 小麦; 拟南芥; 生育酚环化酶; 尿黑酸植基转移酶; 维生素 E

中图分类号: S512.1; S336

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2025)06-0727-08

Effects of Overexpression of *AtHPT* and *AtTC* Genes on Tocopherol Content and Yield Traits of Wheat Grain

WANG Dan, GUO Yajie, LIU Mengtian, HAN Xueying, LI Huifang, JI Xiang, LIU Huiyun

(College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450046, China)

Abstract: Wheat, as one of the main cereal crops, is the primary source of human dietary nutrition. Biological breeding methods can increase the content of vitamin E in wheat grains, especially the α -tocopherol. This study *Agrobacterium*-mediated transferred *AtHPT* and *AtTC* genes into hexaploid wheat Fielder, and selected the lines with high expression of *AtHPT* and *AtTC* genes in grains through qRT-PCR experiments. HPLC was performed on their tocopherol content, and the plant height, grain length, grain width, thousand grain weight, spikelet number, and grain per spike were determined. The results showed that transgenic wheat overexpression lines of *AtTC* gene showed no significant difference in the content of δ -tocopherol compared to Fielder, the content of α -tocopherol was significantly increased in transgenic wheat grains, β -tocopherol was no detected, and the agronomic traits of wheat were significantly increased in spike length, number of spikelets, and number of grains per spike in the offspring lines. While the transgenic wheat lines overexpressing the *AtHPT* gene showed no significant difference in β - or δ -tocopherols content compared to Fielder, α -tocopherol was no detected. γ -tocopherol was no detected in transgenic wheats of *AtHPT* and *AtTC*. The above results indicate that overexpression of *AtTC* can significantly increase the content of α -taopheral in wheat grains without apparent negative effects on wheat yield traits.

收稿日期: 2024-10-11 修回日期: 2025-03-11

基金项目: 河南省自然科学基金项目(232300420189); 河南省科技攻关项目(242102111117); 河南农业大学大学生创新训练计划项目(2022DC008); 国家重点研发计划(2021YFF1000203)

第一作者 E-mail: 15593653136@163.com(王丹)

通讯作者 E-mail: 15611028703@163.com(刘会云)

Keywords: Wheat; *Arabidopsis thaliana*; Tocopherol cyclase; Homogentisate phytyl transferase; Vitamin E

目前中国粮食总产量虽然已基本满足需求,但是“质”的问题并没有完全解决。因营养不均衡导致缺乏某种维生素及人体必需的矿物质,同时其他营养成分上过度摄入导致的“隐性饥饿”,仍然影响着人民的健康^[1]。人们如果长期处于“隐性饥饿”状态,会出现免疫系统弱化,糖尿病、心血管疾病、癌症、肥胖等疾病的发病率显著增大^[2-3]。据统计,发展中国家约有 20 亿人口正在遭受“隐性饥饿”,而中国的“隐性饥饿”人口约有 3 亿^[4-5]。“隐性饥饿”不仅严重影响了个体的生命健康,也在很大程度上制约了经济的发展,成为整个社会的沉重负担。作物营养强化是解决“隐性饥饿”最有前景、最经济有效的途径之一。

维生素 E (tocopherol) 又称生育酚,是由光合生物合成的一类脂溶性的强抗氧化剂,在维持人体健康方面发挥着重要的作用,生育酚缺乏往往会导致共济失调、神经病变、贫血等疾病^[6]。天然维生素 E 有多种形式,分别为 α -、 β -、 γ -、 δ -生育酚或三烯生育酚^[7]。过去 20 多年的研究发现,人体每天通过补充 400 IU (国际单位) 维生素 E (相当于 250 mg α -生育酚) 能够显著降低患心血管疾病和癌症的风险,还可以提高人体的免疫能力,防治或减缓许多恶性疾病的发病概率^[8]。虽然各种形式的生育酚都可作为人类膳食营养中维生素 E 的有效成分,但他们之间的活性却存在很大的差异。在动物体中活性最高的生育酚是被完全甲基化的 RRR- α -生育酚,这可能是 α -生育酚更容易被人体吸收利用的主要原因之一^[9-11]。而 β -、 γ -和 δ -生育酚的活性分别是 α -生育酚活性的 40%、10% 和 1%^[12]。

多数主粮作物中含有丰富的 δ -生育酚,而 α -生育酚含量偏低,然而仅 α -生育酚可被人体有效地吸收利用。小麦是中国主要的粮食作物之一,有一半以上的人口以小麦为食,提高小麦籽粒中 α -生育酚的含量,对于小麦品质改良有着重要的科学意义和应用前景,可以有效缓解“隐性饥饿”问题。

维生素 E 在植物中具有重要的抗氧化功能,能够保护细胞免受氧化损伤,同时也在种子发育和植物对逆境胁迫的响应中发挥重要作用, *VTE1* 和 *VTE2* 是植物合成维生素 E 的两个关键

基因^[13]。*VTE1* 编码的酶是生育酚环化酶 TC (tocopherol cyclase), 能将 2-甲基-6-植基-1,4-苯醌或 2,3-二甲基-5-植基-1,4-苯醌转化为生育酚,它是叶片中生育酚合成的关键限速酶^[14-16]。研究发现,拟南芥中过表达 *AtTC* 会使叶片中的生育酚含量增加 7 倍;烟草中过表达 *AtTC* 的转基因植株其生育酚含量比野生型植株提高 2~10 倍。*VTE2* 编码尿黑酸植基转移酶 HPT (homogentisate phytyl transferase), 能够催化尿黑酸与植基焦磷酸的反应,生成 2-甲基-6-植基-1,4-苯醌^[17-18], 这一反应是维生素 E 合成途径中的关键步骤。目前编码 *HPT* 的基因已在多种植物中被克隆并进行了功能验证,其过表达产物能够显著提高植物中生育酚的总量,并改变生育酚的组成^[19-21]。研究发现,拟南芥中 *AtHPT* 基因突变后,生育酚的含量显著降低^[22]。Sundararajan 等^[23] 将拟南芥的 *AtHPT* 和 *AtTC* 基因分别转化至烟草植株,检测到转基因植株中 α -生育酚的含量显著提高。因此,本研究拟克隆拟南芥 *AtHPT* 和 *AtTC* 基因,并将其分别转化至小麦,以期在不影响小麦产量性状的同时提高小麦籽粒中 α -生育酚含量,增强小麦的营养价值,丰富小麦种质资源。

1 材料与方法

1.1 供试材料

普通六倍体小麦 Fielder 种植于日光温室,白天 25 °C, 夜晚 20 °C, 16 h 光照/8 h 黑暗。

1.2 拟南芥 *AtHPT* 和 *AtTC* 基因克隆

利用 RNA 提取试剂盒 (北京全式金生物技术股份有限公司) 提取野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 总 RNA, 借助反转录试剂盒 (北京全式金生物技术股份有限公司) 反转录为 cDNA, 根据拟南芥 *AtHPT* (NC_003071.7) 和 *AtTC* (NM_119430.5) 的基因序列, 设计引物 HPTF1/HPTR1 和 TCF/TCR1 (表 1), 分别以反转录 cDNA 为模板扩增 *AtHPT* 和 *AtTC* 的 CDS 序列。扩增体系为: 10 μ L Mix (2 \times), 1 μ L cDNA (100 ng \cdot μ L⁻¹), 0.8 μ L 引物混合物 (10 μ mol \cdot L⁻¹), 8.2 μ L ddH₂O。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。

1.3 过表达载体构建及农杆菌转化

设计带有同源臂的引物 110-*Bam* H I-HPTF/110-*Sac* I-HPTR 和 110-*Bam* H I-TCF/110-*Sac* I-TCR(表 1), 分别扩增 *AtHPT* 和 *AtTC* 的 CDS 序列, 利用同源重组分别将其连接到经 *Bam* H I 和 *Sac* I 酶切的双元表达载体 pMWB110^[24], 经过单克隆筛选和 Sanger 测序鉴定, 最终构建过表达载体 pMWB110-HPT 和 pMWB110-TC; 提取 pMWB110-HPT 和 pMWB110-TC 的质粒, 通过热激法分别将其转入农杆菌 C58C1。操作方法如

下: 取 1 μ L 质粒, 分别加入感受态 C58C1 中, 混匀后依次冰浴 5 min, 液氮冷冻 5 min, 37 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 冰上放置 5 min 后加入没有抗性的液体培养基 TY(胰蛋白胨 5 g, 酵母膏 3 g, 溶于 1 000 mL ddH₂O 高压灭菌), 28 $^{\circ}$ C、200 r \cdot min⁻¹ 黑暗条件下培养 2 h, 然后将 100 μ L 活化的菌液均匀涂布于固体培养基 TY(胰蛋白胨 5 g, 酵母膏 3 g, 琼脂 15 g, 溶于 1 000 mL ddH₂O 高压灭菌), 经过 2~3 d 的黑暗培养, 对阳性单克隆进行鉴定。

表 1 *AtHPT* 和 *AtTC* 基因扩增及转基因植株检测引物

Table 1 Primers for amplification of *AtHPT* and *AtTC* genes and detection of the transgenic plants

引物 Primer	引物序列 Primer sequence(5'-3')
TCF	GTCACCACCAACACCAAACACACA
TCR1	CCGTATCATTTACCACAAGGACCG
HPTF1	CGACCCACACAATTCTACAGTTCT
HPTR1	TTTTTGCAGTCTGCCATGTTTCAG
110- <i>Bam</i> H I-HPTF	CGACTCTAGAGGATCCATGGAGTCTCTGCTCTCTAGTTCT
110- <i>Sac</i> I-HPTR	GGGAAAATTCGAGCTCTCACTTCAAAAAAGGTAACAGCAA
110- <i>Bam</i> H I-TCF	CGACTCTAGAGGATCCATGGAGATACGGAGCTTGATTGTT
110- <i>Sac</i> I-TCR	GGGAAAATTCGAGCTCTTACAGACCCGGTGGCTTGAAGAA
Bar67F	ACCATCGTCAACCACTACATCG
Bar496R	GCTGCCAGAAACCCACGTCATG
HPTF	CCGAGTTCTGCGTTGTGATTCGAG
qHPTR	CTGTGCCAATAACTGTATGAGGCC
qTCF	CTCCTACCACAGAAGTTGGGCT
TCR	CGTGTTGCTCGTATCTCCTTTCCA
TaactinF	AGGTGCCCTGAGGTGCTGTT
TaactinR	GCCAAAATAGAGCCACCGAT

1.4 转基因植株获得

开花授粉后 15~16 d 取未成熟小麦籽粒, 在无菌工作台分别用 75% 乙醇清洗 1 min, 15% 次氯酸钠清洗 8~10 min, 最后用无菌水清洗 4~5 次。参照 Wang 等^[25] 的方法将携带 pMWB110-HPT 和 pMWB110-TC 质粒的农杆菌分别转化小麦品种 Fielder 的幼胚, 经过共培养、恢复、筛选、分化和生根培养, 最终获得转基因植株。

1.5 转基因植株检测

取转基因植株叶片, 利用 CTAB 法分别提取其基因组 DNA, 设计引物 Bar67F/Bar496R (表 1), 对筛选标记基因 *bar* 进行检测。反应体系为: 10 μ L Mix(2 \times), 1 μ L DNA(100 ng \cdot μ L⁻¹), 0.8 μ L Bar67F 和 Bar496R 的混合物(10 μ mol \cdot

L⁻¹), 8.2 μ L ddH₂O。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

此外, 利用奥创生物公司的 PAT/BAR 金标免疫快速检测试剂盒, 对转基因植株中 BAR 蛋白的表达情况进行检测。取转基因植株叶片, 将其研磨成粉末后, 分别加入 400 μ L Buffer 混合液, 混匀后按照箭头方向插入试纸条, 5~10 min 后即可鉴定出阳性转基因株系。

1.6 *AtHPT* 和 *AtTC* 基因表达检测

为了明确转基因株系叶片和籽粒中 *AtHPT* 和 *AtTC* 基因的表达情况, 花后 15 d 分别取小麦叶片和籽粒, 利用 RNA 提取试剂盒提取其总 RNA, 并反转录成 cDNA。分别设计 *AtHPT* 和

AtTC 基因的 RT-PCR 引物 HPTF/qHPTR 和 qTCF/TCR (表 1), 对 *AtHPT* 和 *AtTC* 基因的表达情况进行半定量分析。反应体系如下: 10 μL Mix ($2\times$), 1 μL cDNA ($100\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 分别加入 0.8 μL HPTF/qHPTR 和 qTCF/TCR 的混合物 ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 8.2 μL ddH₂O。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 20 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

利用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒对转基因植株进行 qRT-PCR 分析。反应体系: 10 μL SYBR qPCR Mix ($2\times$), 1 μL cDNA ($100\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 分别加入 0.8 μL HPTF/qHPTR 和 qTCF/TCR 的混合物 ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 8.2 μL ddH₂O。用 ABI PRISM 7500 (ABI, Los Angeles, CA, USA) 仪器进行 PCR 扩增。扩增程序参照半定量, 最后用 Bio-Rad CFX Manager 软件进行分析。

1.7 籽粒生育酚含量 HPLC 分析

为了测定转基因小麦中 α -、 β -、 γ -和 δ -生育酚的含量, 收获成熟的小麦籽粒并研磨成粉, 加入 3 mL 含有 2:1 (V/V) 的甲醇: 氯仿 (含有 0.01% W/V 的丁基化羟基甲苯) 溶液混合均匀, 孵育 20 min 后, 分别向每个样品中加入 1 mL 氯仿和 1.8 mL ddH₂O, 混匀后离心, 回收下层有机层, 在氮气下干燥后重新悬浮在二氯甲烷: 甲醇 (1:5, V/V) 中用于 HPLC 分析。在样品提取之前, 将 5, 7-二甲基生育酚 (Matreya 公司) 作为内标添加到每个样品中。使用 XDB-C18 柱 (Agilent Eclipse) 和由甲醇: 水 (95:5, V/V) 组成的溶剂系统, 在流速为 $1.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 下用 Agilent 1100 HPLC 测定提取物中生育酚含量。

1.8 农艺性状分析

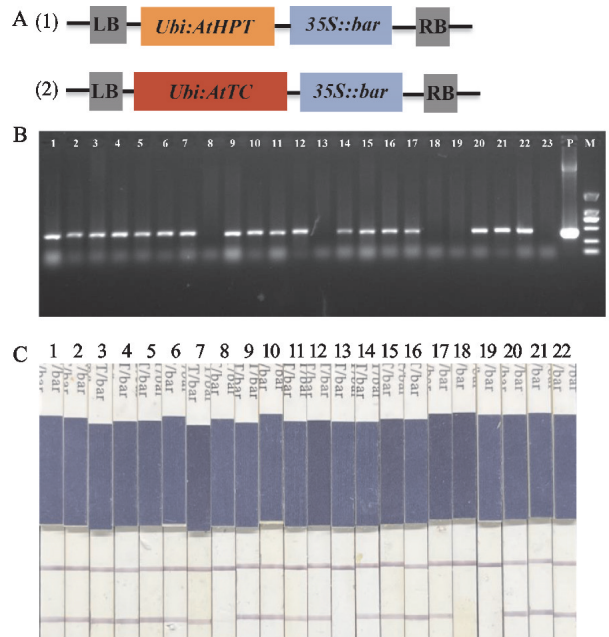
小麦籽粒完全成熟后, 田间调查转基因株系的株高、有效分蘖数、小穗数、穗粒数和穗长。随后每个株系选择 10 株, 测量籽粒的粒长、粒宽和千粒重。利用软件 SPSS 20.0 对调查的各性状进行单因素显著性分析。

2 结果与分析

2.1 过表达 *AtHPT* 和 *AtTC* 转基因植株的获得

将 *Ubi* (*Ubiquitin*) 启动 *AtHPT* 和 *AtTC* 基因表达的双元表达载体 pMWB110-HPT 和 pMWB110-TC (图 1A), 采用农杆菌介导的遗传转

化方法分别转化至小麦幼胚。经过组织培养和筛选, 分别获得了 14 棵转 *AtHPT* 基因植株和 8 棵转 *AtTC* 基因植株, 通过 PCR 和试纸条检测, 最终分别获得了 12 棵转 *AtHPT* 基因的阳性植株 (HPT-1~HPT-12) 和 6 棵转 *AtTC* 基因的阳性植株 (TC-1~TC-6) (图 1B 和图 1C)。



A: 构建 *Ubi* 启动 *AtHPT* 和 *AtTC* 基因过表达载体; B: 转基因植株 PCR 扩增 (1~14: 转 *AtHPT* 基因小麦植株; 15~22: 转 *AtTC* 基因小麦植株; 23: Fielder; P: 阳性质粒; M: 2 000 bp marker); C: 转基因植株试纸条检测 (1~14: 转 *AtHPT* 基因小麦植株; 15~22: 转 *AtTC* 基因小麦植株)。

A: Construction of the overexpression vectors of *AtHPT* and *AtTC* genes; B: Identification of the transgenic plants by PCR (1-14: The transgenic plants of *AtHPT* gene; 15-22: The transgenic plants of *AtTC* gene; 23: Fielder; P: Positive control; M: 2 000 bp marker); C: Identification of the transgenic plants by quickstix test (1-14: The transgenic plants of *AtHPT* gene; 15-22: The transgenic plants of *AtTC* gene).

图 1 *AtHPT* 和 *AtTC* 转基因植株鉴定

Fig. 1 Identification of the transgenic plants of *AtHPT* and *AtTC* genes

2.2 转基因小麦中 *AtHPT* 和 *AtTC* 基因表达量分析

对过表达 *AtHPT* 和 *AtTC* 的转基因小麦植株叶片和籽粒进行定量分析, 结果发现, 虽然 *AtHPT* 基因在 8 个株系 (HPT-2、HPT-3、HPT-5、HPT-6、HPT-7、HPT-8、HPT-11 和 HPT-12) 的叶片中都有表达, 但却只能在 HPT-2、HPT-3、HPT-6、HPT-8 和 HPT-11 的籽粒中检测到, 并且在 HPT-3 和 HPT-8 中表达水平最高 (图 2A~图 2C)。另外, 通过对过表达 *AtTC* 转基因小麦株系进行检测, 发现 TC-1 和 TC-3 的叶片和籽粒中 *AtTC* 基因的表达量较高 (图 2D~图 2F)。

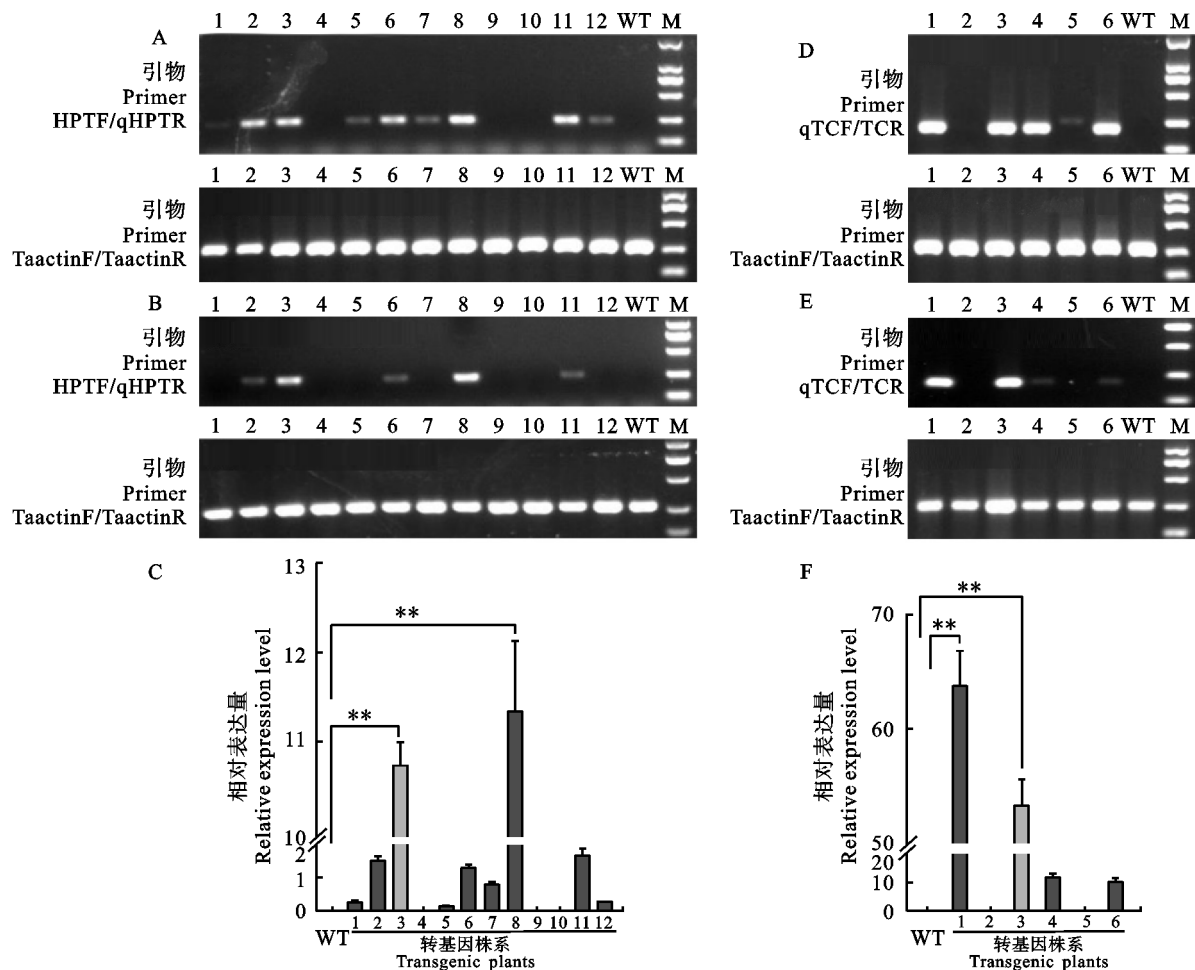


图 2 *AtHPT* 和 *AtTC* 基因在转基因小麦叶片和籽粒中的表达分析

Fig. 2 The expression levels of *AtHPT* and *AtTC* genes in transgenic plants

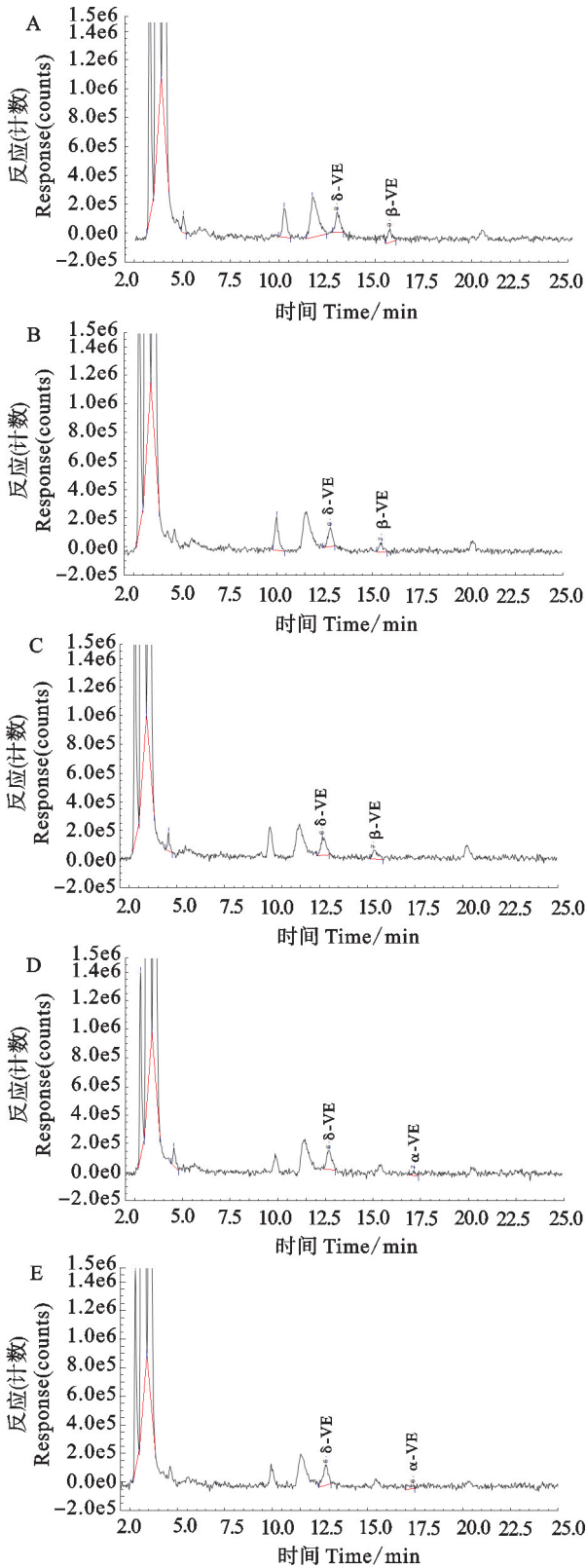
2.3 转基因小麦籽粒中各组生育酚含量分析

选择 *AtHPT* 和 *AtTC* 基因在籽粒中表达量显著提高的株系 HPT-3、HPT-8 及 TC-1、TC-3 进行生育酚含量分析。HPLC 结果显示,在小麦 Fielder 以及转基因小麦 HPT-3、HPT-8、TC-1 和 TC-3 的籽粒中均能检测到 δ -生育酚,差异不显著;而 γ -生育酚在以上株系中均未被检测到;籽粒中 β -生育酚含量在 Fielder 小麦高于转基因小麦株系 HPT-3 和 HPT-8。另外,在转基因小麦株系 TC-1 和 TC-3 的籽粒中虽未检测到 β -生育酚,但 α -生育酚的含量却有显著提高,而在转基因株系 HPT-3 和 HPT-8 以及 Fielder 小麦的籽

粒中均未检测到 α -生育酚(图 3,表 2)。

2.4 转基因小麦农艺性状分析

对过表达 *AtHPT* 的转基因小麦株系 HPT-3 和 HPT-8 后代的农艺性状进行分析,发现其有效分蘖数、株高、穗长、小穗数、穗粒数、粒长、粒宽和千粒重与 Fielder 小麦相比均无显著差异;而过表达 *AtTC* 的转基因小麦 TC-1 和 TC-3 株系的后代在株高、粒长、粒宽和千粒重不变的情况下,与 Fielder 小麦相比显著增加了植株的有效分蘖数、穗长、穗粒数和小穗数(图 4,表 3)。以上实验结果表明,*AtTC* 基因在提高小麦产量方面具有潜在的应用价值。



A~E 分别为 Fielder 和转基因株系 HPT-3、HPT-8、TC-1、TC-3 籽粒。

A~E: Grains from Fielder, HPT-3, HPT-8, TC-1, and TC-3 plants.

图 3 转 *AtHPT* 和 *AtTC* 基因小麦籽粒生育酚含量 HPLC 分析

Fig. 3 Analysis the tocopherol content of transgenic plants of *AtHPT* and *AtTC* genes using HPLC

表 2 野生型和转基因株系籽粒中生育酚含量

Table 2 Tocopherol content in the seeds of wild type and transgenic lines

材料 Material	α -生育酚 α -tocopherol	β -生育酚 β -tocopherol	γ -生育酚 γ -tocopherol	δ -生育酚 δ -tocopherol
Fielder	0	0.41 ± 0.11	0	0.78 ± 0.09
HPT-3	0	0.25 ± 0.02	0	0.66 ± 0.04
HPT-8	0	0.37 ± 0.02	0	0.72 ± 0.06
TC-1	$0.27 \pm 0.02^{**}$	0	0	0.80 ± 0.05
TC-3	$0.40 \pm 0.01^{**}$	0	0	0.83 ± 0.03

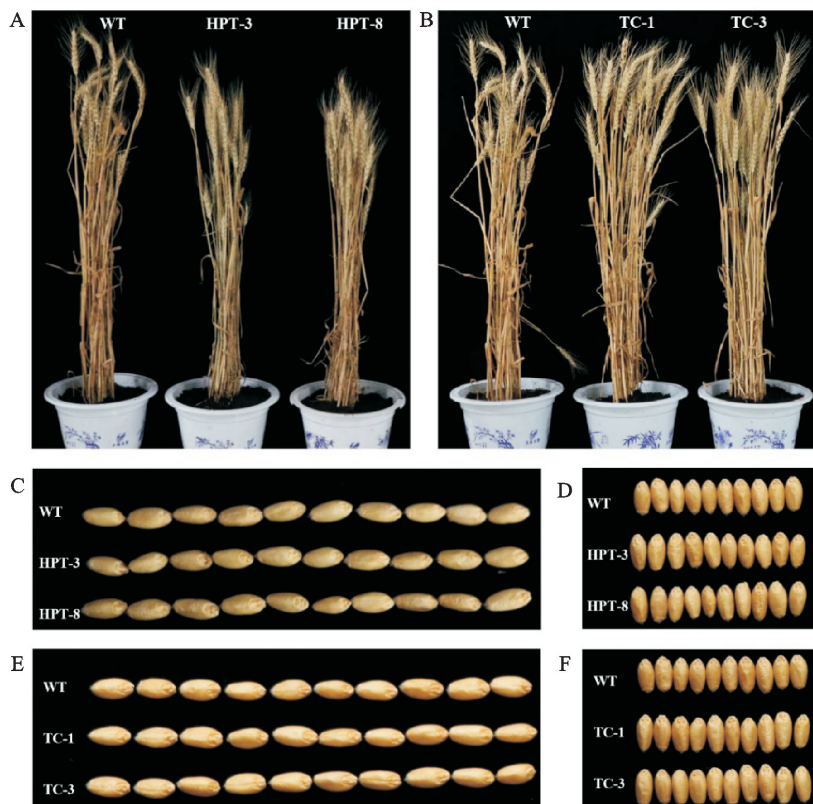
** : HPT-3、HPT-8、TC-1、TC-3 株系与 Fielder 间差异显著。(P<0.01)。表 3 同。

** : Significant difference between the lines HPT-3, HPT-8, TC-1, TC-3 and Fielder(P<0.01). The same in table 3.

3 讨论

微量元素缺乏导致的营养不良是一种世界各地普遍存在的疾病。随着科学技术的发展,在不损害作物农艺价值的情况下,通过代谢工程,在粮食作物的可食用部分赋予有效的遗传性状以提高其重要养分配累,是一种快速、可持续、经济有效的育种方法。研究发现,在拟南芥、烟草、莴苣、甘蓝型油菜和马铃薯中过表达维生素 E 生物合成途径中的关键基因,可以显著提高其维生素 E 含量,改善作物的营养价值^[26]。Sundararajan 等^[23]将拟南芥 *AtHPT* 和 *AtTC* 基因分别转化至烟草,发现过表达 *AtHPT* 和 *AtTC* 的转基因株系中 α -生育酚含量与野生型相比显著增加。Harish 等^[27]在烟草中研究发现,过表达 *AtHPT* 和 *AtTC* 基因能够加速烟草中生育酚合成通路的速率,使 α -生育酚的含量显著提高。本研究利用农杆菌介导的遗传转化方法将 *AtHPT* 和 *AtTC* 基因分别转化至 Fielder 小麦,检测发现过表达 *AtTC* 的转基因小麦籽粒中 α -生育酚的含量与 Fielder 相比显著增加。 α -生育酚作为植物中的一种抗氧化剂,能够与氧化物质发生反应,保护细胞膜免受有害过氧化物的伤害,且 α -生育酚在基因表达调控、信号转导、光同化物质的防御和输出等方面也发挥着重要的作用^[12]。本研究发现,与 Fielder 小麦相比过表达 *AtTC* 的转基因株系后代籽粒中 α -生育酚显著积累。

小麦高产一直是育种家追求的目标之一,穗数、穗粒数、千粒重是决定小麦产量的三个主要因



A:过表达 *AtHPT* 基因小麦植株;B:过表达 *AtTC* 基因小麦植株;C 和 D:过表达 *AtHPT* 基因小麦籽粒;E 和 F:过表达 *AtTC* 基因小麦籽粒。

A: Plant of *AtHPT* overexpression lines; B: Plant of *AtTC* overexpression lines; C, D: Grain of *AtHPT* overexpression lines; E, F: Grain of *AtTC* overexpression lines.

图 4 转基因小麦农艺性状分析

Fig. 4 Analysis of the agronomic traits of *AtHPT* and *AtTC* gene overexpression wheat plants

表 3 野生型和转基因株系主要农艺性状分析

Table 3 Main agronomic traits of wild type and the transgenic lines

材料 Material	千粒重 1 000-kernel weigh/g	粒长 Grain length/mm	粒宽 Grain width/mm	株高 Plant height/cm	穗长 Spike length/cm	分蘖数 Tiller number	小穗数 Spikelet number	穗粒数 Grains per spike
Fielder	34.67±1.02	6.38±0.07	3.02±0.05	95.40±5.50	10.11±0.54	18.00±2.14	17.50±1.50	46.50±7.68
HPT-3	34.32±0.57	6.37±0.03	3.00±0.02	93.00±5.13	10.10±0.83	17.80±0.87	17.40±1.69	48.80±5.49
HPT-8	34.28±0.73	6.34±0.08	3.03±0.09	92.20±5.86	9.97±0.76	18.40±1.62	17.90±1.64	49.00±4.07
TC-1	34.22±0.61	6.36±0.02	2.98±0.03	94.38±3.14	11.26±0.60**	22.40±2.06**	20.00±1.34**	60.20±4.67**
TC-3	34.27±0.63	6.34±0.06	3.02±0.09	94.51±2.62	11.20±0.74**	22.10±2.62**	19.80±1.47**	60.00±3.67**

素^[28]。其中增加每穗小穗数是小麦增产的关键,而小穗数与穗粒数密切相关,因此,在实现小麦增产过程中,小穗数的提高具有重要意义^[29]。另外,小麦穗粒数与穗长密切相关,在小麦后代株系的选育中穗长也是一个备受育种家关注的重要参数之一^[30]。综合本研究结果,过表达 *AtTC* 的转基因后代株系不仅显著提高了小麦籽粒中 α -生育酚的含量,还在不影响小麦株高和成熟期的情

况下显著增加了小麦的穗长、小穗数和穗粒数。因此,*AtTC* 基因在改良小麦营养品质和增加产量方面具有潜在的应用价值。

参考文献:

[1]BEAL T,MASSIOT E,ARSENAULT J E,*et al.* Global trends in dietary micronutrient supplies and estimated prevalence of inadequate intakes [J]. *Public Library of Science One*, 2017,12 (4):e0175554.

- [2] WHITE P J, BROADLEY M R. Biofortifying crops with essential mineral elements [J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(12):586.
- [3] WHITE P J, BROADLEY M R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets; Iron, Zinc, Copper, Calcium, Magnesium, Selenium and Iodine [J]. *New Phytologist*, 2009, 182(1):49.
- [4] DROR D K, ALLEN L H. Vitamin E deficiency in developing countries [J]. *Food and Nutrition Bulletin*, 2011, 32(2):124.
- [5] BAILEY R L, WEST KP JR, BLACK R E. The epidemiology of global micronutrient deficiencies [J]. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 2015, 66(Suppl 2):22.
- [6] CAHOON E B, HALL S E, RIPP K G, et al. Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content [J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(9):1082.
- [7] VENKATESH T V, KARUNANANDAA B, FREE D L, et al. Identification and characterization of an *Arabidopsis* homogentisate phytyltransferase paralog [J]. *Planta*, 2006, 223(6):1134.
- [8] AGGARWAL B B, SUNDARAM C, PRASAD S, et al. Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: Its potential against cancer and other chronic diseases [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2010, 80(11):1613.
- [9] NAQVI S, FARRÉ G, ZHU C, et al. Simultaneous expression of *Arabidopsis* ρ -hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and MPBQ methyltransferase in transgenic corn kernels triples the tocopherol content [J]. *Transgenic Research*, 2011, 20(1):177.
- [10] LIU F Z, GUO A Q, WAN Y S. Cloning and polymorphism analysis of the 2-methyl-6-phytyl-1, 4-benzoquinol methyltransferase gene(VTE3) in *Arachis hypogaea*, *A. duranensis*, and *A. ipaënsis* [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2013, 12(2):1859.
- [11] FUKUZAWA K, TOKUMURA A, OUCHI S, et al. Antioxidant activities of tocopherols on Fe²⁺-ascorbate-induced ascorbate-induced lipid peroxidation in lecithin liposomes [J]. *Lipids*, 1982, 17(7):511.
- [12] TRABER M G, SIES H. Vitamin E in humans: Demand and delivery [J]. *Annual Review of Nutrition*, 1996, 16:321.
- [13] ALBERT E, KIM S, MAGALLANES-LUNDBACK M, et al. Genome-wide association identifies a missing hydrolase for tocopherol synthesis in plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(23):e2113488119.
- [14] MARTINIS J, GLAUSER G, VALIMAREANU S, et al. A chloroplast ABC1-like kinase regulates vitamin E metabolism in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(2):652.
- [15] VIDI P A, KANWISCHER M, BAGINSKY S, et al. Tocopherol cyclase(VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(16):11225.
- [16] LIU X L, HUA X J, GUO J, et al. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing VTE1 for increased tocopherol production from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biotechnology Letters*, 2008, 30(7):1275.
- [17] SCHLEDZ M, SEIDLER A, BEYER P, et al. A novel phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 involved in tocopherol biosynthesis [J]. *FEBS Letters*, 2001, 499(1-2):15.
- [18] COLLAKOVA E, DELLAPENNA D. Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2001, 127(3):1113.
- [19] ESPINOZA A, SAN MARTÍN A, LÓPEZ-CLIMENT M, et al. Engineered drought-induced biosynthesis of α -tocopherol alleviates stress-induced leaf damage in tobacco [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170(14):1285.
- [20] 姜雯珊, 方志红, 陈敏, 等. 紫花苜蓿尿黑酸植基转移酶的克隆、表达分析以及遗传转化研究[J]. 草业学报, 2017, 26(3):82.
- JIANG J S, FANG Z H, CHEN M, et al. Cloning and expression analysis of homogentisate phytyltransferase from *Medicago sativa* and its genetic transformation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2017, 26(3):82.
- [21] KANWISCHER M, PORFIROVA S, BERGMÜLLER E, et al. Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affect tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress [J]. *Plant Physiology*, 2005, 137(2):713.
- [22] SATTTLER S E, CHENG Z G, DELLAPENNA D. From *Arabidopsis* to agriculture: Engineering improved Vitamin E content in soybean [J]. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(8):365.
- [23] SUNDARARAJAN S, RAJENDRAN V, SIVAKUMAR H P, et al. Enhanced vitamin E content in an Indica rice cultivar harbouring two transgenes from *Arabidopsis thaliana* involved in tocopherol biosynthesis pathway [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(6):1083.
- [24] LIU H Y, WANG K, JIA Z M, et al. Efficient induction of haploid plants in wheat by editing of *TaMTL* using an optimized *Agrobacterium*-mediated CRISPR system [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(4):1337.
- [25] WANG K, LIU H Y, DU L P, et al. Generation of marker-free transgenic hexaploid wheat via an *Agrobacterium*-mediated co-transformation strategy in commercial Chinese wheat varieties [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(5):614.
- [26] MÈNE-SAFFRANÉ L, PELLAUD S. Current strategies for vitamin E biofortification of crops [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2017, 44:189.
- [27] HARISH M C, DACHINAMOORTHY P, BALAMURUGAN S, et al. Overexpression of homogentisate phytyltransferase (HPT) and tocopherol cyclase (TC) enhances α -tocopherol content in transgenic tobacco [J]. *Biologia Plantarum*, 2013, 57(2):395.
- [28] 王靖, 李宝强, 李龙, 等. 2019—2020年度国家区试小麦产量与主要农艺性状灰色关联度分析[J]. 陕西农业科学, 2022, 68(1):4.
- WANG J, LI B Q, LI L, et al. Grey correlation degree analysis of wheat yield and main agronomic traits in national regional test from 2019 to 2020 [J]. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 68(1):4.
- [29] RAWSON H M. Spikelet number, its control and relation to yield per ear in wheat [J]. *Australian Journal of Biological Sciences*, 1970, 23(1):1.
- [30] 张安静, 张俊祖, 刘凤琴, 等. 超大穗小麦穗长和小穗数的配合力及遗传模型分析[J]. 麦类作物学报, 2006, 26(4):41.
- ZHANG A J, ZHANG J Z, LIU F Q, et al. Analysis of combining ability and genetic model on spike length and number of spikelets of super large spike wheat [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2006, 26(4):41.