

水稻耐盐分子机制与分子改良

曲梦宇¹, 许惠滨¹, 陈 静¹, 梁廷敏^{1,2}, 韩艺娟¹, 陈燕琼¹, 张书标², 陈松彪¹

(¹ 闽江学院海洋研究院, 福州 350108; ² 福建农林大学农学院, 福州 350002)

摘要: 盐碱地是农业种植的重要后备耕地资源,但其高盐碱度特性严重制约了作物的种植。培育适宜盐碱地种植的作物,对保障粮食安全具有重要意义。近年来,耐盐水稻成为盐碱地改良与利用的首选粮食作物,因此,耐盐性遗传改良已成为水稻遗传育种的一个重要研究方向。高浓度盐胁迫对水稻各生育期的生长发育都会造成影响,导致水稻产量与品质显著下降。水稻耐盐分子机制的研究对培育耐盐水稻品种具有重要指导意义。本文从离子稳态调节、渗透调节、抗氧化调节、气孔调节以及信号分子调节等5个方面综述了水稻耐盐适应性分子机制研究的最新进展,进一步介绍了国内外水稻耐盐性遗传改良的情况,并重点总结了负调控水稻耐盐性功能基因的鉴定,以及基于基因组编辑技术的水稻耐盐性分子改良;同时还探讨了未来值得重点关注的方向及策略,以期为高效培育耐盐性强、综合性状优良的水稻品种提供参考。

关键词: 水稻; 盐胁迫; 耐盐机制; 分子改良; 负调控基因; 基因组编辑

Molecular Mechanisms and Improvement of Salinity Tolerance in Rice

QU Meng-yu¹, XU Hui-bin¹, CHEN Jing¹, LIANG Ting-min^{1,2}, HAN Yi-juan¹,

CHEN Yan-qiong¹, ZHANG Shu-biao², CHEN Song-biao¹

(¹ Institute of Oceanography, Minjiang University, Fuzhou 350108; ² College of Agriculture,

Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

Abstract: Saline-alkali field is an important reserve of arable land resource in agriculture. However, high salinity-alkalinity severely limits the cultivation of crops on saline-alkali soil. The development of crops suitable for growing in saline-alkali soil would be of significant importance in ensuring the food security. In recent years, salt-tolerant rice varieties have become primary candidates for improvement and exploitation of saline-alkali soil. Therefore, the genetic improvement of salinity tolerance has become an important research area in rice breeding. High-level salt stress inhibits the growth and development of rice at all different stages, causing significant reduction in yield and quality. Study on the molecular mechanism of salinity tolerance is of theoretical significance in guiding the development of salinity-tolerant rice varieties. In this review, we summarize the progress of studies on molecular mechanisms of salinity tolerance in rice which involve ion homeostasis regulation, osmotic regulation, antioxidant regulation, stomatal regulation, and signaling regulation. We further summarize the progress of genetic improvements of salinity tolerance in rice, especially highlighting the characterization of functional genes as negative regulators in salinity tolerance and candidates for genome editing-based molecular improvement. We also discuss future research focuses and experimental strategies that would provide a reference for developing highly salt-tolerant rice varieties with elite agronomic traits.

Key words: rice; salinity stress; salinity tolerance mechanism; molecular improvement; negatively regulated gene; genome editing

收稿日期: 2021-11-06 修回日期: 2021-12-01 网络出版日期: 2022-01-18

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20211106002>

第一作者研究方向为植物抗逆分子生物学, E-mail: mengyu_qu@163.com

通信作者: 陈松彪, 研究方向为植物生物技术, E-mail: sbchen@fhage.org

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2020J01853, 2020J01854); 国家国防科技工业局科技项目

Foundation projects: Natural Science Foundation of Fujian Province (2020J01853, 2020J01854), Science and Technology Project of State Administration of Science, Technology and Industry for National Defense

土壤盐渍化严重影响作物生长,是制约粮食生产的全球性问题。我国大约有 1 亿 hm^2 盐碱地与滩涂地,其中约 0.2 亿 hm^2 具有被改造为耕作用地的潜力^[1]。盐碱地是农业种植的重要土地后备资源,但其高盐碱度特性严重制约了普通农作物的种植。

开发利用盐碱土壤最直接的策略之一就是种植耐盐作物。水稻是我国乃至世界上最重要的粮食作物之一,绝大多数品种对盐胁迫敏感或中度敏感。多年来,国内外育种家们在耐盐水稻的筛选、培育等方面开展了大量的工作,并取得了可喜进展^[2]。近年来,耐盐碱水稻已成为盐碱地与滩涂地改良与利用的首选粮食作物,种植耐盐水稻在国内外多地得到了实践。耐盐性遗传改良也已成为水稻遗传育种的重要研究方向之一。本文综述了近年来水稻耐盐分子机制研究与遗传改良的进展,并就水稻耐盐分子改良进行了展望,以期高效培育耐盐性强、综合性状优良的水稻品种提供参考。

1 水稻耐盐分子机制

1.1 盐胁迫对水稻的影响

盐渍化的土壤中,其土壤溶液的渗透压往往高于水稻根毛细胞液的渗透压,导致水稻根系吸水困难,产生渗透胁迫;高浓度的 Na^+ 会干扰水稻对 K^+ 等其他离子的吸收,破坏水稻细胞的离子稳态平衡,产生离子胁迫^[3]。高浓度的 Na^+ 进入水稻细胞内,还会导致植株产生复杂的次级胁迫,包括活性氧 (ROS, reactive oxygen species) 大量积累、蛋白及核酸等组分破坏、脂膜系统损伤以及代谢紊乱等^[3]。

研究表明,盐胁迫会抑制水稻种子萌发、幼苗生长,在生长发育期,盐胁迫会导致水稻根系生长受抑制、叶片早衰、株高变矮、育性降低^[4]、叶绿素含量降低、光合作用效率下降^[5]。高浓度的盐胁迫会导致水稻产量显著下降,甚至完全绝收。此外,在高浓度盐胁迫下,稻米品质变劣,其加工品质、蒸煮食味品质和稻米淀粉黏滞特性明显降低^[6]。

1.2 Na^+ 的吸收及转运

水稻体内 Na^+ 的积累量取决于 Na^+ 吸收与 Na^+ 流出之间的差异。一般认为,植物吸收 Na^+ 与吸收 K^+ 一样,存在高亲和、低亲和两种机制:在低浓度 Na^+ 环境下,高亲和系统起主要作用;在高浓度 Na^+ 环境下,则是低亲和系统起主要作用^[7]。高亲和性钾转运蛋白 (HKT, high-affinity K^+ transporter) 广泛存在于不同的物种,在植物高亲和 Na^+ 吸收

及 Na^+ 转运中具有重要功能^[8]。水稻基因组有 7~9 个编码 HKT 蛋白的功能基因,因品种不同而异。水稻 HKT 蛋白可分为 OsHKT1 (OsHKT1; 1、OsHKT1; 2、OsHKT1; 3、OsHKT1; 4 和 OsHKT1; 5) 和 OsHKT2 (OsHKT2; 1、OsHKT2; 2、OsHKT2; 3 和 OsHKT2; 4) 两个亚家族。基于酵母和非洲爪蟾卵母细胞异源表达系统的实验表明,OsHKT1 亚家族是 Na^+ 选择性转运蛋白,而 OsHKT2 亚家族则是 Na^+ 和 K^+ 的协同转运蛋白^[8]。遗传学及生物学功能研究进一步揭示了 OsHKT1; 1、OsHKT1; 4、OsHKT1; 5、OsHKT2; 1 和 OsHKT2; 2 等在水稻 Na^+ 吸收和转运、离子稳态调节等过程中具有重要作用。OsHKT2; 1 被认为是参与水稻根部 Na^+ 吸收的一个重要转运蛋白^[9-10],其在水稻根部表皮层、外皮层、中柱等组织中优势表达,盐胁迫下,表达水平降低。OsHKT2; 1 蛋白定位于细胞膜,能够转运 Na^+ ,且其特征与水稻根对 Na^+ 高亲和吸收的动力学特征高度吻合^[9,11]。在低 Na^+ 和低 K^+ 的生长条件下,oshkt2; 1 突变体生长受抑制,体内 K^+ 积累量正常,根系 Na^+ 内流则严重受阻,导致 Na^+ 积累量显著减少^[9]。在低亲和 Na^+ 吸收方面,目前广泛认为非选择性阳离子通道 (NSCCs, non-selective cation channels),尤其是非电压依赖型的 NSCC (VI-NSCCs, voltage-independent NSCCs) 是一个重要的途径^[12]。电生理学研究认为 Na^+ 可以通过 NSCCs 进入植物根系细胞^[13]。在拟南芥根系原生质体中,NSCCs 能够转运 K^+ 、 NH_4^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Na^+ 、 Li^+ 、四乙基铵阳离子 (TEA^+ , tetraethylammonium⁺) 等单价阳离子;VI-NSCCs 介导的 Na^+ 吸收对 K^+ 通道阻断剂 TEA^+ 、 Ca^{2+} 通道阻断剂维拉帕米 (Verapamil) 等不敏感,但能够被 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 La^{3+} 、 Gd^{3+} 等离子,以及奎宁 (Quinine)、焦碳酸二乙酯 (DEPC, diethylpyrocarbonate) 抑制;通过施加 NSCCs 阻断剂奎宁,能够减少 Na^+ 进入细胞,证明了 NSCCs 与 Na^+ 内流的相关性^[12]。虽然如此,NSCCs 介导植物低亲和 Na^+ 吸收的遗传基础及分子机制仍待进一步证实。水稻低亲和 Na^+ 吸收分子机制同样有待解析。

Na^+ 进入植物根系细胞后,可以通过胞内原生质流动和胞间连丝介导的共质体途径 (Symplastic pathway) 以及细胞间隙和导管空腔组成的质外体途径 (Apoplastic pathway) 被转运到不同的组织部位^[14]。水稻 HKT 蛋白在 Na^+ 转运中起着重要的功能。研究表明,OsHKT1; 5 (SKC1) 基因在根系

木质部导管周围细胞中优势表达,盐胁迫环境下表达量显著提高;OsHKT1;5 蛋白定位于细胞膜能够介导木质部 Na^+ 的卸载,参与 Na^+ 在水稻体内的循环^[15-16]。在亚细胞水平上,水稻细胞可以通过 Na^+ 转运到液泡与 Na^+ 外排等机制维持胞内 Na^+ 的稳态平衡。过度盐敏感 (SOS, salt overly sensitive) 途径中的质膜 Na^+/H^+ 逆转运蛋白 OsSOS1/OsNHA1 能够介导 Na^+ 外排^[17];在酵母和拟兰芥中,OsSOS1 可以互补 Na^+ 外排功能的缺失突变^[17]。水稻 *ossos1* 突变体表现出对盐异常敏感,根部及地上部 Na^+ 积累量均显著高于野生型,表明 OsSOS1 功能缺失导致 Na^+ 外排受抑制;进一步研究表明,OsSOS1 不仅介导 Na^+ 外排,且在木质部 Na^+ 的装载 (Loading) 过程中具有重要作用^[18]。液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 1 (OsNHX1, Na^+/H^+ antiporters1) 是介导 Na^+ 转运到液泡的重要蛋白,能够通过将 Na^+ 隔离在液泡中,减少细胞质中 Na^+ 的积累,是水稻维持胞内 Na^+ 稳态平衡的重要机制之一^[19]。

1.3 水稻耐盐适应性的分子机制

1.3.1 离子稳态调节 植物通过调控 Na^+ 的吸收、转运、外排,维持体内 Na^+ 、 K^+ 等的稳态平衡,是适应盐胁迫的直接和重要机制之一。

水稻 OsHKT 蛋白家族在调节 Na^+ 、 K^+ 离子稳态、提高植株对盐胁迫的适应性具有重要的功能。Campbell 等^[20]比较分析了籼、粳两个亚种的自然群体,从耐盐性更好的籼稻中鉴定到 *OsHKT1;1* 基因。通过 RNAi 技术敲低 *OsHKT1;1* 表达,水稻植株对盐胁迫更敏感,其根系 Na^+ 浓度更低,但茎部 Na^+ 浓度更高,预测 *OsHKT1;1* 在 Na^+ 的长距离转运、地上部外排等有重要功能^[20-21]。*OsHKT1;4* 介导 Na^+ 通过木质部在叶片、叶鞘、茎部等部位的外排,其作用在生殖生长期较显著,但在营养生长期不显著^[22];另一方面,T-DNA 激活标签介导的过表达 *OsHKT1;4* 植株并未表现出对盐胁迫更敏感,其原因可能在于过表达 *OsHKT1;4* 导致水稻根系维管系统 Na^+ 的过快吸收和外排^[23]。*SKC1* 是控制水稻耐盐性的一个主效 QTL (Quantitative trait locus),编码一个 *OsHKT1;5* 转运蛋白,能够介导木质部 Na^+ 的卸载^[15-16]。与盐敏感品种 Koshihikari 基因组中的 *OsHKT1;5* 相比,耐盐品种 Nona Bokra 中的 *OsHKT1;5/SKC1* 有 4 个氨基酸差异,其转运 Na^+ 的活性提高了 30%,在盐胁迫下能保持水稻体内 K^+/Na^+ 的离子平衡,提高耐盐性^[15]。Oomen 等^[24]从耐盐品种 Nona Bokra 中鉴定到一个 *No-*

OsHKT2;2/1 基因,其 5' 端序列与 *OsHKT2;2* 同源,3' 端序列则与 *OsHKT2;1* 同源。*No-OsHKT2;2/1* 主要在根系表达,并受盐胁迫诱导;进一步研究表明,*No-OsHKT2;2/1* 能够在高 Na^+ 环境下介导 K^+ 吸收,维持水稻细胞内 Na^+/K^+ 比,提高植株耐盐性。通过液泡区隔化 Na^+ ,也是植物维持离子稳态,适应盐胁迫的一种重要机制。水稻 *OsNHX1* 和液泡膜 H^+ - 焦磷酸化酶 *OsVP1* 能够介导 Na^+ 运输并贮存于液泡,过表达 *OsNHX1* 或 *OsVP1* 均能提高植株耐盐性^[25]。

1.3.2 渗透调节 植物遭遇盐胁迫时,可以通过增加渗透调节物质如脯氨酸 (Proline)、甜菜碱 (Betaine)、海藻糖 (Trehalose) 等的积累来适应盐胁迫。

水稻甜菜碱醛脱氢酶 (*OsBADH1*, betaine aldehyde dehydrogenase) 是甘氨酸甜菜碱 (Glycine betaine) 合成途径中的一个关键酶。研究表明,通过调控 *OsBADH1* 表达,能够改变水稻植株的耐盐性。*OsBADH1* 过表达植株的甘氨酸甜菜碱含量增加,其抵抗盐胁迫伤害的能力获得提高^[26]; *OsBADH1-RNAi* 敲低表达的植株则表现出 ROS 积累量增加,耐盐性降低^[27]。在水稻中,参与海藻糖合成的两个关键酶是海藻糖 -6- 磷酸磷酸酶 (*OsTPP*, trehalose-6-phosphate phosphatase) 和海藻糖 -6- 磷酸合酶 (*TPS*, trehalose-6-phosphate synthase)。过表达 *OsTPP1*、*OsTPS1* 或 *OsTPS8*,均能够提高水稻植株脯氨酸、海藻糖的含量,进而提高耐盐性^[28-30]。水稻质膜内在蛋白 (PIPs, plasma membrane intrinsic proteins) 在调控细胞渗透平衡,增强植株耐盐适应性等方面也具有重要的功能。水稻中适量表达 *OsPIP1;1* 能够增强植株的耐盐性^[31]。

1.3.3 抗氧化调节 盐胁迫会导致水稻产生次级伤害,如活性氧 (ROS, reactive oxygen species) 大量积累等,引起植株代谢紊乱。

水稻体内存在着清除 ROS 的过氧化酶系统和抗氧化剂,如超氧化物歧化酶 (SOD, superoxide dismutase)、过氧化氢酶 (CAT, catalase)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX, ascorbate peroxidase)、谷氨酰还原酶 (GRX, glutaredoxin) 等。在遭遇盐胁迫时,水稻能够通过调节抗氧化系统,清除体内过多的 ROS,减少盐胁迫伤害^[32]。

研究表明,在水稻中异源表达酵母 *Mn-SOD* 或过表达水稻 *OsCu/Zn-SOD* 基因,通过提高 SOD 活

性,能够缓解盐胁迫引起的细胞氧化损伤,进而增强水稻植株的耐盐性^[33-34]。水稻应答盐胁迫时,过氧化氢酶基因 *OsCATB*、*OsCATC* 表达量增加^[35],类受体胞质激酶 *OsSTRK1* 能够通过磷酸化机制激活 *OsCATC* 活性,过表达 *OsSTRK1* 能够提高水稻降解盐胁迫产生的过量 H_2O_2 的能力,增强水稻的耐盐性^[36]。水稻抗坏血酸过氧化物酶基因 *OsAPX* 和谷氨酰还原酶基因 *OsGRX* 受盐胁迫诱导表达增强,过表达 *OsAPX2* 或 *OsGRX20* 能够提高水稻植株的耐盐性^[37-38]。这些研究结果表明抗氧化系统在水稻耐盐适应性中具有重要的功能。

1.3.4 气孔调节 在盐胁迫条件下,植物通过 ABA 和 H_2O_2 介导的气孔调节机制,促进气孔关闭,减少叶片水分散失,从而提高耐旱及耐盐性^[39]。*OsDST* 是一个负调控耐盐性的锌指转录因子^[40]。水稻 *osdst* 突变体气孔关闭度增加、气孔密度减少、耐盐性增强。进一步研究发现, *DST* 与一个 *CHY* 锌指蛋白 *DCA1* 互作,通过调控 H_2O_2 清除剂基因 *OsPrx24* 的表达调节 ROS 稳态平衡,介导气孔调节^[41]。

1.3.5 信号分子调节 Ca^{2+} 是植物应答逆境胁迫的一种重要信号分子,在植物适应盐胁迫机制中具有重要作用。

在盐胁迫条件下,植物细胞质 Ca^{2+} 浓度增加,启动 Ca^{2+} 信号系统^[42]。Jiang 等^[43] 通过研究拟南芥葡萄糖醛糖基转移酶 *MOCA1*,揭示了鞘磷脂糖基肌醇磷酸神经酰胺 (GIPC, glycosyl inositol phosphoryl ceramide) 作为盐受体介导 Ca^{2+} 内流的机制。研究表明, *MOCA1* 介导葡萄糖醛酸 (GlcA, glucuronic acid) 与肌醇磷酸神经酰胺 (IPC, inositol phosphoryl ceramide) 结合,形成细胞质膜外侧的鞘脂 GIPC; 在盐胁迫下,胞外 Na^+ 与 GIPC 结合,改变细胞表面电势,激活细胞质膜 Ca^{2+} 通道^[43]。 Ca^{2+} 信号分子进一步激活 *SOS3-SOS2-SOS1* 途径,介导胞内 Na^+ 外排,调节植物对盐胁迫的适应性^[17, 42]。近年来,多项研究进一步鉴定了多个在植物耐盐 *SOS* 途径中起重要功能的关键因子,包括 Ca^{2+} 通透转运蛋白 *AtANN4*^[44]、14-3-3 蛋白^[45]、内含体分选转运复合体 (ESCRTs, endosome sorting complex required for transports) 关键组分 *VPS23A*^[46]、糖原合成酶激酶 3 类蛋白激酶 *BIN2*^[47] 等,加深了人们对 Ca^{2+} 信号分子调节植物耐盐胁迫机制的认识。与拟南芥类似,水稻存在着保守的 *OsSOS3/OsCBL4-OsSOS2/OsCIPK24-OsSOS1* 途径^[17-18]。在盐胁迫下, *OsSOS3/OsCBL4* 感知 Ca^{2+} 信号,进而磷酸化

OsSOS2/OsCIPK24, 激活 *OsSOS1* 外排 Na^+ ^[48]。

植物激素尤其是 ABA,在水稻盐胁迫信号转导途径中有着至关重要的作用。在盐胁迫下,水稻细胞内 ABA 瞬间积累,调节气孔开度^[39],并激活含 ABA 应答元件 (ABRE, ABA-responsive element) 或 ABRE 结合因子 (AREB/ABF, ABRE binding protein/factor) 转录因子的表达,调节细胞渗透平衡,增强水稻植株耐盐适应性^[48]。

2 水稻耐盐性遗传改良

2.1 耐盐水稻种质资源筛选与利用

早在 20 世纪 30 年代,世界各国水稻育种家们便开始开展耐盐水稻种质资源的筛选与利用。斯里兰卡于 1939 年成功选育了世界上第一个耐盐性强的品种 *Pokkali*^[49]。印度^[50] 和日本^[51] 等国家,以及国际水稻研究所 (IRRI, the International Rice Research Institute)^[52] 等研究机构也相继开展水稻耐盐种质筛选、耐盐性遗传分析、耐盐品种选育等工作,育出一系列较耐盐的品种,如 *Nona Bokra*、*Kala Rata 1-24*、*Pamodar*、*SR 26B*、*IR4595-4-1-13* 等,进行推广种植。这些耐盐水稻种质资源,也为耐盐基因挖掘、耐盐分子机制研究以及耐盐水稻现代品种选育奠定了重要的材料基础,如来源于 *Pokkali* 的耐盐 QTL 位点 *Saltol* 已被广泛应用于水稻耐盐性遗传改良^[53]。我国水稻耐盐性研究起步相对较晚,但从 20 世纪 70-80 年代起逐渐形成规模^[2],如山东^[54]、江苏^[55]、辽宁^[56] 等沿海地区的农业科研单位因其所在区域土壤含盐量较高,先后开展了耐盐水稻种质资源筛选鉴定及育种利用,筛选出一批耐盐性较强的种质,并育成了“盐稻”系列、“辽盐”系列等多个耐盐性较强的品种。我国于 1981 年召开“全国稻麦抗盐碱协作会议”,并在“七五”期间 (1986-1990 年) 开展稻种资源耐盐碱性鉴定全国协作,取得显著成效,挖掘到数量众多的耐盐种质,并培育了不少适合不同生态区域的粳、籼类型耐盐新品种 (组合)。在众多耐盐碱种质及品种中,来源于广东湛江滩涂野生水稻资源的海稻 86,耐盐碱性状优异,具有在中度盐碱地推广种植的潜力^[57]。近年来,海稻 86 已被广泛应用于“海水稻”育种实践以及水稻耐盐机理研究中^[58]。

2.2 水稻耐盐性遗传改良

早期鉴定的水稻耐盐种质资源大多存在着农艺性状较差、生态适应性较窄等局限性,难以直接在生产中推广应用。因此,开展耐盐水稻遗传改良、培育

综合性状良好的耐盐水稻品种,是推广种植耐盐水稻的先决条件。

传统水稻耐盐性遗传改良主要通过耐盐种质与普通优良品种杂交,再经过多年多代自交、回交,结合盐胁迫鉴定,筛选耐盐性好且综合性状优良的后代;也有通过诱变育种策略,以综合性状优良的品种为起始亲本进行诱变处理,再经过多代盐胁迫筛选、鉴定,选育耐盐性好的突变体后代。基于这些策略,国内外水稻育种家们已成功选育一系列综合性状优良的耐盐水稻品种,并成功推广种植。如国际水稻所育成 CSR13、CSR10、CSR27、IR2151、Pobbeli、PSBRc 84、PSBRc 48、PSBRc 50、PSBRc 86、PSBRc 88、NSIC 106 等品种,并在多个国家推广^[59]。20 世纪 90 年代以来,我国育种单位也培育了一系列的耐盐常规稻品种或杂交稻组合,主要代表性品种包括东稻 4 号、长白 9 号、长白 10 号、长白 13 号、辽盐 2 号、辽盐 9 号、辽盐 12 号、盐丰 47、津源 85、津源 101、盐稻 12 号、藤系 138、绥粳 1 号、绥粳 5 号、吉农大 30 等^[60],其中盐丰 47 通过了国家品种审定。另一方面,传统育种策略存在周期长、选择效率低、可预测性差等局限性。近年来,随着水稻分子遗传、基因组,尤其是功能基因组研究的发展,越来越多调控水稻耐盐性的 QTL 位点或功能基因得到鉴定^[2-3, 48],为水稻耐盐性遗传改良提供了宝贵的基因资源。同时,分子标记辅助选择(MAS, marker-assisted selection)以及基于高通量检测平台的全基因组选择(GS, genomic selection)等技术的发展和应用,也大大提高了水稻耐盐性遗传改良的效率^[2-3, 48]。

2.3 基于基因组编辑的水稻耐盐性分子改良

2.3.1 负调控水稻耐盐性的功能基因 近年来,CRISPR/Cas9 等系统介导的基因组编辑技术成为遗传操作的革命性创新,为农作物定向、精准遗传改良提供了高效的工具。基因组编辑技术已成为水稻功能基因研究中广泛应用的反向遗传学研究工具,并被应用于水稻光温敏雄性核不育、除草剂抗性、抗病性、产量与品质性状、耐寒性、杂种优势固定、生育期等许多重要农艺性状的遗传改良^[61]。利用基因组编辑技术可以实现对目的基因序列进行突变,包括缺失、插入、替换等。其中,通过引入缺失或插入,造成移码突变,实现基因功能缺失是效率最高的一种方式。因此,重要农艺性状的负调控基因,可以作为基于基因组编辑技术开展农作物重要性状分子改良的候选靶基因。

迄今为止,已有 150 多个调控水稻耐盐性的基因被克隆、鉴定^[2-3]。其中,至少有 22 个基因负调控水稻耐盐性(表 1)。与野生型相比,这些基因的 EMS 突变体、Tos17 插入突变体、T-DNA 插入突变体、CRISPR/Cas9 编辑突变体,或反义 RNA 敲低植株、RNAi 敲低植株均表现出耐盐性增强。功能分析表明,这些基因编码的蛋白没有直接调控 Na⁺ 的吸收及转运等过程,但通过调节植物激素信号途径、抗氧化胁迫、气孔开度、盐胁迫相关基因表达调控、细胞程序性死亡或抗渗透胁迫等机制,提高水稻对盐胁迫的适应性,有望作为基因组编辑的水稻耐盐性分子改良的靶基因。

2.3.2 利用基因组编辑技术创制耐盐水稻材料

Nan 等^[65]利用 CRISPR/Cas9 技术对 *OsMDH1* 基因进行功能敲除;在 100 mmol/L NaCl 胁迫条件下,*osmdh1* 突变体 ROS 积累量降低、维生素 B6 含量增高、耐盐性增强。Wang 等^[68]创制了 *OsDSK2a* 基因的敲除突变体;与野生型相比,*osdsk2a* 植株 GA 含量降低、生长减缓,在 120 mmol/L NaCl 条件下,耐盐性增强。Jiang 等^[74]创制了 *OsIPK1* 基因的 33-nt 缺失突变材料 *osipk1_1*;在 100 mmol/L NaCl 胁迫条件下,*osipk1_1* 植株的肌醇三磷酸(IP3)含量、ROS 积累量降低,抗氧化酶活性、耐盐性增强。Lan 等^[78]利用 CRISPR/Cas9 技术对 *OsSPL10* 基因进行功能敲除;*osspl10* 突变体植株表皮毛发育受抑制,但在 150 mmol/L NaCl 条件下,耐盐性显著增强。Alfatih 等^[81]创制了 *OsPQT3* 基因的敲除突变体;与野生型相比,在 100 mmol/L、175 mmol/L 和 200 mmol/L NaCl 胁迫条件下,*ospqt3* 植株均表现耐盐性增强,且在温室和田间环境下均表现出显著的增产潜力。上述结果验证了 *OsMDH1* 等基因负调控水稻耐盐性的功能,同时也展示了通过定点编辑负调控耐盐性的功能基因,能够高效、快速创制水稻耐盐材料。

基于 Huang 等^[40]、Yang 等^[69]、Takagi 等^[77]前期鉴定的 *OsDST*、*OsEIL1/OsEIL2* 以及 *OsRR22* 等基因负调控水稻耐盐性的基础,Santosh-Kumar 等^[82]、莫天宇等^[83]、Zhang 等^[84]利用 CRISPR/Cas9 技术分别创制了相应基因的突变体材料。Santosh-Kumar 等^[82]创制了一个 *OsDST* 基因的 366-nt 缺失突变材料 *dst^{A184-305}*;与野生型相比,*dst^{A184-305}* 植株叶片变宽、气孔密度降低,在 200 mmol/L NaCl 处理条件下,耐盐性增强。莫天宇等^[83]研究表明,在 200 mmol/L NaCl 处理后,*oseil1/oseil2* 双基因突变

表 1 负调控水稻耐盐性的功能基因

Table 1 Funtional genes negatively regulating salinity tolerance in rice

基因号 Gene ID	基因名称 Gene name	编码蛋白 Coding protein	生物学功能 Biological function	功能验证 Experimental confirmation	参考文献 Reference
<i>LOC_Os01g10840</i>	<i>OsGSK1</i>	糖原合成酶激酶	调节 BR 信号途径	T-DNA 插入突变体耐盐性增强	[62]
<i>LOC_Os01g49290</i>	<i>OsRACK1A</i>	活性蛋白激酶 C 受体	调节 Na ⁺ /K ⁺ 含量、ABA 信号途径	RNAi 植株耐盐性增强	[63]
<i>LOC_Os01g50370</i>	<i>OsMaPKKK63</i>	丝裂原活化蛋白激酶激酶	调节 MAPK 信号途径	T-DNA 插入突变体耐盐性增强	[64]
<i>LOC_Os01g61380</i>	<i>OsMDH1</i>	苹果酸脱氢酶	调节抗氧化剂维生素 B6 含量	CRISPR/Cas9 编辑突变体耐盐性增强	[65]
<i>LOC_Os01g64000</i>	<i>OsABI5</i>	bZIP 转录因子	ND	反义 RNA 植株耐盐性增强、育性降低	[66]
<i>LOC_Os02g42780</i>	<i>SIT1</i>	类受体激酶	调节 ROS 积累	RNAi、T-DNA 插入突变体耐盐性增强	[67]
<i>LOC_Os03g03920</i>	<i>OsDSK2a</i>	泛素结合蛋白	调节 GA 信号途径	T-DNA 插入突变体、CRISPR/Cas9 编辑突变体耐盐性增强	[68]
<i>LOC_Os03g20790</i>	<i>OsEIL1</i>	乙烯信号调控因子	调节乙烯信号途径	RNAi 植株耐盐性增强	[69]
<i>LOC_Os03g57240</i>	<i>DST</i>	锌指转录因子	调节 ROS 积累、气孔开度	EMS 突变体耐盐性增强	[40]
<i>LOC_Os03g60430</i>	<i>IDS1</i>	AP2/ERF 转录因子	调控 <i>LEA1</i> 和 <i>SOS1</i> 基因表达	RNAi、T-DNA 插入突变体耐盐性增强	[70]
<i>LOC_Os04g43200</i>	<i>OsClo5</i>	油体钙蛋白	调控应答盐胁迫相关基因表达	T-DNA 插入突变体耐盐性增强	[71]
<i>LOC_Os04g45810</i>	<i>Oshox22</i>	同源异型域 - 亮氨酸拉链蛋白	调节 ABA 信号途径	T-DNA 插入 (启动子区) 突变体耐盐性增强	[72]
<i>LOC_Os04g56430</i>	<i>OsRMC</i>	类受体激酶	ND	RNAi 植株耐盐性增强	[73]
<i>LOC_Os04g56580</i>	<i>OsIPK1</i>	1, 3, 4, 5, 6- 五磷酸肌醇 2- 激酶	调节 ROS 积累	CRISPR/Cas9 编辑突变体耐盐性增强	[74]
<i>LOC_Os05g25770</i>	<i>OsWRKY45-2</i>	WRKY 转录因子	调节 ABA 信号途径	RNAi 植株耐盐性增强	[75]
<i>LOC_Os05g47446</i>	<i>OsPDCD5</i>	细胞程序性死亡调控蛋白	调节细胞程序性死亡	反义 RNA 植株耐盐性增强、育性降低	[76]
<i>LOC_Os06g08440</i>	<i>OsRR22</i>	B 型响应调节蛋白	调节 cytokinin 信号途径	EMS、Tos17 插入突变体耐盐性增强	[77]
<i>LOC_Os06g44860</i>	<i>OsSPL10</i>	SBP-Box 蛋白	ND	CRISPR/Cas9 编辑突变体耐盐性增强	[78]
<i>LOC_Os07g48630</i>	<i>OsEIL2</i>	乙烯信号调控因子	调节 ET 信号途径	RNAi 植株耐盐性增强	[69]
<i>LOC_Os07g48760</i>	<i>OsCIPK03</i>	蛋白激酶	调节渗透调节物质 (脯氨酸) 积累	RNAi 植株耐盐性增强	[79]
<i>LOC_Os08g43334</i>	<i>OsHsfB2b</i>	热激因子	调节渗透调节物质 (脯氨酸) 积累	RNAi 植株耐盐性增强	[80]
<i>LOC_Os10g29560</i>	<i>OsPQT3</i>	E3 泛素连接酶	调节氧化胁迫应答	CRISPR/Cas9 编辑突变体耐盐性增强	[81]

ND: 未明确生物学功能

ND: Not determined

植株幼苗存活率达到 75.0%, 显著高于野生型植株 8.3% 的存活率。Zhang 等^[84]创制了 *OsRR22* 基因的敲除突变植株; 在 0.75% 盐溶液处理条件下, *osrr22* 突变植株耐盐性显著高于野生型植株; 在非盐胁迫条件下, *osrr22* 农艺性状与野生型无明显差异。

3 展望

近年来, 水稻耐盐性的基因资源挖掘、分子机制研究等取得了许多进展, 结合高通量基因组选择、基因组编辑等创新性技术的进展, 为水稻耐盐分子改良奠定了重要的基础。另一方面, 水稻耐盐遗传改良仍然处于起步阶段。多数耐盐品种的耐盐性有待提高或耐盐性与产量、抗性、适应性、品质等难以协调统一。未来通过进一步挖掘、利用优异耐盐基因资源, 加强耐盐分子机制研究, 发展精准分子改良等策略, 促进水稻耐盐分子改良的进展。

3.1 优异耐盐种质资源及基因资源挖掘

迄今为止, 国内外已经育成的耐盐水稻品种众多, 但绝大多数品种的耐盐碱性不够强, 难以满足高盐碱地块的种植需求。优异基因资源是水稻耐盐遗传改良的基础。来源于广东湛江滩涂野生水稻资源的海稻 86 是目前认可的耐盐性强的水稻种质资源, 其耐盐性显著高于耐盐栽培品种盐丰 47^[85]。Wu 等^[58]初步从海稻 86 中鉴定到一个 QTL 位点 *qST1.1* 可能与耐盐性有关。进一步挖掘海稻 86 的耐盐基因, 能够为培育强耐盐性的水稻提供基因资源。历史上, 我国一些沿海地区曾种植一些耐盐碱强的农家品种, 如 20 世纪 70 年代至 80 年代初, 福建省漳州市沿海地区常年种植耐盐碱强的水稻农家种“咸种”。征集此类地方种质资源或野生稻并从中挖掘更多优异耐盐资源, 能够为水稻耐盐遗传改良提供更丰富的基因资源。

3.2 基于基因组编辑的多个耐盐基因的聚合

通过聚合控制不同性状的多个基因, 能够实现培育综合性状优良品种的目标。多基因聚合也被广泛应用于单一性状的加强, 通过聚合多个抗病基因, 培育抗性增强、抗谱拓宽的作物品种, 便是其中典型的多基因聚合应用的例子。通过聚合多个耐盐基因, 同样有助于选育耐盐性更强的水稻品种^[86]。近年来, 随着越来越多的 QTL 得到鉴定, 通过分子标记辅助选择或全基因组选择的策略, 能够实现多个耐盐基因或 QTL 的聚合。另一方面, 目前已鉴定的来源于自然水稻种质的耐盐功能基因较少, 多数与

耐盐相关的 QTL 效应不够显著, 难以被高效率应用于多基因聚合。

基于基因组编辑技术定点突变负调控水稻耐盐性的功能基因, 为创制聚合多个耐盐基因的水稻材料提供了一个高效便捷的途径。基因组编辑技术的发展, 使得一次性突变多个目的基因成为一种常规操作。研究表明, 水稻耐盐负调控基因具有不同的耐盐途径。因此, 通过同时突变多个耐盐负调控基因, 实现多个耐盐基因聚合, 有望叠加不同耐盐途径的效应, 培育出耐盐性更强的水稻材料。

参考文献

- [1] 彭既明. 耐盐(碱)水稻研发的建议. 中国稻米, 2019, 25(1): 7-9
Peng J M. Suggestions for developing saline-alkaline tolerant rice. China Rice, 2019, 25(1): 7-9
- [2] Qin H, Li Y, Huang R. Advances and challenges in the breeding of salt-tolerant rice. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(21): 8385
- [3] Ponce K S, Meng L, Guo L, Leng Y, Ye G. Advances in sensing, response and regulation mechanism of salt tolerance in rice. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(5): 2254
- [4] Chang J, Cheong B E, Natera S, Roessner U. Morphological and metabolic responses to salt stress of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars which differ in salinity tolerance. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 144: 427-435
- [5] Tsai Y C, Chen K C, Cheng T S, Lee C, Lin S H, Tung C W. Chlorophyll fluorescence analysis in diverse rice varieties reveals the positive correlation between the seedlings salt tolerance and photosynthetic efficiency. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 403
- [6] 肖丹丹, 李军, 邓先亮, 卫平洋, 唐健, 韦还和, 陈英龙, 戴其根. 不同品种稻米品质形成对盐胁迫的响应. 核农学报, 2020, 34(8): 1840-1847
Xiao D D, Li J, Deng X L, Wei P Y, Tang J, Wei H H, Chen Y L, Dai Q G. Response of quality formation of different rice varieties to salt stress. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(8): 1840-1847
- [7] Rains D W, Epstein E. Sodium absorption by barley roots: Role of the dual mechanisms of alkali cation transport. Plant Physiology, 1967, 42: 314-318
- [8] Riedelsberger J, Miller J K, Valdebenito-Maturana B, Piñeros M A, González W, Dreyer I. Plant HKT channels: An updated view on structure, function and gene regulation. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(4): 1892
- [9] Horie T, Costa A, Kim T H, Han M J, Horie R, Leung H Y, Miyao A, Hirochika H, An G, Schroeder J I. Rice OsHKT2; 1 transporter mediates large Na^+ influx component into K^+ -starved roots for growth. The EMBO Journal, 2007, 26(12): 3003-3014
- [10] Yao X, Horie T, Xue S, Leung H Y, Katsuhara M, Brodsky D E, Wu Y, Schroeder J I. Differential sodium and potassium transport selectivities of the rice OsHKT2; 1 and OsHKT2; 2

- transporters in plant cells. *Plant Physiology*, 2010, 152(1): 341-355
- [11] Garcíadeblas B, Senn M E, Banuelos M A, Rodríguez-Navarro A. Sodium transport and HKT transporters: The rice model. *Plant Journal*, 2003, 34: 788-801
- [12] Demidchik V, Tester M. Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology*, 2002, 128: 379-387
- [13] Davenport. A weakly voltage-dependent nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat. *Plant Physiology*, 2000, 122: 823-834
- [14] Isayenkov S V, Maathuis F J M. Plant salinity stress: Many unanswered questions remain. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 80
- [15] Ren Z H, Gao J P, Li L G, Cai X L, Huang W, Chao D Y, Zhu M Z, Wang Z Y, Luan S, Lin H X. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature Genetics*, 2005, 37: 1141-1146
- [16] Kobayashi N I, Yamaji N, Yamamoto H, Okubo K, Ueno H, Costa A, Tanoi K, Matsumura H, Fujii-Kashino M, Horiuchi T, Nayef M A, Shabala S, An G, Ma J F, Horie T. OsHKT1; 5 mediates Na^+ exclusion in the vasculature to protect leaf blades and reproductive tissues from salt toxicity in rice. *Plant Journal*, 2017, 91: 657-670
- [17] Martínez-Atienza J, Jiang X, Garcíadeblas B, Mendoza I, Zhu J K, Pardo J M, Quintero F J. Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. *Plant Physiology*, 2007, 143(2): 1001-1012
- [18] El Mahi H, Pérez-Hormaeche J, De Luca A, Villalta I, Espartero J, Gámez-Arjona F, Fernández J L, Bundó M, Mendoza I, Mieulet D, Lalanne E, Lee S Y, Yun D J, Guiderdoni E, Aguilar M, Leidi E O, Pardo J M, Quintero F J. A critical role of sodium flux via the plasma membrane Na^+/H^+ exchanger SOS1 in the salt tolerance of rice. *Plant Physiology*, 2019, 180(2): 1046-1065
- [19] Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A, Tanaka H, Miyao A, Hirochika H, Tanaka Y. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter from rice. *Plant and Cell Physiology*, 2004, 45(2): 146-159
- [20] Campbell M T, Bandillo N, Al-Shiblawi F R A, Sharma S, Liu K, Du Q, Schmitz A J, Zhang C, Véry A A, Lorenz A J, Walia H. Allelic variants of OsHKT1; 1 underlie the divergence between *indica* and *japonica* subspecies of rice (*Oryza sativa*) for root sodium content. *PLoS Genetics*, 2017, 13(6): e1006823
- [21] Wang R, Jing W, Xiao L, Jin Y, Shen L, Zhang W. The rice high-affinity potassium transporter1; 1 is involved in salt tolerance and regulated by an MYB-type transcription factor. *Plant Physiology*, 2015, 168(3): 1076-1090
- [22] Suzuki K, Yamaji N, Costa A, Okuma E, Kobayashi N I, Kashiwagi T, Katsuhara M, Wang C, Tanoi K, Murata Y, Schroeder J I, Ma J F, Horie T. OsHKT1; 4-mediated Na^+ transport in stems contributes to Na^+ exclusion from leaf blades of rice at the reproductive growth stage upon salt stress. *BMC Plant Biology*, 2016, 16: 22
- [23] Oda Y, Kobayashi N I, Tanoi K, Ma J F, Itou Y, Katsuhara M, Itou T, Horie T. T-DNA tagging-based gain-of-function of OsHKT1; 4 reinforces Na exclusion from leaves and stems but triggers Na toxicity in roots of rice under salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(1): 235
- [24] Oomen R J, Benito B, Sentenac H, Rodríguez-Navarro A, Talón M, Véry A A, Domingo C. HKT2; 2/1, a K^+ -permeable transporter identified in a salt-tolerant rice cultivar through surveys of natural genetic polymorphism. *Plant Journal*, 2012, 71(5): 750-762
- [25] Liu S P, Zheng L Q, Xue Y H, Zhang Q, Wang L, Shuo H X. Overexpression of *OsVPI* and *OsNHX1* increases tolerance to drought and salinity in rice. *Journal of Plant Biology*, 2010, 53: 444-452
- [26] Hasthansombut S, Supaibulwatana K, Mii M, Nakamura I. Genetic manipulation of *Japonica* rice using the *OsBADH1* from *Indica* rice to improve salinity tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2011, 104: 79-89
- [27] Tang W, Sun J, Liu J, Liu F, Yan J, Gou X, Lu B R, Liu Y. RNAi-directed downregulation of *betaine aldehyde dehydrogenase 1* (*OsBADH1*) results in decreased stress tolerance and increased oxidative markers without affecting glycine betaine biosynthesis in rice (*Oryza sativa*). *Plant Molecular Biology*, 2014, 86(4-5): 443-454
- [28] Ge L F, Chao D Y, Shi M, Zhu M Z, Gao J P, Lin H X. Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene *OsTPP1* confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes. *Planta*, 2008, 228(1): 191-201
- [29] Li H W, Zang B S, Deng X W, Wang X P. Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene *OsTPS1* enhances abiotic stress tolerance in rice. *Planta*, 2011, 234(5): 1007-1018
- [30] Vishal B, Krishnamurthy P, Ramamoorthy R, Kumar P P. *OsTPS8* controls yield-related traits and confers salt stress tolerance in rice by enhancing suberin deposition. *New Phytologist*, 2019, 221(3): 1369-1386
- [31] Liu C, Fukumoto T, Matsumoto T, Gena P, Frascaria D, Kaneko T, Katsuhara M, Zhong S, Sun X, Zhu Y, Iwasaki I, Ding X, Calamita G, Kitagawa Y. Aquaporin OsPIP1; 1 promotes rice salt resistance and seed germination. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 63: 151-158
- [32] Kibria M G, Hossain M, Murata Y, Hoque M A. Antioxidant defense mechanisms of salinity tolerance in rice genotypes. *Rice Science*, 2017, 24(3): 155-162
- [33] Tanaka Y, Hibino T, Hayashi Y, Tanaka A, Kishitani S, Takabe T, Yokota S, Takabe T. Salt tolerance of transgenic rice overexpressing yeast mitochondrial Mn-SOD in chloroplasts. *Plant Science*, 1999, 148(2): 131-138
- [34] Guan Q, Liao X, He M, Li X, Wang Z, Ma H, Yu S, Liu S. Tolerance analysis of chloroplast *OsCu/Zn-SOD* overexpressing rice under NaCl and NaHCO_3 stress. *PLoS ONE*, 2017, 12(10): e0186052
- [35] Yamane K, Mitsuya S, Taniguchi M, Miyake H. Transcription profiles of genes encoding catalase and ascorbate peroxidase in the rice leaf tissues under salinity. *Plant Production Science*, 2010, 13(2): 164-168
- [36] Zhou Y B, Liu C, Tang D Y, Yan L, Wang D, Yang Y Z, Gui J S, Zhao X Y, Li L G, Tang X D, Yu F, Li J L, Liu L L, Zhu Y H, Lin J Z, Liu X M. The receptor-like cytoplasmic kinase STRK1

- phosphorylates and activates CatC, thereby regulating H₂O₂ homeostasis and improving salt tolerance in rice. *Plant Cell*, 2018, 30(5): 1100-1118
- [37] Zhang Z, Zhang Q, Wu J, Zheng X, Zheng S, Sun X, Qiu Q, Lu T. Gene knockout study reveals that cytosolic ascorbate peroxidase 2 (OsAPX2) plays a critical role in growth and reproduction in rice under drought, salt and cold stresses. *PLoS ONE*, 2013, 8(2): e57472
- [38] Ning X, Sun Y, Wang C, Zhang W, Sun M, Hu H, Liu J, Yang L. A rice CPYC-type glutaredoxin *OsGRX20* in protection against bacterial blight, methyl viologen and salt stresses. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 111
- [39] Song Y, Miao Y, Song C P. Behind the scenes: The roles of reactive oxygen species in guard cells. *New Phytologist*, 2014, 201(4): 1121-1140
- [40] Huang X Y, Chao D Y, Gao J P, Zhu M Z, Shi M, Lin H X. A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. *Genes and Development*, 2009, 23(15): 1805-1817
- [41] Cui L G, Shan J X, Shi M, Gao J P, Lin H X. DCA1 acts as a transcriptional co-activator of DST and contributes to drought and salt tolerance in rice. *PLoS Genetics*, 2015, 11(10): e1005617
- [42] Dodd A N, Kudla J, Sanders D. The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61: 593-620
- [43] Jiang Z, Zhou X, Tao M, Yuan F, Liu L, Wu F, Wu X, Xiang Y, Niu Y, Liu F, Li C, Ye R, Byeon B, Xue Y, Zhao H, Wang H N, Crawford B M, Johnson D M, Hu C, Pei C, Zhou W, Swift G B, Zhang H, Vo-Dinh T, Hu Z, Siedow J N, Pei Z M. Plant cell-surface GIPC sphingolipids sense salt to trigger Ca²⁺ influx. *Nature*, 2019, 572(7769): 341-346
- [44] Ma L, Ye J, Yang Y, Lin H, Yue L, Luo J, Long Y, Fu H, Liu X, Zhang Y, Wang Y, Chen L, Kudla J, Wang Y, Han S, Song CP, Guo Y. The SOS2-SCaBP8 complex generates and fine-tunes an AtANN4-dependent calcium signature under salt stress. *Developmental Cell*, 2019, 48(5): 697-709
- [45] Yang Z, Wang C, Xue Y, Liu X, Chen S, Song C, Yang Y, Guo Y. Calcium-activated 14-3-3 proteins as a molecular switch in salt stress tolerance. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 1199
- [46] Lou L, Yu F, Tian M, Liu G, Wu Y, Wu Y, Xia R, Pardo J M, Guo Y, Xie Q. ESCRT-I component VPS23A sustains salt tolerance by strengthening the SOS module in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1134-1148
- [47] Li J, Zhou H, Zhang Y, Li Z, Yang Y, Guo Y. The GSK3-like kinase BIN2 is a molecular switch between the salt stress response and growth recovery in *Arabidopsis thaliana*. *Developmental Cell*, 2020, 55(3): 367-380
- [48] Chen T, Shabala S, Niu Y, Chen Z H, Shabala L, Meinke H, Venkataraman G, Pareek A, Xu J, Zhou M. Molecular mechanisms of salinity tolerance in rice. *The Crop Journal*, 2021, 9(3): 506-520
- [49] Fernando L H. The performance of salt resistant paddy, Pokkali in Ceylon. *Tropical Agriculturist*, 1949, 105: 124-126
- [50] Shendge P Y, Chavan V M, Deshpande J D. Breeding of saline resistant varieties in Bombay state. *Rice News Letter*, 1959, 8(2,3): 18-19
- [51] Akbar M, Yabuno T, Nakao S. Breeding for saline resistant varieties of rice. I. Variability for salt tolerance among rice varieties. *Japanese Journal of Breeding*, 1972, 22(5): 277-284
- [52] Moeljopawiro S, Ikehashi H. Inheritance of salt tolerance in rice. *Euphytica*, 1981, 30: 291-300
- [53] Thomson M J, de Ocampo M, Egdane J, Rahman M A, Sajise A G, Adorada D L, Tumimbang-Raiz E, Blumwald E, Seraj Z I, Singh R K, Gregorio G B, Ismail A M. Characterizing the *saltol* quantitative trait locus for salinity tolerance in rice. *Rice*, 2010, 3: 148-160
- [54] 周汝伦, 侯家龙, 方宗熙, 王明珍, 宋景芝, 刘惠令. 耐盐水稻品种选育初报. *中国农业科学*, 1983, 16(5): 7-13
Zhou R L, Hou J L, Fang Z X, Wang M Z, Song J Z, Liu H L. First report on breeding of salt-tolerant rice plants. *Scientia Agricultura Sinica*, 1983, 16(5): 7-13
- [55] 吴荣生, 王志霞, 蒋荷, 王根来, 顾平, 陈炳泉. 太湖流域稻种资源耐盐性筛选鉴定. *江苏农业科学*, 1989(1): 8-9
Wu R S, Wang Z X, Jiang H, Wang G L, Gu P, Chen B Q. Screening and assessment of salt tolerance in rice germplasms from Tai Lake basin. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 1989(1): 8-9
- [56] 沈家驹. 抗盐高产水稻新品种辽盐2号. *中国种业*, 1991(4): 47-48
Shen J J. New salt-resistant, high-yield rice variety Liaoyan No.2. *China Seed Industry*, 1991(4): 47-48
- [57] Chen R, Cheng Y, Han S, Van Handel B, Dong L, Li X, Xie X. Whole genome sequencing and comparative transcriptome analysis of a novel seawater adapted, salt-resistant rice cultivar-sea rice 86. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 655
- [58] Wu F, Yang J, Yu D, Xu P. Identification and validation a major QTL from "Sea Rice 86" seedlings conferred salt tolerance. *Agronomy*, 2020, 10(3): 410
- [59] Das P, Nutan K K, Singla-Pareek S L, Pareek A. Understanding salinity responses and adopting 'omics-based' approaches to generate salinity tolerant cultivars of rice. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 712
- [60] 袁隆平. 耐盐碱水稻育种技术. 济南: 山东科学技术出版社, 2019: 121-131
Yuan L P. Saline-alkaline tolerance rice breeding technology. Jinan: Shandong Technology Press, 2019: 121-131
- [61] 任俊, 曹跃炫, 黄勇, 董慧荣, 刘庆, 王克剑. 基因编辑技术及其水稻中的发展和应用. *中国稻米*, 2021, 27(4): 92-100
Ren J, Cao Y X, Huang Y, Dong H R, Liu Q, Wang K J. Development and application of genome editing technology in rice. *China Rice*, 2021, 27(4): 92-100
- [62] Koh S, Lee S C, Kim M K, Koh J H, Lee S, An G, Choe S, Kim S R. T-DNA tagged knockout mutation of rice *OsGSK1*, an orthologue of *Arabidopsis* BIN2, with enhanced tolerance to various abiotic stresses. *Plant Molecular Biology*, 2007, 65(4): 453-466
- [63] Zhang D, Wang Y, Shen J, Yin J, Li D, Gao Y, Xu W, Liang J. *OsRACK1A*, encodes a circadian clock-regulated WD40 protein, negatively affect salt tolerance in rice. *Rice*, 2018, 11(1): 45
- [64] Na Y J, Choi H K, Park M Y, Choi S W, Xuan Vo K T, Jeon J S, Kim S Y. OsMAPKKK63 is involved in salt stress response and seed dormancy control. *Plant Signal and Behavior*, 2019, 14(3): e1578633

- [65] Nan N, Wang J, Shi Y, Qian Y, Jiang L, Huang S, Liu Y, Wu Y, Liu B, Xu Z Y. Rice plastidial NAD-dependent malate dehydrogenase 1 negatively regulates salt stress response by reducing the vitamin B6 content. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18 (1): 172-184
- [66] Zou M, Guan Y, Ren H, Zhang F, Chen F. A bZIP transcription factor, OsABI5, is involved in rice fertility and stress tolerance. *Plant Molecular Biology*, 2008, 66 (6): 675-683
- [67] Li C H, Wang G, Zhao J L, Zhang L Q, Ai L F, Han Y F, Sun D Y, Zhang S W, Sun Y. The receptor-like kinase SIT1 mediates salt sensitivity by activating MAPK3/6 and regulating ethylene homeostasis in rice. *Plant Cell*, 2014, 26 (6): 2538-2553
- [68] Wang J, Qin H, Zhou S, Wei P, Zhang H, Zhou Y, Miao Y, Huang R. The ubiquitin-binding protein OsDSK2a mediates seedling growth and salt responses by regulating gibberellin metabolism in rice. *Plant Cell*, 2020, 32 (2): 414-428
- [69] Yang C, Ma B, He S J, Xiong Q, Duan K X, Yin C C, Chen H, Lu X, Chen S Y, Zhang J S. MAOHUZI6/ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE2 regulate ethylene response of roots and coleoptiles and negatively affect salt tolerance in rice. *Plant Physiology*, 2015, 169 (1): 148-165
- [70] Cheng X, Zhang S, Tao W, Zhang X, Liu J, Sun J, Zhang H, Pu L, Huang R, Chen T. INDETERMINATE SPIKELET1 recruits histone deacetylase and a transcriptional repression complex to regulate rice salt tolerance. *Plant Physiology*, 2018, 178 (2): 824-837
- [71] Jing P, Kong D, Ji L, Kong L, Wang Y, Peng L, Xie G. OsC1o5 functions as a transcriptional co-repressor by interacting with OsDi19-5 to negatively affect salt stress tolerance in rice seedlings. *Plant Journal*, 2021, 105 (3): 800-815
- [72] Zhang S, Haider I, Kohlen W, Jiang L, Bouwmeester H, Meijer A H, Schlupmann H, Liu C M, Ouwerkerk P B. Function of the HD-Zip I gene *Oshox22* in ABA-mediated drought and salt tolerances in rice. *Plant Molecular Biology*, 2012, 80 (6): 571-585
- [73] Zhang L, Tian L H, Zhao J F, Song Y, Zhang C J, Guo Y. Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. *Plant Physiology*, 2009, 149 (2): 916-928
- [74] Jiang M, Liu Y, Li R, Li S, Tan Y, Huang J, Shu Q. An *inositol 1, 3, 4, 5, 6-pentakisphosphate 2-kinase 1* mutant with a 33-nt deletion showed enhanced tolerance to salt and drought stress in rice. *Plants*, 2020, 10 (1): 23
- [75] Tao Z, Kou Y, Liu H, Li X, Xiao J, Wang S. *OsWRKY45* alleles play different roles in abscisic acid signaling and salt stress tolerance but similar roles in drought and cold tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62 (14): 4863-4874
- [76] Yang M, Sun F, Wang S, Qi W, Wang Q, Dong X, Yang J, Luo X. Down-regulation of *OsPDCD5*, a homolog of the mammalian *PDCD5*, increases rice tolerance to salt stress. *Molecular Breeding*, 2013, 31: 333-346
- [77] Takagi H, Tamiru M, Abe A, Yoshida K, Uemura A, Yaegashi H, Obara T, Oikawa K, Utsushi H, Kanzaki E, Mitsuoka C, Natsume S, Kosugi S, Kanzaki H, Matsumura H, Urasaki N, Kamoun S, Terauchi R. MutMap accelerates breeding of a salt-tolerant rice cultivar. *Nature Biotechnology*, 2015, 33 (5): 445-449
- [78] Lan T, Zheng Y, Su Z, Yu S, Song H, Zheng X, Lin G, Wu W. *OsSPL10*, a SBP-box gene, plays a dual role in salt tolerance and trichome formation in rice (*Oryza sativa* L.). *G3 (Bethesda)*, 2019, 9 (12): 4107-4114
- [79] Rao X L, Zhang X H, Li R J, Shi H T, Lu Y T. A calcium sensor-interacting protein kinase negatively regulates salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa*). *Functional Plant Biology*, 2011, 38 (6): 441-450
- [80] Xiang J, Ran J, Zou J, Zhou X, Liu A, Zhang X, Peng Y, Tang N, Luo G, Chen X. Heat shock factor OsHsfB2b negatively regulates drought and salt tolerance in rice. *Plant Cell Reports*, 2013, 32 (11): 1795-1806
- [81] Alfatih A, Wu J, Jan S U, Zhang Z S, Xia J Q, Xiang C B. Loss of rice *PARQUATTOLERANCE 3* confers enhanced resistance to abiotic stresses and increases grain yield in field. *Plant, Cell and Environment*, 2020, 43 (11): 2743-2754
- [82] Santosh-Kumar V V, Verma R K, Yadav S K, Yadav P, Watts A, Rao M V, Chinnusamy V. CRISPR-Cas9 mediated genome editing of *drought and salt tolerance (OsDST)* gene in *indica* mega rice cultivar MTU1010. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2020, 26 (6): 1099-1110
- [83] 莫天宇, 徐善斌, 邹德堂, 王敬国, 刘化龙, 孙健, 贾琰, 赵宏伟, 郑洪亮. 利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 *OsEIL1* 和 *OsEIL2* 基因改良水稻耐盐性. *华北农学报*, 2021, 36 (1): 71-80
- Mo T Y, Xu S B, Zou D T, Wang J G, Liu H L, Sun J, Jia Y, Zhao H W, Zheng H L. Enhancing salt tolerance of rice by knocking out *OsEIL1* and *OsEIL2* via CRISPR/Cas9 system. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2021, 36 (1): 71-80
- [84] Zhang A, Liu Y, Wang F, Li T, Chen Z, Kong D, Bi J, Zhang F, Luo X, Wang J, Tang J, Yu X, Liu G, Luo L. Enhanced rice salinity tolerance via CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *OsRR22* gene. *Molecular Breeding*, 2019, 39: 47
- [85] 刘凯, 朱静雯, 宛柏杰, 代金英, 唐红生, 孙明法. 水稻耐盐性分子遗传研究进展. *植物遗传资源学报*, 2021, 22 (4): 881-889
- Liu K, Zhu J W, Wan B J, Dai J Y, Tang H S, Sun M F. Research progress on molecular genetics of rice salt tolerance. *Journal of Plant Genetics Resources*, 2021, 22 (4): 881-889
- [86] Shailani A, Joshi R, Singla-Pareek S L, Pareek A. Stacking for future: Pyramiding genes to improve drought and salinity tolerance in rice. *Physiologia Plantarum*, 2021, 172 (2): 1352-1362