



冷春旭,闫平,徐振华,等. CRISPR/Cas 基因编辑系统在水稻耐盐碱研究中的应用[J]. 黑龙江农业科学, 2022(8):52-56.

# CRISPR/Cas 基因编辑系统在水稻耐盐碱研究中的应用

冷春旭<sup>1,2,3</sup>, 闫平<sup>1,2,3</sup>, 徐振华<sup>1,2,3</sup>, 孙中义<sup>1,2,3</sup>, 张书利<sup>1,2,3</sup>, 武洪涛<sup>1,2,3</sup>, 吴立成<sup>1,2,3</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院 生物技术研究, 黑龙江 哈尔滨 150023; 2. 黑龙江省作物与家畜分子育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150023; 3. 国家耐盐碱水稻技术创新中心东北中心 五常试验站, 黑龙江 哈尔滨 150023)

**摘要:** 盐碱胁迫是限制水稻生长发育和阻碍农业生产的重要因素, 是世界范围内造成农作物产量损失的主要原因之一。CRISPR/Cas 基因编辑系统是一种高效简单的基因编辑技术, 在植物非生物胁迫响应研究方面具有重要的应用价值。本文主要介绍了 CRISPR/Cas 基因编辑系统的发展过程、分类以及水稻对盐碱胁迫的响应机制, 论述了近年来 CRISPR/Cas 技术在水稻耐盐碱品种开发中的应用, 并对其应用前景进行了展望。

**关键词:** 基因编辑; CRISPR/Cas 系统; 水稻; 耐盐碱

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



土壤盐碱化是影响农业生产的主要环境问题之一, 全球约 20% 灌溉土地受高盐胁迫的影响造成减产。盐碱胁迫对植物生长发育的影响包括离子毒害、渗透胁迫、活性氧胁迫和高 pH 胁迫<sup>[1-2]</sup>。盐碱度胁迫影响种子萌发, 阻碍植物生长, 抑制生殖发育, 最终降低作物产量<sup>[3]</sup>。此外, 盐胁迫还会影响细胞超微结构, 破坏细胞膜, 增加活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)的形成, 破坏光合机制, 降低酶活性。因此, 提高作物的耐盐碱性不但有助于更有效地利用盐碱地, 而且有利于农业的可持续发展和缓解全球粮食危机。

培育抗盐碱胁迫的水稻品种既可实现农业的可持续发展又可满足日益增长的粮食需求。传统育种方法培育的各种耐盐品系(品种)数量极其有限, 主要是因为遗传变异较小, 无法实现预期性状改变, 但基因组编辑技术可高效实现育种目标<sup>[4]</sup>。以 CRISPR/Cas9 为代表的基因编辑技术是目前应用最广泛的高效基因定点编辑技术, 具有成本低、操作简单、特异性高、脱靶率低、多基因编辑等优点。本文介绍了 CRISPR/Cas 基因编辑系统的分类及作用原理, 及其在水稻抗盐碱改良中的

应用, 为进一步利用 CRISPR/Cas 技术培育耐盐碱水稻新品种提供参考。

## 1 CRISPR/Cas 基因编辑系统介绍

CRISPR/Cas 是广泛位于细菌和古生菌染色体的适应性免疫系统。当外源 DNA 进入细菌细胞时, 被 Cas 蛋白特异剪切成小片段, 形成多个连续的 DNA 片段, 成为 CRISPR 间隔序列。当外源 DNA 再次侵入宿主细胞时, Cas 蛋白表达并加工 CRISPR 基因座以产生 CRISPR RNA(crRNA), 这些 crRNA 与 tracrRNA(trans-activating crRNA)配对结合, 之后识别、结合 Cas 蛋白, 并切割目标 DNA 以干扰外来入侵者<sup>[5]</sup>。与 ZFN 和 TALEN 等需执行蛋白融合过程的基因编辑技术相比, CRISPR/Cas 技术仅利用设计的特异性向导 RNA(sequence-specific guide RNA)作为 DNA 结合结构域, 替代了整个蛋白融合过程, 方便操作, 极大地降低了技术难度<sup>[6]</sup>。

## 2 CRISPR/Cas 基因编辑系统发展过程

20 世纪 80 年代, 日本科学家 Ishinoy 等<sup>[7]</sup>在研究大肠杆菌 *iap* 基因时, 发现其 3' 端含有 29 个核苷酸高度重复序列, 被 32 个核苷酸序列间隔分开, 但这些序列的作用并不清楚。2000 年, 西班牙科学家 Mojica 等<sup>[8]</sup>也在多种微生物中发现类似的重复序列。直到 2002 年, Jansen 等<sup>[9]</sup>在大量细菌和古细菌中发现了一类特征明显, 排序整齐的简单重复序列, 将其命名为 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)。2007 年, Barrangou 等<sup>[10]</sup>在研究噬菌体攻击嗜热

收稿日期: 2022-05-24

基金项目: 黑龙江省生物育种科技重大专项(2020ZX16B01013); 国家现代农业产业技术体系(CARS-01-54); 黑龙江省农业科学院乡村振兴科技支撑示范项目(TGY-2021-02 重点技术)。

第一作者: 冷春旭(1979—), 女, 博士, 助理研究员, 从事水稻分子育种研究。E-mail: lengchunxu@163.com。

通信作者: 闫平(1967—), 男, 硕士, 研究员, 从事水稻遗传育种研究。E-mail: yanping8011@163.com。

链球菌时,证实 CRISPR 系统是一种适应性免疫系统,病毒入侵嗜热链球菌时,被整合到链球菌基因组中形成一个新的间隔序列,当同一病毒再次感染宿主,细菌便对其产生了抵抗力。如果改变间隔序列,则会影响细菌对病毒的免疫能力。2008 年,在大肠杆菌中发现来自噬菌体间隔序列被转录成小 RNA,称为 CRISPR RNA (crRNA),其引导 Cas 蛋白至靶 DNA<sup>[11]</sup>。2010 年,发现 CRISPR/Cas9 在 PAM 序列上游精确切割,使 DNA 发生断裂。Cas9 是 II 型 CRISPR 系统切割唯一需要的蛋白,它与 crRNAs 共同介导发挥 CRISPR/Cas9 的编辑功能。2011 年,发现 CRISPR 系统除 crRNA 外还有一种小 RNA,命名为反式激活 CRISPR RNA (tracrRNA),长度为 24 个核苷酸,与 crRNA 互补配对形成双链,引导 Cas9 至目标 DNA。至此,天然 CRISPR/Cas9 系统的干扰机制被研究清楚<sup>[12-13]</sup>。2012 年在体外系统证明了 crRNA 通过碱基互补配对与 tracrRNA 形成双链 RNA,引导 Cas9 在目标 DNA 的 PAM 位点上游 3 个核苷酸处发生精确的平端切割<sup>[14]</sup>。crRNA 可融合为单链向导 RNA (single guide) 发挥引导 Cas9 的作用,此外 sgRNA 可减少到 20 nt,仍然具引导 Cas9 在靶位点发生有效切割的作用<sup>[6]</sup>。2016 年,在纤毛菌中发现 CRISPR 酶 Cas13a 蛋白具有 RNA 介导的 RNA 酶功能,240 d 后又发现了另一种同类酶 Cas13b<sup>[15]</sup>。

### 3 CRISPR/Cas 基因编辑系统的类型

CRISPR/Cas 系统根据 Cas 蛋白在细菌免疫反应中的功能不同分为两大类,一类是仅在细菌中发现的 CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf 系统,在这些系统中由单亚基蛋白行使特异性靶向识别和切割作用,其作用分子是相对单一的 Cas 蛋白;另一类是在细菌和古细菌中发现的多亚基结构的 crRNA 蛋白系统,该系统由 crRNA-蛋白复合体完成 crRNA 加工、靶向定位及切割作用,包括 I 型、III 型和 IV 型。

### 4 CRISPR/Cas 基因编辑系统作用机理

#### 4.1 CRISPR/Cas9 基因编辑系统作用机理

CRISPR/Cas9 系统是最常用的基因编辑系统,在基因编辑过程中,tracrRNA、pre-crRNA 和 Cas9 蛋白首先被转录和表达,然后 tracrRNA 对 precrRNA 进行修饰,在 RNA 酶 III 作用下产生成熟的 crRNA,最终形成 tracrRNA、crRNA 和 Cas9 蛋白复合物,识别靶向 DNA,产生双链断裂激活 DNA 损伤修复。经过人工改造后,sgRNA

取代 crRNA 和 tracrRNA 识别 PAM 序列切割靶向 DNA<sup>[16-17]</sup>。CRISPR/Cas9 系统在生物体内可实现基因的敲除、敲入和替换等操作,行使特定的生物学功能。

#### 4.2 CRISPR/Cpf1 基因编辑系统作用机理

CRISPR/Cpf1 系统是 Class II 型系统,Cpf1 (CRISPR from *Prevotella* and *Francisella* 1) 也称为 Cas12a,是 Type V 型效应蛋白,与 Type II 型 Cas9 蛋白有明显的不同。第一,Cas9 需 crRNA 和 tracrRNA 联合作用靶向 DNA,而 Cpf1 仅需 RNA 引导而不需要 tracrRNA,而且 Cpf1 蛋白不需要其他 RNA 酶的介入而形成成熟的 crRNA<sup>[18]</sup>;第二,Cas9 识别的靶位点 3' 端富含 G 的 PAM 处 (5'-NGG-3'),而 Cpf1 识别的靶位点 5' 端富含 T 的 PAM [5'-(T)TTN-3'];第三,Cpf1 仅含有 1 个核酸酶结构域 RuvC,而 Cas9 具有 RuvC 和 HNH 两个结构域<sup>[16]</sup>;第四,Cpf1 切割靶 DNA 产生交错的断裂末端<sup>[19]</sup>,而 Cas9 产生的断裂为平末端<sup>[20]</sup>;第五,CRISPR/Cpf1 系统的脱靶效率低于 CRISPR/Cas9 系统<sup>[21]</sup>。

#### 4.3 CRISPR/Cas13a 基因编辑系统作用机理

CRISPR/Cas13a 系统与 Cas9 相比,可特异性识别并切割 RNA 并敲除特定的 mRNA,弥补了 Cas9 仅限于 DNA 水平的编辑和脱靶效应的缺陷,从而调控基因功能表达<sup>[22]</sup>。2017 年 Liu 等<sup>[23]</sup>利用高分辨电镜解析了 Cas13a 的晶体结构,由 crRNA 识别区和核酸酶区构成。识别区包含 N 端结构域 (N-Terminal Domain, NTD) 和 Helical-1 结构域。核酸酶区由 Helical-2、Helical-3、HEPN1 (Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-Binding, 高等真核和原核生物核苷酸结合域) 和 HEPN2 结构域组成。Helical-1 和 HEPN 结构域发挥核酸酶切割作用,当 crRNA 与目标 RNA 形成复合物后可促使 HEPN1 结构域向 HEPN2 结构域移动,蛋白构象发生变化,发挥双重核酸酶活性,切割 RNA 靶标并加工 crRNA。

### 5 水稻对盐碱胁迫的响应机制

#### 5.1 盐碱胁迫对水稻的危害

盐碱胁迫影响水稻整个生长发育过程,种子萌发时过高的盐碱浓度对水稻造成渗透胁迫,延迟种子发芽时间,延缓生育进程和降低芽率<sup>[24]</sup>。同时盐碱胁迫显著抑制水稻幼苗的根长、根数和芽长的生长<sup>[25]</sup>。盐碱胁迫对水稻籽粒的影响包括延迟水稻返青时间和分蘖时间,降低水稻成穗率,减少有效分蘖,进而导致产量下降<sup>[26-27]</sup>。另外,谷娇娇等<sup>[28]</sup>研究表明,盐碱胁迫也会对水稻

根系造成不可逆的伤害,导致水稻根长、根表面积、根体积、根干重和根系活力显著降低。Gerona 等<sup>[29]</sup>研究盐胁迫对水稻生长发育的影响发现开花期与幼苗期相比对盐更敏感。国际水稻研究所根据盐胁迫条件下水稻幼苗分蘖、叶片和叶尖的表现以及整株水稻的死亡程度,制定了一套水稻耐盐鉴定的指标,通过计算叶片死亡百分比,将水稻分为 6 个耐盐等级<sup>[30]</sup>。

盐碱胁迫对水稻产量构成四要素(千粒重、有效穗数、穗粒数和结实率)均有影响,其中对千粒重的影响最显著<sup>[30]</sup>。张瑞珍等<sup>[26]</sup>研究表明,随着盐碱胁迫程度加重水稻生物产量和经济产量都急剧下降,在重度碱胁迫的条件下,经济产量降低 61.2%。朱明霞等<sup>[27]</sup>研究表明,水稻产量构成因素随着盐浓度的增加而呈递减趋势,当土壤盐含量大于 2.2‰ 时,千粒重、有效穗数、穗粒数和结实率均显著下降,从而导致产量降低。盐碱胁迫对水稻食味品质、外观品质以及加工品质都有显著影响。胡博文等<sup>[31]</sup>研究表明,盐胁迫条件下,淀粉合成相关酶活性降低,从而使直链淀粉含量升高,支链淀粉含量降低,食味值降低。周婵婵等<sup>[32]</sup>研究表明,稻米外观品质也受盐胁迫影响,当盐处理浓度升高时,稻米垩白度和垩白粒率显著增加,稻米品质降低。周根友等<sup>[33]</sup>研究发现,加工品质也受盐碱胁迫的影响,蛋白质含量、消减值与起始糊化温度在盐碱胁迫下显著增加。

## 5.2 盐碱胁迫对水稻生理特性的影响

盐碱胁迫造成水稻光合速率下降,主要影响气孔导度、气孔密度和蒸腾速率等指标。刘晓龙等<sup>[34]</sup>研究表明,盐碱胁迫浓度与气孔密度呈正相关,与气孔宽度呈负相关,气孔导度和蒸腾速率也受到影响。Suruyan 等<sup>[35]</sup>研究表明,盐处理条件下,叶片中叶绿素和类胡萝卜素含量显著下降, $K^+/Na^+$ 也显著降低。盐碱浓度过高打破水稻细胞内  $K^+/Na^+$  的离子平衡,导致  $Na^+$  的积累过高,细胞内物质交换平衡破坏,代谢紊乱。高盐浓度也会影响水稻根系中  $Ca^{2+}$  和  $Mg^{2+}$  浓度<sup>[36]</sup>。盐碱胁迫也会对水稻激素产生影响,汤日圣等<sup>[37]</sup>研究表明,脱落酸(ABA)是一种重要的激素,水稻幼苗经盐处理后喷施 ABA 能提高秧苗耐盐能力,促进叶片中脯氨酸和可溶性糖的积累,有效提高抗氧化剂水平。

## 5.3 水稻对盐碱胁迫响应的分子机制

水稻从细胞分子水平调控自身的生理生化条件从而产生盐碱胁迫抗性。不同功能基因的表达能够产生不同的抗性,目前已有许多关于水稻抗逆基因的报道。Zou 等<sup>[38]</sup>构建热激蛋白 OsHsp17.0

和 OsHsp23.7 的过表达载体,转化水稻获得热激蛋白含量增加的转基因水稻,可抵御盐碱胁迫对水稻的影响。石卫标等<sup>[39]</sup>在逆境条件下通过转基因过表达转录因子 OsBHLH120,可增强水稻耐盐性和抗旱性。转录因子 EIN3(ETHYLENE-INSENSITIVE 3)和 EILs(EIN3-likes)在植物发育和防御反应中发挥重要作用。Jin 等<sup>[40]</sup>在水稻中过表达 *OsEIL2* 的转基因植株对盐胁迫和干旱胁迫的耐受性较对照降低,而干扰 *OsEIL2* 基因表达的转基因植株对盐胁迫和干旱胁迫的耐受性较对照明显增强,说明 *OsEIL2* 是一个负调控水稻耐盐和抗旱性的基因。

随着分子测序技术的发展,科学家们已定位很多与水稻耐盐碱性相关的 QTL。索艺宁等<sup>[41]</sup>利用盐敏感和耐盐品种构建重组自交系定位到 18 个与盐碱胁迫相关的 QTL。李佳锐等<sup>[42]</sup>利用小白梗子与空育 131 为亲本建立重组自交系,对盐碱胁迫条件下水稻地上部  $Na^+/K^+$  进行 QTL 分析,共定位到 15 个 QTL。大麦和水稻均属于禾本科,但是耐盐性差异较大。Fu 等<sup>[43]</sup>通过比较水稻和大麦转录组对盐胁迫的响应,揭示了水稻适应盐胁迫过程中如何协调转录调控的分子机制。

## 6 CRISPR/Cas 系统在水稻抗盐碱中的应用

水稻因其基因组小且全基因组测序较早,而被作为单子叶植物的模式作物。近年来,CRISPR/Cas9 基因组编辑技术被广泛应用于编辑水稻基因组,可以有效地开发耐盐碱水稻品种。Kumar 等<sup>[44]</sup>利用 CRISPR/Cas9 编辑技术对籼稻品种 MTU1010 的 *DST*(drought and salt tolerance)基因进行编辑,创造等位突变。利用两个不同的 gRNA 对 *DST* 蛋白进行突变,成功产生 *DST* 基因的不同等位突变,获得了 366 bp 缺失的纯合 *dst* 突变体 *dst*<sup>Δ184-305</sup>。*dst*<sup>Δ184-305</sup> 突变体叶片变宽,气孔密度降低,增强了脱水胁迫下叶片的保水能力,该突变体幼苗期对渗透胁迫具有中等耐受性,对盐胁迫具有较高耐受性,且有利于产量的增加。

为了挖掘水稻的耐盐碱机制,Zhan 等<sup>[45]</sup>以水稻 *OsRR22* 基因为靶点构建 Cas9-*OsRR22*-gRNA 载体提高水稻耐盐性。从 14 个 T<sub>0</sub> 代转基因植株中鉴定出 9 个突变体,测序结果表明这些植株在靶位点处产生 6 种突变类型,并且稳定传递到下一代。对纯合的 T<sub>2</sub> 代进行耐盐性和农艺性状研究,发现 T<sub>2</sub> 纯合子突变体幼苗期耐盐性较野生型显著增强,农艺性状与野生型植株无显著

差异。CRISPR/Cas9 技术可作为提高水稻耐盐性的有效方法。2020 年 Liu 等<sup>[46]</sup>利用 CRISPR/Cas9 成功突变了水稻 *OsRAV2* 基因,使突变体水稻在高盐浓度下存活。随后利用 CRISPR/Cas9 靶向突变确定 GT-1 元件参与盐诱导调控 *OsRAV2* 的作用。基于 CRISPR/Cas 的研究表明, *OsGT<sub>γ</sub>-2* 是一个与 GT-1 元件直接互作的重要的三螺旋转录因子,参与调控水稻的盐度适应性。水稻 *OsNAC041* 基因在盐胁迫下影响种子萌发和植物的耐盐性,为其在水稻抗盐育种中的应用提供了新的思路。因此,Bo 等<sup>[47]</sup>利用 CRISPR/Cas9 载体创制了一个比野生型具有更高耐盐性的定向突变体 *osnac041*。

## 7 展望

水稻应对盐碱环境是一个极其复杂的过程,会通过生理生化变化、形态结构以及基因型来适应盐碱胁迫环境。CRISPR/Cas 系统具有广阔的应用前景。CRISPR/Cas 基因编辑技术不但克服了传统育种技术的缺点,还能避免转基因技术的安全问题。因为编辑后没有外源基因的污染,所以选育品种也更具安全性。总之,随着水稻基因组研究水平的提高,水稻抗逆基因得以规模化发掘,通过 CRISPR/Cas 系统将单一或多个与盐碱性相关基因聚合到同一品种将成为未来培育优质耐盐碱水稻品种的发展方向。

## 参考文献:

- [1] YANG Y, GUO Y. Unraveling salt stress signaling in plants[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2018, 60 (9): 796-804.
- [2] YANG Y, GUO Y. Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses[J]. The New Phytologist, 2018, 217(2): 523-539.
- [3] MURAT A, TURAN M, AWADELKARIM A, et al. Effect of salt stress on growth, stomatal resistance, proline and chlorophyll concentrations on maize plant[J]. African Journal of Agricultural Research, 2009, 4: 893-897.
- [4] HSU P D, SCOTT D A, WEINSTEIN J A, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(9): 827-832.
- [5] PLAGENS A, RICHTER H, CHARPENTIER E, et al. DNA and RNA interference mechanisms by CRISPR-Cas surveillance complexes[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2015, 39(3): 442-463.
- [6] 杨永昌, 常帅, 赵欣宇. CRISPR-Cas 介导基因编辑技术的发展趋势及研究进展[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2022, 6(6): 131-136.
- [7] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [8] MOJICA F J, DÍEZ-VILLASENOR C, SORIA E, et al.

Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria[J]. Molecular Microbiology, 2000, 36(1): 244-246.

- [9] JANSEN R, EMBDEN J D, GAASTRA W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [10] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [11] MARRAFFINI L A, SONTHEIMER E J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA[J]. Science, 2008, 322(5909): 1843-1845.
- [12] GARST A D, BASSALO M C, PINES G, et al. Genomewide mapping of mutations at single-nucleotide resolution for protein, metabolic and genome engineering[J]. Nature Biotechnology, 2017, 35(1): 48-55.
- [13] WANG T, GUAN C, GUO J, et al. Pooled CRISPR interference screening enables genome-scale functional genomics study in bacteria with superior performance[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 2475.
- [14] LIAN J, SCHULTZ C, CAO M, et al. Multi-functional genome-wide CRISPR system for high throughput genotype-phenotype mapping[J]. Nature Communications, 2019, 10 (1): 5794.
- [15] LEE H H, OSTROV N, WONG B G, et al. Functional genomics of the rapidly replicating bacterium *Vibrio natriegens* by CRISPRi[J]. Nature Microbiology, 2019, 4 (7): 1105-1113.
- [16] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821.
- [17] MARRAFFINI L A, SONTHEIMER E J. Self versus nonself discrimination during CRISPR RNA-directed immunity[J]. Nature, 2010, 463(7280): 568-571.
- [18] FONFARA I, RICHTER H, BRATOVIĆ M, et al. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA[J]. Nature, 2016, 532 (7600): 517-521.
- [19] ZETSCHE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. Cell, 2015, 163(3): 759-771.
- [20] SWARTS D C, VAN DER OOST J, JINEK M. Structural basis for guide RNA processing and seed-dependent DNA targeting by CRISPR-Cas12a[J]. Molecular cell, 2017, 66 (2): 221-233. e4.
- [21] KIM D, KIM J, HUR J K, et al. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells[J]. Nature Biotechnology, 2016, 34(8): 863-868.
- [22] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMANN S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. Science, 2016, 353(6299): aaf5573.
- [23] LIU L, LI X, MA J, et al. The molecular architecture for RNA-guided RNA cleavage by Cas13a[J]. Cell, 2017, 170 (4): 714-726. e10.
- [24] 祁栋灵, 韩龙植, 张三元. 水稻耐盐/碱性鉴定评价方法[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(2): 226-230, 235.
- [25] JAMIL M, BAE L D, YONG J K, et al. Effect of salt

- (nacl) stress on germination and early seedling growth of four vegetables species[J]. Journal of Central European Agriculture, 2006, 7(2): 273-281.
- [26] 张瑞珍, 邵玺文, 童淑媛, 等. 盐碱胁迫对水稻源库与产量的影响[J]. 中国水稻科学, 2006, 20(1): 116-118.
- [27] 朱明霞, 高显颖, 邵玺文, 等. 不同浓度盐碱胁迫对水稻生长发育及产量的影响[J]. 吉林农业科学, 2014, 39(6): 12-16.
- [28] 谷娇娇, 胡博文, 贾琰, 等. 盐胁迫对水稻根系相关性状及产量的影响[J]. 作物杂志, 2019(4): 176-182.
- [29] GERONA M, DEOCAMPO M P, EGDANE J A, et al. Physiological responses of contrasting rice genotypes to salt stress at reproductive stage[J]. Rice Science, 2019, 26(4): 14.
- [30] 杨娅坤, 赵飞, 刘建, 等. 盐碱胁迫对水稻的影响及其相关机制的研究进展[J]. 分子植物育种, 2021: 1-17 [2022-05-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210315.0838.004.HTML>.
- [31] 胡博文, 谷娇娇, 贾琰, 等. 盐胁迫对寒地梗稻籽粒淀粉形成积累及产量的影响[J]. 华北农学报, 2019, 34(1): 115-123.
- [32] 周婵婵, 王术, 黄元财, 等. 不同水稻品种产量和品质对盐碱胁迫的响应[J]. 种子, 2017, 36(11): 29-33.
- [33] 周根友, 翟彩娇, 邓先亮, 等. 盐逆境对水稻产量、光合特性及品质的影响[J]. 中国水稻科学, 2018, 32(2): 146-154.
- [34] 刘晓龙, 徐晨, 徐克章, 等. 盐胁迫对水稻叶片光合作用和叶绿素荧光特性的影响[J]. 作物杂志, 2014(2): 88-92.
- [35] SURUYAN CHA-UM, KANYARATT S, CHALERMPOL K. Comparative effects of salt stress and extreme pH stress combined on glycinebetaine accumulation, photosynthetic abilities and growth characters of two rice genotypes[J]. Rice Science, 2009, 16(4): 274-282.
- [36] RAZZAQUE M A, TALUKDER N M, ISLAM M T, et al. Salinity effect on mineral nutrient distribution along roots and shoots of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes differing in salt tolerance[J]. Archives of Agronomy & Soil Science, 2011, 57(1): 33-45.
- [37] 汤日圣, 童红玉, 唐现洪, 等. 脱落酸提高水稻秧苗耐盐性的效果[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(4): 910-911.
- [38] ZOU J, LIU C, LIU A, et al. Overexpression of OsHsp17.0 and OsHsp23.7 enhances drought and salt tolerance in rice[J]. Journal of Plant Physiology, 2012, 169(6): 628-635.
- [39] 石卫标, 杨芬, 刘姣, 等. 过表达 *OsbHLH120* 基因提高水稻苗期抗旱性[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(12): 5558-5563.
- [40] JIN J, DUAN J, SHAN C, et al. Ethylene insensitive3-like2 (OsEIL2) confers stress sensitivity by regulating *OsBURP16*, the  $\beta$  subunit of polygalacturonase (PG1 $\beta$ -like) subfamily gene in rice[J]. Plant Science, 2020, 292: 110353.
- [41] 索艺宁, 张春可, 于乔乔, 等. 盐、碱胁迫下水稻苗期根数和根长的 QTL 分析[J]. 华北农学报, 2018, 33(5): 9-15.
- [42] 李佳锐, 张萃雯, 刘化龙, 等. 盐碱胁迫下水稻苗期地上部  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  浓度的 QTL 分析[J]. 华北农学报, 2020, 35(2): 35-42.
- [43] FU L, SHEN Q, KUANG L, et al. Transcriptomic and alternative splicing analyses reveal mechanisms of the difference in salt tolerance between barley and rice [J]. Environmental and Experimental Botany, 2019, 166: 103810.
- [44] KUMAR V V S, VERMA R K, YADAV S K, et al. CRISPR-Cas9 mediated genome editing of drought and salt tolerance (*OsDST*) gene in indica mega rice cultivar MTU1010 [J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2020, 26(6): 1099-1110.
- [45] ZHANG A, LIU Y, WANG F, et al. Enhanced rice salinity tolerance via CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *OsRR22* gene[J]. Molecular Breeding, 2019, 39: 47.
- [46] LIU X, WU D, SHAN T, et al. The trihelix transcription factor OsGTy-2 is involved adaption to salt stress in rice [J]. Plant Molecular Biology, 2020, 103(4-5): 545-560.
- [47] BO W, ZHAOHUI Z, HUANHUAN Z, et al. Targeted mutagenesis of NAC transcription factor gene, *OsNAC41*, leading to salt sensitivity in rice[J]. Rice Science, 2019, 26(2): 98-108.

## Application of CRISPR/Cas Gene Editing System in Saline-Alkali Tolerance of Rice

LENG Chun-xu<sup>1,2,3</sup>, YAN Ping<sup>1,2,3</sup>, XU Zhen-hua<sup>1,2,3</sup>, SUN Zhong-yi<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Shu-li<sup>1,2,3</sup>,  
WU Hong-tao<sup>1,2,3</sup>, WU Li-cheng<sup>1,2,3</sup>

(1. Biotechnology Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150023, China;  
2. Key Laboratory of Crop and Livestock Molecular Breeding of Heilongjiang, Harbin 150023, China;  
3. Wuchang Experimental Station, Northeast Branch of National Center of Technology Innovation for Saline-Alkali Tolerant Rice, Harbin 150023, China)

**Abstract:** Saline-alkali stress has a significant impact on rice development and productivity and is one of the leading causes of crop yield losses in agricultural productivity worldwide. CRISPR/Cas gene editing system is an efficient and simple gene editing technology, which has important application value in abiotic stress of plants. In this paper, we introduced the development process, classification and function of CRISPR/Cas gene editing system, as well as the response mechanism of rice to saline-alkali stress and reviewed the application of the CRISPR/Cas technology in developing saline-alkali tolerant rice varieties in recent years, and prospected its application prospect.

**Keywords:** gene editing; CRISPR/Cas; rice; saline-alkaline tolerance