

段玉玲, 朱小雨, 郝婷婷. 原卟啉原Ⅸ氧化酶基因 *PPO2* 过表达赋予水稻对丙炔氟草胺除草剂的耐受性[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(9):1674-1682.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2025.09.002

# 原卟啉原Ⅸ氧化酶基因 *PPO2* 过表达赋予水稻对丙炔氟草胺除草剂的耐受性

段玉玲<sup>1</sup>, 朱小雨<sup>1</sup>, 郝婷婷<sup>2</sup>

(1.扬州大学生物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009; 2.江苏省农业科学院种质资源与生物技术研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 近年来, 稻田抗性杂草的发生日益加剧, 培育抗除草剂水稻新品种, 是高效解决抗性杂草问题的措施之一。原卟啉原Ⅸ氧化酶(*PPO*)是植物生长过程中叶绿素和血红素合成的关键酶之一。据报道, 植物中 *PPO* 存在 2 种异构体, 即质体靶向(*PPO1*)和线粒体靶向(*PPO2*)。本研究以 *PPO2* 基因为研究对象, 通过构建表达载体 pCAMBIA1309-*OsPPO2*, 利用农杆菌介导法将来自镇稻 18 的 *PPO2* 基因导入秀水 134 (作为野生型, 即 WT) 中。通过筛选和鉴定, 成功获得了过表达 *OsPPO2* 的转基因株系 *OsPPO2*-OE。通过除草剂封闭喷施和茎叶喷雾处理, 检测 WT 和 *OsPPO2*-OE 对丙炔氟草胺的抗性。封闭喷施处理结果表明, 过表达 *OsPPO2* 的水稻株系比 WT 对丙炔氟草胺有更好的耐受性, 约为 WT 的 2 倍。茎叶喷雾处理结果显示, 在低浓度除草剂条件下, WT 生长受到了明显抑制, 植株矮化, 而过表达 *OsPPO2* 株系表现出更好的耐受性。双逻辑非线性回归模型分析结果表明, 在丙炔氟草胺处理下, WT 和过表达 *OsPPO2*-OE 株系的鲜重抑制中量 ( $GR_{50}$ ) 分别为 43.17 g/hm<sup>2</sup>, a.i. 和 88.25 g/hm<sup>2</sup>, a.i., 抗性指数 (*RI*) 均为 2.04。此外, 叶绿素含量测定结果显示, 转基因株系与 WT 相比没有显著差异。本研究结果证明了水稻内源基因 *OsPPO2* 在提高水稻耐 *PPO* 类除草剂方面的可行性, 并为未来培育耐除草剂水稻新品种提供了重要的理论依据和实践参考。

**关键词:** 水稻; *OsPPO2*; 过表达; 除草剂抗性

中图分类号: S482.4; S511 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2025)09-1674-09

## Overexpression of protoporphyrinogen IX oxidase gene *PPO2* in rice confers tolerance to the herbicide flumioxazin

DUAN Yuling<sup>1</sup>, ZHU Xiaoyu<sup>1</sup>, HAO Tingting<sup>2</sup>

(1. College of Biological Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Institute of Germplasm Resources and Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** In recent years, the occurrence of resistant weeds in paddy fields has been increasing. Breeding new varieties of herbicide-resistant rice is one of the effective measures to solve the problem of resistant weeds. Protoporphyrinogen

收稿日期: 2025-03-07

基金项目: 农业生物育种国家科技重大专项(2023ZD0406602); 中央引导地方科技发展资金农业科技项目(BE2024001-2)

作者简介: 段玉玲(1998-), 女, 四川内江人, 硕士研究生, 主要从事水稻抗除草剂育种研究。(E-mail) 1121917346@qq.com

通讯作者: 郝婷婷, (E-mail) 17812067912@126.com

IX oxidase (*PPO*) is one of the key enzymes in the synthesis of chlorophyll and heme in plant growth. It was reported that there were two isomers of *PPO* in plants, namely plastid targeted *PPO1* and mitochondrial targeted *PPO2*. In this study, the *PPO2* gene was taken as the research object. An expression vector pCAMBIA1309-*OsP*

*PPO2* was constructed, and the *PPO2* gene from Zhendao 18 was introduced into Xiushui 134 (WT) by *Agrobacterium*-mediated transformation. Through screening and identification, transgenic lines overexpressing *OsPPO2* (*OsPPO2*-OE) were successfully obtained. The resistance of WT and *OsPPO2*-OE lines to flumioxazin was evaluated through herbicide application via soil pre-emergence (closed spray) and foliar post-emergence treatments. The results of pre-emergence treatment showed that the rice lines overexpressing *OsPPO2* had better tolerance to flumioxazin than WT, the tolerance was about twice that of WT. The results of post-emergence treatment showed that under low herbicide concentration conditions, the growth of WT was significantly inhibited, with dwarfing of plants, while the transgenic lines overexpressing *OsPPO2* exhibited better tolerance. The results of double logistic nonlinear regression model analysis showed that under flumioxazin treatment, the 50% fresh weight reduction ( $GR_{50}$ ) values for WT and the transgenic line overexpressing *OsPPO2*-OE were 43.17 g/hm<sup>2</sup>, a.i. and 88.25 g/hm<sup>2</sup>, a.i., respectively, with a resistance index (*RI*) of 2.04. In addition, the chlorophyll content determination results showed no significant difference between the transgenic lines and WT. This study has demonstrated the feasibility of improving rice tolerance to *PPO* herbicides by overexpressing the endogenous *OsPPO2* gene in rice and has provided important theoretical basis and practical reference for the future development of herbicide-tolerant rice varieties.

**Key words:** rice; *OsPPO2*; overexpression; herbicide resistance

水稻 (*Oryza sativa* L.) 作为中国三大粮食作物之一,在国民经济中占有举足轻重的地位。随着中国人口增长和居民消费水平升级,人们对稻米的需求量和食用品质要求持续提高。然而,在全球范围内,杂草危害导致水稻产量和品质下降的问题日益严重。杂草通过与农作物竞争营养、光照、空间和水分,严重影响作物的生长,降低作物产量和农产品质量<sup>[1]</sup>。研究表明,在水稻、玉米、大豆等常见农作物中,杂草的影响导致作物平均产量损失达 60%~70%<sup>[2]</sup>。因此,解决稻田杂草危害问题已成为当务之急。目前主要采取以生物控草为辅、化学防除为主的综合防治措施。其中,化学除草剂因其高效快捷的特点成为主要手段。然而,随着除草剂用量的增加,杂草抗性日益突出<sup>[3-4]</sup>,增加了杂草防治的难度。培育具有抗除草剂特性的水稻品种,成为应对稻田杂草危害和减缓杂草抗性问题的有效策略。

原卟啉原氧化酶 (*PPO*) 是四吡咯生物合成途径中的一种通用酶,是叶绿素和血红素合成途径的关键酶<sup>[5]</sup>,在分子氧存在的条件下催化原卟啉原IX生成原卟啉IX<sup>[6]</sup>。*PPO* 在动物、植物及微生物中广泛存在,具有重要生物功能<sup>[7]</sup>。Sassa 等<sup>[8]</sup>研究发现,当人类的卟啉原活性降低时会引起多种卟啉病;Boynton 等<sup>[9]</sup>在大肠杆菌中敲除 *PPO* 同源 *hemG* 基因,结果导致大肠杆菌生长受到抑制。对于绿色植物来说,*PPO* 活性被抑制会导致植物光合作用受阻,最终导致植物干枯、卷曲、死亡<sup>[10]</sup>。由于这一特

性,*PPO* 被用作常用的除草剂靶标位点之一,而对应的除草剂也被称为光漂白除草剂或过氧化物除草剂<sup>[11]</sup>。*PPO* 类除草剂被广泛应用于单子叶和双子叶杂草防治,在低浓度下有效,对哺乳动物低毒,且对环境安全友好<sup>[12]</sup>。针对该靶标位点,目前已经开发出二苯醚 (DPE) 类除草剂、*N*-苯基酞酰亚胺类除草剂、噁二唑酮类除草剂和噻二唑酮类除草剂等<sup>[13]</sup>。DPE 类除草剂主要为早期 *PPO* 抑制剂,如乙氧氟草醚、三氟羧草醚和氰氟草酯等;*N*-苯基酞酰亚胺类除草剂包括氟胺草酯、丙炔噁草酮和丙炔氟草胺等;噁二唑酮类除草剂有噁草酮;噻二唑酮类除草剂有氟噻乙草酯和噻二唑草胺。在这些 *PPO* 抑制剂中,乙氧氟草醚、氟胺草酯、噁草酮与丙炔噁草酮在中国已使用多年。其中,丙炔氟草胺是 *N*-苯基酞酰亚胺类中一种活性很强的触杀型选择性除草剂<sup>[14]</sup>,广泛用于小麦、玉米、棉花和水稻等大田作物杂草防治,主要防除一年生阔叶杂草和部分禾本科杂草,具有用量少、效果好的特点。

在 21 世纪初,编码 *PPO* 的基因已从细菌、人类和植物中被成功克隆,用于开发转基因作物,如水稻、玉米和番茄等<sup>[15-17]</sup>。目前,众多植物如拟南芥、菠菜、烟草 (*Nicotiana tabacum*) 等 *PPO* 原生基因已被鉴定<sup>[15,17-19]</sup>。原卟啉原IX氧化酶最初分别在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中被鉴定,其编码基因分别命名为 *hemG* 和 *hemY*<sup>[20-21]</sup>。此后,拟南芥、烟草和菠菜中的 *PPO* 基因通过在大肠杆菌 *hemG* 突变体中的功能互补试验被成功分离和鉴定<sup>[19]</sup>。近年来,*PPO*

基因的克隆与功能研究为抗除草剂作物品种育种提供了新思路。Warabi 等<sup>[22]</sup>在大豆细胞系中增加线粒体 *PPO* 活性使大豆产生了对氧氟芬的抗性。Ha 等<sup>[23]</sup>研究发现过表达枯草芽孢杆菌 *PPO* 基因的转基因水稻也对氧氟芬具有抗性。据报道,将拟南芥、人、黄杆菌和黄黏球菌的 *PPO* 基因导入水稻后,也对氧氟芬产生抗性<sup>[24-27]</sup>。然而, Jung 等<sup>[28]</sup>研究发现,导入人类 *PPO* 基因的水稻株系虽表现出除草剂抗性,但出现了严重的叶斑和生长迟缓现象。这种负面表型可能源于异源 *PPO* 基因过表达,使原卟啉 IX (Proto IX) 水平升高,进而引发强烈的光动力反应,导致 Proto IX 蛋白积累以及对活性氧解毒能力的不足,最终引起细胞死亡。相比之下, Liu 等<sup>[29]</sup>发现,过表达 *OsPPO1* 基因水稻对氧氟芬具有高度抗性,并且对植株生长和产量无显著负面影响。但是当 *OsPPO1* 基因发生缺失突变时,会导致水稻坏死病变。此外,研究结果表明,*PPO1* 基因缺失会导致拟南芥植株死亡,而 *PPO2* 基因缺失则无致死效应,这表明,尽管 *PPO1* 和 *PPO2* 在功能上具有相似性,但它们在植物生长发育过程中分别承担着独特的生物学作用。

迄今为止,仅有单子叶植物 *PPO1* 基因突变的报道,而针对 *PPO2* 基因的研究相对较少,尤其是关于其在水稻中的功能及其在对除草剂抗性中的应用潜力鲜见报道。目前的研究主要集中于利用异源基因构建 *PPO* 过表达材料,以提高植物对除草剂的耐受性,而针对内源基因过表达后的作用机理方面的研究很少。本研究拟以水稻品种秀水 134 为初始材料,利用农杆菌介导法将镇稻 18 的内源 *OsPPO2* 基因导入秀水 134 中,利用丙炔氟草胺对过表达材料进行抗性筛选,获得能够稳定遗传且具有 *PPO* 除草剂抗性的转基因植株,并对其抗性作用机理进行初步探究。本研究结果旨在为抗 *PPO* 抑制剂类除草剂的水稻种质资源创新研究提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本研究以水稻品种秀水 134 为受体材料(作为野生型,即 WT),用于遗传转化试验。同时,利用镇稻 18 扩增 *OsPPO2* 基因的 cDNA 序列。通过农杆菌介导的遗传转化方法,成功获得了 *OsPPO2* 基因过表达的水稻阳性植株,命名为 *OsPPO2-OE*。以上

材料均由本实验室保存。

本研究所用除草剂为丙炔氟草胺,购自四川利尔作物科学有限公司,推荐剂量为 120~180 g/hm<sup>2</sup>,有效成分含量为 51%。本研究使用剂量为 120 g/hm<sup>2</sup>。

高保真 DNA 聚合酶、HiScript II Q RT SuperMix for qPCR 试剂盒、农杆菌 EHA105、大肠杆菌感受态 DH5 $\alpha$ 、ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit、RNA 提取试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;B-96 型梯度 PCR 仪购自杭州博日科技股份有限公司;HPD-2102C 恒温摇床购自常州市华普达有限公司;DYY-11 电泳仪购自北京六一生物科技有限公司;Spark 多功能酶标仪购自瑞士 Tecan 有限公司。其他化学试剂均为实验室常用试剂。基因测序及引物合成由南京擎科生物科技有限公司完成。

### 1.2 过表达材料的构建及筛选

1.2.1 过表达材料的构建 以镇稻 18 的 cDNA 为模板,设计引物 *OsPPO2-F*:5'-TTACTTCTGCACTAG-GTACCATGCTCTCTCCTGCCACCAC-3'; *OsPPO2-R*:5'-CTTAGAATTCCCGGGGATCCCTAATTGCTCTGA-TCTGTGCAAGATTCAAG-3',使用超高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增反应。通过琼脂糖凝胶电泳验证,对符合要求的条带进行回收纯化,获得 *OsPPO2* 基因扩增产物。将纯化产物利用一步法克隆试剂盒进行无缝克隆反应,连接至 pCambia1309 载体中,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,挑取单克隆进行 PCR 验证,筛选阳性克隆,送南京擎科生物科技有限公司进行测序鉴定。然后利用农杆菌介导法将 *OsPPO2* 基因导入水稻愈伤组织中,待出苗后,进行鉴定。

1.2.2 阳性植株的筛选 设计特异性扩增引物 1309Ubi-F/1309NosT-R,引物序列如下 1309Ubi-F:5'-CGGTTCGTTTCATTTCGTTCTAG-3'; 1309NosT-R:5'-AATTCCTGATCTAGTAACATAG-3'。采用十六烷基三甲基溴化铵法(CTAB)<sup>[30]</sup>提取水稻总 DNA,利用 1309Ubi-F/1309NosT-R 对过表达 *OsPPO2-OE* 和 WT 植株的 DNA 进行聚合酶链式反应(PCR)。利用琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行分析,确认目标条带的大小是否符合预期,并进行测序,据此获得阳性植株。

1.2.3 植株 *PPO2* 基因表达水平分析 取三叶期水稻幼苗叶片,用液氮迅速冷冻处理,使用诺唯赞的 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。WT 和 *OsPPO2-OE*

每种样本均取 3 份独立样本,并进行 3 次技术重复,以确保试验结果的可靠性。提取的 RNA 经 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR 试剂盒反转录生成 cDNA 后,利用实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)分别对 WT 和 *OsPPO2*-OE 中的 *PPO2* 基因表达水平进行检测,以水稻泛素基因(*OsUBQ*)作为内参基因,对应内参扩增引物为 *OsUBQ*-F\_YH:5'-GCTCCGTGCGG-TATCAT-3';*OsUBQ*-R\_YH:5'-CGGCAGTTGACAGCCC-TAG-3'。*PPO2* 特异性扩增引物为 *PPO2*-F2:5'-TGTTTCAGATCGAGCTCCT-3';*PPO2*-R2:5'-TGTCCC-TCAACACCCAAGAG-3'。

### 1.3 *OsPPO2*-OE 对丙炔氟草胺的抗性鉴定

1.3.1 种子萌发试验 参考 Lee 等<sup>[25]</sup>的方法,在 1/2 MS 培养基中添加不同浓度的丙炔氟草胺用于筛选抗性转基因株系。选取秀水 134(WT)和过表达株系(*OsPPO2*-OE)均匀饱满的种子,去壳后,采用 75%乙醇和次氯酸钠溶液进行消毒,并点播于添加了不同浓度丙炔氟草胺的 1/2 MS 培养基上,培养基中丙炔氟草胺浓度分别为 0 nmol/L、10 nmol/L、20 nmol/L、40 nmol/L、80 nmol/L、160 nmol/L,每个处理重复 3 次,7 d 后观察种子的萌发情况。

1.3.2 *OsPPO2*-OE 对丙炔氟草胺抗性水平的鉴定 依据《农药室内生物测定试验准则 除草剂 第 4 部分:活性测定试验 茎叶喷雾法》(NY/T 1155.4-2006)<sup>[31]</sup>,测定 WT 和 *OsPPO2*-OE 对丙炔氟草胺的抗性水平。取 WT 和 *OsPPO2*-OE 种子催芽萌发后,播种于盛有基质营养土的 250 mL 一次性塑料杯中。待生长至三叶期时,选取生长状态相似的植株幼苗,采用茎叶喷雾的方式,分别使用不同浓度的丙炔氟草胺对 WT 和 *OsPPO2*-OE 进行处理。处理浓度分别为推荐剂量的 0 倍、0.25 倍、0.50 倍、1.00 倍、2.00 倍、4.00 倍、8.00 倍,即 0 g/hm<sup>2</sup>, a.i.、15.3 g/hm<sup>2</sup>, a.i.、30.6 g/hm<sup>2</sup>, a.i.、61.2 g/hm<sup>2</sup>, a.i.、122.4 g/hm<sup>2</sup>, a.i.、244.8 g/hm<sup>2</sup>, a.i.、489.6 g/hm<sup>2</sup>, a.i., 每个处理设 3 个重复。于茎叶喷雾处理 21 d 后观察植株表型,对其地上部株高进行测量,计算株高抑制率,计算方法见公式(1);并称取地上部鲜重,计算各品种的鲜重抑制率,计算方法见公式(2):

$$\text{株高抑制率} = \frac{\text{对照组株高} - \text{处理组株高}}{\text{对照组株高}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{鲜重抑制率} = \frac{\text{对照组鲜重} - \text{处理组鲜重}}{\text{对照组鲜重}} \times 100\% \quad (2)$$

根据鲜重抑制率计算结果,采用 SigmaPlot 4.0 进行数据分析,用 Logistic 方程拟合不同处理下过表达株系和野生型水稻除草剂剂量与鲜重抑制率的关系,进行鲜重抑制中量( $GR_{50}$ )的计算;根据计算出的  $GR_{50}$ ,按公式(3)计算抗性指数(RI)。

$$RI = \frac{\text{抗性种群 } GR_{50}}{\text{敏感种群 } GR_{50}} \quad (3)$$

### 1.4 叶绿素含量的测定

采用丙酮乙醇混合液法<sup>[32]</sup>对 WT 和 *OsPPO2*-OE 的叶绿素含量进行测定。待获得的过表达植株和野生型植株种子萌发,露白时种于穴盘中,在水稻幼苗期取样测定叶绿素含量。首先称取 0.1 g 发芽 14 d 后的新鲜水稻叶片,清除叶脉,剪碎成细丝状放入离心管中,向 50 mL 离心管中加入 20 mL 丙酮、无水乙醇和水(4.5:4.5:1.0,体积比)的混合液,盖紧摇匀,混合液避光处理 24 h。至混合液中水稻叶片丝呈白色,将叶绿素提取液加入比色皿中,以丙酮乙醇混合液为空白对照,分别在波长 663 nm 和 645 nm 处测定吸光度,设置 3 次重复,计算叶绿素含量。根据 Arnon<sup>[33]</sup>的方法计算叶绿素含量(mg/g):

$$\text{叶绿素 a 含量} = (12.70 \times D_{663} - 2.59 \times D_{645}) \times V/W \quad (4)$$

$$\text{叶绿素 b 含量} = (22.90 \times D_{645} - 4.68 \times D_{663}) \times V/W \quad (5)$$

$$\text{叶绿素总含量} = (20.29 \times D_{645} + 8.04 \times D_{663}) \times V/W \quad (6)$$

式中, $D_{663}$ 、 $D_{645}$ 分别为 663 nm 和 645 nm 波长下的吸光值, $V$ 为提取液的体积(mL), $W$ 为叶片重量(mg)。

### 1.5 数据处理与分析

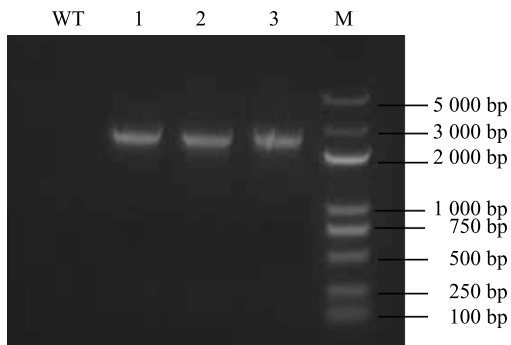
使用 Microsoft Excel 2016 进行水稻数据处理及图表制作。通过 Logistic 方程拟合不同处理条件下野生型和突变体水稻的除草剂剂量与鲜重抑制率之间的关系,计算鲜重抑制中量和抗性指数。

## 2 结果与分析

### 2.1 过表达材料的获取

本研究成功克隆了镇稻 18 的 *PPO2* 基因,并

构建了含有镇稻 18 的 *PPO2* 基因的重组载体 pCAMBIA1309-*OsPPO2*。通过 PCR 技术从镇稻 18 基因组中扩增出 *PPO2* 基因,将其与 pCAMBIA1309 载体进行连接,并将连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞后,经抗生素筛选和菌落 PCR 鉴定,筛选出阳性克隆,并进行测序。根据测序结果选择正确的阳性菌株提取质粒,将质粒转入 EHA105 农杆菌感受态细胞,并通过农杆菌介导法将重组载体导入 WT 的愈伤组织中,待出苗后,鉴定并获得目的条带大小为 2 500 bp 的阳性植株,野生型植株没有明显条带(图 1)。



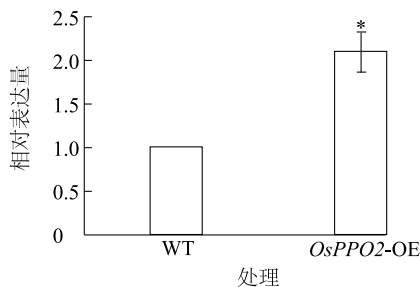
1,2,3 为过表达 *OsPPO2*-OE, WT 为野生型植株(秀水 134), M 为 DNA marker。

图 1 部分阳性植株鉴定结果

Fig.1 Identification results of partially positive plants

## 2.2 植株 *PPO2* 基因相对表达水平分析

实时荧光定量 PCR 结果显示,过表达株系中 *OsPPO2* 基因的表达水平显著高于野生型对照, *OsPPO2*-OE 的 *PPO2* 基因相对表达量为 WT 的 2.1 倍(图 2)。



WT 为野生型植株(秀水 134), *OsPPO2*-OE 为过表达株系; \* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 2 *OsPPO2* 基因过表达水稻的相对表达量

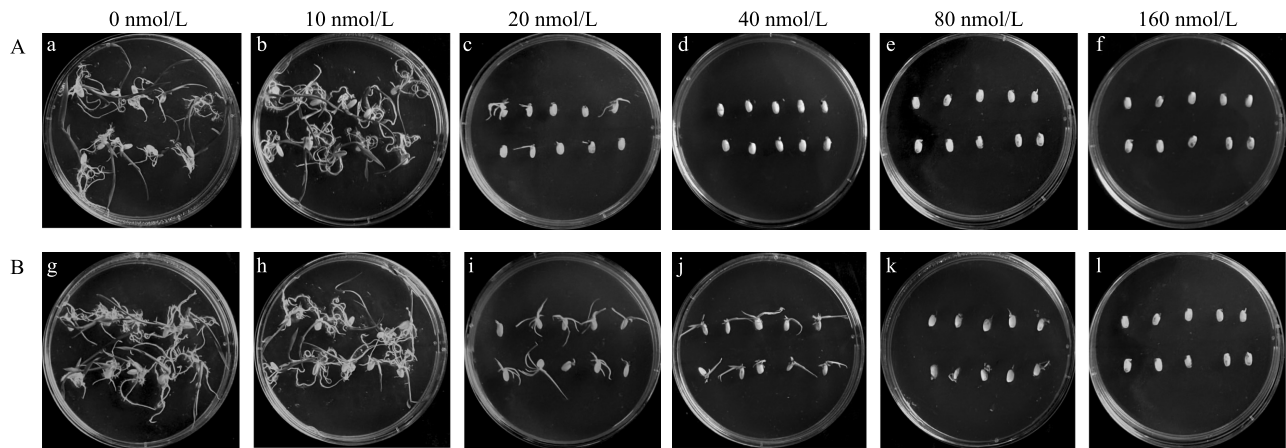
Fig.2 Relative expression in *OsPPO2* gene overexpressing rice

## 2.3 *OsPPO2*-OE 对丙炔氟草胺抗性的鉴定

2.3.1 种子萌发试验 本研究通过培养基用药萌发试验评估了野生型 WT 和过表达 *OsPPO2*-OE 水稻种子对丙炔氟草胺的耐受性。结果(图 3)表明,当丙炔氟草胺浓度为 0~10 nmol/L 时,WT 和 *OsPPO2*-OE 种子均能正常萌发,萌发率及芽长无明显差异(图 3a、图 3b、图 3g、图 3h);当丙炔氟草胺浓度增加至 20 nmol/L 时(图 3c、图 3i),WT 萌发率下降至 60%,而 *OsPPO2*-OE 种子仍能全部萌发,但生长受到了抑制,芽长明显变短;当丙炔氟草胺浓度提高至 40 nmol/L 时(图 3d、图 3j),WT 种子全部死亡,而 *OsPPO2*-OE 种子仍能正常萌发,表现出良好的耐受性。当丙炔氟草胺浓度提高至 160 nmol/L 时(图 3g、图 3l),*OsPPO2*-OE 种子全部死亡,此时 WT 和 *OsPPO2*-OE 种子胚芽处呈褐色,表现出明显的药害症状。在相同的丙炔氟草胺浓度下,*OsPPO2*-OE 比 WT 表现出更好的耐受性,耐受性约为 WT 的 2 倍。

2.3.2 *OsPPO2*-OE 对丙炔氟草胺抗性水平的鉴定 图 4 显示,当丙炔氟草胺用量为 0~30.6 g/hm<sup>2</sup>, a.i. 时,茎叶喷雾 21 d 后,WT 和 *OsPPO2*-OE 植株均可正常生长(图 4A、图 4B),随着丙炔氟草胺用量加大,植株的株高受到了不同程度的抑制;用量增加至 61.2 g/hm<sup>2</sup>, a.i. 时,即推荐剂量时,WT 植株受到明显抑制,株高抑制率达 35.00%(图 4C),而此用量下 *OsPPO2*-OE 植株矮化的并不明显,株高抑制率为 20.14%(图 4C);当丙炔氟草胺用量达到 122.4 g/hm<sup>2</sup>, a.i. 时,WT 部分植株发黄枯萎,无法正常生长,而过表达株系生长情况明显好于野生型。当丙炔氟草胺用量为 244.8 g/hm<sup>2</sup>, a.i. 时,野生型植株全部枯萎死亡,此时 *OsPPO2*-OE 植株受到明显抑制,但仍呈现出绿色;当用量为 489.6 g/hm<sup>2</sup>, a.i. 时, *OsPPO2*-OE 植株全部枯萎死亡。

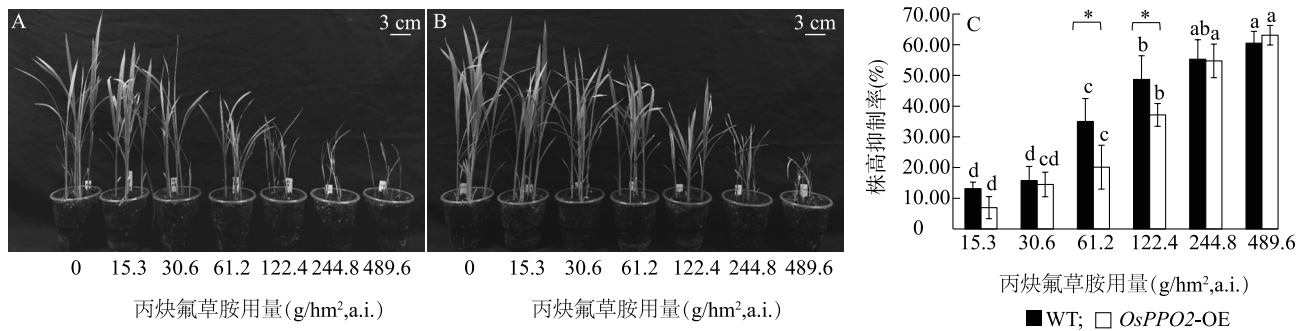
称量各处理浓度下 WT 与 *OsPPO2*-OE 植株地上部鲜重,结果(图 5)显示,在低浓度丙炔氟草胺处理下,WT 植株鲜重已经受到抑制,且随着除草剂浓度的增加所受到的抑制越明显,直至植株死亡;而 *OsPPO2*-OE 植株在低浓度丙炔氟草胺处理下,植株鲜重并未受到明显抑制。利用双逻辑非线性回归模型计算出丙炔氟草胺处理下 WT 和 *OsPPO2*-OE 的鲜重抑制中量 ( $GR_{50}$ ),结果(表 1)显示,WT 的  $GR_{50}$  值为 43.17 g/hm<sup>2</sup>, a.i., *OsPPO2*-OE 的  $GR_{50}$  值为 88.25 g/hm<sup>2</sup>, a.i., 抗性指数 (RI) 为 2.04。



A: WT 种子在不同丙炔氟草胺浓度下的出芽情况; B: *OsPPO2*-OE 在不同丙炔氟草胺浓度下的出芽情况。WT 为野生型植株(秀水 134), *OsPPO2*-OE 为过表达株系。

图3 *OsPPO2* 过表达植株对丙炔氟草胺抗性的测定

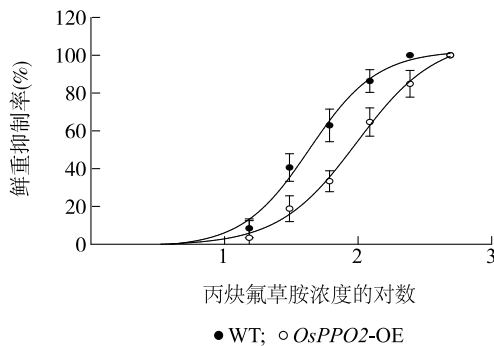
Fig.3 Determination of resistance of overexpressing *OsPPO2* plant to flumioxazin



A: WT 处理 21 d 后的表型; B: *OsPPO2*-OE 处理 21 d 后的表型; C: WT 与 *OsPPO2*-OE 处理 21 d 的株高抑制率。WT 为野生型植株(秀水 134), *OsPPO2*-OE 为过表达株系。\* 表示 WT 和 *OsPPO2*-OE 差异显著( $P < 0.05$ )。不用小写字母表示处理间差异显著( $P < 0.05$ )。

图4 *OsPPO2*-OE 对丙炔氟草胺抗性水平的分析

Fig.4 Resistance level analysis of *OsPPO2*-OE to flumioxazin



WT 为野生型株系, *OsPPO2*-OE 为过表达株系。

图5 植株丙炔氟草胺剂量-反应曲线

Fig.5 The dose-response curve of plants to flumioxazin

表1 *OsPPO2*-OE 对丙炔氟草胺的抗性水平

Table 1 Resistance level of *OsPPO2*-OE to flumioxazin

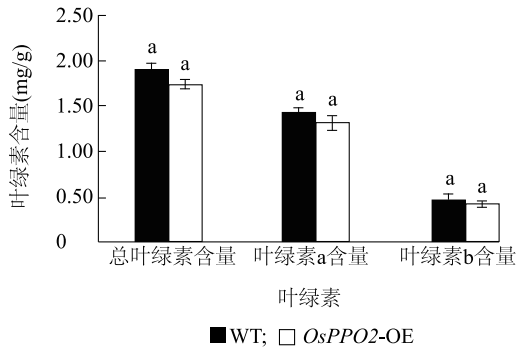
种群	生物型	鲜重抑制中量 (g/hm <sup>2</sup> , a.i.)	相关系数 (r)	抗性指数
WT	敏感种	43.17±2.78	0.997 3	
<i>OsPPO2</i> -OE	抗性种群	88.25±5.45	0.999 0	2.04

WT 为野生型植株(秀水 134), *OsPPO2*-OE 为过表达株系。

#### 2.4 *OsPPO2* 过表达材料叶绿素含量分析

在本试验中,采用有机溶剂提取法,从磨碎的叶片中提取叶绿素,并利用酶标仪在特定波长下测定吸光值。通过计算得出,WT 的总叶绿素含量为 1.89 mg/g,其中叶绿素 a 含量为 1.43 mg/g,叶绿素

b 含量为 0.46 mg/g, 而 *OsPPO2*-OE 总叶绿素含量为 1.74 mg/g, 其中叶绿素 a 含量为 1.32 mg/g, 叶绿素 b 含量为 0.42 mg/g (图 6)。差异显著性分析结果表明, *OsPPO2*-OE 总叶绿素含量、叶绿素 a 含量、叶绿素 b 含量与野生型没有显著差异。说明, WT 植株, 即秀水 134 在插入镇稻 18 的 *OsPPO2* 基因后, 并未对其叶绿素含量造成明显的影响。



WT 为野生型植株 (秀水 134), *OsPPO2*-OE 为过表达株系。相同小写字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

图 6 野生型和突变体株系叶绿素含量

Fig.6 Chlorophyll content of wild type and mutant strains

### 3 讨论

原卟啉原 IX 氧化酶 (*PPO*) 作为生物体内一种关键的代谢酶, 在植物叶绿素生物合成和光合作用中发挥着重要作用, 其功能异常可能导致植物死亡<sup>[34]</sup>。因此, *PPO* 作为一种关键的酶, 已成为除草剂研发和抗除草剂作物培育中的重要靶点。然而, 长期依赖和过度使用 *PPO* 抑制剂类除草剂会导致杂草出现抗药性。截至 2015 年, 6 种双子叶植物已对乙氧氟草醚产生抗性<sup>[35]</sup>。根据国际抗除草剂杂草协会的报告, 目前已有 13 种杂草对 *PPO* 抑制剂类除草剂表现出抗药性。与其他类型除草剂相比, *PPO* 抑制剂类除草剂的抗性虽然尚未达到普遍程度, 但其潜在威胁不容忽视<sup>[36]</sup>。杂草抗性的产生不仅增加了杂草防除的难度和生产成本, 对作物的生长也造成了威胁。随着开发新型除草剂越来越困难, 培育具备除草剂抗性的水稻品种, 扩大其配套除草剂的应用范围, 也是解决杂草抗性问题的措施之一。丙炔氟草胺属于 *N*-苯基酰胺亚胺类除草剂, 主要用于大豆田、花生田中, 目前未在水稻上登记使用。本研究以秀水 134 为试验材料, 通过过表达水

稻 *PPO2* 基因, 构建了对丙炔氟草胺具有抗性的水稻 *OsPPO2*-OE, 为丙炔氟草胺在水稻上的使用及抗除草剂水稻育种提供了一定的理论依据。

针对植物产生除草剂抗性的现象, 科学家通过对抗性机理的研究, 将其分为靶点抗性 (TSR) 和非靶点抗性 (NTSR)<sup>[37-38]</sup>。NTSR 机制包括减少除草剂的吸收和转运、增加除草剂的螯合, 以及增强对除草剂降解或其代谢为毒性较小的化合物<sup>[39]</sup>。20 世纪末 Lermontova 等<sup>[40]</sup> 和 Lee 等<sup>[41]</sup> 分别将枯草芽孢杆菌 *PPO* 基因和拟南芥 *PPO1* 基因导入烟草中进行过表达, 分别产生了对 DPE 除草剂氧氟芬和乙酰氧氟芬的抗性。21 世纪初, 科学家将人体 *PPO* 导入水稻基因中, 使水稻对乙氧氟草醚产生抗性<sup>[42]</sup>。本研究构建了 *PPO2* 基因过表达载体, 并将其转入水稻中, 使其对丙炔氟草胺产生抗性。由此可以看出, 无论是对 *PPO1* 还是对 *PPO2* 基因进行过表达, 均可使植株产生抗性。*PPO2* 基因过表达显著增强了水稻对 *PPO* 抑制剂的耐受性, 这主要是通过增加 *PPO* 的表达量, 加速原卟啉原 IX 的氧化, 从而减少其在细胞内的积累, 避免光毒性反应的发生<sup>[43]</sup>。这表明 *PPO2* 基因的过表达为植物提供了代谢冗余, 使其在除草剂胁迫下仍能维持正常的生理功能。此外, Yun 等<sup>[44]</sup> 发现 *PPO2* 过表达的转基因植物在干旱胁迫下表现出更好的生长状态, 这表明 *PPO2* 可能在植物的逆境响应中发挥重要作用。

在对 *OsPPO2* 过表达 (*OsPPO2*-OE) 株系和野生型植物叶绿素含量进行比较时, 发现两者之间叶绿素含量无显著差异。这表明, *OsPPO2* 基因过表达并未对叶片中叶绿素的合成或积累造成明显影响。这一结果与 Lermontova 等<sup>[40]</sup> 的研究结果一致。他们将一个编码拟南芥质体原卟啉原氧化酶的基因引入烟草进行过表达, 结果显示, 过量 *PPO* 活性并没有显著提高原卟啉 IX 的合成量, 也没有造成叶绿素含量的增加。叶绿素合成是一个复杂的酶促反应过程, 涉及多个酶的协同作用及多个基因的调控。*PPO* 虽在这一过程起着关键催化作用, 但是若底物中原卟啉 IX 没有增加, 过表达则不影响植物的生化反应, 叶绿素含量也不会产生显著变化。

尽管本研究取得了相应的成果, 但仍存在一些局限性。首先, 试验中仅测试了丙炔氟草胺一种除草剂, 其他 *PPO* 抑制剂类除草剂的效果尚需进一步验证。其次, 虽然转基因植株在实验室条件下表现

出良好的耐受性,但在田间环境中的长期表现仍需进一步研究。此外,*PPO2* 基因过表达对植物其他生理过程的影响仍需深入研究,以确保其在实际应用中的安全性和有效性。未来的研究可以进一步探索 *PPO2* 基因在不同环境条件下的表达调控机制,以及其在植物逆境响应中的具体作用。此外,可以在田间条件下对转基因水稻进行长期种植试验,以评估其在实际农业生产中的应用潜力。同时,可以考虑通过基因编辑技术进一步优化 *PPO2* 基因的表达,以提高其在不同环境条件下的稳定性和耐受性。

## 4 结论

本研究以水稻品种秀水 134 为受体材料,利用农杆菌介导的遗传转化技术,成功将镇稻 18 中的内源 *OsPPO2* 基因导入水稻基因组中,并通过丙炔氟草胺筛选获得了具有稳定遗传性的除草剂抗性植株 (*OsPPO2*-OE)。抗性测试结果表明,*OsPPO2*-OE 株系对 *PPO* 除草剂的耐受性显著增强,其抗性水平约为野生型的 2 倍。进一步的 qPCR 分析结果显示,*OsPPO2* 基因在过表达株系中的相对表达量是野生型的 2 倍,表明 *OsPPO2* 基因的过表达是植株获得除草剂抗性的关键因素。此外,叶绿素含量测定结果表明,过表达株系与野生型的叶绿素含量无显著差异,说明 *OsPPO2* 基因的过表达并未对植株的光合作用产生负面影响。这些结果表明,通过过表达 *OsPPO2* 基因,可以有效提高水稻对 *PPO* 抑制剂类除草剂的耐受性,同时保持植株的正常生长发育。本研究结果为培育抗 *PPO* 抑制剂类除草剂的水稻品种提供了关键的技术手段和理论支持,为农业生产中的杂草防治提供了新的策略。

## 参考文献:

- [1] CHAUHAN B S, OPENA J. Effect of tillage systems and herbicides on weed emergence, weed growth, and grain yield in dry-seeded rice systems[J]. *Field Crops Research*, 2012, 137: 56-69.
- [2] HASAN M, AHMAD-HAMDANI M S, ROSLI A M, et al. Bioherbicides: an eco-friendly tool for sustainable weed management[J]. *Plants*, 2021, 10(6): 1212.
- [3] DAYAN F E. Current status and future prospects in herbicide discovery[J]. *Plants*, 2019, 8(9): 341.
- [4] MATZRAFI M, PELEG Z, RAN L T. Herbicide resistance in weed management[J]. *Agronomy*, 2021, 11(2): 280.
- [5] BEALE S I, WEINSTEIN J D. Biochemistry and regulation of photosynthetic pigment formation in plants and algae[J]. *New Comprehensive Biochemistry*, 1991, 19: 155-235.
- [6] KOCH M, BREITHAUPT C, KIEFERSAUER R, et al. Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: a key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis[J]. *The EMBO Journal*, 2004, 23(8): 1720-1728.
- [7] 朱子薇, 张健, 王倩, 等. 卟啉代谢途径高价值产物及其微生物合成研究进展[J]. *中国科学: 生命科学*, 2020, 50(12): 1405-1417.
- [8] SASSA S, KAPPAS A. Molecular aspects of the inherited porphyrias[J]. *Journal of Internal Medicine*, 2000, 247(2): 169-178.
- [9] BOYNTON T O, DAUGHERTY L E, DAILEY T A, et al. Identification of *Escherichia coli* HemG as a novel, menadione-dependent flavodoxin with protoporphyrinogen oxidase activity[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(29): 6705-6711.
- [10] ALNAFTA N, BEFFA R, BOJACK G, et al. Designing new protoporphyrinogen oxidase-inhibitors carrying potential side chain isosteres to enhance crop safety and spectrum of activity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(47): 18270-18284.
- [11] HAO G F, ZUO Y, YANG S G, et al. Protoporphyrinogen oxidase inhibitor: an ideal target for herbicide discovery[J]. *Chimia*, 2011, 65(12): 961-969.
- [12] DUKE S O, LYDON J, BECERRIL J M, et al. Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides[J]. *Weed Science*, 1991, 39(3): 465-473.
- [13] 苏少泉. 靶标原卟啉原氧化酶除草剂的发展[J]. *农药*, 2005, 44(8): 342-346.
- [14] 张永斌. 丙炔氟草胺: 一个新的旱田除草剂[J]. *世界农药*, 2003, 25(4): 48-49.
- [15] NARITA S I, TANAKA R, ITO T, et al. Molecular cloning and characterization of a cDNA that encodes protoporphyrinogen oxidase of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Gene*, 1996, 182(1/2): 169-175.
- [16] RANDOLPH-ANDERSON B L, SATO R, JOHNSON A M, et al. Isolation and characterization of a mutant protoporphyrinogen oxidase gene from *Chlamydomonas reinhardtii* conferring resistance to porphyrin herbicides[J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 38(5): 839-859.
- [17] CHE F S, WATANABE N, IWANO M, et al. Molecular characterization and subcellular localization of protoporphyrinogen oxidase in spinach chloroplasts[J]. *Plant Physiology*, 2000, 124(1): 59-70.
- [18] WATANABE N, CHE F S, IWANO M, et al. Dual targeting of spinach protoporphyrinogen oxidase II to mitochondria and chloroplasts by alternative use of two in-frame initiation codons[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(23): 20474-20481.
- [19] LERMONTOVA I, KRUSE E, MOCK H P, et al. Cloning and characterization of a plastidial and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(16): 8895-8900.
- [20] SASARMAN A, LETOWSKI J, CZAIKA G, et al. Nucleotide se-

- quence of the *hemG* gene involved in the protoporphyrinogen oxidase activity of *Escherichia coli* K12[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1993, 39(12): 1155-1161.
- [21] HANSSON M, HEDERSTEDT L. Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis hemEHY* gene cluster, which encodes protoheme IX biosynthetic enzymes[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(24): 8081-8093.
- [22] WARABI E, USUI K, TANAKA Y, et al. Resistance of a soybean cell line to oxyfluorfen by overproduction of mitochondrial protoporphyrinogen oxidase[J]. Pest Management Science, 2001, 57(8): 743-748.
- [23] HA S B, LEE S B, LEE D E, et al. Transgenic rice plants expressing *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene show low herbicide oxyfluorfen resistance[J]. Biologia Plantarum, 2003, 47(2): 277-280.
- [24] HA S B, LEE S B, LEE Y, et al. The plastidic *Arabidopsis* protoporphyrinogen IX oxidase gene, with or without the transit sequence, confers resistance to the diphenyl ether herbicide in rice[J]. Plant, Cell & Environment, 2004, 27(1): 79-88.
- [25] LEE Y, JUNG S, BACK K. Expression of human protoporphyrinogen oxidase in transgenic rice induces both a photodynamic response and oxyfluorfen resistance[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2004, 80(2): 65-74.
- [26] JUNG H I, KUK Y I. Resistance mechanisms in protoporphyrinogen oxidase (PROTOX) inhibitor-resistant transgenic rice[J]. Journal of Plant Biology, 2007, 50(5): 586-594.
- [27] JUNG S, LEE Y, YANG K, et al. Dual targeting of *Myxococcus xanthus* protoporphyrinogen oxidase into chloroplasts and mitochondria and high level oxyfluorfen resistance[J]. Plant, Cell & Environment, 2004, 27(11): 1436-1446.
- [28] JUNG S, LEE H J, LEE Y, et al. Toxic tetrapyrrole accumulation in protoporphyrinogen IX oxidase-overexpressing transgenic rice plants[J]. Plant Molecular Biology, 2008, 67(5): 535-546.
- [29] LIU X, DENG X J, LI C Y, et al. Mutation of protoporphyrinogen IX oxidase gene causes spotted and rolled leaf and its overexpression generates herbicide resistance in rice[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(10): 5781.
- [30] 陈忠明, 王秀娥, 胡兴雨, 等. 水稻长穗颈恢复系 9311 eR 的诱变选育[J]. 江苏农业科学, 2005, 33(4): 9-11.
- [31] 农药室内生物测定试验准则. 除草剂. 第 4 部分: 活性测定试验. 茎叶喷雾法; NY/T 1155.4-2006[S]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [32] 叶景秀, 杜德志. 甘蓝型油菜叶片叶绿素含量测定方法的优化及不同时期叶绿素含量比较[J]. 青海大学学报, 2024, 42(5): 56-60, 93.
- [33] ARNON D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in beta vulgaris[J]. Plant Physiology, 1949, 24(1): 1-15.
- [34] ORR G L, HESS F D. Mechanism of action of the diphenyl ether herbicide acifluorfen-methyl in excised cucumber (*Cucumis sativus* L.) cotyledons: light activation and the subsequent formation of lipophilic free radicals[J]. Plant Physiology, 1982, 69(2): 502-507.
- [35] 叶 萱. 全球抗性杂草的现状[J]. 世界农药, 2015, 37(2): 11-18.
- [36] HEAP I. Herbicide resistant weeds[M]. Berlin, Germany: Springer Netherlands, 2014: 281-301.
- [37] 周佳伟, 王歆凯, 唐兆成, 等. EMS 诱变的水稻不同位点突变体对 ALS 抑制剂类除草剂抗性差异[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(7): 1153-1160.
- [38] 江 群, 凌溪铁, 唐兆成, 等. EMS 诱变创制水稻抗乙酰辅酶 A 羧化酶抑制剂类除草剂种质[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(2): 305-312.
- [39] 项星淳, 芋鑫鑫, 符晶晶, 等. 抗除草剂基因及其在作物中的应用研究进展[J]. 植物生理学报, 2024, 60(7): 1068-1078.
- [40] LERMONTOVA I, GRIMM B. Overexpression of plastidic protoporphyrinogen IX oxidase leads to resistance to the diphenyl-ether herbicide acifluorfen[J]. Plant Physiology, 2000, 122(1): 75-84.
- [41] LEE J J, KUK Y I, CHUNG J S, et al. Physiology and growth of transgenic tobacco plants containing *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene in response to oxyfluorfen treatment[J]. Korean Journal of Weed Science, 1998, 18(3): 237-245.
- [42] 李君君, 戴玲玲, 黄文化, 等. 原卟啉原氧化酶抑制剂的作用机制及抗性进展[J]. 农药, 2019, 58(10): 703-707.
- [43] SALAS R A, BURGOS N R, TRANEL P J, et al. Resistance to PPO-inhibiting herbicide in palmer amaranth from Arkansas[J]. Pest Management Science, 2016, 72(5): 864-869.
- [44] YUN Y B, PARK J I, CHOI H S, et al. Protoporphyrinogen oxidase-overexpressing transgenic rice is resistant to drought stress[J]. Crop Science, 2013, 53(3): 1076-1085.

(责任编辑: 陈海霞)