

基于 *OsSPL10* 编辑创制沿黄光叶耐盐水稻新种质

轩强兵, 周慧岗, 朱明兰, 王俊杰*, 梁卫红*

河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007

轩强兵, 周慧岗, 朱明兰, 王俊杰, 梁卫红. 基于 *OsSPL10* 编辑创制沿黄光叶耐盐水稻新种质[J]. 生物工程学报, 2025, 41(2): 706-718.
XUAN Qiangbing, ZHOU Huigang, ZHU Minglan, WANG Junjie, LIANG Weihong. Creation of new glabrous and salt-tolerant rice germplasm along the Yellow River by CRISPR-Cas9-mediated editing of *OsSPL10*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 706-718.

摘要: *OsSPL10* 基因能够调控水稻表皮毛发育, 并与抗盐、耐干旱等性状相关, 但该基因是否可用于基因编辑创制光叶耐盐水稻新种质尚不明确。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术, 以河南省沿黄稻区 3 个粳稻品种‘新丰 2 号’‘新科稻 31’和‘新稻 25’为材料, 对 *OsSPL10* 基因进行编辑, 经筛选鉴定获得 6 种 *spl10* 突变体。肉眼观察结合扫描电镜检测证实 6 种 *spl10* 突变体的叶片和颖壳均出现无毛性状, 光叶标记基因 *OsHL6*、*OsGL6* 和 *OsWOX3B* 的表达量显著低于野生型; 剑叶生理特征检测显示, 6 种 *spl10* 突变体的净光合速率、气孔导度和蒸腾速率均极显著高于对应的野生型水稻。苗期耐盐性鉴定结果表明, 200 mmol/L NaCl 处理 7 d 后, 突变株的存活率远高于野生型。实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测结果显示, 与野生型相比, 盐胁迫相关基因 *OsGASR1* 表达量显著降低, *OsNHX2* 和 *OsIDS1* 的表达量显著升高。农艺学性状分析发现, 与野生型相比, 突变体的株高显著增加, 产量等相关性状均无明显变化。本研究创制的 6 种 *spl10* 突变体不仅具有光叶、光颖壳特征, 而且耐盐能力显著提高, 为沿黄水稻定向育种提供了新的种质资源。

关键词: CRISPR/Cas9 技术; 沿黄水稻; *OsSPL10*; 光叶; 抗盐

资助项目: 国家自然科学基金(32201248); 河南省重点研发与推广专项(242102111164); 河南省科技研发计划联合基金(222301420106)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32201248), the Key Research and Development and Promotion Projects of Henan Province (242102111164), and the Henan Science and Technology Research and Development Plan Joint Fund (222301420106).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Junjie, 2019093@htu.edu.cn; LIANG Weihong, liangwh@htu.edu.cn

Received: 2024-04-08; Accepted: 2024-07-24; Published online: 2024-07-29

Creation of new glabrous and salt-tolerant rice germplasm along the Yellow River by CRISPR-Cas9-mediated editing of *OsSPL10*

XUAN Qiangbing, ZHOU Huigang, ZHU Minglan, WANG Junjie*, LIANG Weihong*

College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, Henan, China

Abstract: The *OsSPL10* gene has previously been reported to positively regulate trichome development and negatively regulate salt and drought stress tolerance in rice. However, it is not clear whether this gene can be used for gene editing to create new germplasm of glabrous leaf and salt-tolerant rice. In this study, we created six rice mutants by CRISPR/Cas9-mediated editing of *OsSPL10* from ‘Xinfeng 2’, ‘Xinkedao 31’, and ‘Xindao 25’, the main rice cultivars along the Yellow River. Visual observation and scanning electron microscopy verified that the mutants lacked trichomes on the leaves and glumes, and the expression of glabrous marker genes *OsHL6*, *OsGL6*, and *OsWOX3B* in mutants was down-regulated compared with that in the wild type. The net photosynthetic rate, stomatal conductance, and transpiration rate of flag leaves in the mutants were significantly higher than those in the wild type. In addition, the survival rates of the mutants were much higher than that of the wild type after 7 days of treatment with 200 mmol/L NaCl. The results of quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) further verified that compared with the wild type, the mutants demonstrated down-regulated expression of the salt stress-related gene *OsGASR1* and up-regulated expression of *OsNHX2* and *OsIDS1*. Statistical analysis of agronomic traits showed that the mutants had increased plant height and no significant changes in yield-related traits compared with the wild type. The six *spl10* mutants created in this study not only had glabrous leaves and glumes but also demonstrated enhanced tolerance to salt stress, serving as new germplasm resources for directional breeding of rice along the Yellow River.

Keywords: CRISPR/Cas9; rice along the Yellow River; *OsSPL10*; glabrous leaf; salt tolerance

粮食安全是国民经济发展、社会稳定的基石。水稻作为我国主要粮食作物之一，在国家粮食生产中具有举足轻重的作用。自 20 世纪 50 年代至今，我国水稻遗传育种研究居国际领先水平，经历了矮化育种、杂交水稻育种和绿色超级稻育种 3 次跨越式突破，在实现水稻单产显著提高的同时，稻米品质及抗性农艺性状也得到显著的改善^[1-2]。

SPL (squamosa promoter binding protein-like) 基因编码一类植物特有的转录因子，在调控植物生长与发育、激素信号通路、生物和非生物

胁迫等方面发挥重要作用^[3-8]。水稻基因组中有 19 个 SPL 基因，其中 *IPA1* (ideal plant architecture1) 编码 *OsSPL14* 蛋白，既能提高产量又能提高水稻对稻瘟病的抗性^[9]。*OsSPL16* 则参与水稻粒型、产量以及稻米品质的调控^[10]。*OsSPL10* 正向调控表皮毛的发育，同时负向调控对盐胁迫、干旱、草铵膦和褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*) 的耐受性^[6,11-15]。SPL 基因在提高水稻产量、改善水稻品质、增进抗逆性中有潜在的应用价值。

CRISPR/Cas9 基因编辑是种质改良技术的重大突破，可对特定基因进行定向改造，与传统

育种技术相比具有独特的优势,加快了水稻育种的进程,在水稻耐盐、抗旱、抗病、高产优质等性状改良与分子设计育种方面发挥着重要的作用^[13,16-18]。例如,利用 CRISPR/Cas9 技术定向编辑控制水稻耐盐性的主效基因 *OsRR22*,在 T₁ 代成功获得了 3 个纯合突变体,水稻耐盐性显著提高,存活率比野生型高 30%以上^[16]。对杂交水稻骨干不育系隆科 638S 的感病基因 *Bsr-d1*、*Pi21* 和 *ERF922* 进行多基因敲除,获得了同时对稻瘟病和白叶枯病具有广谱抗性的新种质^[17]。Hui 等^[18]通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术创制了新型 *BADH2* 等位基因系,为三系杂交稻香味性状改良提供了新思路。CRISPR/Cas9 基因编辑技术具有操作简单、高效、精准等特点,为水稻的基因功能鉴定和遗传改良提供了新的有力工具。

沿黄稻区是 20 世纪 50 年代开始,通过引黄稻改良发展起来的稻麦两熟高产区和优质米生产基地。本研究以沿黄稻区优势粳稻品种‘新丰 2 号’‘新科稻 31’和‘新稻 25’为遗传转化受体材料,利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对 *OsSPL10* 进行定向改造,以期获得沿黄光叶抗盐水稻新种质,明确 *OsSPL10* 基因的育种利用价值,拓展沿黄水稻种质资源的遗传多样性,服务于分子设计育种以及水稻种业的迭代升级。

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料、载体与主要试剂

本研究所用的材料为粳稻(*Oryza sativa* subsp. Japonica)品种‘新丰 2 号’‘新科稻 31’和‘新稻 25’。所用菌株为大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105。基因编辑中间载体为 SKm-gRNA,植物表达载体为 pC1300-Cas9。限制性内切酶和 T4 连接酶购自大连宝生物工程有限公司; 2 \times Es Taq Master Mix、ChamQ Universal SYBR qPCR

Master Mix、HiScript II Q RT SuperMix for qPCR、DNA marker、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司。本研究所用引物采用 Primer Premier 5.0 软件设计,经 NCBI 的 Primer-BLAST 确定引物特异性后,由天津金唯智生物科技有限公司合成(表 1)。

1.2 载体构建

将 *OsSPL10* (GenBank 登录号: LOC4341729) 在 NCBI 网站中进行检索,获得该基因序列信息并设计 gRNA (guide RNA),在水稻基因组序列数据库(<https://www.ricedata.cn/>)中进行 blast 比对验证,确定 gRNA 的特异性,据此设计靶位点引物 F1 和 R1,并通过引物退火制备 gRNA 片段,经 Aar I 酶切后连入 SKm-gRNA 载体。将中间载体用 *Kpn* I/*Bgl* II 酶切后,连入经 *Kpn* I/*Bam*HI 酶切后的植物表达载体 pC1300-Cas9,测序确认后,重组载体命名为 pC1300-*OsSPL10*。

1.3 遗传转化及筛选

采用农杆菌介导法,将 pC1300-*OsSPL10* 转化‘新丰 2 号’‘新科稻 31’和‘新稻 25’,经筛选和再分化,获得再生植株。取再生水稻幼嫩叶片,采用 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) 法提取水稻基因组 DNA,利用潮霉素基因 *Hyg* 特异引物进行 PCR 检测,筛选转基因阳性植株,然后采用 Hi-TOM 测序法^[19]进行突变位点检测,筛选不同突变类型的 *OsSPL10* 基因编辑水稻纯合株系。

1.4 剑叶表面特征的观察

分别取 *OsSPL10* 基因编辑水稻及对应的野生型水稻剑叶,按照 Lan 等^[6]的方法,采用扫描电镜观察叶片表面特征,并拍照记录。

1.5 剑叶光合指标检测

使用便携式光合作用测定系统,采用开放式气路,于晴天正午分别测定抽穗期野生型水稻及 *OsSPL10* 基因编辑水稻剑叶中部的净光合

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Purpose
F1	AAACGTTCTGGGGCGATGCAGGCG	Synthesis of <i>OsSPL10</i> editing target sites
R1	GGCACGCCTGCATCGCCCCGAAC	
F2	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	Construction of gRNA- <i>OsSPL10</i> vector
R2	TAATACGACTCACTATAGGG	
F3	CAGGAAACAGCTATGACC	Construction of pC1300- <i>OsSPL10</i> vector
R3	ATCTTCGTCCCATAGGTGTC	
F4	CTGCCCGCTGTTCTACAACCGG	<i>Hyg</i> gene confirmation
R4	GGAGCATATACGCCCGGAGTC	
F5	GGAGTGAGTACGGTGTGCCTATGATGAGCGGTAGGATG	Hi-TOM sequencing primers
R5	GAGTTGGATGCTGGATGGCCATGGTCGAACCCGACGTA	
F6	CATGCTATCCCTCGTCTCGACCT	qRT-PCR primers for <i>OsAct1</i> gene
R6	CGCACTTCATGATGGAGTTGTAT	
F7	GCTGGGGAAGCTAGTGGACA	qRT-PCR primers for <i>OsWOX3B</i> gene
R7	AGAGGTCCAGCGTCTTGAGC	
F8	CAAGACATCATCAGCACGGC	qRT-PCR primers for <i>OsHL6</i> gene
R8	CCCTGAACTTGATAGCGGCA	
F9	GAACCACTCAAACGACAA	qRT-PCR primers for <i>OsGL6</i> gene
R9	CCAACAGCTTAAGTGTGTC	
F10	CCTCCAAGTTTCCATGGCTGG	qRT-PCR primers for <i>OsGASR1</i> gene
R10	CACACGCCGCAGTACTTGAG	
F11	GGCCCACTCAACTCCCTAG	qRT-PCR primers for <i>OsNHX2</i> gene
R11	GTGGATCCGAAAGCGCACT	
F12	CTGTGGCTCTAGCTGCAAGT	qRT-PCR primers for <i>OsIDS1</i> gene
R12	GCAGGGATTGCATTTGCAGC	

速率、气孔导度和蒸腾速率。测量数据导入 Excel 中, 进行分类统计, 利用 DPS 7.5 中单因素实验统计分析最小显著差异(least significant difference, LSD), 进行差异显著性分析, 使用 Origin 9.1 软件分析数据, 生成柱状图。

1.6 编辑水稻耐盐性的鉴定

采用土培条件, 在智能人工气候室(温度为 30 °C, 光照强度为 150 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光照条件为 16 h 光照/8 h 黑暗), 将水稻培养至三叶一心期, 以 200 mmol/L 的 NaCl 浇灌, 模拟高盐胁迫处理, 观察记录 *OsSPL10* 基因编辑水稻与相应野生型水稻出现明显表型差异的时间, 并及时拍照记录。

1.7 qRT-PCR 分析

提取经盐处理幼苗的叶片总 RNA 以及抽穗

期的剑叶总 RNA, 按照 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR 试剂盒说明书逆转录为 cDNA, 并进行 qRT-PCR 分析。内参基因为 *OsAct1* (GenBank 登录号: LOC4333919)、水稻光叶标记基因为 *OsHL6*、*OsGL6* 和 *OsWOX3B*, 盐胁迫标记基因为 *OsGASR1*、*OsNHX2* 和 *OsIDS1*, 引物为 F6/R6-F12/R12 (表 1)。数据处理分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 使用 Origin 2019 软件作图。

1.8 *OsSPL10* 基因编辑水稻农艺性状统计

待水稻完全成熟之后, 分别选取野生型以及各基因编辑水稻 10 个单株, 统计株高、有效分蘖数, 收获并风干后进行穗长、穗粒数、结实率和千粒重测定, 使用 SPSS 22.0 进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 *OsSPL10* 编辑载体的构建

经 NCBI 检索显示, *OsSPL10* 基因由 3 个外显子和 2 个内含子构成。根据编辑靶位点设计原则, 选择第 1 外显子 48–66 bp 处作为 gRNA 靶位点(图 1A)。通过引物 F1/R1 退火制备 gRNA 片段, 连入 SKm-gRNA 中间载体后, 通过双酶切将重组中间载体与植物表达载体 pC1300-*Cas9* 连接, 构建编辑载体 pC1300-*OsSPL10* (图 1B)。该载体中的 *Hyg* 基因由 CAMV35S 驱动, 靶位点和 gRNA 由 *OsU3* 启动子驱动, *Cas9* 基因由 *Ubi* 启动子驱动, 以 CAMV 终止子终止。

2.2 *OsSPL10* 编辑水稻的筛选鉴定

采用农杆菌介导法, 将编辑载体 pC1300-*OsSPL10* 分别转化‘新丰 2 号’‘新科稻 31’和‘新稻 25’, 经筛选分别获得 32 株、26 株、

38 株再生植株。利用 *Hyg* 基因引物 F4 和 R4 进行 PCR 筛选, 证实 3 种转化材料分别获得 26 株、22 株、33 株阳性转基因植株。进一步利用特异性 Hi-TOM 引物 F5 和 R5 对转基因阳性植株的靶位点区域进行扩增并测序, 结果显示, ‘新丰 2 号’阳性植株中有 21 株被编辑, 突变效率为 80.77%; ‘新科稻 31’阳性植株中有 16 株被编辑, 突变效率为 72.73%; ‘新稻 25’阳性植株中有 30 株被编辑, 突变效率为 90.91% (表 2)。

对 T_1 代继续筛选, 测序结果表明, ‘新丰 2 号’中获得 3 株纯合的基因编辑水稻 (*spl10-A1*、*spl10-A2*、*spl10-A3*)、‘新科稻 31’中获得 1 株(*spl10-B1*)、‘新稻 25’中获得 2 株 (*spl10-D1*、*spl10-D2*) (图 2)。在这些突变体中, *OsSPL10* 基因编辑靶序列中发生了碱基插入或者缺失, 导致发生移码突变和无义突变, 翻译提前终止, 预期分别产生长度为 104–234 个氨基酸组成的截短蛋白。

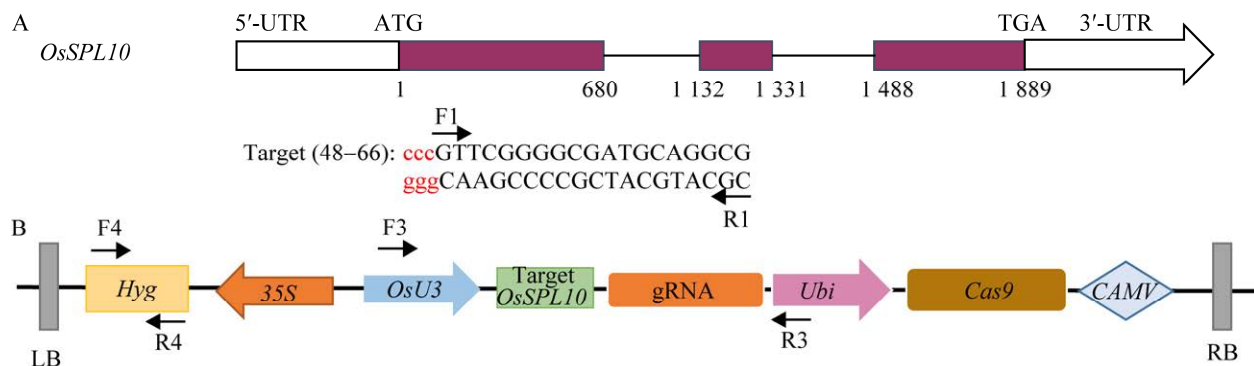


图 1 *OsSPL10* 基因编辑靶点选择(A)及编辑载体结构示意图(B)

Figure 1 *OsSPL10* structure and target site (A) and schematic diagram of editing vector (B).

表 2 T_0 代转基因植株基因型统计

Table 2 Genotype statistics of T_0 generation transgenic plants

Materials	Transgenic plants	Positive plants	Edited plants	Unedited plants	Mutation frequency (%)
‘Xinfeng 2’	32	26	21	5	80.77
‘Xinkedao 31’	26	22	16	6	72.73
‘Xindao 25’	38	33	30	3	90.91

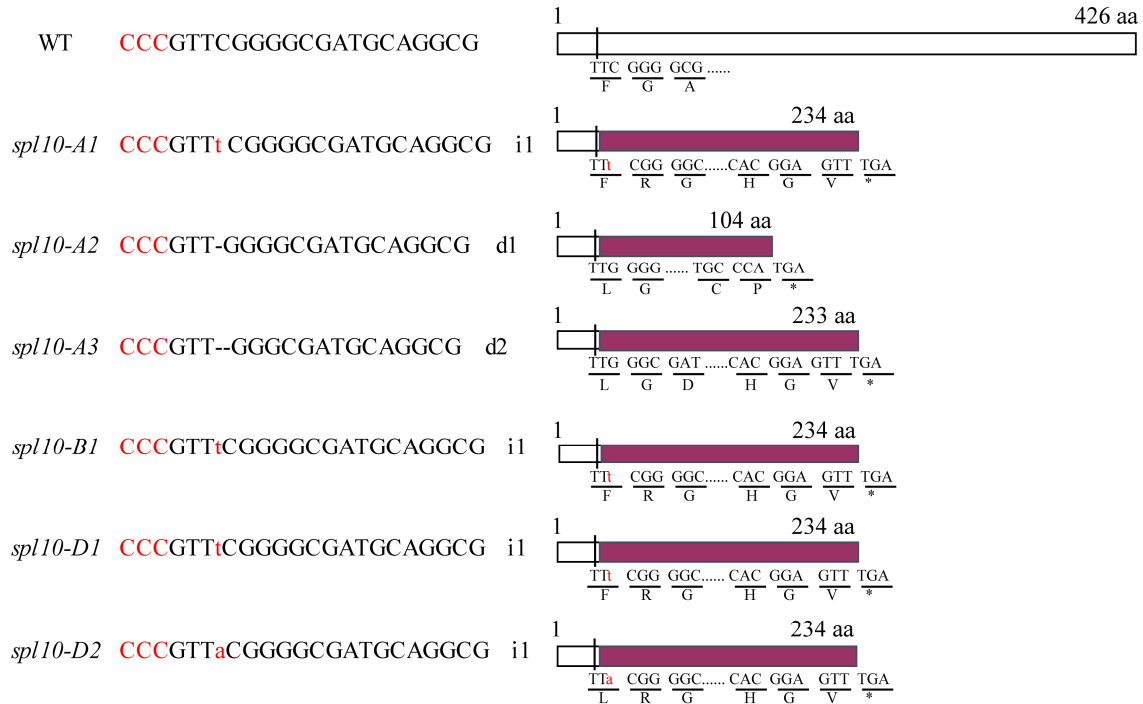


图 2 *OsSPL10* 敲除水稻突变类型

Figure 2 Mutation types of *OsSPL10* knockout rice. Red letters represent PAM sequences; Red lowercase letters and stripes indicate mutational bases; d: Deletion; i: Insertion; The numbers after the letters d and i represent the number of mutational bases. The rectangle represents the predicted protein; The number above the rectangle represents the number of amino acids in the protein; The red area represents the mutant protein sequence.

2.3 *OsSPL10* 编辑水稻的表型鉴定

2.3.1 叶片表面特征

肉眼观察基础上，进一步采用扫描电镜观察编辑水稻剑叶，结果显示，3 种对照组野生型水稻剑叶表面分布着大量的长毛、微毛和腺毛，而 6 种编辑水稻剑叶表面均有表皮毛缺失现象，表现出典型的“光叶”性状(图 3A)。进一步采用 qRT-PCR 技术，检测了光叶表型标记基因 *OsHL6*、*OsGL6* 和 *OsWOX3B* 在 *OsSPL10* 编辑水稻叶片中的表达量，结果显示，与相应的野生型相比，*OsHL6*、*OsGL6* 和 *OsWOX3B* 在 6 种 *OsSPL10* 纯合编辑水稻叶片中的表达量均显著下降(图 3B)。

2.3.2 叶片生理特征

为了进一步检测 *OsSPL10* 编辑水稻光叶性状对叶片生理的影响，对孕穗期野生型和 *OsSPL10*

基因编辑水稻剑叶的光合作用指标进行测定。统计学分析显示，6 种 *OsSPL10* 基因编辑水稻与对照相比，剑叶的气孔导度提高 1 倍左右，净光合速率和蒸腾速率也分别提高了近 10%和 30%，且差异均达到极显著水平(图 4)，表明叶片表皮毛的缺失有利于叶片气孔开放，进而提高净光合速率和蒸腾速率。

2.3.3 籽粒表面特征

对成熟种子进行观察，可见 3 种野生型水稻成熟种子颖壳上布满肉眼可见的稃毛，而 *OsSPL10* 编辑水稻成熟种子的颖壳表面光滑少毛，说明 *OsSPL10* 基因的敲除导致颖壳的毛状体明显退化，出现光颖壳表型(图 5)。

进一步分析 *OsSPL10* 编辑对水稻粒型的影响，统计学分析显示，与野生型相比，突变体 *spl10-A1*、*spl10-A2* 和 *spl10-A3* 的粒长、粒厚和

千粒重均无显著变化, *spl10-A1* 和 *spl10-A2* 的粒宽没有变化, *spl10-A3* 粒宽增加; 突变体 *spl10-B1* 的粒宽显著减少, 粒长、粒厚和千粒重均无显著变化; 突变体 *spl10-D1* 和 *spl10-D2* 的粒长、粒宽、粒厚和千粒重均没有显著变化(图 6, 表 3)。

2.4 *OsSPL10* 编辑水稻耐盐性分析

幼苗期耐盐性实验结果表明, 盐胁迫处理 7 d 后, 6 种 *OsSPL10* 编辑水稻的盐耐受性均显著高于对照野生型。对照组‘新丰 2 号’完全枯死呈灰白色, 停止生长, 基因编辑水稻 3 个株系尽管叶尖枯萎卷曲, 但叶片仍维持绿色, 主茎秆生长正常。对照组‘新科稻 31’和‘新稻 25’叶片全部枯萎卷曲成灰白色, 但茎秆中部分保持

绿色, 根部枯萎, 而编辑水稻叶尖枯萎, 叶片部分维持绿色, 茎秆生长正常(图 7A)。

qRT-PCR 检测已知的水稻盐胁迫标记基因 *OsGASR1*、*OsNHX2* 和 *OsIDS1* 在叶片中的相对表达量。结果表明, 盐胁迫处理后, 与相应的野生型相比, 3 种盐胁迫标记基因在 *OsSPL10* 基因编辑水稻叶片中的表达均有显著的改变, 其中盐胁迫诱导基因 *OsGASR1* 在盐胁迫处理后幼苗叶片中的表达量显著低于对照野生型, Na^+ 转运蛋白编码基因 *OsNHX2* 和盐胁迫负调控基因 *OsIDS1* 的表达水平不同程度高于对应的野生型(图 7B), 提示在编辑水稻中耐盐性的显著提高涉及复杂的基因表达调控网络。

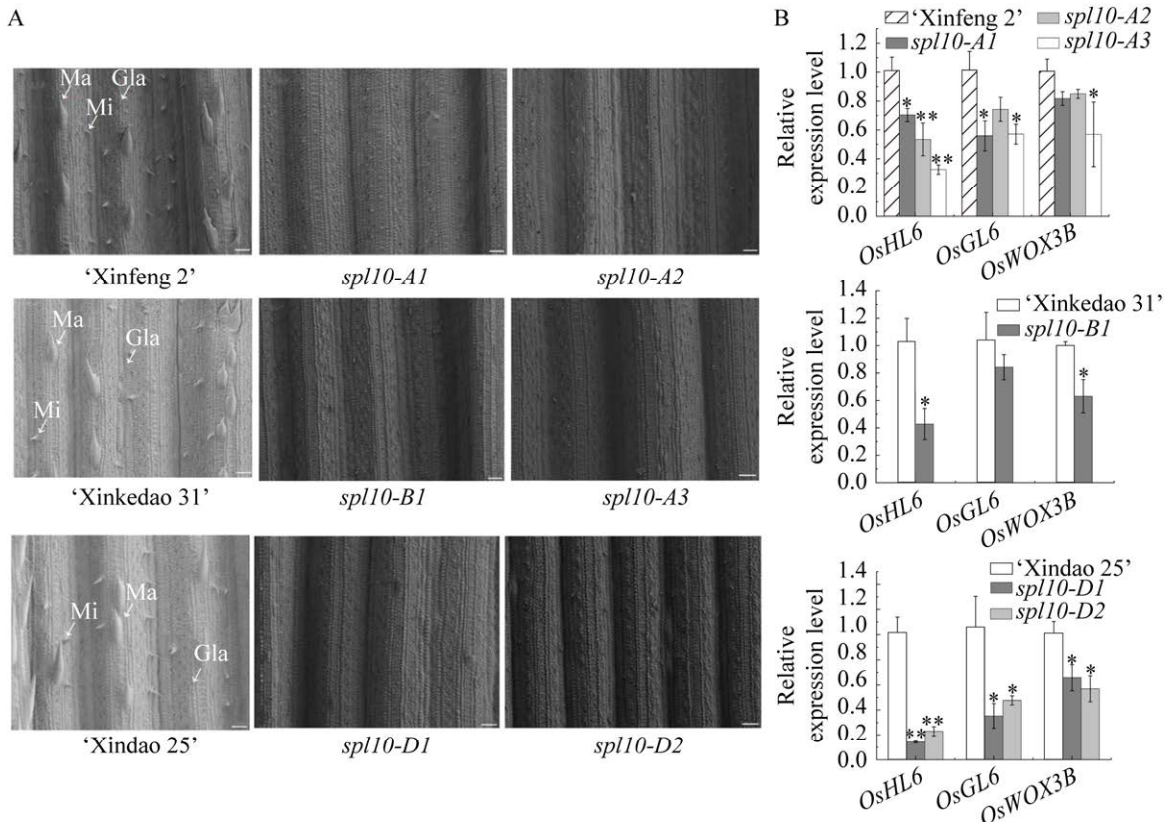


图 3 *OsSPL10* 基因编辑水稻剑叶表皮毛特征(A)与光叶标记相关基因表达分析(B)

Figure 3 Observation of trichome on the flag leaf of *OsSPL10* knockout mutants (A) and relative expression levels of glabrous marker genes (B). Ma: Macrohair; Mi: Microhair; Gla: Glandular trichome. The error bar indicates standard errors in three biological replicates; "*" indicates significant difference at $P < 0.05$ compared with the wild type by t test; "**" indicates significant difference at $P < 0.01$ by t test; "***" indicates significant difference at $P < 0.001$ by t test; Bar=500 μm .

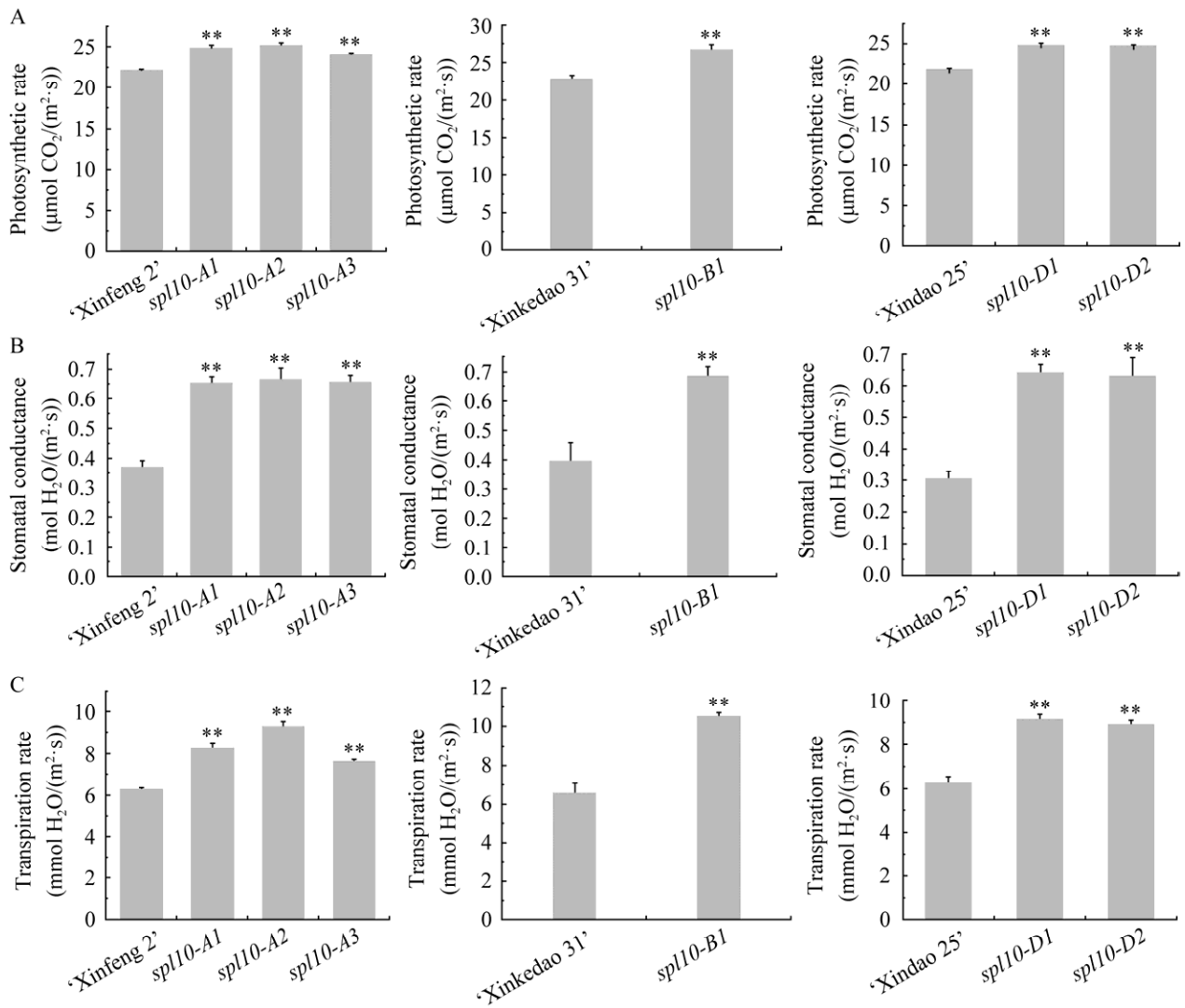


图 4 *OsSPL10* 基因编辑水稻剑叶光合作用相关指标的比较

Figure 4 Photosynthesis characteristics analysis of *OsSPL10* knockout rice. A: Photosynthetic rate. B: Stomatal conductance. C: Transpiration rate. The error bar indicates standard errors in three biological replicates; “**” indicates significant difference at $P < 0.01$ compared with the wild type by *t*-test.



图 5 *OsSPL10* 基因编辑水稻籽粒表面特征

Figure 5 Grain surface of *OsSPL10* knockout rice. Bar=0.5 cm.



图 6 *OsSPL10* 突变体粒型观察

Figure 6 Grain shape analysis of *OsSPL10* mutant. Bar=1 cm.

表 3 *OsSPL10* 敲除水稻与野生型的粒型比较

Table 3 Grain shape analysis of *OsSPL10* knockout rice and wild-type

Materials	Grain length (mm)	Grain width (mm)	Grain thickness (mm)	1 000-grain weight (g)
'Xinfeng 2'	7.50±0.08	3.24±0.04	2.21±0.01	25.47±0.11
<i>spl10-A1</i>	7.64±0.07	3.28±0.08	2.19±0.02	25.32±0.08
<i>spl10-A2</i>	7.49±0.06	3.30±0.05	2.19±0.01	24.79±0.34
<i>spl10-A3</i>	7.48±0.08	3.45±0.03*	2.22±0.02	25.59±0.31
'Xinkedao 31'	7.32±0.02	3.33±0.03	2.16±0.08	23.05±0.13
<i>spl10-B1</i>	7.28±0.10	3.16±0.02*	2.11±0.05	22.23±0.37
'Xindao 25'	7.01±0.02	3.38±0.01	2.29±0.08	25.21±0.11
<i>spl10-D1</i>	7.04±0.04	3.43±0.02	2.26±0.07	25.35±0.36
<i>spl10-D2</i>	7.01±0.05	3.39±0.01	2.26±0.05	24.35±0.42

“*” indicates significant difference at $P < 0.05$ compared with the wild type by *t*-test.

2.5 *OsSPL10* 编辑水稻其他农艺学性状分析

为确定 *OsSPL10* 基因编辑对产量相关农艺学性状的影响, 对株高、分蘖数、穗长、每穗粒数、

结实率进行统计学分析和比较, 结果显示, 与野生型相比, 6 种 *OsSPL10* 基因编辑水稻中, 只有株高显著高于相应的对照, 其他的农艺学性状(分蘖数、穗长、每穗粒和结实率)均未发生显著变化(表 4)。

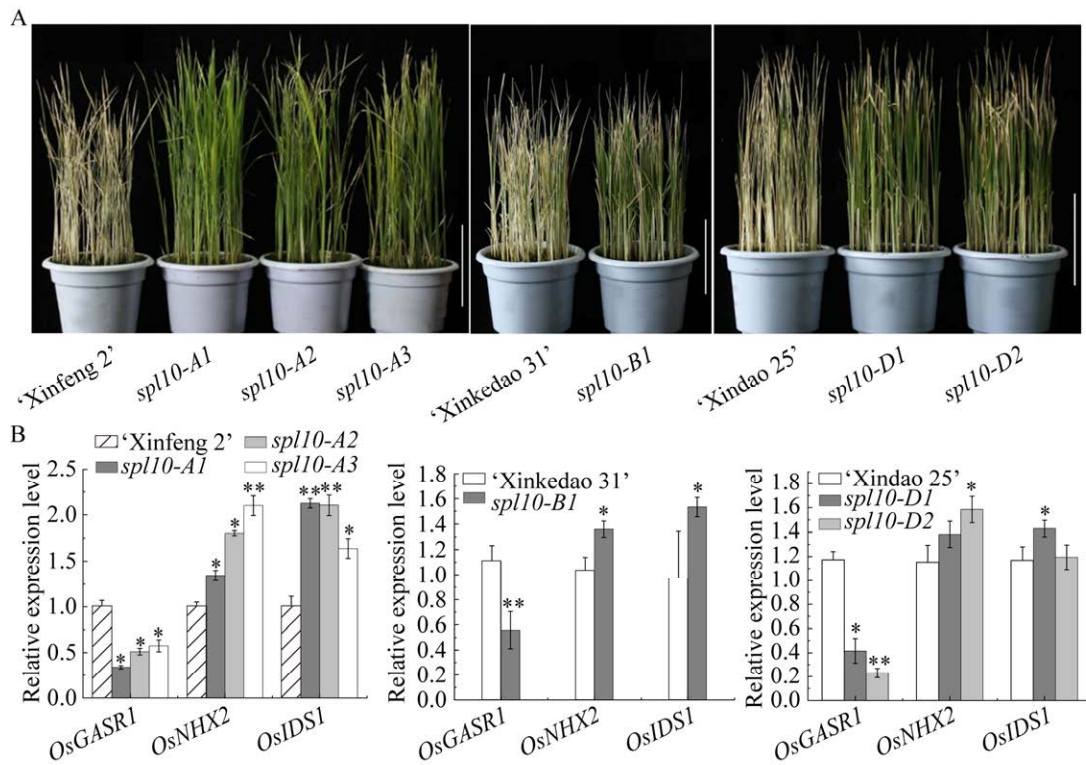


图 7 盐胁迫后 *OsSPL10* 突变体表型(A)与盐胁迫相关基因的表达分析(B)

Figure 7 Phenotype of *OsSPL10* mutants after salinity treatment (A) and relative expression levels of salt resistance related genes (B). The error bar indicates standard errors in three biological replicates; “*” indicates significant difference at $P<0.05$ compared with the wild type by *t*-test; “***” indicates significant difference at $P<0.01$ by *t*-test; Bar=10 cm.

表 4 *OsSPL10* 突变体其他农艺学性状分析

Table 4 Analysis of other agronomic traits of *OsSPL10* mutants

Materials	Plant height (cm)	Tiller number	Panicle length (cm)	Grain number per panicle	Seed setting rate (%)
'Xinfeng 2'	99.96±0.53	7.75±0.49	19.88±0.41	167.40±7.95	93.62±1.86
<i>spl10-A1</i>	102.70±0.43**	7.38±0.38	18.17±0.66	168.40±4.58	91.89±1.64
<i>spl10-A2</i>	105.00±0.67**	7.63±0.38	19.26±0.31	170.30±6.30	93.49±1.16
<i>spl10-A3</i>	105.15±0.48**	8.25±0.25	19.24±0.28	164.10±5.90	94.05±1.29
'Xinkedao 31'	100.56±1.05	7.75±0.49	19.04±0.44	174.80±4.79	91.55±1.74
<i>spl10-B1</i>	106.33±0.70*	7.88±0.35	19.44±0.36	166.40±6.27	92.48±1.39
'Xindao 25'	100.21±0.90	7.88±0.40	18.11±0.25	172.30±3.53	93.81±1.00
<i>spl10-D1</i>	104.04±0.76*	7.38±0.32	17.63±0.17	181.40±13.01	90.99±1.23
<i>spl10-D2</i>	104.25±0.57*	8.13±0.23	17.83±0.19	174.30±10.07	93.69±1.59

“*” indicates significant difference at $P<0.05$ compared with the wild type by *t*-test; “***” indicates significant difference at $P<0.01$ by *t*-test.

3 讨论与结论

光叶水稻是非常重要的种质资源，具有强抗倒伏、对高光适应性强、光合利用效率高、

米质优良的优点，尤其是因叶片、颖壳等表面光滑无毛，不仅适合现代农业的机械化操作，而且能有效增加仓储量空间^[20-21]。近年来，以美国光叶稻为亲本，选育出一大批穗大粒多、

米质优良的光叶杂交水稻,如‘光 153S’^[22] ‘嘉 58’^[23] ‘越 518’^[24]等,但我国对光叶稻的利用率还不高^[25],关于沿黄光叶水稻的种质创新也有待开展。除了传统的杂交育种方法,近年来利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,以籼稻品种 ‘R401’为受体材料,对水稻 *OsWOX3B* 基因进行敲除,得到了整体光滑无毛的突变体 *Oswox3b*^[26];在 ‘NIL-HL6’背景下敲除 *OsSPL10*,也成功获得了表皮毛数量显著降低的 *OsSPL10* 突变体^[11],表明利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,对已知的表皮毛发育相关基因进行编辑,是创制光叶水稻新种质的有效手段。

由于光叶表型与表皮毛发育相关,因此对水稻表皮毛发育相关基因的鉴定以及表皮毛发育机制的研究受到关注。近年来,一些水稻表皮毛相关基因相继被鉴定或克隆,已知的相关基因主要有 *OsSPL10*(*GLR3*)、*OsWOX3B*(*GLR1*、*NUDA/GL-1/dep*、*GL5*)、*GL6*(*HL6*)、*glr2*、*gl1*、*GLL*等,这些基因的突变往往导致水稻叶片与颖壳表皮毛减少或缺失^[27]。其中, *OsSPL10* 是目前研究较为深入的光叶基因, Lan 等^[6,28]通过自然诱变的方法成功获得了 *spl10* 突变体,发现该基因在水稻耐盐性和毛状体形成中起双重作用,它负向控制耐盐性,但正调控毛状体的发育。本研究通过 CRISPR/Cas9 技术对 3 种沿黄水稻的 *OsSPL10* 进行编辑,并成功获得了 6 种 *OsSPL10* 敲除水稻,获得了预期的光叶和光颖壳表型,并发现产量相关的主要农艺学性状并未受到影响,为后续沿黄水稻定向育种提供了新的种质。

盐胁迫是制约水稻生产的非生物胁迫因素之一^[6],有研究认为 *OsSPL10* 可能通过茉莉酸信号途径调节 Na^+ 含量,从而影响水稻对盐的敏感性^[29]。本研究对创制的 6 种 *OsSPL10* 敲除水稻进行苗期耐盐性鉴定,也证明所有突变体的耐盐性均显著提高。有研究认为,苗期耐盐

性的提高是通过离子渗透平衡调节、清除活性氧和营养平衡调节来实现的^[30-31]。本研究通过 qRT-PCR 检测发现 Na^+ 转运蛋白编码基因 *OsNHX2* 的表达水平显著高于野生型, *OsNHX2* 转运蛋白的功能是将 Na^+ 从细胞质运输到液泡中,提高细胞对盐的耐受性^[32]。因此在敲除水稻中,该基因表达量的提高可能通过增强 Na^+ 向液泡的转运,降低细胞质 Na^+ 的水平,提高对盐的耐受性。有研究显示,在盐胁迫条件下, *OsGASR1* 过表达可以降低 H_2O_2 的含量^[33],降低细胞的氧化损伤,本研究发现,盐胁迫处理后 *OsGASR1* 在突变体中的表达量显著降低,提示突变体对氧化应激的耐受性显著高于野生型,这一推测与盐胁迫负调控基因 *OsIDS1* 的表达的变化相符。 *OsIDS1* 编码 AP2/ERF 转录因子,通过招募组蛋白去乙酰化酶和转录抑制复合物,抑制水稻耐盐关键基因的表达^[34]。据此推测,敲除水稻耐盐性的显著提高一方面与 Na^+ 离子的转运活性及区室化过程加强有关,另一方面与细胞氧化应激耐受性的改变相关。除上述发现外,本研究还观察到 6 种 *OsSPL10* 突变体的净光合速率、气孔导度和蒸腾速率均显著增加。由于蒸腾作用是植物水分吸收和盐分运输的重要驱动力,而 *OsSPL10* 突变体耐盐性的提高是否与蒸腾速率等指标的改变存在联系,值得后续深入地研究。

本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建了 3 类 6 种 *OsSPL10* 敲除水稻,丰富了沿黄优势粳稻品种的种质资源,不仅观察到了预期的光叶、光颖壳和耐盐表型,而且发现 *OsSPL10* 突变对产量相关的主要农艺学性状没有显著影响,不仅为沿黄水稻育种创新提供了新的种质资源,而且也后续鉴定 *OsSPL10* 在调控表皮毛发育和耐盐中的作用机制奠定了基础。

REFERENCES

- [1] 吴比, 胡伟, 邢永忠. 中国水稻遗传育种历程与展望[J]. 遗传, 2018, 40(10): 841-857.
WU B, HU W, XING YZ. The history and prospect of rice genetic breeding in China[J]. Hereditas (Beijing), 2018, 40(10): 841-857 (in Chinese).
- [2] 占小登, 王凯, 曹立勇. 近年我国水稻遗传育种研究进展与展望[J]. 中国稻米, 2023, 29(6): 1-4.
ZHAN XD, WANG K, CAO LY. Advance and prospect of rice genetics and breeding research in 2020-2022 in China[J]. China Rice, 2023, 29(6): 1-4 (in Chinese).
- [3] ZHONG H, KONG WL, GONG ZY, FANG XY, DENG XX, LIU C, LI YS. Evolutionary analyses reveal diverged patterns of *SQUAMOSA* promoter binding protein-like (*SPL*) gene family in *Oryza* genus[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 565.
- [4] JIANG MM, HE Y, CHEN XN, ZHANG XH, GUO YR, YANG SH, HUANG J, TRAW MB. CRISPR-based assessment of genomic structure in the conserved *SQUAMOSA* promoter-binding-like gene clusters in rice[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2020, 104(5): 1301-1314.
- [5] LIAN TX, HUANG YY, XIE XN, HUO X, SHAHID MQ, TIAN L, LAN T, JIN J. Rice *SST* variation shapes the rhizosphere bacterial community, conferring tolerance to salt stress through regulating soil metabolites[J]. mSystems, 2020, 5(6): e00721-20.
- [6] LAN T, ZHENG YL, SU ZL, YU SB, SONG HB, ZHENG XY, LIN GG, WU WR. *OsSPL10*, a SBP-box gene, plays a dual role in salt tolerance and trichome formation in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Genes|Genomes|Genetics, 2019, 9(12): 4107-4114.
- [7] LI L, SHI F, WANG GL, GUAN YB, ZHANG YF, CHEN MJ, CHANG JL, YANG GX, HE GY, WANG YS, LI Y. Conservation and divergence of *SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* gene family between wheat and rice[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(4): 2099.
- [8] ZHONG ZF, ZHONG LJ, ZHU X, JIANG YM, ZHENG YH, LAN T, CUI HT. Transcription factor *OsSPL10* interacts with *OsJAmyb* to regulate blast resistance in rice[J]. The Crop Journal, 2024, 12(1): 301-307.
- [9] WANG J, ZHOU L, SHI H, CHERN M, YU H, YI H, HE M, YIN JJ, ZHU XB, LI Y, LI WT, LIU JL, WANG JC, CHEN XQ, QING H, WANG YP, LIU GF, WANG WM, LI P, WU XJ, et al. A single transcription factor promotes both yield and immunity in rice[J]. Science, 2018, 361(6406): 1026-1028.
- [10] WANG SK, LI S, LIU Q, WU K, ZHANG JQ, WANG SS, WANG Y, CHEN XB, ZHANG Y, GAO CX, WANG F, HUANG HX, FU XD. The *OsSPL16-GW7* regulatory module determines grain shape and simultaneously improves rice yield and grain quality[J]. Nature Genetics, 2015, 47: 949-954.
- [11] LI JJ, TANG B, LI YX, LI CG, GUO MJ, CHEN HY, HAN SC, LI J, LOU QJ, SUN WQ, WANG P, GUO HF, YE W, ZHANG ZY, ZHANG HL, YU SB, ZHANG L, LI ZC. Rice *SPL10* positively regulates trichome development through expression of *HL6* and auxin-related genes[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63(8): 1521-1537.
- [12] LIAO QL, CHENG XL, LAN T, GUO XK, SU ZL, AN XX, ZHENG YL, CUI HT, WU WR, LAN T. *OsSPL10* controls trichome development by interacting with *OsWOX3B* at both transcription and protein levels in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. The Crop Journal, 2023, 11(6): 1711-1718.
- [13] LI YX, HAN SC, SUN XM, KHAN NU, ZHONG Q, ZHANG ZY, ZHANG HL, MING F, LI ZC, LI JJ. Variations in *OsSPL10* confer drought tolerance by directly regulating *OsNAC2* expression and ROS production in rice[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2023, 65(4): 918-933.
- [14] LU L, SUN ZX, WANG RM, DU YF, ZHANG ZL, LAN T, SONG YY, ZENG RS. Integration of transcriptome and metabolome analyses reveals the role of *OsSPL10* in rice defense against brown planthopper[J]. Plant Cell Reports, 2023, 42(12): 2023-2038.
- [15] XIA JQ, LIANG QY, HE DY, ZHANG ZY, WU J, ZHANG J, ZHAO PX, ZHANG ZS, XIANG CB. Knockout of *OsSPL10* confers enhanced glufosinate resistance in rice[J]. Plant Communications, 2024, 5(2): 100731.
- [16] 牛淑琳, 鞠培娜, 周冠华, 戴南平, 周晋军, 谢先芝, 郑崇珂. 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑 *OsRR22* 基因创制耐盐水稻种质资源[J]. 山东农业科学, 2023, 55(2): 30-35.
NIU SL, JU PN, ZHOU GH, DAI NP, ZHOU JJ, XIE XZ, ZHENG CK. Creation of salt-tolerant rice germplasm by editing *OsRR22* gene via CRISPR/Cas9 technique[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2023, 55(2): 30-35 (in Chinese).
- [17] ZHOU YB, XU SC, JIANG N, ZHAO XH, BAI ZN, LIU JL, YAO W, TANG QY, XIAO G, LV C, WANG K, HU XC, TAN JJ, YANG YZ. Engineering of rice varieties with enhanced resistances to both blast and bacterial blight diseases via CRISPR/Cas9[J]. Plant Biotechnology Journal, 2022, 20(5): 876-885.
- [18] HUI SZ, LI HJ, MAWIA AM, ZHOU L, CAI JY, AHMAD S, LAI CK, WANG JX, JIAO GA, XIE LH, SHAO GN, SHENG ZH, TANG SQ, WANG JL, WEI XJ, HU SK, HU PS. Production of aromatic three-line hybrid rice using novel alleles of *BADH2*[J]. Plant Biotechnology Journal, 2022, 20(1): 59-74.
- [19] LIU Q, WANG C, JIAO XZ, ZHANG HW, SONG LL, LI YX, GAO CX, WANG KJ. Hi-TOM: a platform for high-throughput tracking of mutations induced by CRISPR/Cas systems[J]. Science China Life Sciences, 2019, 62(1): 1-7.
- [20] HU BL, WAN Y, LI X, ZHANG FT, YAN WG, XIE JK. Phenotypic characterization and genetic analysis of rice with pubescent leaves and glabrous hulls (*PLgh*)[J]. Crop Science, 2013, 53(5): 1878-1886.
- [21] 郭龙彪, 罗利军, 钟代彬, 余新桥, 梅捍卫, 王一平, 应存山. 美国光壳稻品种农艺性状评价及其改良和利用[J]. 浙江农业科学, 1999, 40(5): 201-206.
GUO LB, LUO LJ, ZHONG DB, YU XQ, MEI HW, WANG YP, YING CS. Evaluation, improvement and utilization on some selected American rice cultivars[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 1999, 40(5):

- 201-206 (in Chinese).
- [22] 张建新, 黄建鸿, 陈建明, 胡昌泉, 程天杰. 光身稻光温敏核不育系光 153S 的选育[J]. 杂交水稻, 2006, 21(6): 11-13.
ZHANG JX, HUANG JH, CHEN JM, HU CQ, CHENG TJ. Breeding of nude PTGMS line Guang 153S in rice[J]. Hybrid Rice, 2006, 21(6): 11-13 (in Chinese).
- [23] 高荣村, 陆金根, 李鹏, 李金军. 光身软香米新品种‘嘉 58’特征特性及栽培技术[J]. 中国稻米, 2014, 20(2): 74-75.
GAO RC, LU JG, LI P, LI JJ. Characteristics and cultivation techniques of new glabrous scented rice variety ‘Jia 58’[J]. China Rice, 2014, 20(2): 74-75 (in Chinese).
- [24] 徐玉峰, 杨新宇, 徐洁芬, 朱邦辉, 张庆, 石惠, 曾启铭, 朱晓玉. 光身稻软米品种越光 518 的选育与应用[J]. 中国稻米, 2024, 30(2): 108-111.
XU YF, YANG XY, XU JF, ZHU BH, ZHANG Q, SHI H, ZENG QM, ZHU XY. Breeding and application of glabrous and soft rice variety Yueguang 518[J]. China Rice, 2024, 30(2): 108-111 (in Chinese).
- [25] 胡培松, 唐绍清, 罗炬, 黄发松. 美国光身稻品种の利用与超高产品种的选育[J]. 作物学报, 1999, 25(1): 32-28.
HU PS, TANG SQ, LUO J, HUANG FS. Utilization of American glabrous rice and breeding of super-high-yield varieties[J]. Acta Agronomica Sinica, 1999, 25(1): 32-38 (in Chinese).
- [26] 郑亚莉, 余林闯, 安肖肖, 程心乐, 任丽君, 苏子龙, 郑小雅, 兰涛. 一份水稻 *OsWOX3B* 基因敲除突变体的鉴定[J]. 中国水稻科学, 2021, 35(2): 112-120.
ZHENG YL, YU LC, AN XX, CHENG XL, REN LJ, SU ZL, ZHENG XY, LAN T. Identification of a knockout mutant of *OsWOX3B* gene in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2021, 35(2): 112-120 (in Chinese).
- [27] 冯连杰, 安文静, 刘迪, 刘亚菲, 王凯婕, 梁卫红. 水稻表皮毛发育相关基因研究进展[J]. 生物技术通报, 2021, 37(6): 236-243.
FENG LJ, AN WJ, LIU D, LIU YF, WANG KJ, LIANG WH. Progress in research of rice trichome related genes[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(6): 236-243 (in Chinese).
- [28] LAN T, ZHANG SJ, LIU TT, WANG B, GUAN HZ, ZHOU YC, DUAN YL, WU WR. Fine mapping and candidate identification of *SST*, a gene controlling seedling salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Euphytica, 2015, 205(1): 269-274.
- [29] 郑亚莉. 水稻耐盐光身基因 *OsSPL10* 及其相关基因的功能分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2020.
ZHENG YL. Functional analysis of salt-tolerant naked gene *OsSPL10* and its related genes in rice[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2020 (in Chinese).
- [30] ATTA K, MONDAL S, GORAI S, SINGH AP, KUMARI A, GHOSH T, ROY A, HEMBRAM S, GAIKWAD DJ, MONDAL S, BHATTACHARYA S, JHA UC, JESPERSEN D. Impacts of salinity stress on crop plants: improving salt tolerance through genetic and molecular dissection[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1241736.
- [31] LIU CT, MAO BG, YUAN DY, CHU CC, DUAN MJ. Salt tolerance in rice: physiological responses and molecular mechanisms[J]. The Crop Journal, 2022, 10(1): 13-25.
- [32] FUKUDA A, NAKAMURA A, HARA N, TOKI S, TANAKA Y. Molecular and functional analyses of rice NHX-type Na^+/H^+ antiporter genes[J]. Planta, 2011, 233(1): 175-188.
- [33] LEE SC, HAN SK, KIM SR. Salt- and ABA-inducible *OsGASR1* is involved in salt tolerance[J]. Journal of Plant Biology, 2015, 58(2): 96-101.
- [34] CHENG XL, ZHANG SX, TAO WC, ZHANG XX, LIU J, SUN JQ, ZHANG HW, PU L, HUANG RF, CHEN T. INDETERMINATE SPIKELET1 recruits histone deacetylase and a transcriptional repression complex to regulate rice salt tolerance[J]. Plant Physiology, 2018, 178(2): 824-837.