

郭冬妹, 杨郁文, 李笑, 等. 基于基因编辑的水稻 4-羟基苯丙酮酸双加氧酶(*HPPD*) 基因突变体库构建及抗 *HPPD* 抑制剂类除草剂种质筛选[J]. 江苏农业学报, 2026, 42(5): 865-875.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2026.05.001

基于基因编辑的水稻 4-羟基苯丙酮酸双加氧酶 (*HPPD*) 基因突变体库构建及抗 *HPPD* 抑制剂类除草剂种质筛选

郭冬妹, 杨郁文, 李笑, 余月

(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: 为鉴定更多的抗性新位点, 创制更多的抗 4-羟基苯丙酮酸双加氧酶(*HPPD*) 抑制剂类除草剂水稻种质, 实现 *HPPD* 抑制剂类除草剂在水稻生产中的应用, 本研究采用基因编辑技术介导的体内定向进化策略, 针对水稻 *HPPD* 基因的编码区、上游启动子区及 5' 非翻译区, 设计 300 个基因编辑靶标位点, 分别利用碱基编辑器和多基因敲除突变载体构建突变体库, 并进行基因突变当代植株基因型鉴定和测序, 及突变体对除草剂硝磺草酮的抗性鉴定。结果表明, 在 *HPPD* 基因编码区的 99 个基因编辑靶标位点检测到碱基突变, 在编码区上游区域检测到 43 种不同形式的纯合插入突变或缺失突变。鉴定到 2 个对 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 硝磺草酮抗性提高的突变体株系, 包括 1 个编码区碱基突变的突变体株系和 1 个编码区上游碱基缺失的突变体株系。编码区碱基突变的突变体株系的突变类型为 *HPPD* 蛋白第 419 位甘氨酸(Glycine, G)突变为天冬氨酸(Aspartic acid, D); 编码区上游碱基缺失突变体株系存在 168 bp 的碱基缺失, 且其 *HPPD* 基因表达水平是野生型的 8.0 倍。本研究为培育抗 *HPPD* 抑制剂类除草剂的水稻品种提供了新的遗传材料和方法。

关键词: 水稻; *HPPD* 基因; 抗 *HPPD* 抑制剂类除草剂种质

中图分类号: S511 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2026)05-0865-11

Genome editing-mediated mutant library construction of rice 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (*HPPD*) gene and identification of germplasm with resistance to *HPPD*-inhibiting herbicides

GUO Dongshu, YANG Yuwen, LI Xiao, YU Yue

(*Institute of Germplasm Resources and Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China*)

Abstract: To identify more new resistance sites, create more rice germplasm resistant to 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (*HPPD*)-inhibiting herbicides, and realize the application of *HPPD*-inhibiting herbicides in rice production, this study used genome editing technology-mediated *in vivo* directed evolution strategy to design 300 gene editing target sites for the coding region, upstream promoter region and 5' untranslated region of rice *HPPD* gene. The base editor and multi-gene knockout mutation vectors were used to construct the mutant library, and the genotype identification and

sequencing of transgenic contemporary plants were carried out, and the resistance of the mutants to mesotrione was identified. The results showed that base mutations were detected at 99 genome editing target sites in the coding region of *HPPD* gene, and 43 different forms of

收稿日期: 2025-12-31

基金项目: 江苏省重点研发计划项目——现代农业(BE2022365)

作者简介: 郭冬妹(1988-), 女, 辽宁锦州人, 博士, 副研究员, 主要从事水稻基因编辑技术和抗除草剂育种研究。(Tel) 13811136765; (E-mail) guodongshugdong@163.com

homozygous insertion mutations or deletion mutations were detected in the upstream region of the coding region. Two mutant lines with increased resistance to 0.3 $\mu\text{mol/L}$ mesotrione were identified, including one mutant line carrying a base mutation in the coding region and one mutant line carrying a base deletion mutation in the upstream region of the coding region. The mutation type in the mutant line carrying a base mutation in the coding region was the mutation of glycine (G) to aspartic acid (D) at the 419th site of the HPPD protein. The mutant line carrying a base deletion in the upstream of the coding region had a base deletion of 168 bp, and its HPPD gene expression level was 8.0 times that of the wild type. This study provides new genetic materials and methods for the cultivation of rice varieties resistant to HPPD-inhibiting herbicides.

Key words: rice; HPPD gene; germplasm resistant to HPPD-inhibiting herbicides

稻田杂草严重危害水稻生产。近年来,随着省工、节本的水稻直播技术推广,稻田杂草危害面积和强度均呈增加趋势^[1-2]。目前,使用除草剂防治杂草是最为经济有效的手段^[3-4],稻田常用除草剂包括酰胺类、磺酰脲类和合成激素类等除草剂^[5]。然而,单一靶标除草剂的连年超量使用加速了抗性杂草的产生,使得除草剂的使用效果越来越差。因此,亟待开发新型作用靶标的除草剂用于防治稻田抗性杂草。然而,新型除草剂的开发难度较大且成本较高,近30年来没有全新靶标的除草剂问世^[6-7]。鉴于此,使用应用于其他植物的除草剂进行稻田杂草防治成为一种可行的替代策略。常用于玉米田杂草防治的4-羟基苯丙酮酸双加氧酶(HPPD)抑制剂类除草剂对于多种稻田杂草具有较好的防治效果,并且具有低残留、环境友好等特点,对于稻田除草具有巨大的应用潜力^[7-9]。然而,绝大多数HPPD抑制剂类除草剂对水稻产生不同程度的药害。因此,培育抗HPPD抑制剂类除草剂水稻品种是将HPPD抑制剂类除草剂应用于稻田除草的先决条件^[3,10]。

HPPD是酪氨酸代谢途径中的关键酶,能催化4-羟基苯基丙酮酸(4-hydroxyphenylpyruvic acid, HPPA)生成尿黑酸(Homogentisic acid, HGA),并进一步生成质体醌和生育酚^[7-8]。质体醌是光合作用电子传递链的重要辅助因子,生育酚是重要的抗氧化剂。HPPD功能受到抑制后将导致质体醌和生育酚无法正常合成,进而影响植物光合作用和类胡萝卜素的生物合成,并导致植株白化死亡^[7-8]。植物对除草剂的抗性主要分为靶标抗性和非靶标抗性。Wang等^[11]基于靶标抗性,利用碱基编辑器创制水稻HPPD基因编码区单碱基突变体库,并筛选抗性突变体;Wu等^[9]利用基因编辑载体改造水稻HPPD基因3'非翻译区,创制抗HPPD抑制剂类除草剂的突变体;Lu等^[12]利用基因编辑介导的基因重复技术提高水稻HPPD基因的表达水平。另有一些研

究^[3,7,10,13]通过细菌中的定向进化或蛋白结构分析鉴定到水稻HPPD基因的抗除草剂位点,并通过过量表达或异源表达突变基因等方式验证突变位点的抗除草剂效果。Maeda等^[14]基于非靶标抗性,鉴定到1个三酮类除草剂的修饰基因HISI,该基因能对除草剂进行羟基化进而实现解毒作用,且粳稻比籼稻具有更强的除草剂抗性。目前,已报道的水稻HPPD基因抗性突变位点数量及其突变体的抗性水平仍较为有限,难以达到生产上的要求。水稻HPPD蛋白第336位点(P336L)和338位点(N338D)的氨基酸突变能够使水稻突变体在萌发阶段对200 nmol/L的硝磺草酮、异噁唑草酮或环磺酮具有微弱的耐受性,在苗期对40~50 $\mu\text{mol/L}$ 的异噁唑草酮和环磺酮具有一定的抗性^[11]。其他已报道的水稻HPPD基因抗性位点的验证依靠过量表达或异位表达,缺乏水稻内源突变体的试验数据支持^[3,7,10,13]。鉴定更多具有抗性位点的HPPD基因和抗性突变体有助于深化对抗性机制的理解,也能为创制高抗HPPD抑制剂类除草剂的水稻种质提供更为丰富的遗传材料。

近年来发展起来的基因编辑技术已经成为作物基因改造和优化的强大工具^[15]。基于定向进化的策略,利用基因编辑介导的碱基编辑器和基因敲除载体对水稻^[9,11]、棉花^[16]、拟南芥^[17]等植物中除草剂靶标基因进行定点突变,构建基因编码区以及非编码区的突变体库,并利用相应除草剂进行筛选,获得抗性突变体。然而该种策略存在一定的随机性,且不同研究采用的筛选药剂和筛选方法各有不同,难以一次性鉴定出所有的潜在抗性位点。本研究利用腺嘌呤碱基编辑器(Adenine base editor, ABE)和胞嘧啶碱基编辑器(Cytidine base editor, CBE)突变HPPD基因编码区以及利用多靶标基因敲除载体突变HPPD基因上游启动子区和5'非翻译区,构建水稻HPPD基因的突变体库,并利用硝磺草酮进行抗HPPD抑制剂类

除草剂水稻种质鉴定,为创制抗 *HPPD* 抑制剂类除草剂的水稻种质提供新的遗传材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水稻粳稻(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*)品种秀水 134 作为转基因受体,由江苏省农业科学院种质资源与生物技术研究所保存。

1.2 质粒载体构建

腺嘌呤碱基编辑器(ABE8e-NGG/NG/Ry)由上海辰山植物园华凯博士提供,胞嘧啶碱基编辑器(FERNY-NG)和基因敲除载体由华南农业大学刘耀光教授和祝钦泷教授提供。

针对水稻 *HPPD* 基因(*LOC_Os02g07160*)的编码区,设计适用于 ABE8e-NGG/NG/Ry 和 FERNY-NG 的靶标位点,选取 131 个靶点(A1~A131)用于构建 ABE8e-NGG 和 ABE8e-NG,21 个靶点(ARY1~ARY21)用于构建 ABE8e-Ry,105 个靶点(C1~C105)用于构建 FERNY-NG。委托金斯瑞生物科技股份有限公司合成引物,每对引物退火形成双链,对于 ABE8e-NGG/NG/Ry,通过 T4 连接酶[宝日医生物技术(北京)有限公司产品]连入利用限制性内切酶 *Bsa* I [纽英伦生物技术(北京)有限公司产品]线性化的碱基编辑终载体(ABE 载体);对于 FERNY-NG,按照文献[18]的方法构建碱基编辑终载体(CBE 载体)。靶标位点序列委托南京擎科生物科技有限公司进行 Sanger 测序验证,载体骨架通过限制性内切酶进行酶切验证。

选取上游基因编码区序列结束的位置到 *HPPD* 基因起始密码子(ATG)前的 2 500 bp 区域作为水稻 *HPPD* 基因的启动子区和 5'非翻译区(UTR)用于突变体构建。设计 43 个间隔为 50~200 bp 的靶标位点,每 4 个靶标为 1 组,构建在同一个基因敲除载体上,共计得到 14 个基因敲除载体,分别命名为 CRISPR-HPPDP-4T-1~CRISPR-HPPDP-4T-14,前 1 个载体的最后 1 个靶标与后 1 个载体的第 1 个靶标相同。参照文献[18]的“Golden Gate”策略进行 4 靶标基因敲除载体的构建,构建载体的靶标位点序列及骨架分别进行 Sanger 测序验证和限制性内切酶酶切验证。

1.3 农杆菌介导的水稻遗传转化

利用热激法将每 1 个碱基编辑载体和编码区上

游 4 靶点编辑载体分别转入农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 EHA105(AC1010,上海唯地生物技术有限公司产品),利用含有终浓度为 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 利福平的液体 LB 培养基培养农杆菌至 600 nm 吸光值(OD_{600})约为 2,用于水稻转化。利用培养 4 周左右的秀水 134 成熟胚诱导产生的愈伤组织作为遗传转化的外植体。对于 ABE 和 CBE 载体,257 个碱基编辑载体按每 5~10 个质粒为 1 组,通过农杆菌法混合转化水稻。其中,ABE 载体质粒分为 19 个转化组,CBE 载体质粒分为 18 个转化组。每组质粒对应的农杆菌菌液等体积混合,利用共培养液调节农杆菌菌液的 OD_{600} 至 0.08,转化 1 份愈伤组织;对于编码区上游多基因敲除载体,每个载体单独转化 1 份愈伤组织。利用含潮霉素 B 质量浓度为 50 mg/L 的培养基筛选阳性愈伤组织,利用含潮霉素 B 质量浓度为 25 mg/L 的分化培养基培养潮霉素抗性愈伤组织直至出苗^[19]。

1.4 突变体基因型鉴定

针对水稻 *HPPD* 基因编码区设计两对序列特异性引物,分别用于扩增包含第一外显子和第二外显子的片段;针对编码区上游序列,设计 5 对序列特异性引物覆盖全部靶标位点,引物序列见表 1。利用 CTAB 法提取转基因当代(T_0 代)潮霉素抗性幼苗的叶片总 DNA(CTAB 配方:100 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 2% CTAB)。利用聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)扩增含有目标位点的片段。PCR 体系:2.00 μ L 100 ng/ μ L 基因组 DNA, 12.50 μ L 2 \times Rapid Taq Master Mix(P222,南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品),0.75 μ L 10 μ mol/L 正向引物,0.75 μ L 10 μ mol/L 反向引物,补充去离子水至 25.00 μ L。PCR 程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 20 s,56 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环。PCR 产物委托江苏康为世纪生物科技股份有限公司进行 Sanger 测序或纳米孔测序^[20],利用 Vector NTI 软件比对测序结果和野生型序列,并结合峰图确定突变形式和突变位置。

对于 T_0 代的自交后代(T_1 代)中的抗除草剂植株,提取叶片总 DNA,利用引物 *HPPD*-E2F 和 *HPPD*-E2R 进行 PCR,鉴定编码区突变体基因型;利用引物 *HPPD*-P1F 和 *HPPD*-P1R 鉴定编码区上游突变体基因型,PCR 体系和程序同 T_0 代潮霉素抗性

植株的鉴定方法,引物序列见表 1。PCR 产物直接进行 Sanger 测序。

1.5 突变体除草剂抗性鉴定

对于编码区和编码区上游突变体库, T_0 代检测到突变植株自交获得的种子用于生产中常用的 *HPPD* 抑制剂类除草剂硝磺草酮的抗性鉴定。采用水培法鉴定抗性突变体。将 T_1 代突变体种子用清水浸泡,置于 37 °C 培养箱培养至种子露白,再转移到含有改良型霍格兰营养液(NSP1020,北京酷来搏科技有限公司产品)的 96 孔水培盒中,置于光周期 16 h/d、昼温 32 °C、夜温 28 °C 的水稻生长室继续培养,每盒种植 48 株。每个株系鉴定 8~12 株 T_1 代幼苗,待幼苗长至 2~3 叶期时,向营养液中加入 27 μ L 10 mmol/L 的硝磺草酮母液,使培养液硝磺草酮终浓度为 0.3 μ mol/L。另外向营养液中加入 27 μ L 二甲基亚砜(DMSO)溶剂作为不加除草剂的对照。培养 14 d 后测定不同处理植株高度。每处理 3 次重复。

1.6 基因表达水平检测

取 3 叶 1 心期、生长状态一致的野生型植株和 T_1 代抗硝磺草酮突变体的叶片,利用总 RNA 小量提

取试剂盒(RC411-01,南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品)提取叶片 RNA,进一步利用逆转录试剂盒(R323-01,南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品)进行逆转录反应,合成 cDNA 模板。根据水稻 *HPPD* 基因的编码序列设计跨内含子序列的特异性引物 *HPPD*-QF 和 *HPPD*-QR,利用实时定量 PCR (qPCR) 检测水稻 *HPPD* 基因表达水平。以水稻 *Ubiquitin* 基因 (*LOC_Os03g13170*) 作为内参基因, *OsUBQ*-QF 和 *OsUBQ*-QR 为检测引物(表 1),进行 qPCR 扩增。qPCR 体系为: 2 \times ChamQ Universal SYBR qPCR Master 预混液(Q312-02,南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品) 10.00 μ L, 10 μ mol/L 正向引物 0.50 μ L, 10 μ mol/L 反向引物 0.50 μ L, cDNA 模板 3.00 μ L, 补充去离子水至 20.00 μ L。PCR 反应程序为 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 40 个循环。PCR 产物熔解曲线测定温度范围为 60~95 °C,以 0.1 °C 为梯度连续采集荧光信号,生成熔解曲线。根据相对于内参基因表达水平的倍数得到 *HPPD* 基因的相对表达水平。

表 1 引物列表

Table 1 Primer lists

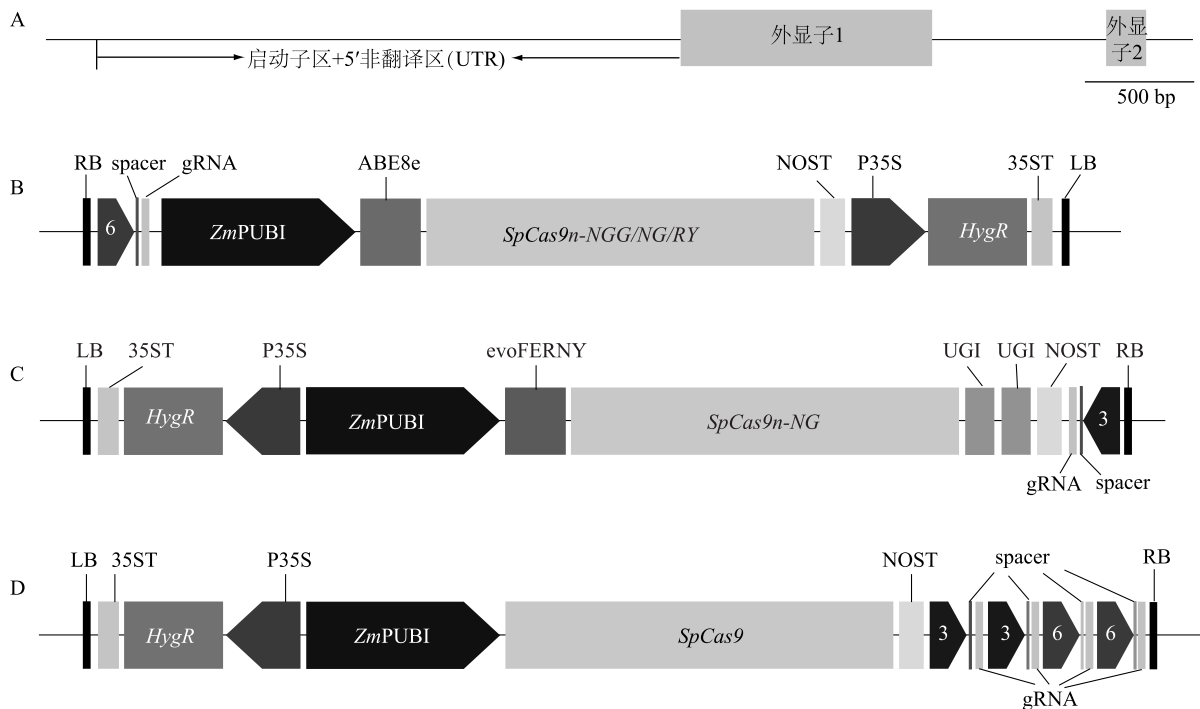
引物名称	序列(5'→3')	用途
<i>HPPD</i> -E1F	ACCAGAGGACAAATCCCGT	<i>HPPD</i> 基因第一外显子基因型鉴定
<i>HPPD</i> -E1R	GTGTCACAATCTTCAGAAAGGC	
<i>HPPD</i> -E2F	ACTACATCTAAGGTCCATGG	<i>HPPD</i> 基因第二外显子基因型鉴定
<i>HPPD</i> -E2R	AGCAGCAATGCCAACACTAG	
<i>HPPD</i> -P1F	CCATTACTACTCTCCCGATTTC	<i>HPPD</i> 基因编码区上游序列鉴定
<i>HPPD</i> -P1R	ACCAGAGCTCGACGTGCTGGAA	
<i>HPPD</i> -P2F	TTGAGACAGCTCATTCTACCGC	<i>HPPD</i> 基因编码区上游序列鉴定
<i>HPPD</i> -P2R	GGGAAACAAATTTTGTGGTAAC	
<i>HPPD</i> -P3F	GAATAAGACGAACGGTCAAACATGTG	<i>HPPD</i> 基因编码区上游序列鉴定
<i>HPPD</i> -P3R	GAATCGGGGAGAGTAGTAATGGAGGA	
<i>HPPD</i> -P4F	GAGTTTCCAGATTGGCTTCC	<i>HPPD</i> 基因编码区上游序列鉴定
<i>HPPD</i> -P4R	GGTTATCGTGATGGCTCTTC	
<i>HPPD</i> -P5F	GCTGAAGAATCGAAAGACGG	<i>HPPD</i> 基因编码区上游序列鉴定
<i>HPPD</i> -P5R	GAGGTAGTATGGCATACTACA	
<i>HPPD</i> -QF	ACAGGGATGACCAGGGGCTGTTGC	<i>HPPD</i> 基因表达水平检测
<i>HPPD</i> -QR	GCTTGCTTGGCTTCAAGGGATTTCTCA	
<i>OsUBQ</i> -QF	GCTCCGTGGCGGTATCAT	内参基因表达水平检测
<i>OsUBQ</i> -QR	CGGCAGTTGACAGCCCTAG	

2 结果与分析

2.1 水稻 *HPPD* 基因编码区突变体库构建

水稻 *HPPD* 基因编码区长度为1 341 bp,包括 2 个外显子(图 1A)。本研究选择识别 NGG PAM

(Protospacer adjacent motif, 前间隔序列邻近基序) (ABE8e-NGG)、NG PAM (ABE8e-NG) 和 RY PAM (ABE8e-RY) 的 3 种 ABE 载体(图 1B)^[21-22] 和识别 NG PAM 的 CBE 载体(FERNY-NG)(图 1C)^[23] 用于构建水稻 *HPPD* 基因编码区碱基突变体库。



A: 水稻 *HPPD* 基因结构, 灰色方框表示 2 个外显子, 外显子间的黑色短线代表内含子, 外显子 1 上游黑色直线标注启动子区和 5' 非翻译区 (UTR); B: 腺嘌呤碱基编辑器 (ABE8e) 载体 T-DNA 区段示意图; C: 胞嘧啶碱基编辑器 (evoFERNY) 载体 T-DNA 区段示意图; D: 多基因编辑载体 T-DNA 区段示意图。ZmPUBI: 玉米 *Ubiquitin1* 基因启动子; *SpCas9n-NGG/NG/Ry*: 优化后的识别不同 PAM 的酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) Cas9 切口酶编码基因; NOST: NOS 终止子; P35S: 花椰菜花叶病毒 (Cauliflower mosaic virus, CaMV) 35S 启动子; *HygR*: 潮霉素抗性基因; 35ST: 35S 终止子; LB: T-DNA 左边界; RB: T-DNA 右边界; *SpCas9n-NG*: 优化后的识别 NG PAM 的 Cas9 切口酶编码基因; evoFERNY: 优化后的胞嘧啶脱氨酶; UGI: 尿嘧啶糖基化酶抑制子 (uracil glycosylase inhibitor); *SpCas9*: 按照水稻进行密码子优化的 Cas9 编码基因; 3: 水稻 U3b 启动子; 6: 水稻 U6b 启动子; spacer: 基因编辑靶标位点; gRNA: 引导 RNA。

图 1 水稻 *HPPD* 基因结构及基因编辑载体 T-DNA 区元件示意图

Fig.1 Schematic diagrams of rice *HPPD* gene structure and T-DNA region of genome editing vectors

对于 *HPPD* 基因编码区, 利用单碱基编辑技术共得到 2 850 株 T_0 代潮霉素抗性植株。 T_0 代检测到的突变类型和氨基酸变化形式如表 2 所示。从表中可以看出, 在 99 个靶标位点覆盖区域检测到至少 1 种形式的碱基突变, 突变类型包括纯合突变、杂合突变和双等位突变。绝大多数位点的碱基变化为 A→G 和 C→T 的典型突变, 也存在较低比例的非典型突变及片段缺失。蛋白质水平上突变类型分为单氨基酸突变、双氨基酸突变和三氨

基酸突变 3 种类型, 共 182 种不同氨基酸突变形式, 包括错义突变、同义突变、氨基酸缺失或翻译提前终止。

本研究随机选取 1 个转化组的基因突变阳性植株, 扩增载体上含有基因编辑靶点序列的区段进行测序, 在 53 株被测植株中, 有 39 株检测到靶标位点序列, 靶标位点检出率为 73.58%。该转化组混合的全部 8 个载体均检测到 2~10 个独立转化事件, 其中有 2 个靶标位点区域检测到突变(表 3)。

表 2 T₀代碱基编辑突变体蛋白质水平上突变类型鉴定结果Table 2 Identification results of mutation types at the protein level in T₀ generation base editing mutants

突变类型	突变靶点编号	突变氨基酸形式
单氨基酸突变	A2、A4、A6、A8、A9、A10、A11、A19、A21、A22、A23、A24、A28、A30、A31、A32、A35、A36、A39、A47、A60、A63、A65、A66、A71、A80、A88、A89、A90、A91、A92、A93、A95、A96、A98、A100、A101、A105、A106、A107、A109、A112、A118、A119、A122、A123、A124、A125、A128、A129、A130、A131、C3、C4、C5、C12、C19、C27、C28、C32、C33、C34、C37、C40、C41、C47、C52、C60、C69、C71、C72、C76、C88、C95、C96、ARY1、ARY2、ARY3、ARY5、ARY6、ARY8、ARY10、ARY18、ARY19、ARY20	T11A、V14A、S15P、H31Y、R32C、V35A、N38D、N38S、N38G、R43W、F44S、F44L、F44P、H50R、A59A、A59V、A60V、F66P、F66S、F66L、A72V、P73S、R77G、A98T、L100P、F101S、T102A、Y105C、G107N、H109R、A133V、A133A、V140A、V143A、V147A、F154L、F154P、F154S、V158A、F166P、F166S、F166L、F175S、A178V、E179G、Y183H、D198G、L202P、E206G、V208A、S209G、D215G、Y216H、V224I、V225A、V228A、V234A、Y237C、I238V、F241L、F241P、F250S、F250P、F250L、T251A、T257A、S260G、N279D、H283R、H283Y、V303M、Q304R、H305R、I306T、A307T、V313A、L314P、Y340H、V343A、L351P、S352P、Q360R、V364A、T379I、P386S、P386L、T387A、T387T、M392V、M392T、I393T、R395K、R395R、I396V、M399I、E400K、S404G、Q406*、Y408Y、Q409*、K410E、K410G、C413R、G415E、G417K、G417R、G417E、K418E、K418G、N420D、N420G、F425L、S427P、Y431H、K433E、K433G、S434P、A437V、P441P、P441F、P441S、P441L、T442I、V443A、Q444*、G445R、G445K、G445E
双氨基酸突变	A1、A2、A23、A24、A28、A32、A32+A36、A39、A47、A48、A55、A63、A67、A80、A83、A84、A89、A119、A122、A124、A125、A128、A130、A131、C3、C4、C5、C7、C12、C19、C32、C38、C41、C44、C46、C47、C58、ARY1、ARY2、ARY4、ARY5、ARY18、ARY6+ARY20	T6A+T8A、T10A+T11A、G12D+A13T、V14A+S15P、H31Y+R32C、R43W+Q45*、L47P+F49P、A59V+A60V、A72V+P73S、L100P+F101S、G107N+D108N、P122P+S123P、A129V+R130W、A133V+A134V、V140A+V143A、S209G+N210D、D215G+Y216C、Y237C+I238V、E259G+S260G、S260G+H283R、L267F+A268V、Q304R+H305R、V313A+L314P、Y339H+Y340H、L351P+S352P、G360R+E361G、V364A+V366A、L365P+V366A、D367G+R368G、P386L+T387T、P386P+T387A、E391G+M392V、M392T+I393T、C398Y+M399I、M399V+E400G、M399I+E400K、E400G+K401G、S404G+Q406R、Q409H+D3、K410R+S434P、K418K+G419D、K418K+G419N、L424P+F425P、L424P+F425L、Y431H+S434P、P441P+V443A、P441F+T442I、P441S+T442I
三氨基酸突变	A83、A84、C7、C38、ARY2、ARY5	G12D+A13T+V14I、I121T+P122P+S123P、P122P+S123P+F124L、E391G+M392V+I393M、E400G+K401G+D402G、K410K+G411N+G412D

氨基酸以单字母简写表示。A:丙氨酸;R:精氨酸;N:天冬酰胺;D:天冬氨酸;C:半胱氨酸;Q:谷氨酰胺;E:谷氨酸;G:甘氨酸;H:组氨酸;I:异亮氨酸;L:亮氨酸;K:赖氨酸;M:甲硫氨酸;F:苯丙氨酸;P:脯氨酸;S:丝氨酸;T:苏氨酸;W:色氨酸;Y:酪氨酸;V:缬氨酸。氨基酸之间数字表示突变氨基酸的位置。*表示终止密码子;D+数字表示氨基酸缺失数目。

表 3 基因突变当代突变体靶标位点统计

Table 3 Statistics of target sites in T₀ generation mutants with gene mutations

靶标位点编号	测定株数	突变情况
A14	10	未检测到突变
A15	10	未检测到突变
A16	2	未检测到突变
A17	3	未检测到突变
A18	4	未检测到突变
A20	3	未检测到突变
A21	2	2株植株突变
A22	5	3株植株突变

2.2 水稻 HPPD 基因启动子区和 5'非翻译区突变体库构建

分别用在水稻 HPPD 基因的启动子区和 5'UTR 选取的 43 个靶标位点构建的 14 个 4 靶标基因编辑载体转化野生型水稻后共得到 389 株 T₀代潮霉素抗性植株。T₀代被测植株中共检测到 48 种不同的突变形式,包括 43 种纯合突变,其中发生大于 10 bp

的较长片段插入或缺失的突变形式有 27 种(表 4),其余突变体的突变形式为小于 10 bp 的短片段插入或缺失。另有 5 种突变体的 Sanger 测序结果表现为套峰形式,可能为杂合或双等位突变。

2.3 抗除草剂硝磺草酮突变体

0.3 μmol/L硝磺草酮处理 14 d 对秀水 134 野生型和突变体 3 叶期株型和株高的影响如图 2 所示。从图中可以看出,硝磺草酮处理 14 d 时,秀水 134 野生型茎秆和新叶明显白化(图 2A、图 2C),生长受到严重抑制,移栽后植株死亡;绝大多数基因突变阳性植株后代表现出与野生型相似的表型。有 2 个株系的被测植株在硝磺草酮处理 14 d 时茎秆和新叶均保持绿色(图 2B、图 2D),植株形态与 CK(图 2E、图 2G)相似,且其株高显著高于硝磺草酮处理 14 d 时秀水 134 野生型植株,移栽后植株能够成活。这两个株系分别为编码区突变体和编码区上游突变体,本研究将这两个株系分别命名为 CMR 和 PMR。无硝磺草酮处理下,水培 14 d 时 CMR、PMR 突变体株系植株表型和株高均与野生型植株无显著差异。

表 4 T_0 代基因编辑突变体 *HPPD* 基因启动子区和 5' 非翻译区 (UTR) 较长片段 (>10 bp) 插入或缺失突变体的基因型鉴定结果Table 4 Genotyping results of T_0 generation gene-edited mutants with longer fragment (>10 bp) insertions or deletions in the *HPPD* gene promoter region and 5' untranslated region (UTR)

载体编号	靶点组合	碱基突变形式和位置
1	T1~T4	D61(24~84)+D102(92~193)+D5,I1+D76(88~163),I1+I1+D16(158~173),D4+D77(207~283)
2	T4~T7	D429(90~518)+D39(587~625),D16(506~521)+D21(580~600)+I8, ^a I1+D712(579~1 290), ^b I1+D712(579~1 290),D18(576~593)+I5
4	T10~T13	D7+D32(890~921)+I1,D106(878~983)+I15,I1+D13(919~931)+I1,D32(890~921)+D179(952~1 130),D32(890~921)+I1,I1+D50(955~1 004)
10	T28~T31	D721(1064~1784)+D49(1 802~1 850)+I1+I1,D620(1 231~1 850)+I3+I1+I1,I1+D84(1 852~1 935),D70(1 845~1 914)+I1
11	T31~T34	D654(1 828~2 481)
12	T34~T37	D4+D122(2 017~2 138),I1+D2+D113(2 113~2 225)+I17
14	T40~T43	D199(2 223~2 421),D145(2 258~2 402),D10(2 260~2 269)+I468+I1+D9,I1+D88(2 387~2 474),I1+D37(2 473~2 509)

突变形式中,D+数字表示缺失碱基数目,大于 10 bp 的突变位点标注缺失区段的起止位置,以起始密码子 ATG 上游第 1 位为 1;I+数字表示插入碱基数目;“+”表示前后的突变在同一突变体中同时出现;“^a”和“^b”表示在同一位置插入的碱基不同。

2.4 T_1 代抗除草剂硝磺草酮突变体基因型鉴定和 *HPPD* 基因表达水平检测

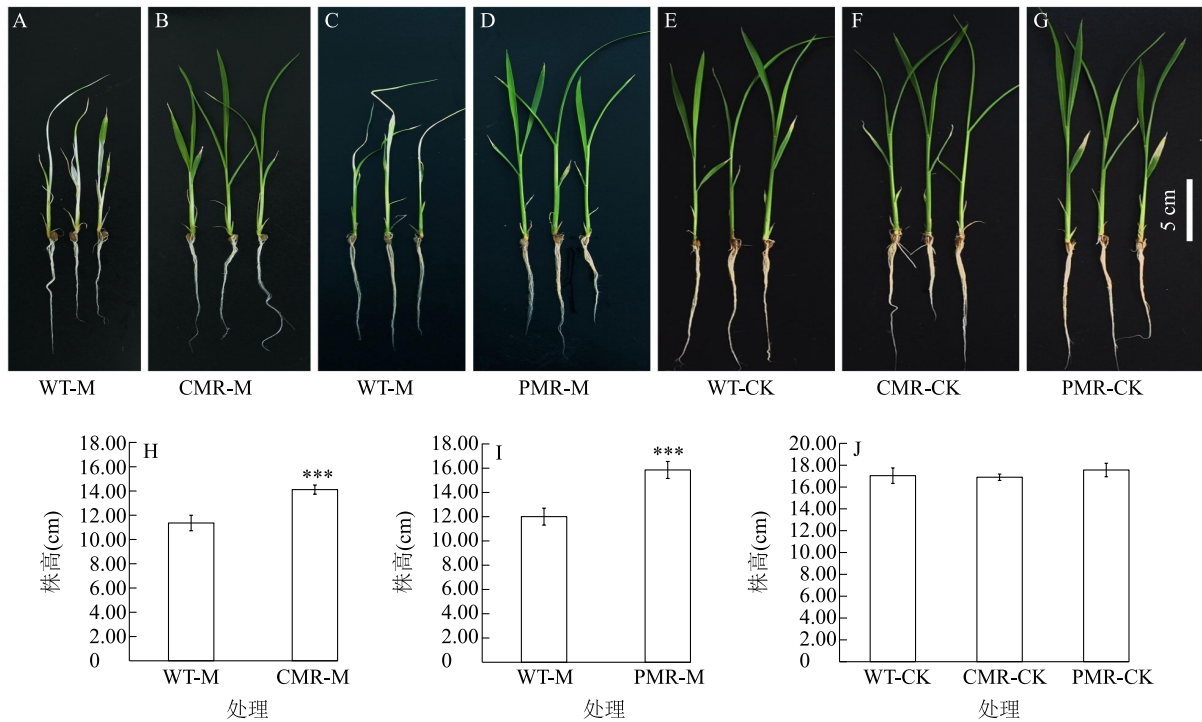
2 个抗硝磺草酮突变体株系基因型鉴定结果如图 3 所示。从图中可以看出,被测 T_1 代抗性植株均表现为和 T_0 代相同的纯合基因型,在 CMR 突变体株系中,*HPPD* 基因编码区第 1 254 和 1 256 位的鸟嘌呤(G)同时突变为腺嘌呤(A),导致 *HPPD* 蛋白第 419 位甘氨酸(Glycine, G)突变为天冬氨酸(Aspartic acid, D),第 418 位赖氨酸(Lysine, K)发生同义突变(图 3A),该突变对应识别 NG PAM 的 CBE 碱基编辑器靶标位点,靶点第 5 位和第 7 位的胞嘧啶(C)突变为胸腺嘧啶(T);与野生型 *HPPD* 基因碱基序列相比,PMR 突变体株系 *HPPD* 基因编码区上游有 3 段碱基发生缺失,累计共缺失 168 个碱基(图 3B)。2 个突变体株系中 *HPPD* 基因的表达水平如图 4 所示。从图中可以看出,PMR 突变体中株系 *HPPD* 基因的表达水平显著高于野生型,为野生型的 8.0 倍;而 CMR 突变体株系 *HPPD* 基因的表达水平没有显著变化。

3 讨论

水稻 *HPPD* 是重要的除草剂作用靶标,创制对 *HPPD* 抑制剂类除草剂抗性提高的突变体对于抗 *HPPD* 抑制剂类除草剂水稻品种的培育具有重要意义。本研究选取 257 个基因编辑靶标位点,利用腺嘌呤碱基编辑器和胞嘧啶碱基编辑器构建了水稻 *HPPD* 基因编码区的突变体库,在 2 850 个基因突变阳性植株中,在 99 个靶标位点覆盖区域至少检测到 1 种碱基编辑事件;同一靶标位点可能发生不同位

置的碱基突变,绝大多数突变分布在靶标位点的第 3~12 位,突变形式为 A→G 或 C→T,仅有个别突变体发生非典型突变,符合 ABE 和 CBE 碱基编辑器的识别规则^[21-23]。在被测的基因突变阳性植株中,检测到突变的靶标位点数目占总靶标位点数的 38.5%,有半数以上靶标位点未检测到突变。由于 *HPPD* 基因对于植物生长发育具有重要作用,部分关键位点突变可能导致突变体在愈伤组织阶段无法生长或再生植株白化,本研究旨在筛选对 *HPPD* 抑制剂类除草剂抗性提高的突变体,故仅对能够正常再生的绿色基因突变植株进行基因型统计,因此发生突变的靶点比例可能在一定程度上被低估。此外,研究结果还表明本研究所采用的混合转化方案可以较为全面地覆盖不同靶标位点,而不同靶标位点的碱基编辑效率可能有较大差异。为了获得更为丰富的变异形式,未来的研究中可采用编辑效率更高的碱基编辑器。本研究还利用 4 靶基因编辑载体构建了 *HPPD* 基因编码区上游突变体库,在 389 株基因突变阳性植株中检测到至少 43 种不同的纯合突变形式。突变形式包括少数几个碱基的插入或缺失,同时也检测到较长片段的插入或缺失。在 43 种不同的纯合突变形式中,有 27 种突变形式包含大于 10 bp 的片段插入或缺失。构建多靶标位点载体有助于实现不同靶标位点之间的较长片段缺失,以更大程度上对基因启动子区和 5'UTR 进行突变。

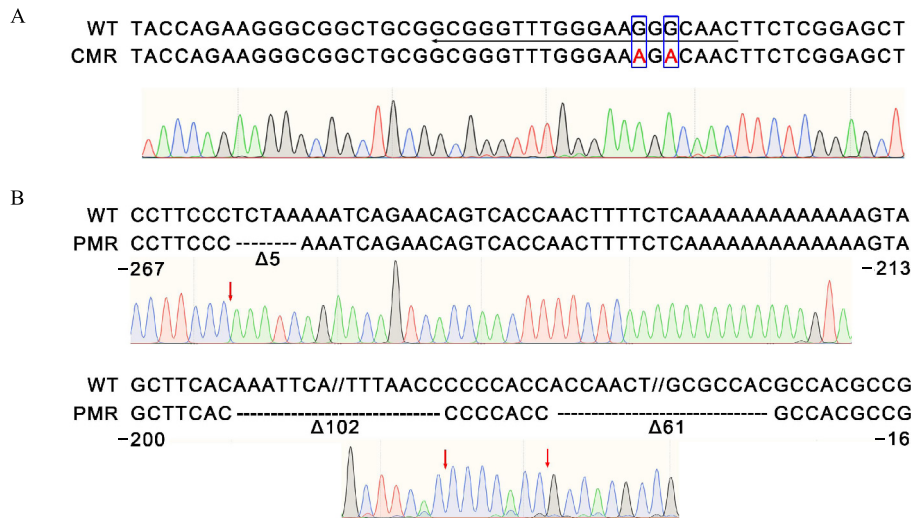
利用相对稳定可控的水培体系,本研究鉴定到 2 个对 *HPPD* 抑制剂类除草剂硝磺草酮抗性提高的突变体株系。其中,1 个突变体株系的 *HPPD* 蛋白第 419 位甘氨酸(G)突变为天冬氨酸(D),这在以



A~D:0.3 μmol/L 硝磺草酮处理 14 d 时抗硝磺草酮突变体株系 CMR、PMR 和野生型 WT 的表型;E~G:无硝磺草酮处理的突变体株系 CMR、PMR 和野生型(WT)的表型;H、I:0.3 μmol/L硝磺草酮处理 14 d 时突变体株系植株和野生型植株的株高;J:无硝磺草酮处理的突变体株系植株和野生型植株的株高。*** 表示在 0.3 μmol/L硝磺草酮处理下抗硝磺草酮突变体株系与野生型相比在 0.001 水平上差异显著。

图 2 硝磺草酮处理后突变体和野生型植株表型

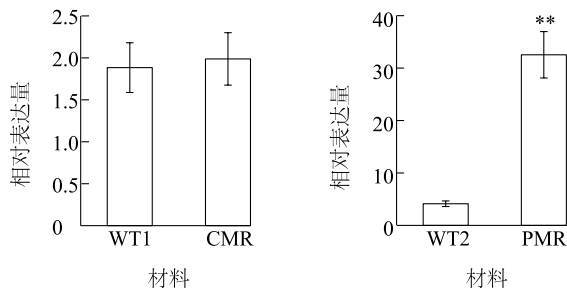
Fig.2 Phenotypes of mutant and wild-type plants after treatment with mesotrione



A:抗硝磺草酮突变体株系 CMR 和野生型靶位点附近基因序列比对结果和突变体 Sanger 测序峰图,黑色带箭头线段指示靶位点序列,箭头方向表示靶位点 5'→3'方向,方框标注突变碱基;B:抗硝磺草酮突变体株系 PMR 和野生型靶位点附近序列比对结果和突变体 Sanger 测序峰图,序列和测序峰图分两段展示,虚线(----)表示突变体缺失碱基,Δ加数字表示缺失碱基数目,序列下方数字表示所示序列首尾碱基在 *HPPD* 基因起始密码子 ATG 上游的位置;绿色、红色、蓝色和黑色峰分别表示碱基 A、T、C 和 G,红色箭头指示缺失序列两侧碱基的位置。

图 3 抗硝磺草酮突变体基因型鉴定及 Sanger 测序峰图

Fig.3 Genotyping results and Sanger sequencing chromatograms of mesotrione-resistant mutants



CMR: *HPPD* 基因编码区发生突变的抗硝磺草酮突变体株系; PMR: 编码区上游发生突变的抗硝磺草酮突变体株系; WT1、WT2 分别为不同批次野生型。** 表示与野生型 *HPPD* 基因表达量相比差异极显著 ($P < 0.01$)。

图4 抗硝磺草酮突变体和野生型 *HPPD* 基因表达水平

Fig.4 Relative expression levels of *HPPD* gene in mesotrione-resistant mutants and wild-type plants

前的水稻相关研究中未见报道。Qian 等^[16]利用大肠杆菌的显色反应证明,棉花 *HPPD* 蛋白第 412 位氨基酸由甘氨酸(G)突变为丝氨酸(S)能提高棉花 *HPPD* 蛋白对 *HPPD* 抑制剂类除草剂的抗性,且棉花 *HPPD* 蛋白第 412 位甘氨酸和水稻 *HPPD* 蛋白第 419 位甘氨酸可能为对应位置的保守氨基酸,暗示该位置的甘氨酸对 *HPPD* 与除草剂的结合可能具有重要作用。Wang 等^[11]利用碱基编辑器获得水稻 *HPPD* 蛋白 P336L 和 N338D 突变能够赋予水稻突变体对不同种类 *HPPD* 抑制剂类除草剂的较弱抗性; Dong 等^[13]利用蛋白质结构预测和拟南芥中突变基因的异位表达试验证明,水稻 *HPPD* 蛋白第 432 位氨基酸由谷氨酸(E)突变为甲硫氨酸(M)能够提高突变体对 *HPPD* 抑制剂类除草剂的抗性; Yang 等^[3]通过大肠杆菌中的定向进化和水稻中过量表达突变基因证明,6 位点组合突变能够提高水稻对 *HPPD* 抑制剂类除草剂的抗性。目前,多个能提高水稻对 *HPPD* 抑制剂类除草剂抗性的突变位点得到了鉴定,这为创制高抗 *HPPD* 抑制剂类除草剂的水稻种质提供了抗性位点资源,同时也为蛋白功能分析和新抗性位点的预测提供了试验数据支持。未来的研究中可结合 *HPPD* 蛋白结构信息,进行分子对接和预测模拟,对不同的单个抗性位点进行聚合,有望获得抗性更高的多位点组合突变^[3,16]。

本研究同时鉴定到 1 个 *HPPD* 基因上游序列发生片段缺失的突变体株系。该突变体株系 *HPPD* 基因上游存在 3 段缺失,累计共 168 个碱基发生缺失,

而基因编码区没有变化。该突变体株系对硝磺草酮的耐受性高于野生型。此前未见报道改造 *HPPD* 基因启动子区或 5'UTR 能够提高水稻对 *HPPD* 抑制剂类除草剂的抗性。qPCR 结果显示该突变体株系中 *HPPD* 基因的表达水平高于野生型。*HPPD* 基因表达水平提高可能是该突变体株系对硝磺草酮抗性提高的一个原因。Park 等^[24]的研究结果表明,拟南芥 *HPPD* 基因的表达水平受到油菜素内酯(Brassinosteroid, BR)的抑制,响应 BR 的转录因子 BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT 1) 直接结合 *HPPD* 基因启动子区,在 BZR1 功能获得性突变体中,BR 对 *HPPD* 表达的抑制作用增强。这一结果说明植物中 *HPPD* 基因的表达可能存在负调控机制。未来的研究可以利用报告基因系统对本研究鉴定到的抗硝磺草酮突变体株系 PMR *HPPD* 基因中缺失区段进行更细致的分析,探究水稻中是否也存在对基因表达水平起关键作用的元件或位点,这有助于利用基因编辑技术创制更多的抗 *HPPD* 抑制剂类除草剂的水稻种质。

除了改造 *HPPD* 基因的编码区和启动子区,改造 *HPPD* 基因的 3'UTR 也能够获得对 *HPPD* 抑制剂类除草剂抗性提高的突变体,但其抗性机制目前尚不清楚^[9]。敲除水稻氨基转移酶编码基因 *DNRI* 能够通过提高 *HPPD* 的底物 HPPA 和产物 HGA 的水平,从而提高水稻对 *HPPD* 抑制剂类除草剂的抗性^[25]。Maeda 等^[14]克隆到 1 个通过对三酮类除草剂的羟基化实现解毒作用的基因 *HIS1*,过量表达 *HIS1* 基因或改造 *HIS1* 基因可赋予水稻对 *HPPD* 抑制剂类除草剂的抗性。通过倒位等手段创制染色体结构变异突变体,将 *HPPD* 或 *HIS1* 基因的编码区置换到高表达基因的启动子下游也能够提高 *HPPD* 或 *HIS1* 基因的表达,创制除草剂抗性水平提高的突变体^[12,26]。但基因组较大片段的倒位或异位可能导致染色体空间结构的变异,进而影响非目标基因的表达,可能产生在常规种植条件下不易发现的潜在风险,因此相关抗性种质使用前需在不同环境条件下谨慎评估。与乙酰乳酸合酶基因(*ALS*)或乙酰辅酶 A 羧化酶基因(*ACCase*)等单一位点突变即可产生对相应除草剂的高水平抗性突变体不同^[5,27],目前已报道的水稻 *HPPD* 基因的单一位点或单一抗性机理的突变体抗性水平有限,单一突变类型难以达到实际生产中所需的高抗性水平。未来的研究中可

通过精准多基因编辑、杂交育种等手段,聚合不同类型的抗性突变形式,对不同组合突变体的除草剂抗性和农艺性状进行综合评估以创制高抗 *HPPD* 抑制剂类除草剂的水稻种质。

除了作为除草剂靶标基因,植物 *HPPD* 基因在促进质体醌和生育酚的合成、提高植物抗氧化能力和抗非生物胁迫中的重要作用也备受关注^[28-30]。本研究构建的水稻 *HPPD* 基因突变体库也可用于筛选抗氧化和抗非生物逆境能力提高的水稻种质。

4 结论

本研究利用基于基因编辑的单碱基编辑器构建水稻 *HPPD* 基因编码区突变体库,利用多靶标编辑载体构建 *HPPD* 基因启动子和 5'非翻译区的突变体库,分别筛选到 1 个 *HPPD* 蛋白第 419 位甘氨酸(G)突变为天冬氨酸(D)的突变体(CMR)及 1 个 *HPPD* 基因编码区上游缺失 168 个碱基的突变体(PMR),其中,PMR 突变体 *HPPD* 基因表达水平显著高于野生型。2 个突变体表型与无 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 的硝磺草酮处理对照无显著差异。

参考文献:

- [1] FAROOQ M, SIDDIQUE K H M, REHMAN H, et al. Rice direct seeding: experiences, challenges and opportunities [J]. Soil and Tillage Research, 2011, 111(2): 87-98.
- [2] 廖萍, 翁文安, 高辉, 等. 我国直播稻栽培技术应用现状与发展建议 [J]. 中国农业科学, 2024, 57(24): 4854-4870.
- [3] 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.
- [4] SYNOWIEC A, CZEKAJ M, VERDEGUER M, et al. Herbicides in use: current status and perspectives in the different biogeographic regions of Europe [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(36): 22089-22109.
- [5] JIN M, CHEN L, DENG X W, et al. Development of herbicide resistance genes and their application in rice [J]. The Crop Journal, 2022, 10(1): 26-35.
- [6] DUKE S O. Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? [J]. Pest Management Science, 2012, 68(4): 505-512.
- [7] 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.
- [8] NDIKURYAYO F, MOOSAVI B, YANG W C, et al. 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors: from chemical biology to agrochemicals [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(39): 8523-8537.
- [9] WU Y Y, XIAO N, CAI Y, et al. CRISPR-Cas9-mediated editing of the *OsHPPD* 3' UTR confers enhanced resistance to *HPPD*-inhibiting herbicides in rice [J]. Plant Communications, 2023, 4(5): 100605.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] DONG J, DONG J Q, WANG X L, et al. Structure-based directed evolution of rice 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase confers enhanced herbicide tolerance [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(30): 18923-18931.
- [14] MAEDA H, MURATA K, SAKUMA N, et al. A rice gene that confers broad-spectrum resistance to β -triketone herbicides [J]. Science, 2019, 365(6451): 393-396.
- [15] WANG Y, PHELPS A, GODBEHERE A, et al. Revolutionizing agriculture with CRISPR technology: applications, challenges, and future perspectives [J]. Biotechnology Journal, 2025, 20(9): e70113.
- [16] QIAN H J, SHI H Z. Herbicide-resistant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase variants identified via directed evolution [J]. Journal of Experimental Botany, 2024, 75(22): 7096-7106.
- [17] WANG X, PAN W B, SUN C, et al. Creating large-scale genetic diversity in *Arabidopsis* via base editing-mediated deep artificial evolution [J]. Genome Biology, 2024, 25(1): 215.
- [18] MA X L, ZHANG Q Y, ZHU Q L, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants [J]. Molecular Plant, 2015, 8(8): 1274-1284.
- [19] MIAO J, GUO D S, ZHANG J Z, et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system [J]. Cell Research, 2013, 23(10): 1233-1236.
- [20] WANG Y H, ZHAO Y, BOLLAS A, et al. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications [J]. Nature Biotechnology, 2021, 39(11): 1348-1365.
- [21] HUA K, TAO X P, LIANG W Y, et al. Simplified adenine base editors improve adenine base editing efficiency in rice [J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(3): 770-778.
- [22] RICHTER M F, ZHAO K T, ETON E, et al. Phage-assisted evo-

- lution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity [J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 883-891.
- [23] ZENG D C, LIU T L, TAN J T, et al. PhieCBEs: plant high-efficiency cytidine base editors with expanded target range [J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(12): 1666-1669.
- [24] 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.
- [25] LI Y, LING X T, ZHANG W T, et al. OsDNR1 as a key regulator of rice resistance to 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase-inhibiting herbicides [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2025, 67(9): 2262-2264.
- [26] SUN C, LI H C, LIU Y J, et al. Iterative recombinase technologies for efficient and precise genome engineering across kilobase to megabase scales [J]. *Cell*, 2025, 188(17): 4693-4710.
- [27] ZHOU Z Z, JIANG Q, QIU Z Y, et al. Differential resistance to acetyl-CoA carboxylase inhibitors in rice: insights from two distinct target-site mutations [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(21): 12029-12044.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] YU X H, WEN X, DONG J Q, et al. Hydroxylation of HPPD facilitates its PUB11-mediated ubiquitination and degradation in response to oxidative stress in *Arabidopsis* [J]. *Plant Communications*, 2025, 6(11): 101521.

(责任编辑:石春林)