

朱小雨, 谭庆, 姚瑶, 等. 小麦 4-羟基苯丙酮酸双氧化酶 (*TaHPPD*) 基因克隆与功能鉴定 [J]. 江苏农业学报, 2026, 42(1): 8-20.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2026.01.002

小麦 4-羟基苯丙酮酸双氧化酶 (*TaHPPD*) 基因克隆与功能鉴定

朱小雨¹, 谭庆², 姚瑶³, 杨郁文³, 张保龙³

(1.扬州大学生物科学与技术学院, 江苏扬州 225009; 2.海南大学热带农林学院, 海南海口 570228; 3.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: 为明确小麦除草剂靶基因 *HPPD* 的特征与功能, 本研究克隆了小麦 *HPPD* 基因并对其进行序列分析、表达特征分析、亚细胞定位、原核表达、蛋白酶活性及功能分析等。结果表明, 小麦有 3 个 *HPPD* 等位基因, 分别位于 6A、6B 和 6D 染色体, 其中 *TaHPPD-A* 与 *TaHPPD-B* 亲缘关系较近。*TaHPPD* 启动子含有大量光响应元件和逆境响应元件。光照处理 12 h, *TaHPPD-A* 及 *TaHPPD-D* 的表达量分别比暗处理结束时 (对照) 下降 80.9% 和 63.3%, 光照处理 24 h, *TaHPPD-A*、*TaHPPD-B* 及 *TaHPPD-D* 表达量分别比 CK 下降 88.1%、40.4% 和 63.6%。*TaHPPD* 的表达受赤霉病、条锈病及干旱等逆境胁迫诱导。亚细胞定位分析结果表明 *TaHPPD-A* 蛋白位于细胞质与叶绿体, 而 *TaHPPD-D* 蛋白仅定位于叶绿体。*TaHPPD* 蛋白在较高浓度硝磺草酮显色液中仍能显色, 但蛋白质表达量显著高于玉米 *HPPD* 蛋白和水稻 *HPPD* 蛋白, 但小麦 *HPPD* 酶活性显著低于水稻 *HPPD* 酶活性和玉米 *HPPD* 酶活性。相对于野生型水稻中花 11, 3 个相对表达量最高的 *TaHPPD* 过表达植株 (*TaHPPD-A-OE-18*、*TaHPPD-B-OE-7* 和 *TaHPPD-D-OE-7*) 对 *HPPD* 抑制剂类除草剂硝磺草酮的抗性指数分别为 13.92、15.66、7.63。本研究结果可为抗 *HPPD* 抑制剂类除草剂小麦种质的创制提供基础与依据。

关键词: 小麦; 4-羟基苯丙酮酸双氧化酶; 硝磺草酮; 除草剂抗性

中图分类号: S512.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2026)01-0008-13

Cloning and functional identification of wheat 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (*TaHPPD*) gene

ZHU Xiaoyu¹, TAN Qing², YAO Yao³, YANG Yuwen³, ZHANG Baolong³

(1. College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China; 3. Institute of Germplasm Resources and Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to clarify the characteristics and functions of the wheat herbicide target gene *HPPD*, the wheat *HPPD* genes were cloned, and sequence analysis, expression feature analysis, subcellular localization, prokaryotic expression, enzymatic activity assays and functional analysis of the wheat *HPPD* genes were conducted in this study. The results showed that there were three *HPPD* alleles in wheat, which were located on chromosomes 6A, 6B and 6D, respectively, and *TaHPPD-A* was closely related to *TaHPPD-B*. The *TaHPPD* promoter contained a large number of light response elements and stress response elements. After 12 h of light treatment, the expression levels of *TaHPPD-A* and *TaHPPD-D* decreased by 80.9% and 63.3%, respectively, compared with the end of dark treatment (control). After 24 h of light treatment, the expression levels of *TaHPPD-A*, *TaHPPD-B* and *TaHPPD-D* decreased by 88.1%,

收稿日期: 2025-03-13

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(21)1002]

作者简介: 朱小雨 (1999-), 女, 安徽蚌埠人, 硕士研究生, 主要从事作物抗除草剂育种研究。(E-mail) 1247239590@qq.com

通讯作者: 杨郁文, (E-mail) 13814001979@139.com

elements and stress response elements. After 12 h of light treatment, the expression levels of *TaHPPD-A* and *TaHPPD-D* decreased by 80.9% and 63.3%, respectively, compared with the end of dark treatment (control). After 24 h of light treatment, the expression levels of *TaHPPD-A*, *TaHPPD-B* and *TaHPPD-D* decreased by 88.1%,

40.4% and 63.6%, respectively, compared with the control. The expression of *TaHPPD* was induced by stress conditions such as Fusarium head blight, stripe rust and drought. Subcellular localization analysis showed that *TaHPPD*-A protein was located in cytoplasm and chloroplast, while *TaHPPD*-D protein was only located in chloroplast. *TaHPPD* protein retained chromogenic activity even in a high-concentration mesotrione chromogenic solution. However, its protein expression level was significantly higher than that of corn *HPPD* protein and rice *HPPD* protein, while *HPPD* enzyme activity of wheat was significantly lower than that of rice and corn. Compared with the wild type rice Zhonghua11, the resistance indices of the three *TaHPPD* overexpression plants (*TaHPPD*-A-OE-18, *TaHPPD*-B-OE-7 and *TaHPPD*-D-OE-7) with the highest relative expression level were 13.92, 15.66 and 7.63, respectively. The results of this study provide a basis for the development of wheat germplasm resistant to *HPPD* inhibitor herbicides.

Key words: wheat; 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; mesotrione; herbicide resistance

草害是小麦(*Triticum aestivum* L.)生长过程中常见的生物胁迫,严重威胁小麦产量与品质。中国小麦种植面积最大的是河南省,小麦田杂草危害面积占播种面积70%以上,产量损失可达30%左右^[1]。当前,化学除草剂是田间杂草防治的主要手段,其中,乙酰辅酶A羧化酶(*ACCase*)抑制剂类和乙酰乳酸合酶(*ALS*)抑制剂类除草剂在小麦田被广泛应用^[2]。然而,随着这2类除草剂的长期使用,抗性杂草问题愈发严峻。目前,多花黑麦草、茵草、日本看麦娘、看麦娘、耿氏假硬草、棒头草及野燕麦等麦田杂草种群中均已出现对这2类除草剂具有抗性的杂草^[3-8]。因此,发掘利用新型除草剂应对麦田抗性杂草,已成为农业生产领域亟待解决的关键问题之一。

近年来,4-羟基苯丙酮酸双氧化酶(*HPPD*)抑制剂类除草剂因具有高效、低毒、长期使用杂草不易产生抗性、对多种农田恶性杂草防效显著等优势而受到广泛关注^[9]。截至目前,全球范围内因*HPPD*抑制剂类除草剂导致的抗性杂草的报道仅有4例,而*ALS*抑制剂类和*ACCase*抑制剂类除草剂导致的抗性杂草的报道分别高达165例和49例^[10]。在植物酪氨酸代谢途径中,*HPPD*作为关键酶催化对羟基苯基丙酮酸(*HPPA*)转化为尿黑酸(*HGA*),而*HGA*是合成质体醌和生育酚的重要前体物质。*HPPD*抑制剂类除草剂通过特异性抑制*HPPD*活性,阻断*HGA*的合成,进而干扰质体醌的生物合成过程。由于质体醌是植物光合作用电子传递链的重要组成部分,其合成受阻将导致电子传递链中断,最终使植物叶片在光照条件下因无法抵御紫外线伤害而出现漂白症状,并逐渐发展为坏死组织,最终导致植株死亡^[11]。

关于*HPPD*基因的表达特征以及功能已有一些初步研究。向日葵*HaHPPD*基因在植株生长的各个时期及不同部位均有表达,子叶中的表达量最

高^[12]。苜蓿*MsHPPD*在根、茎、叶、花中均有表达^[13]。此外,*HPPD*基因的表达具有明显的昼夜节律,拟南芥和苜蓿的*HPPD*基因能被黑暗诱导表达而被光照抑制表达^[13-14]。大麦(*Hordeum vulgare*)*HPPD*基因能够被茉莉酸甲酯、乙烯及其他伤害诱导表达^[15];干旱和强光照处理后莠苣的*HPPD*基因表达量显著提高^[16];盐、聚乙二醇(PEG)、脱落酸(*ABA*)等能诱导苜蓿*HPPD*基因的表达^[17]。*ALS*、原卟啉原氧化酶(*PPO*)和*HPPD*等大部分除草剂靶基因均定位在叶绿体^[18]。不同植物*HPPD*蛋白N端前50个氨基酸高度保守,均含有叶绿体信号肽(Chloroplast-targeting peptide,CTP)。玉米*HPPD*蛋白的叶绿体信号肽是其N端的40个氨基酸。*HPD*基因转录起始位点差异会导致*HPPD*蛋白亚细胞定位改变。大豆含有长度分别为449个和490个氨基酸的2种*HPPD*蛋白,其中长度为449个氨基酸的*HPPD*蛋白位于细胞质,而长度为490个氨基酸的*HPPD*蛋白位于叶绿体^[19]。

目前,*HPPD*的研究主要聚焦于抗性位点的发掘与抗性种质创制。研究方法主要包括基于微生物的定向进化以及基于基因编辑的原位定向进化。Siehl等^[19]通过DNA家族改组技术改造玉米*HPPD*基因,引入18个点突变,将其转入大豆后成功赋予植株三酮类除草剂抗性。Chen等^[20]通过优化DNA改组技术构建水稻*HPPD*随机突变文库,筛选获得硝磺草酮抗性突变体*MFRR-2*;Yang等^[21]利用易错PCR技术获得15个单点抗性突变体,并迭代聚合得到6位点突变体*OsHPPD-6M*,体外显色试验显示其对硝磺草酮抗性较野生型提升200倍。Wang等^[22]运用单碱基编辑技术,筛选出拟南芥抗*HPPD*抑制剂的新位点*AtHPPDY*^{342H},并证实水稻同源位点*OsHPPD*^{N338D}同样具有*HPPD*抗性。小麦是异源六

倍体作物,基因组包含3个 *HPPD* 等位基因,分别定位于 A、B 和 D 同源染色体组^[23]。虽然关于水稻、拟南芥和玉米等作物 *HPPD* 基因的功能特性已有广泛研究,而对小麦 *HPPD* 基因的功能特性研究仍较缺乏。目前,基于传统育种手段尚未筛选出高抗 *HPPD* 抑制剂类除草剂的小麦种质资源,这严重制约了该类除草剂在小麦生产中的应用。

本研究拟利用信息分析、分子生物学技术,解析小麦 *HPPD* 基因的特性以及功能,旨在为抗性基因挖掘、抗 *HPPD* 抑制剂类除草剂小麦种质创制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用的小麦材料为宁麦 136,水稻材料为中花 11,均由江苏省农业科学院种质资源与生物技术研究所收集和保存。

1.2 *TaHPPD* 的序列分析

从美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)下载小麦全基因组蛋白质氨基酸序列(IWGSC CS RefSeq v2.1)。使用拟南芥 *HPPD* 基因(AT1G06570)的氨基酸序列作为检索序列,通过生物技术信息数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)搜索小麦 *HPPD* 蛋白。

从 NCBI 数据库中下载小麦、水稻、大麦、玉米、棉花等 22 个物种 *HPPD* 基因的蛋白质氨基酸序列。利用 Clustalw 算法对 22 个物种 *HPPD* 蛋白的氨基酸序列进行序列比对,通过 MEGA11 软件的邻接法(Neighbor-joining)构建系统发育进化树,其中重复次数设为 1 000。利用在线数据库 ExPasy(https://web.expasy.org/compute_pi/)分析小麦 *HPPD* 蛋白的等电点及相对分子量。用 LOCALIZER(<https://localizer.csiro.au/>)在线软件进行亚细胞定位预测。

选取小麦 *HPPD* 基因翻译起始位点 ATG 上游的 2 000 bp 作为 *HPPD* 基因启动子序列,利用 PlantCARE 网站(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)在线分析小麦 *HPPD* 基因启动子区域的顺式作用元件。

1.3 *TaHPPD* 的表达特征分析

将生长至 3~4 叶期小麦植株置于不同光照条件下^[14],即在暗室生长 12 h 后转移至 4 000 lx 光照条件下,光照处理 6 h、12 h 和 24 h,分别随机选取 3 张

叶片混合,并设置 3 个生物重复。按照 RNA 提取试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品)说明书提取叶片总 RNA。按照 HiScript II Q RT Super-Mix for qPCR (+gDNA wiper)(南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品)试剂说明书合成 cDNA。以 *Ta54227* 为小麦内参基因^[24],利用 qRT-PCR 检测 *TaHPPD* 基因的表达水平。PCR 反应体系 20.0 μ L: 2 \times ChamQ Universal SYBR qPCR Master 预混液 10.0 μ L、正反向引物各 0.5 μ L、cDNA 模板 3.0 μ L 和去离子水 6.0 μ L。PCR 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,40 个循环;熔解曲线设置为 60.0~95.0 $^{\circ}$ C,每 0.1 $^{\circ}$ C 读数 1 次。根据小麦大数据在线平台 WheatOmics-bata 版(<http://202.194.139.32/expression/index.html>)的转录组数据,分析病原菌、激素、逆境等不同环境因子对小麦 *HPPD* 基因表达的影响^[25-30]。

1.4 *TaHPPD* 的亚细胞定位分析

扩增 *TaHPPD-A* 和 *TaHPPD-D* 的编码区,扩增产物分别与 pCAMBIA-2301-GFP4 双酶切(*Kpn* I 和 *Bam* H I)产物连接,构建 *TaHPPD* 与绿色荧光蛋白(GFP)融合的表达载体,启动子为 CaMV35S。制备水稻原生质体,将 40~60 棵水稻幼苗的茎和鞘组织切成约 0.5 mm 的条状,立即转移到 0.6 mol/L 甘露醇中进行快速质解处理,然后在黑暗中轻轻摇动进行酶切。利用 40 μ m 尼龙网过滤并收集原生质体,用荧光载体转化原生质体并进行显微观察^[31]。

1.5 *TaHPPD* 基因原核表达及酶活性分析

扩增 *TaHPPD-A*、*TaHPPD-B*、*TaHPPD-D* 编码区片段。扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,35 个循环。扩增产物与 pET29a 双酶切(*Nde* I 和 *Xho* I)产物在 50 $^{\circ}$ C 条件下进行同源重组 15 min,连接产物转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞。进一步对感受态细胞阳性克隆进行 PCR 鉴定。PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,35 个循环。利用显色法分析 *TaHPPD* 的功能^[21]。在显色板中分别加入 400 μ L 含有 0 μ mol/L、100 μ mol/L、200 μ mol/L、500 μ mol/L、800 μ mol/L 和 1 000 μ mol/L 的硝磺草酮(江苏中旗化工有限公司产品)显色液,挑取菌板上阳性单克隆置于显色液中,28 $^{\circ}$ C,220 r/min 孵育 24 h 后观察颜色反应。以野生型水稻中花 11 *HPPD* 基因作为阴性

对照,密码子优化后的玉米 *HPPD* 突变基因 *Mutant-Maize* 作为阳性对照^[20]。

挑取原核表达的阳性单克隆接种到含有 50 mg/L 卡那霉素抗性 LB 液体培养基中,37 ℃,220 r/min 过夜培养。将菌液以 1:100 的稀释比例加入 100 mL LB 液体培养基中扩繁,至菌液 600 nm 吸光度 (OD_{600}) 达 0.6~0.8 时,加入 3 mL 0.3 mmol/L 异丙基- β -硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导蛋白质表达,16 ℃、180 r/min 培养 12~16 h。将培养液在 4 ℃,12 000 r/min 离心 10 min,收集菌体。加入 10 mL 1×PBS 磷酸缓冲液 (pH=7.4) 重悬菌体后超声破碎,离心并收集上清液,即得粗酶液。粗酶液经 0.22 μ m 滤膜过滤后,加入预平衡好的 Co^{2+} 亲和层析柱 His GraviTrap TALON (美国 Cytiva 公司产品),在 4 ℃ 下进行蛋白质纯化。利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 方法检测蛋白质质量。按照 BCA 法蛋白质含量测定试剂盒 (上海生工生物工程有限公司产品) 测定蛋白质含量^[13]。采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定尿黑酸 (HGA) 浓度,并计算 *HPPD* 的相对酶活性。其中,色谱柱为 ZORBAX SB-Aq 色谱柱 (4.6 mm×250.0 mm, 5 μ m), 流动相为体积比 6:94 的甲醇与 0.1% 甲酸水混合溶液,流速为 1.0 mL/min,柱温为 40 ℃,进样量为 20 μ L, HGA 检测波长为 292 nm。

1.6 *TaHPPD* 基因过表达载体构建及过表达植株对硝磺草酮的抗性分析

基于 pCambia1390 构建 *TaHPPD* 过表达载体,启动子为 Ubi-1。取 100 粒脱壳水稻种子置于 50 mL 无菌离心管中,用 75% 乙醇清洗浸泡 1 min 后取出;再利用体积比 1:2 的次氯酸钠与无菌水消毒液分 2 次清洗并浸泡稻种,浸泡时间分别为 20 min 和 5 min,浸泡期间摇晃离心管,浸泡后用无菌水冲洗 7~8 次。然后,将种子置于灭菌滤纸上吸干水分后,用无菌镊子将种子放于 N6 诱导培养基 (每皿 20 粒),28 ℃ 恒温正置培养 15 d,将诱导出的愈伤组织移至新的 N6 诱导培养基继代培养 15 d,得到愈伤组织,通过农杆菌介导法对野生型中花 11 水稻愈伤组织进行遗传转化,获得潮霉素阳性转基因 T_0 代植株^[32]。

将 T_0 代植株种植于江苏省农业科学院温室,提取 3 叶期的 T_0 代植株叶片 DNA 并鉴定基因型。鉴定为阳性植株后分单株收种,得到 T_1 代种子。每个 T_1 代株系选取 10 株纯合株系幼苗,生长至 3 叶期,

提取植株叶片 DNA 用于分子鉴定^[33]。PCR 反应程序为 95 ℃ 预变性 1 min;94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 10 min,35 个循环。利用 Trizol 法^[34] 提取 RNA,用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。按照 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 试剂盒说明书合成 cDNA,通过实时荧光定量 PCR 方法,分析转基因株系目的基因的表达水平。以水稻 *Ubiquitin1* 为内参基因,荧光定量 PCR 反应体系和程序同方法 1.3。

以野生型中花 11 为对照,选择 *TaHPPD-A*、*TaHPPD-B* 和 *TaHPPD-D* 表达量较一致的 T_1 代纯合株系进行硝磺草酮耐受性试验。选取 20~30 粒饱满种子用 3% 双氧水浸泡 2~3 h 后用蒸馏水洗净,在 37 ℃ 培养箱中浸润催芽,待种子露白后,挑选露白一致的种子放入装有基质土的 250 mL 塑料杯中,每杯放 5 粒种子,每个株系 3 次重复。生长条件设置为光照 16 h、黑暗 8 h,白天温度 30 ℃,夜晚 25 ℃。当幼苗生长至 3 叶期时,喷施有效剂量分别为 0 g/hm²、7.5 g/hm²、15.0 g/hm²、30.0 g/hm²、60.0 g/hm²、120.0 g/hm² 和 240.0 g/hm² 的硝磺草酮溶液 (山东胜邦绿野化学有限公司产品)。喷施 14 d 后观察植株长势,测定植株地上部分鲜重。利用 SigmaPlot 10.0 软件进行 4 参数 Logistic 模型拟合植株地上部分鲜重与喷施有效剂量的定量关系,确定 50% 生长量所对应的除草剂有效剂量^[35]。4 参数 Logistic 模型如下式:

$$y = C + (D - C) / [1 + (X / GR_{50})^b] \quad (1)$$

式中, y 为除草剂有效剂量 x 处理下生长量与有效剂量 0 处理下生长量的百分比, b 、 C 、 D 为模型参数, GR_{50} 为 50% 生长量所对应的除草剂有效剂量。

根据过表达植株和野生型中花 11 的 GR_{50} 比值,得到过表达植株对 *HPPD* 抑制剂类除草剂硝磺草酮的抗性指数 (RI)。

1.7 引物设计

使用 Premier 5.0 软件设计特异性引物。所用引物序列信息见表 1。

2 结果与分析

2.1 *TaHPPD* 基因编码的蛋白质理化性质

小麦有 3 个 *HPPD* 等位基因,分别位于 6A、6B 和 6D 染色体上,分别命名为 *TaHPPD-A* (TraesCS6A-02G141500.1)、*TaHPPD-B* (TraesCS6B02G16700.1) 和

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	序列(5'→3')	用途
9648-F	GTTACTTCTGCACTAGGTACCATGCCGCCACCCACCACCCC	<i>TaHPPD</i> 过表达载体构建
9649-R1	TCTTAGAATTAAGGGGATCCCTATGATCCCTGAACTGCAGCA	
9650-R2	TCTTAGAATTCGGGGATCCTCTATGATGCCTGAACTGCAGCA	
9564-F	AAGAAGGAGATATACATATACCGCCACCCACCACC	<i>TaHPPD</i> 原核表达载体构建
9565-R1	TGGTGGTGGTGTGCTGAGTGATCCCTGAACTGCAGCA	
9566-R2	TGGTGGTGGTGTGCTGATGATGCCTGAACTGCAG	
9848-F	TTACGAACGATAGGTACCATGCCGCCACCCACCAC	<i>TaHPPD</i> 亚细胞定位载体构建
9849-R1	CTTGCTCACCATGGATCCTCCAGAggagcctcctagatcctccagaTGATCCCTGAACTGCAGC	
9850-R2	CTTGCTCACCATGGATCCTCCAGAggagcctcctagatcctccagaTGATGCCTGAACTGCAGCAG	
9444-F	CGTCAGCCACCCGGACGGCAG	<i>TaHPPD-A</i> 的 qRT-PCR 引物
9450-R	CCGGGACGTTGCCGACGACGT	
9394-F	CAGTCACCCGGATGACACGGA	<i>TaHPPD-B</i> 的 qRT-PCR 引物
9395-R	GACCTATCGCGGGCGGGGCA	
9393-F	CAGCCATCCGGACGGCAGGAC	<i>TaHPPD-D</i> 的 qRT-PCR 引物
9360-R	TACGTAGCGGGCGGGAAGCA	
<i>OsUbiq-F</i>	GCTCCGTGGCGGTATCAT	水稻 qRT-PCR 内参引物
<i>OsUbiq-R</i>	CGGCAGTTGACAGCCCTAG	
<i>Ta54227-F</i>	CAAATACGCCATCAGGGAGAACATC	小麦 qRT-PCR 内参引物
<i>Ta54227-R</i>	CGCTGCCGAAACCACGAGAC	
9235-R	GGGAAATTCGAGCTGGTCACCT	与引物 9648 配对鉴定过表达植株

TaHPPD-D (TraesCS6D02G130800.1)。小麦 HPPD 蛋白质理化性质如表 2 所示。*TaHPPD-A*、*TaHPPD-B* 和 *TaHPPD-D* 编码蛋白质的相对分子量分别为 4.63×10^4 、 4.66×10^4 及 4.65×10^4 ，等电点分别为 5.49、5.42 及 5.57。预测 *TaHPPD-A*、*TaHPPD-B* 和 *TaHPPD-D* 均定位在叶绿体。

表 2 *TaHPPD* 基因成员及其编码的蛋白质理化性质Table 2 *TaHPPD* members and physicochemical characteristics of their encoded proteins

基因名称	基因登录号	编码蛋白质性质		
		等电点	相对分子量 ($\times 10^4$)	预测细胞定位
<i>TaHPPD-A</i>	TraesCS6A02G141500.1	5.49	4.63	叶绿体
<i>TaHPPD-B</i>	TraesCS6B02G169700.1	5.42	4.66	叶绿体
<i>TaHPPD-D</i>	TraesCS6D02G130800.1	5.57	4.65	叶绿体

利用小麦、水稻、大麦、玉米、棉花等 22 个物种

27 个 HPPD 蛋白构建的系统发育进化树如图 1 所示。27 个 HPPD 蛋白可分为 4 组，其中双子叶植物油橄榄、番茄、大豆、百脉根、葡萄、陆地棉、拟南芥和蔓菁的 HPPD 蛋白全部聚类于 IV 组，而单子叶植物芒、高粱、玉米等聚类为 3 个组 (I 组 ~ III 组)。小麦、大麦以及二穗短柄草中的一个 HPPD 同源蛋白聚类于 II 组，说明这些蛋白具有较近的亲缘关系。此外，*TaHPPD* 的 3 个等位蛋白中，*TaHPPD-A* 与 *TaHPPD-B* 具有更近的亲缘关系。

2.2 *TaHPPD* 基因启动子特征

小麦 *HPPD* 基因的启动子特征如表 3 所示。*TaHPPD-A*、*TaHPPD-B* 和 *TaHPPD-D* 基因启动子均含有光响应元件 Box II、G-Box、Sp1 和 TCCC-motif。*TaHPPD-A* 启动子还特异含有 3-AF1 binding site，*TaHPPD-B* 启动子特异含有 ATCT-motif，而 *TaHPPD-D* 启动子特异含有 Box 4、GT1-motif 及 chs-CMA2a。*TaHPPD-D* 启动子含有更丰富的光响应元

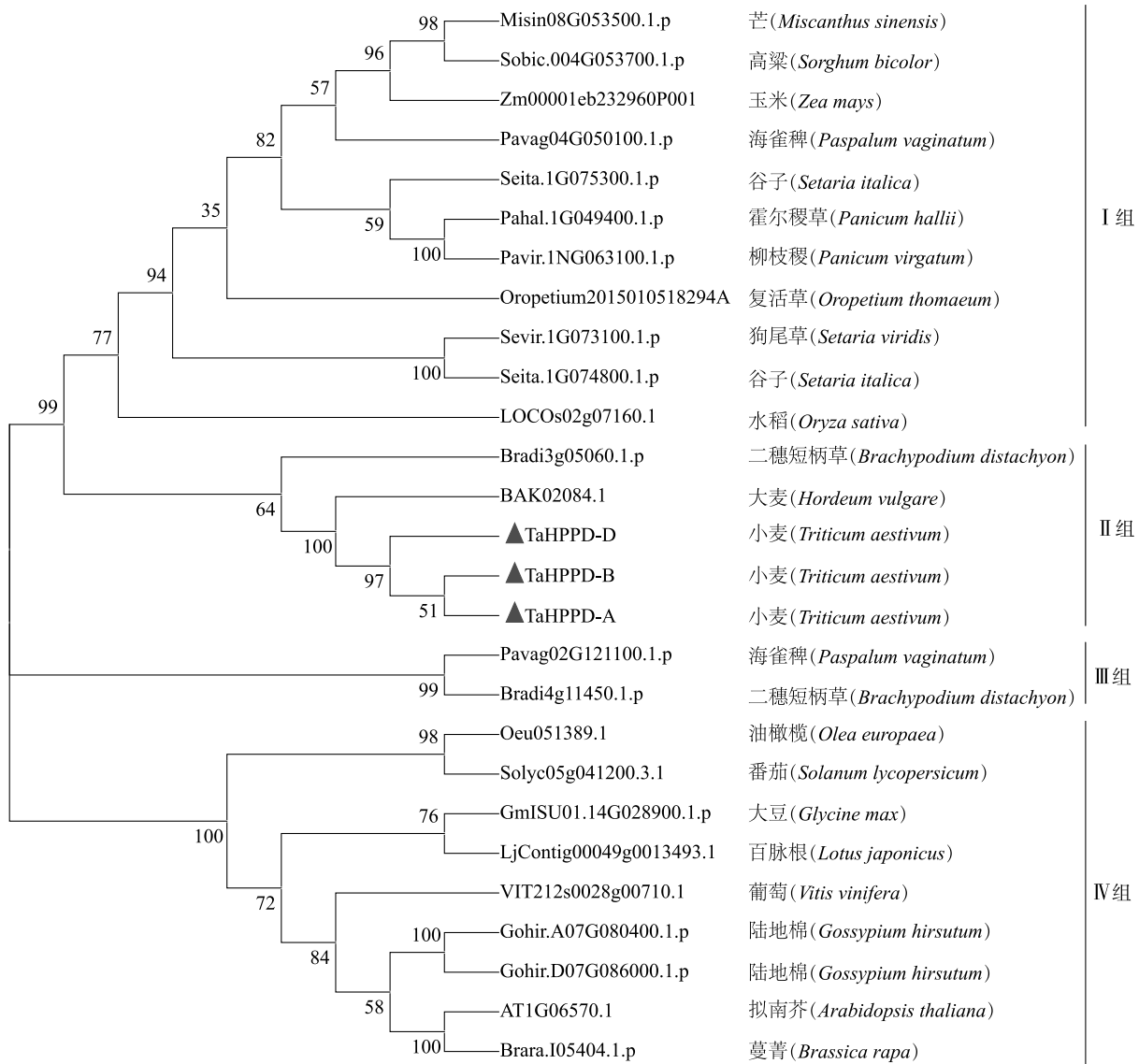


图 1 HPPD 蛋白序列聚类分析及序列比对

Fig.1 Clustering analysis and sequence alignment of HPPD protein sequences

件,推测受光的影响程度最大。小麦 *HPPD* 基因启动子还含有一定数量的激素响应元件, *TaHPPD-B* 启动子含有脱落酸、茉莉酸、赤霉素、生长素以及水杨酸响应元件,与 *TaHPPD-B* 启动子相比, *TaHPPD-A* 启动子缺少水杨酸响应元件, *TaHPPD-D* 启动子缺少赤霉素、生长素以及水杨酸响应元件。此外, *TaHPPD-A* 启动子还含有低温响应元件、厌氧环境响应元件, *TaHPPD-B* 启动子含有低温响应元件、伤害诱导元件, *TaHPPD-D* 启动子含有低温响应元件、厌氧环境响应元件、伤害诱导元件、干旱诱导元件及胚乳表达元件。

2.3 *TaHPPD* 亚细胞定位

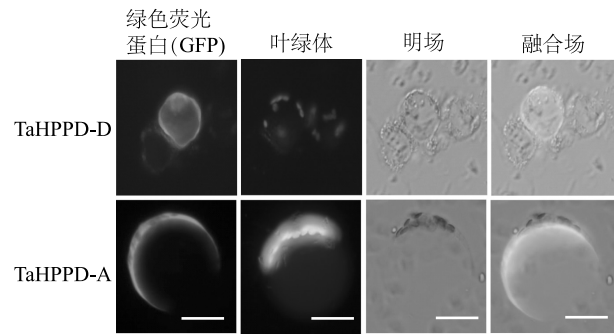
在线数据库预测 *TaHPPD-A*、*TaHPPD-B* 和 *TaHPPD-D* 均位于叶绿体。显微镜下观察 *TaHPPD-A-GFP4* 的原生质转化体,绿色荧光信号遍布整个细胞,但在细胞边缘有颗粒状信号,对比叶绿体标记的红色荧光,说明 *TaHPPD-A* 同时位于细胞质和叶绿体。*TaHPPD-D* 的荧光信号仅分布于细胞边缘内侧,在同样的位置检测到叶绿体标记的红色荧光信号,说明 *TaHPPD-D* 仅定位于叶绿体。*TaHPPD-B* 的载体转化原生质体未观察到荧光信号(图 2)。

表 3 *TaHPPD* 基因成员启动子元件Table 3 Promoter elements of *TaHPPD* gene members

元件类型	元件名称	<i>TaHPPD</i> 基因元件数量(个)			
		<i>TaHPPD-A</i>	<i>TaHPPD-B</i>	<i>TaHPPD-D</i>	
光响应原件	3-AF1 binding site	1			
	Box II	1	1	2	
	G-Box	2	3	7	
	Sp1	3	1	2	
	TCCC-motif	1	2	2	
	ATCT-motif		1		
	TCT-motif		1		
	Box 4			1	
	GT1-motif			1	
	chs-CMA2a			1	
	启动子核心元件	TATA-box	5	10	8
		CAAT-box	22	19	15
	脱落酸响应元件	ABRE	4	3	6
		TGACG-motif	4	4	6
茉莉酸响应元件	CGTCA-motif	4	4	6	
	TATC-box	1	1		
赤霉素响应元件	TGA-element	2	1		
水杨酸响应元件	TCA-element		1		
低温响应元件	LTR	3	1	1	
厌氧环境响应	ARE	1		3	
	GC-motif	1		1	
伤害诱导	WUN-motif		1	1	
干旱诱导	MBS			2	
	MYB recognition site	1		1	
分生组织特异表达	CAT-box	1	2	1	
醇溶蛋白代谢调控	O2-site	2		1	
胚乳表达	GCN4_motif			1	

2.4 *TaHPPD* 基因的表达特征

2.4.1 光照对 *TaHPPD* 基因表达的影响 小麦植株暗处理 12 h 后转至光照条件下, *HPPD* 基因的表达特征如图 3 所示。光照处理 6 h, *TaHPPD-A*、*TaHPPD-B* 和 *TaHPPD-D* 的相对表达量分别比暗处理结束(0 h)时提高 66.8%、144.4% 以及 143.0%。光照处理 12 h 和 24 h, *TaHPPD-A* 相对表达量较暗处理结束(0 h)时下降 80.9% 和 88.1%。光照处理 12 h, *TaHPPD-B* 相对表达量无显著变化, 而光照处理 24 h, *TaHPPD-B* 相对表达量比暗处理结束(0 h)时下降 40.4%。光照处理 12 h 和 24 h, *TaHPPD-D*

图 2 *TaHPPD* 蛋白的亚细胞定位Fig.2 Subcellular localization of *TaHPPD* proteins

的相对表达量比暗处理结束(0 h)时分别下降 63.3% 和 63.6%。光照处理抑制拟南芥 *HPPD* 基因的表达, 而小麦 *HPPD* 基因在光照处理后呈现先上升后下降的表达模式, 说明光照在调控不同作物 *HPPD* 表达机制方面存在差异。

2.4.2 *TaHPPD* 基因逆境响应表达分析 除光响应元件外, *TaHPPD* 基因启动子上还有激素响应、非生物胁迫响应等逆境响应元件。基于 WheatOmics 平台的小麦转录组数据, 不同环境因子下小麦 *HPPD* 基因表达量变化如图 4 所示。从图中可以看出, 大部分胁迫都能引起 *HPPD* 基因的表达量变化。赤霉病病菌诱导小麦后, 小穗 3 个 *HPPD* 等位基因表达量都显著上调。白粉病病菌处理 24~48 h, *TaHPPD-A* 表达量显著上调, 72 h 转为下调。条锈病病菌处理后 24 h 3 个小麦 *HPPD* 等位基因表达量都显著提高。4 °C 低温条件能诱导 *TaHPPD-B* 和 *TaHPPD-D* 的表达。干旱诱导 6 h, 3 个等位基因均被强烈诱导, 而盐诱导作用不明显。另外, *HPPD* 基因的表达还受到氮素影响, 其中 *TaHPPD-B* 在氮饥饿、氮恢复处理下表现出更高的表达量。

2.5 *TaHPPD* 基因原核表达分析

2.5.1 *TaHPPD* 显色结果 以水稻 *OsHPPD* 和玉米 *ZmHPPD* 基因对照, 不同浓度硝磺草酮显色液中 *TaHPPD* 显色结果如图 5 所示。*OsHPPD* 在含有 100 μmol/L 硝磺草酮显色液中无显色, 说明该浓度除草剂已完全抑制 *OsHPPD* 酶活性。*ZmHPPD* 在 200 μmol/L 硝磺草酮显色液中仍能显色, 但在 500 μmol/L 硝磺草酮中无显色, 说明 *ZmHPPD* 能够抗 200 μmol/L 浓度硝磺草酮。而 *TaHPPD-A* 在 100 μmol/L, *TaHPPD-B* 和 *TaHPPD-D* 在 200 μmol/L 硝磺草酮中仍然能够显色。

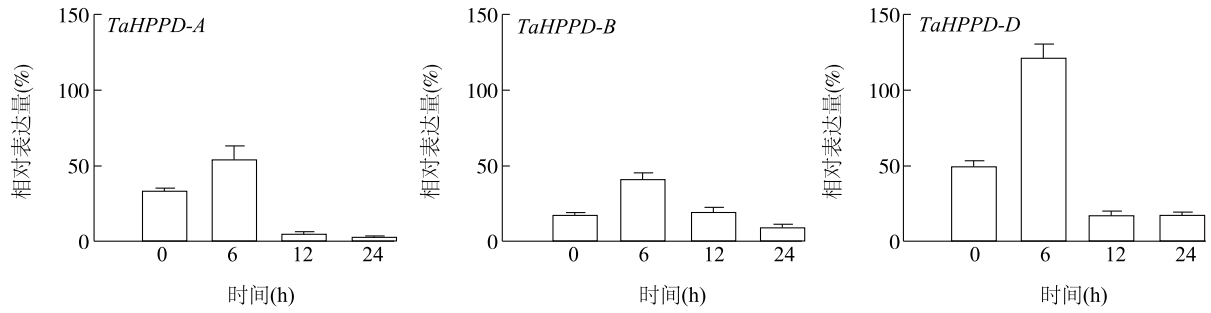
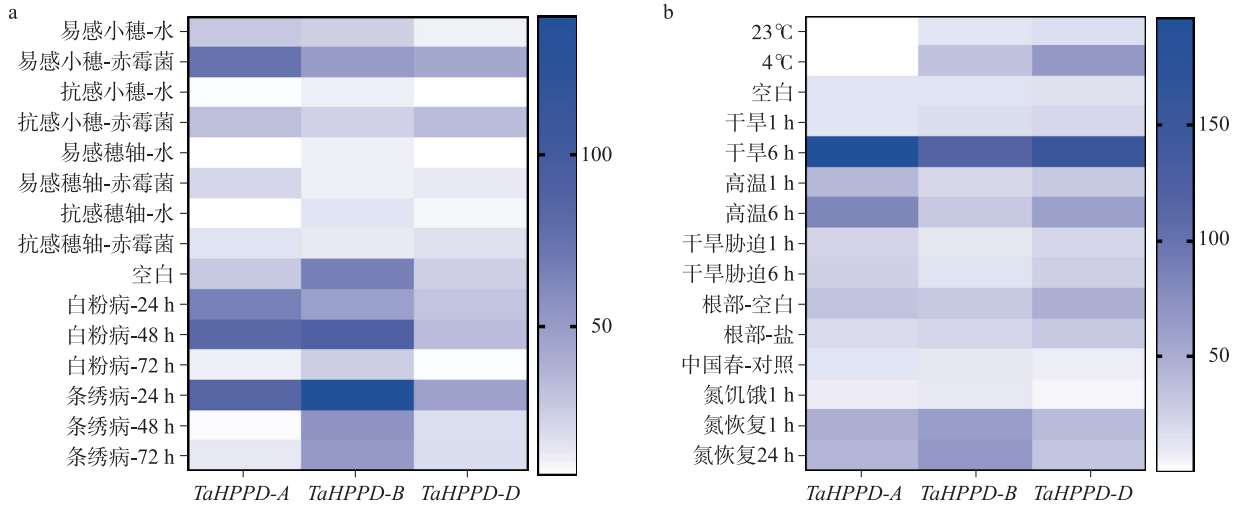


图3 *TaHPPD* 基因的光诱导表达分析

Fig.3 Light-induced expression analysis of *TaHPPD* genes



a: 不同病原菌处理下小麦 *HPPD* 基因表达量; b: 不同非生物胁迫下小麦 *HPPD* 基因表达量。

图4 不同因子下小麦 *HPPD* 基因表达量变化

Fig.4 Changes of *HPPD* gene expression in wheat under different factors

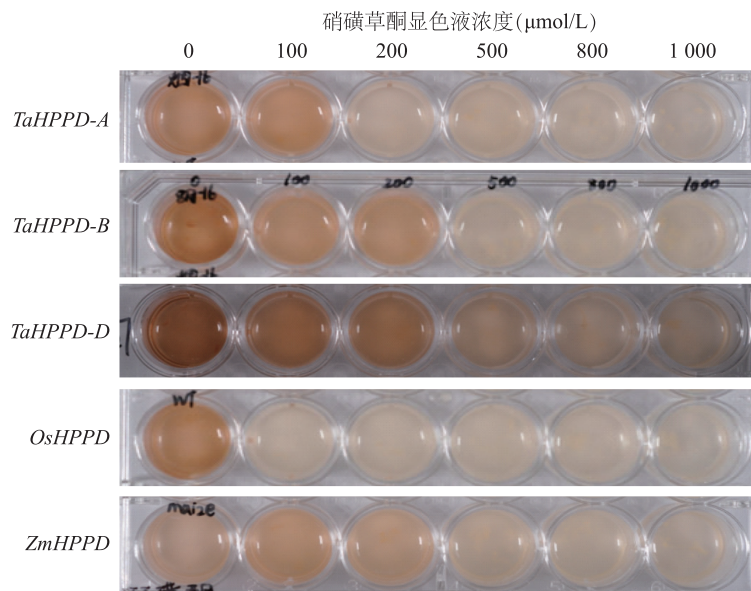


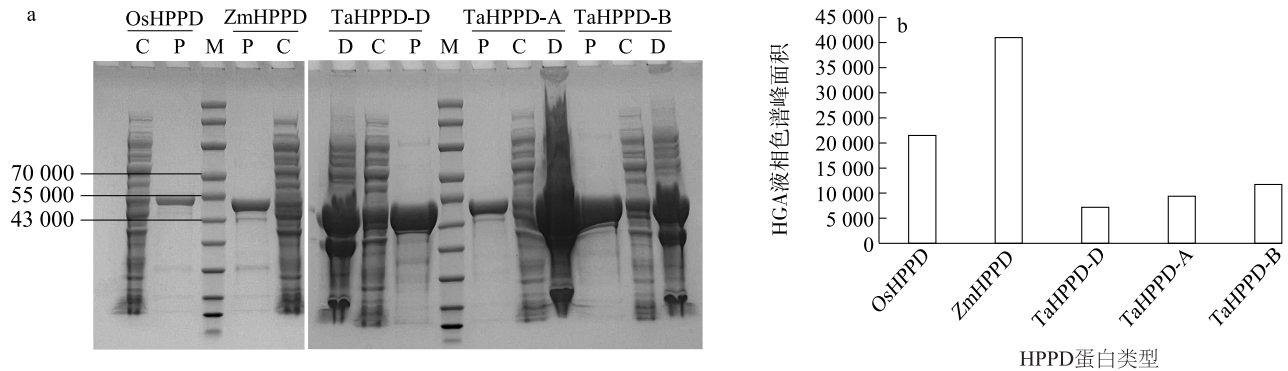
图5 *HPPD* 在不同浓度硝磺草酮显色液中的显色结果

Fig.5 Colorimetric results of *HPPD* in mesotrione solutions at different concentrations

2.5.2 *TaHPPD* 酶活性 不同 *TaHPPD* 蛋白 SDS-PAGE 试验结果如图 6 所示。从图中可以看出, *TaHPPD*-A、*TaHPPD*-B、*TaHPPD*-D 蛋白的相对分子量均约为 4.5×10^4 。相同纯化条件下, 小麦 *TaHPPD* 蛋白浓度显著高于水稻 *HPPD* 蛋白和玉米 *HPPD* 蛋白, 且不同等位基因存在一定差异。 *TaHPPD*-B 和 *TaHPPD*-D 的蛋白浓度明显高于 *TaHPPD*-A (图

6a)。该结果与显色结果一致, 说明显色信号的强弱不仅体现 *HPPD* 蛋白对 *HPPD* 抑制剂类除草剂抗性水平, 还与 *HPPD* 蛋白表达量呈正相关。

玉米 *HPPD* 酶活性最高, 水稻 *HPPD* 酶活性次之, 而 *TaHPPD* 的酶活性最低。 *TaHPPD*-A、*TaHPPD*-B、*TaHPPD*-D 的酶活性分别为玉米 *HPPD* 酶活性的 22.6%、28.6%、17.6% (图 6b)。



a: SDA-PAGE 配制电泳图, 其中 D 代表沉淀, C 代表粗酶, P 代表纯酶, M 代表 marker; b: 不同 *HPPD* 相对酶活性。HGA: 尿黑酸。

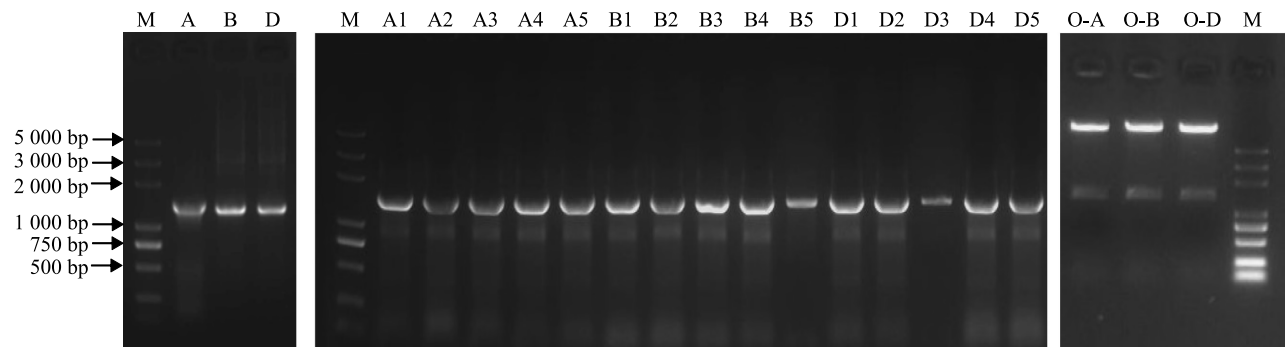
图 6 不同 *HPPD* 蛋白的原核表达产物及酶活性

Fig.6 Prokaryotic expression and enzyme activity analysis of different *HPPD* proteins

2.6 *TaHPPD* 过表达植株的获得与抗性分析

2.6.1 *TaHPPD* 过表达载体的构建 利用特异性引物对构建的小麦 3 个等位基因过表达载体鉴定结果如图 7 所示。从图中可以看出, 所有过表达载体均可扩增得到 1 500 bp 大小的目的条带。载体构建成功

后使用试剂盒提取的质粒通过琼脂糖凝胶电泳呈现一条优势超螺旋条带(主条带), 其下方可见微弱的开环条带, 大小符合预期。将测序正确的重组载体命名为 *TaHPPD*-A-OE、*TaHPPD*-B-OE 和 *TaHPPD*-D-OE。



M: DL5000 maker; A、B、D 分别为 *TaHPPD*-A、*TaHPPD*-B、*TaHPPD*-D 扩增片段; A1~A5、B1~B5、D1~D5 分别为 *TaHPPD*-A、*TaHPPD*-B、*TaHPPD*-D 过表达载体扩增片段; O-A、O-B、O-D 分别为 *TaHPPD*-A、*TaHPPD*-B、*TaHPPD*-D 过表达载体质粒胶图。

图 7 *TaHPPD* 过表达载体鉴定结果

Fig.7 *TaHPPD* overexpression vector construction

2.6.2 过表达植株分子鉴定及除草剂抗性鉴定 利用 qRT-PCR 检测 T₁ 代过表达株系中 *TaHPPD* 外源基因的相对表达水平, 结果如图 8 所示。从图中可以看出, *TaHPPD*-A-OE-18 植株 *TaHPPD*-A 基因

相对表达量高于其他植株, *TaHPPD*-B-OE-7 和 *TaHPPD*-B-OE-11 植株 *TaHPPD*-B 基因相对表达量高于其他植株, *TaHPPD*-D-OE-7 植株 *TaHPPD*-D 基因相对表达量高于其他植株。

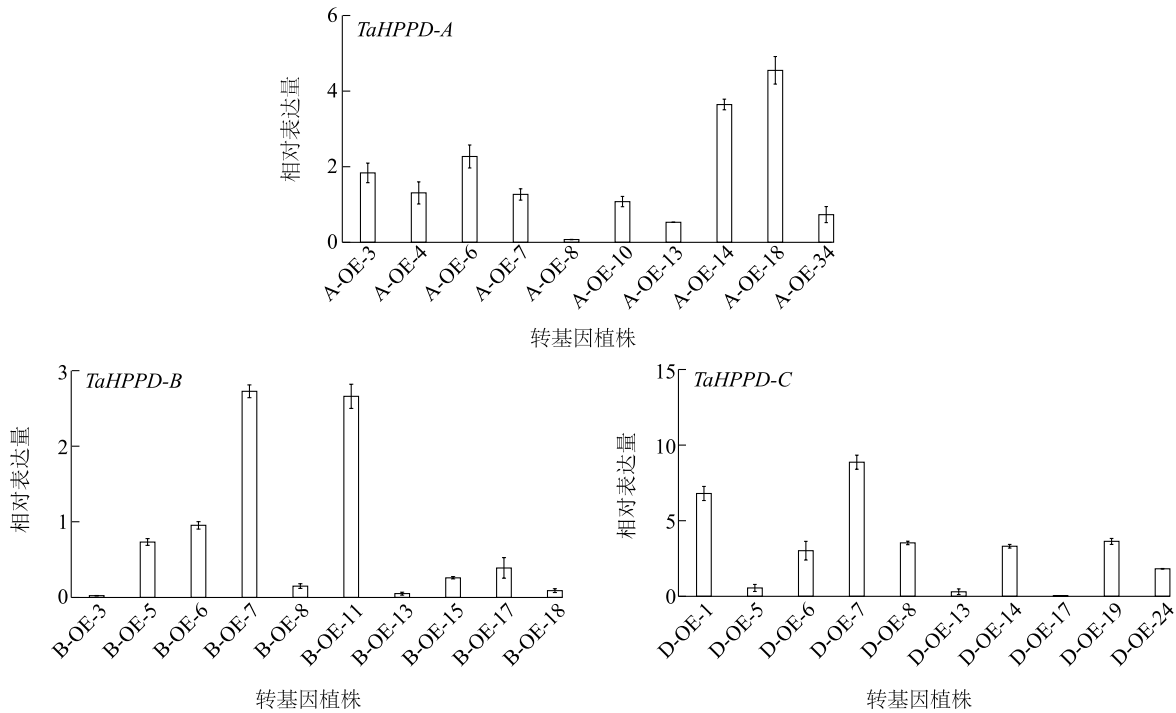
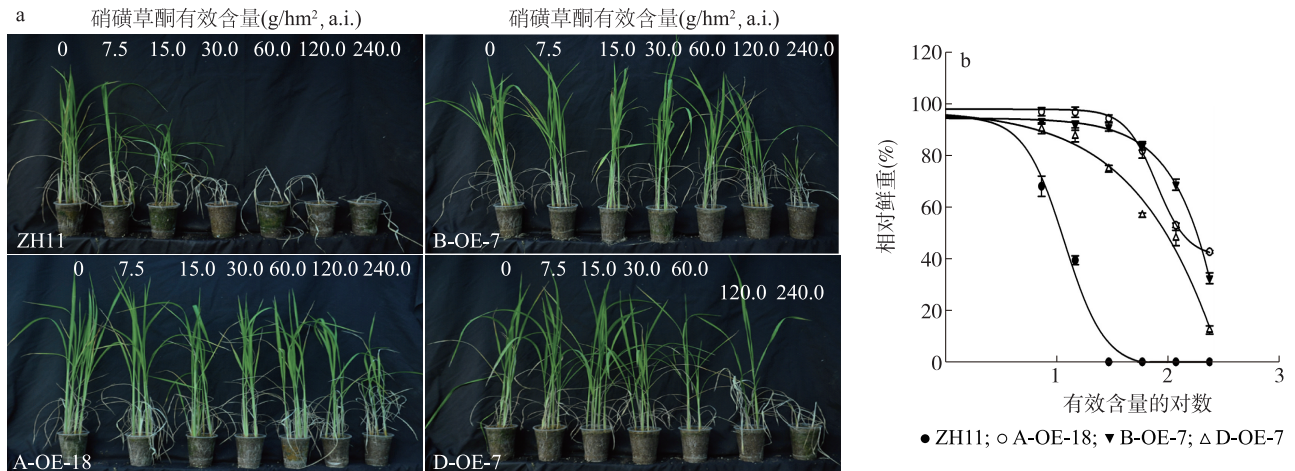


图8 转基因植株中 *TaHPPD-A*、*TaHPPD-B* 和 *TaHPPD-D* 的表达水平
 Fig.8 Expression levels of *TaHPPD-A*, *TaHPPD-B* and *TaHPPD-D* in transgenic plants

对 *TaHPPD* 相对表达量最高的过表达植株 *TaHPPD-A-OE-18*、*TaHPPD-B-OE-7* 和 *TaHPPD-D-OE-7* 及野生型水稻中花 11 喷施不同有效含量硝磺草酮溶液处理 14 d 后表型如图 9a 所示。从图中可以看出,野生型水稻中花 11 在硝磺草酮含量为 15 g/hm², a.i. 时,即出现明显药害,而 *TaHPPD* 过表达株系的硝磺草酮抗性显著提高:*TaHPPD-A-OE-18* 和 *TaHPPD-B-OE-7* 在硝磺草酮含量 ≤ 120 g/hm², a.i. 仍

能正常生长,直到含量达到 240 g/hm², a.i. 时生长才被抑制,而 *TaHPPD-D-OE-7* 能够耐受 60 g/hm², a.i. 的除草剂,在 120 g/hm², a.i. 时出现明显药害。利用 SigmaPlot 10.0 软件,得到过表达植株 *TaHPPD-A-OE-18*、*TaHPPD-B-OE-7* 和 *TaHPPD-D-OE-7* 相对于野生型水稻中花 11 的抗性指数分别为 13.92、15.66、7.63,说明外源 *TaHPPD* 基因过表达能显著增强小麦对硝磺草酮的抗性(图 9b、表 4)。



ZH11: 中花 11 植株; A-OE-18、B-OE-7、D-OE-7 分别为 *TaHPPD-A-OE-18*、*TaHPPD-B-OE-7* 和 *TaHPPD-D-OE-7* 植株。

图9 *TaHPPD* 过表达植株抗硝磺草酮水平
 Fig.9 Herbicide tolerance of *TaHPPD* overexpressing plants to mesotrione

表 4 *TaHPPD* 过表达株系 50% 生长量所对应的硝磺草酮有效含量 (GR_{50}) 及抗性指数

Table 4 The effective dose (GR_{50}) of mesotrione corresponding to 50% growth and resistance index of *TaHPPD* overexpression lines

材料	GR_{50} (g/hm ² , a.i.)	抗性指数 (RI)
ZH11	11.74±0.63	1.00
A-OE-18	163.37±11.07	13.92
B-OE-7	183.81±5.09	15.66
D-OE-7	89.62±8.24	7.63

GR_{50} : 50% 生长量所对应的硝磺草酮有效含量。

3 讨论与结论

HPPD 是植物代谢途径中的关键酶, 其表达量与 *HPPD* 抑制剂类除草剂抗性呈正相关, 因此明确植物 *HPPD* 基因表达特征是创制抗除草剂种质的前提条件。本研究克隆了小麦 3 个 *HPPD* 等位基因并对其表达特征进行分析。研究表明, 赤霉病菌、白粉病菌及条锈病菌等生物胁迫和低温、干旱、氮饥饿等非生物胁迫, 均能显著诱导小麦 *HPPD* 基因表达。小麦 *HPPD* 基因启动子区域也存在低温响应元件、厌氧响应元件、伤害诱导元件、干旱诱导元件及多种激素响应元件, 说明 *HPPD* 可能参与多种植物代谢, 是植物代谢网络的关键节点。同时, Kim 等^[36] 研究发现, 甘薯 *IbHPPD* 过表达植株对盐、干旱以及氧化胁迫的耐受性显著提高。其原因可能是 *HPPD* 能催化维生素 E 的合成^[37], 而维生素 E 具有抗氧化作用, 能够捕捉自由基, 减少自由基对细胞的损害^[38]。

Park 等^[14] 的研究结果表明, 拟南芥的 *HPPD* 基因表达受黑暗诱导并被光抑制, 存在明显的昼夜节律。本研究发现, 小麦 3 个 *HPPD* 等位基因同样表现出明显的昼夜节律。由黑暗转光照处理 12 h 和 24 h, *TaHPPD-A* 的相对表达量分别比黑暗对照显著降低 80.9% 和 88.1%; *TaHPPD-B* 光照处理 12 h 时相对表达量变化不明显, 但光照处理 24 h 时比对照下降 40.4%; *TaHPPD-D* 在光照处理 12 h 和 24 h 的相对表达量比黑暗对照分别下降 63.3% 和 63.6%。此外, 与弱光照条件相比, 强光照条件下喷施 *HPPD* 抑制剂类除草剂, 药害出现更快且更为严重, 除草效果好, 这可能与光照对 *HPPD* 表达的调控密切相关^[39]。 *HPPD* 基因昼夜节律性表达模式为抗除草

剂种质创制提供了新方向。若能打破 *HPPD* 基因的节律性表达, 减缓光照下 *HPPD* 表达量的下降幅度, 有望显著提升植物的 *HPPD* 抑制剂类除草剂抗性。

显色反应是快速鉴定 *HPPD* 突变体抗性的常用方法^[21]。水稻对 *HPPD* 抑制剂类除草剂不具有耐受性, 而玉米对该类除草剂具有天然抗性。同样水稻 *OsHPPD* 在 100 μmol/L 硝磺草酮显色液中已无法显色, 而玉米 *ZmHPPD* 在 200 μmol/L 硝磺草酮显色液中仍正常显色。本研究结果表明, 小麦 *TaHPPD-B* 和 *TaHPPD-D* 在 200 μmol/L 硝磺草酮显色液中能够显色。但 *HPPD* 抑制剂类除草剂对小麦有明显的药害^[40], 说明小麦对 *HPPD* 抑制剂类除草剂没有抗性, 因此显色反应无法用于检测 *TaHPPD* 的抗性水平。SDS-PAGE 试验结果表明, 小麦 *HPPD* 蛋白表达量要显著高于水稻和玉米, 这可能是小麦 *HPPD* 能够在高浓度硝磺草酮显色液中显色的原因。因此在开展显色反应时必须考虑蛋白质的表达量, 并结合蛋白酶活性进行判断。

植物 *HPPD* 基因的表达量与其对 *HPPD* 抑制剂类除草剂的抗性正相关。抗性长芒苋 (*Amaranthus palmeri* S. Watson) 的 *HPPD* 基因序列与敏感型长芒苋无显著差异, 但其表达量显著高于敏感亲本^[41]。Lu 等^[42] 通过基因倒位和重复, 成功构建双靶点 CRISPR 载体, 编辑的水稻植株 *PPO1* 和 *HPPD* 基因表达量提高了数十倍, 使水稻植株对 *HPPD* 抑制剂类除草剂的抗性显著提高。 *HPPD* 基因过表达除了赋予植株除草剂抗性外, 还具有提升植株抗逆性及优化营养品质等功能。作为植物代谢通路中的关键酶, *HPPD* 催化产物物质体醌作为八氢番茄红素脱氢酶 (*PDS*) 的辅酶因子, 参与类胡萝卜素合成^[43]。研究表明, 在 6M-OE 植株中积累了更多的类胡萝卜素^[21]; 大麦 *HPPD* 基因在烟草中过表达能提高烟草种子维生素 E 含量^[44]; 拟南芥 *HPPD* 基因过表达植株中的维生素 E 含量亦显著提高^[45]。这些研究表明 *HPPD* 基因过表达植株是理想的优质育种材料。本研究获得的 3 个小麦 *HPPD* 等位基因过表达植株抗性鉴定结果表明, 3 个小麦 *HPPD* 等位基因的过表达株系的硝磺草酮抗性均显著提高, 抗性指数为 7.63~15.66。

综上所述, 本研究系统解析了小麦 *HPPD* 基因的特征与功能, 不仅为揭示其抗性机制提供了理论依据, 更为抗 *HPPD* 抑制剂类除草剂小麦种质的创

制奠定了重要基础。

参考文献:

- [1] 刘学,陶岭梅,吴仁海. 浅析小麦田恶性杂草多花黑麦草综合防控[J]. 农药科学与管理,2024,45(7):1-4.
- [2] 董立尧,王豪,高海涛,等. 我国小麦田禾本科杂草对精噁唑禾草灵的抗药性研究进展[J]. 植物保护,2023,49(5):303-315.
- [3] 彭程. 日本看麦娘与蔺草对冬小麦的影响和防除技术研究[D]. 扬州:扬州大学,2023.
- [4] 许锦程,毕亚玲,李君君,等. 江淮部分地区麦田日本看麦娘对精噁唑禾草灵的抗性及其交互抗性[J]. 麦类作物学报,2022,42(7):892-901.
- [5] 郭文磊. 小麦田看麦娘(*Alopecurus aequalis*)对精噁唑禾草灵和甲基二磺隆抗性研究[D]. 泰安:山东农业大学,2017.
- [6] 袁国徽. 小麦田耿氏硬草对精噁唑禾草灵的抗性研究[D]. 泰安:山东农业大学,2016.
- [7] 莫博程. 棒头草 ACCase 2078 位突变对精噁唑禾草灵抗性的研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2023.
- [8] 潘浪. 麦田蔺草(*Beckmannia syzigachne*)对精噁唑禾草灵抗药性及其机理研究[D]. 南京:南京农业大学,2018.
- [9] 周蕴赉,李正名. *HPPD* 抑制剂类除草剂作用机制和研究进展[J]. 世界农药,2013,35(1):1-7.
- [10] 唐剑峰,吴建挺,袁雪. 除草剂安全剂的研究进展概况[J]. 世界农药,2021,43(2):6-14.
- [11] AHRENS D H, LANGE D G, MÜLLER D T, et al. 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors in combination with safeners: solutions for modern and sustainable agriculture[J]. *Angewandte Chemie International Edition*,2013,52(36):9388-9398.
- [12] 方韬,夏子涵,帅佳雪,等. 向日葵 *HPPD* 基因的克隆与表达分析[J]. 分子植物育种,2023,49(2):426-437.
- [13] 张云秀,蒋旭,尉春雪,等. 紫花苜蓿高迁移率族蛋白基因 *Ms HMG-Y* 调控花期的功能分析[J]. 中国农业科学,2022,55(16):3082-3092.
- [14] PARK T K, KANG I A, PARK C H, et al. Inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase expression by brassinosteroid reduces carotenoid accumulation in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*,2022,73(5):1415-1428.
- [15] FALK J O N, KRAUB N, DÄHNHARDT D, et al. The senescence associated gene of barley encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is expressed during oxidative stress [J]. *Journal of Plant Physiology*,2002,159(11):1245-1253.
- [16] REN W W, ZHAO L X, ZHANG L D, et al. Molecular cloning and characterization of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene from *Lactuca sativa* [J]. *Journal of Plant Physiology*,2011,168(10):1076-1083.
- [17] JIANG J S, CHEN Z H, BAN L P, et al. P-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Medicago sativa* is involved in vitamin E biosynthesis and abscisic acid-mediated seed germination [J]. *Scientific Reports*,2017,7:40625.
- [18] DEZFULIAN M H, FOREMAN C, JALILI E, et al. Acetolactate synthase regulatory subunits play divergent and overlapping roles in branched-chain amino acid synthesis and *Arabidopsis* development [J]. *BMC Plant Biology*,2017,17(1):71.
- [19] SIEHL D L, TAO Y M, ALBERT H, et al. Broad 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitor herbicide tolerance in soybean with an optimized enzyme and expression cassette [J]. *Plant Physiology*,2014,166(3):1162-1176.
- [20] CHEN L, LIU R, TAN Q, et al. Improving the herbicide resistance of rice 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by DNA shuffling basis-directed evolution [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,2023,71(41):15186-15193.
- [21] YANG Y W, ZHOU Z Z, LIU T L, et al. Multisite mutagenesis of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (*HPPD*) enhances rice resistance to *HPPD* inhibitors and its carotenoid contents [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,2024,72(40):22063-22072.
- [22] WANG M G, ZHONG Y L, HE Y X, et al. Identifying resistant mutations in the herbicide target site of the plant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase [J]. *Plant Biotechnology Journal*,2025,23(1):75-77.
- [23] JIAO C Z, XIE X M, HAO C Y, et al. Pan-genome bridges wheat structural variations with habitat and breeding [J]. *Nature*,2025,637(8045):384-393.
- [24] PAOLACCI A R, TANZARELLA O A, PORCEDDU E, et al. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat [J]. *BMC Molecular and Cell Biology*,2009,10:11.
- [25] BISELLI C, BAGNARESI P, FACCIOLI P, et al. Comparative transcriptome profiles of near-isogenic hexaploid wheat lines differing for effective alleles at the 2DL FHB resistance QTL [J]. *Frontiers in Plant Science*,2018,9:37.
- [26] ZHANG H, YANG Y Z, WANG C Y, et al. Large-scale transcriptome comparison reveals distinct gene activations in wheat responding to stripe rust and powdery mildew [J]. *BMC Genomics*,2014,15(1):898.
- [27] LI Q, ZHENG Q, SHEN W Y, et al. Understanding the biochemical basis of temperature-induced lipid pathway adjustments in plants [J]. *The Plant Cell*,2015,27(1):86-103.
- [28] LIU Z S, XIN M M, QIN J X, et al. Temporal transcriptome profiling reveals expression partitioning of homeologous genes contributing to heat and drought acclimation in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *BMC Plant Biology*,2015,15:152.
- [29] AMIRBAKHHTIAR N, ISMAILI A, GHAFFARI M R, et al. Transcriptome response of roots to salt stress in a salinity-tolerant bread wheat cultivar [J]. *PLoS One*,2019,14(3):e0213305.
- [30] SHAHRIARI A G, MAJLÁTH I, ALIAKBARI M, et al. Identifying critical regulators in the viral stress response of wheat (*Triticum aestivum* L.) using large-scale transcriptomics data [J]. *Agronomy*

- omy,2023,13(10):2610.
- [31] ZHANG Y, SU J B, DUAN S, et al. A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes [J]. *Plant Methods*, 2011, 7(1):30.
- [32] 周田田,唐兆成,李笑,等. 利用基因编辑技术创制低谷蛋白水稻种质[J]. *作物学报*,2024,50(10):2435-2446.
- [33] 卢扬江,郑康乐. 提取水稻 DNA 的一种简易方法[J]. *中国水稻科学*,1992,6(1):47-48.
- [34] 高志勇. 一种水稻总 RNA 提取的简易方法[J]. *曲阜师范大学学报(自然科学版)*,2005,31(4):97-98.
- [35] 冯久焕,张廷璧. 国产稗属植物的细胞学研究[J]. *武汉植物学研究*,1993(4):293-299.
- [36] KIM S E, BIAN X F, LEE C J, et al. Overexpression of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (*lhHPPD*) increases abiotic stress tolerance in transgenic sweetpotato plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*,2021,167:420-429.
- [37] TSEGAYE Y, SHINTANI D K, DELLAPENNA D. Overexpression of the enzyme p-hydroxyphenolpyruvate dioxygenase in *Arabidopsis* and its relation to tocopherol biosynthesis[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*,2002,40(11):913-920.
- [38] NIK E. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger;*in vitro* and *in vivo* evidence [J]. *Free Radical Biology and Medicine*,2014,66:3-12.
- [39] 张国霞. 水稻中油菜素内酯与磷饥饿应答相互调控的分子机制解析[D]. 北京:中国科学院大学,2020.
- [40] ZHAO C X, WANG L H, QU G H, et al. Development of an HPPD-inhibitor resistant wheat and multiomics integrative analysis of herbicide toxicity and *OsHIS1* detoxification in wheat[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(46):25811-25826.
- [41] NAKKA S, GODAR A S, WANI P S, et al. Physiological and molecular characterization of hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (*HPPD*)-inhibitor resistance in palmer amaranth (*Amaranthus palmeri* S. Wats.) [J]. *Frontiers in Plant Science*,2017,8:555.
- [42] LU Y, WANG J Y, CHEN B, et al. A donor-DNA-free CRISPR/Cas-based approach to gene knock-up in rice[J]. *Nature Plants*, 2021,7(11):1445-1452.
- [43] NORRIS S R, BARRETTE T R, DELLAPENNA D. Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation[J]. *The Plant Cell*,1995,7(12):2139-2149.
- [44] FALK J, ANDERSEN G, KERNEBECK B, et al. Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves[J]. *FEBS Letters*,2003,540(1/2/3):35-40.
- [45] CROWELL E F, MCGRATH J M, DOUCHES D S. Accumulation of vitamin E in potato (*Solanum tuberosum*) tubers[J]. *Transgenic Research*,2008,17(2):205-217.

(责任编辑:石春林)