

## 利用 CRISPR/CAS9 技术编辑水稻香味基因 *Badh2*

邵高能 谢黎虹 焦桂爱 魏祥进 圣忠华 唐绍清\* 胡培松\*

(中国水稻研究所/水稻生物学国家重点实验室/农业部水稻生物学与遗传育种重点实验室, 杭州 310006; \*通讯联系人, E-mail: sqtang@126.com, hupeisong@caas.cn)

### CRISPR/CAS9-mediated Editing of the Fragrant Gene *Badh2* in Rice

SHAO Gaoneng, XIE Lihong, JIAO Guiai, WEI Xiangjin, SHENG Zhonghua, TANG Shaoqing\*, HU Peisong\*

(State Key Laboratory of Rice Biology, Key Laboratory of Rice Biology and Breeding of Ministry of Agriculture, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; \*Corresponding author, E-mail: sqtang@126.com, hupeisong@caas.cn)

**Abstract:** 【Objective】Fragrant rice, which is favored because of its quality characteristics of faint scent and tastiness, is a special rice type. Fragrance in rice is mainly controlled by the gene encoding betaine aldehyde dehydrogenase on chromosome 8. 【Method】The fragrant gene *Badh2* in Zhonghua 11 was edited by CRISPR/CAS9. 【Result】Twenty  $T_1$  individuals derived from  $T_0$  generation were genotyped. One plant, which contains an additional T base in the first exon of *Badh2* without the vector skeleton, was finally produced. qRT-PCR result suggested that *Badh2* RNA level was decreased in the mutant. Compared with the wild type, the mutant increased 2-acetyl-1-pyrroline content by the GC-MS method. Furthermore, two rice yield-related traits including tiller numbers and seed-setting rate showed significant difference at the 0.05 level among five traits related to yield and three traits related to cooking and eating quality. 【Conclusion】We succeed editing the *Badh2* by CRISPR-CAS9 technical in rice, and it would provide abundant theoretical guidance and accelerate the breeding process of fragrant rice.

**Key words:** rice; *Badh2*; CRISPR/CAS9; fragrance

**摘 要:** 【目的】香稻作为一类特殊的水稻群体, 以其清香可口的品质特性备受消费者的欢迎。到目前为止, 水稻中的香味主要受第 8 染色体上编码甜菜碱脱氢酶基因 *Badh2* 控制。【方法】通过 CRISPR/CAS9 技术对中华 11 的香味基因 *Badh2* 进行编辑。【结果】获得转基因  $T_0$  代植株并对其所衍生的  $T_1$  代 20 个单株进行了鉴定分析, 获得了一个剔除了载体骨架且第 1 外显子上插入一个碱基 T 的突变体材料。该材料中 *Badh2* RNA 水平显著下调; 利用 GC-MS 技术测定野生型及突变体材料籽粒 2-乙酰-1-吡咯啉含量, 结果表明突变体材料中的香味物质显著增加; 此外, 我们还对野生型及  $T_2$  代香型植株水稻产量及稻米蒸煮食味品质进行了考查及测定分析, 发现除分蘖数及结实率呈现出显著差异外 ( $P<0.05$ ), 其余各项指标在两组材料间都无显著差异。【结论】通过 CRISPR/CAS9 技术成功地对水稻香味基因进行了编辑, 可为香稻育种提供丰富的理论指导, 加快香稻的育种进程。

**关键词:** 水稻; *Badh2*; CRISPR/CAS9; 香味

中图分类号: Q755; S511.032

文献标识码: A

文献编号: 1001-7216(2017)02-0216-07

水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 为全世界约 21% 人口提供了食物来源。近年来, 随着人们生活水平的提高, 稻米品质越来越成为消费者考量的重要指标。香味被认为是一种重要的品质指标, 在世界范围内, 香稻已广为传播并普遍受到消费者的欢迎, 其市场价格也比普通大米高出许多, 这也为香稻研究提供了更为广阔的市场前景<sup>[1]</sup>。

近些年来, 大量研究报道了水稻香味基因的研究, 主要包括香味基因的遗传分析, 基因的克隆以

及香味基因的育种利用等<sup>[2-4]</sup>。早期研究表明香味基因主要由 1~3 对显性或隐性基因控制<sup>[2, 4]</sup>, 随着研究的深入, 遗传分析结果表明水稻中香味主要受位于第 8 染色体上的一个单隐性基因 *Badh2* 控制, 该基因编码甜菜碱脱氢酶<sup>[5]</sup>, 包含 15 个外显子和 14 个内含子, 共编码 503 个氨基酸, 研究表明该基因与香味密切相关并成功克隆<sup>[5-6]</sup>。香味物质的合成也是香稻研究的重要方面, 前人报道了脯氨酸和鸟氨酸可能为香味物质 2-乙酰-1-吡咯啉 (2-AP) 的前

收稿日期: 2016-06-20; 修改稿收到日期: 2016-09-10。

基金项目: 国家自然科学基金国际 (地区) 合作与交流项目 (31161140348); 浙江省自然科学基金资助项目 (Y14C130040)。

体物质<sup>[7]</sup>, 当 *Badh2* 突变后导致香味物质 2-AP 含量的大量积累, 非香稻材料中该基因所编码的蛋白甜菜碱脱氢酶可能通过催化其底物 4-氨基丁醛进而转化为 4-氨基丁酸, 而香稻材料中则可能促进 4-氨基丁酸转化为 1-吡咯啉, 进而与乙酰基团结合, 从而形成香味物质 2-AP, 但具体的 *Badh2* 蛋白功能及 2-AP 代谢途径还没有彻底研究清楚<sup>[6]</sup>。

分子标记辅助选择被认为是一种有效的育种手段, 特别适合于一些性状考查比较困难的基因。香味性状的鉴定相对比较困难, 容易受主观因素的影响, 因此, 香味基因分子标记辅助选择可以大大提高其选择的效率。*Badh2* 第 7 外显子 8 bp 缺失的突变体基因 *badh2* 首先被报道。此外, Chen 等<sup>[5]</sup>还发现了 *Badh2* 另外一个等位基因, 即第 2 外显子存在 7 bp 的缺失, 并将有功能的 *Badh2* 基因转化到第 2 外显子缺失的香稻材料中, 发现转基因植株的 2-AP 含量显著下降, 该研究结果表明第 2 外显子上 7 个碱基的缺失也可引起水稻香味的产生。此外, 随着香味基因 *Badh2* 的克隆<sup>[6]</sup>, 一系列 *Badh2* 等位变异基因被成功鉴定, 相关的功能标记也被开发利用<sup>[8-11]</sup>。近些年来研究人员希望通过生物技术手段对水稻品种中的香味基因进行编辑, 从而加快育种进程。Niu 等<sup>[12]</sup>通过 RNAi 技术, 对日本晴中的香味基因 *BADH2* 进行敲除, 结果发现, 转基因后代植株中的香味物质 2-乙酰-1-吡咯啉 (2-AP) 含量明显增加; Chen 等<sup>[13]</sup>采用人工小 RNA 转基因技术, 对日本晴中的香味基因 *BADH2* 进行敲除, 结果表明转基因后代籽粒中 2-AP 含量明显提高。转录激活因子效应物核酸酶 (TALEN) 是基因组编辑核酸酶, 可以有效地对靶向基因组进行编辑, Shan 等<sup>[14]</sup>

通过 TALEN 技术, 对水稻香味基因 *BADH2* 进行基因组编辑, 获得了大约 30% 的杂合 *BADH2* 基因型的遗传材料, 通过后代分离鉴定, 获得剔除了转基因克隆载体的香型突变体材料, 突变体材料的 2-AP 含量明显提高。

本研究利用 CRISPR-CAS9 技术, 以中花 11 为研究对象, 对水稻香味基因 *Badh2* 进行编辑, 获得不携带转基因克隆载体及表现出香味的植株, 以期为加快水稻香味育种进程提供一定的理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本研究以中花 11 为遗传转化受体, 开展常规的转基因试验, 转基因材料种植于中国水稻研究所富阳试验基地, 常规田间种植及管理。

### 1.2 载体构建及转基因研究

利用试剂盒快速方便地将 gRNA 靶点序列插入到 Cas9/gRNA 质粒中。构建好的 Cas9/gRNA 质粒能够同时表达植物密码子优化的 Cas9 蛋白及 gRNA, 应用 CRISPR 技术进行目标基因的敲除和编辑, 构建载体及具体插入位置信息如图 1 所示 (北京唯尚立德生物科技有限公司)。

### 1.3 香味物质测定

香味物质 2-乙酰-1-吡咯啉 (2-AP) 含量利用气相色谱-质谱联用仪测定。测定过程中采用 2,4,6-三甲基吡啶作为内标, 将气体成分以氦气作为传送媒介连续地注射到配置有光离子探测器的气相色谱仪, 气相色谱仪与 5975 质量选择检测器连接,

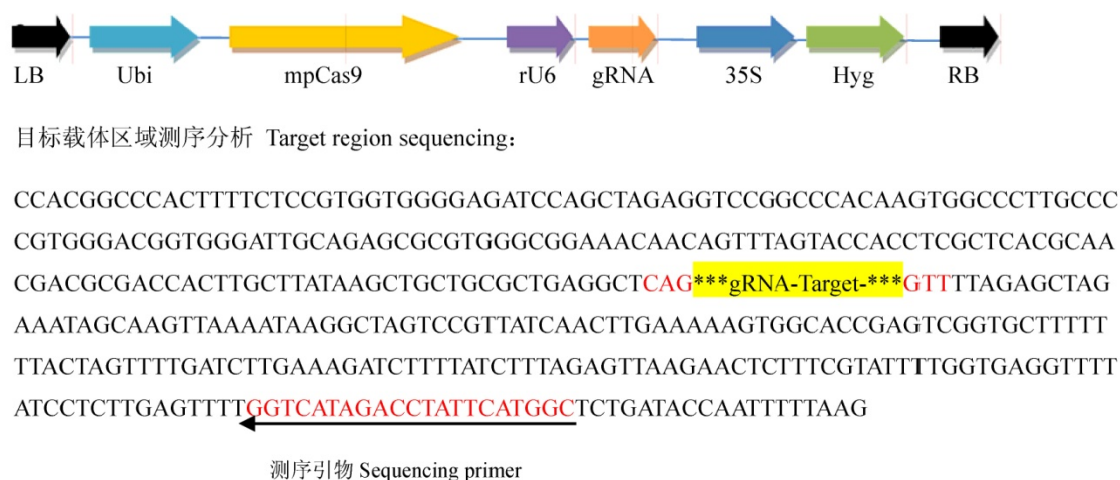


图 1 Cas9/gRNA 载体图

Fig. 1. Vector map of Cas9/gRNA.

LB—载体左边界; Ubi—Ubi启动子; mpCas9—Cas9蛋白; gRNA—引导RNA; rU6—水稻U6启动子; 35S—35S启动子; Hyg—潮霉素; RB—载体右边界。

LB, Vector left border; Ubi, Ubi promoter; mpCas9, Cas9 protein; gRNA, Guide RNA; rU6, Rice U6 promoter; 35S, 35S promoter; Hyg, Hygromycin; RB, Vector right border.

表 1 本研究所使用的引物  
Table 1. List of primers used in this study.

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
Target1-F	CAGTGGCCACGGCGATCCCGCAG
Target1-R	AACCTGCGGGATCGCCGTGGCCA
Vector identify-F	AAAACCTCACCAAAATACGA
Vector identify-R	TTGCTCCCAACAATTCTTAA
Seq-F	TCTCCCACCACCACTCCACA
Seq-R	TCAGCCATGCTTCCAAC TTATTC
Badh2-Q-F	TCCGGGCCAAGTACCTCC
Badh2-Q-R	CGTCCATGTCCCATGCTG
Ubi-Q-F	AACCAGCTGAGGCCCAAGA
Ubi-Q-R	ACGATTGATTTAACCAGTCCATGA

其中采用一个 HP-5MS 色谱毛细管柱气体样品直接作为离子源，通过电子碰撞的模式起作用，最后经由 NIST2005 检测香气物质的峰值，2-AP 的出峰时间为 6.324 min。该方法样品处理简单、快速、灵敏，样本和试剂消耗少，能较容易地区分香稻和非香稻品种，降低了人为判断香味的主观性，提高了香味鉴定的准确性，特别适合大批量香稻育种材料的鉴定，具体方法参考 Shan 等<sup>[14]</sup>，并作了相应的改进。

1.4 突变体表型分析

利用中花 11 及突变体材料，考查株高、分蘖数、结实率及每穗粒数等产量性状。考查 8 个单株，获得数据通过 Excel 进行统计分析；千粒重的测定方法为数 300 粒种子并测定其质量，8 个重复。此外，还对直链淀粉含量，胶稠度及碱消值等三项蒸煮食味品质指标进行了测定，3 次重复，获得的数据通过 Excel 进行统计分析。

1.5 PCR 鉴定分析及 qRT-PCR 分析

分蘖盛期取参试材料单株叶片，采用 CTAB 法提取全基因组 DNA，之后放置于-20℃冰箱中保存。然后将提取的 DNA 用于 PCR 扩增实验，PCR 体系如下：DNA 5 μL，正反向引物（10 μmol/L）各 1.5 μL，dNTPs（2 μmol/L）10 μL，2×缓冲液 25 μL，KOD Fx 酶 1 μL，加 ddH<sub>2</sub>O 补足 50 μL。PCR 产物在 2%琼脂糖凝胶上进行电泳，电泳结束后 EB 溶液显色并拍照，需要测序的样品直接切胶回收送上海博尚生物技术有限公司。

利用 RNA 提取试剂盒(Axygen)提取突变体和野生型叶片总 RNA。首先利用 DNase I 处理总 RNA，接着以消化处理后的 RNA 为模板，采用

cDNA 合成试剂盒(TOYOBO)反转录合成第 1 链 cDNA，然后利用实时定量 PCR (qRT-PCR)方法分析 *Badh2* 在野生型和突变体中的表达量，其中 *Ubiquitin* 基因作为内参基因。qRT-PCR 体系如下：cDNA 模板 1 μL，2×SYBR qPCR Mix (TOYOBO) 10 μL，正反引物(10 μmol/L)各 1 μL，ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μL。PCR 扩增程序如下：95℃下预变性 3 min，95℃下 10 s，60℃下 30 s，72℃下 20 s，45 个循环。利用公式  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算基因的相对表达量。

1 结果与分析

2.1 CRISPR-CAS9 表达载体的构建

通过对中花 11 编码甜菜碱脱氢酶基因 *Badh2* 进行测序分析，发现该基因开放阅读框 ORF 序列与日本晴高度一致，属于典型的非香型粳稻材料。此外，该材料在转基因过程中由于其转化效率高、生育期适中、结实率较高等优点，因此，我们以中花 11 为转基因受体，借助 CRISPR/CAS9 基因敲除技术开展转基因实验。首先我们通过已知的香味基因 *Badh2* 登录号 LOC\_Os08g32870，获得了其全长 cDNA 序列，结合 <http://crispr.dbcls.jp/> 生物信息学网站，通过序列比对分析，在 *Badh2* 外显子上找到一条长度为 20 bp 特异性较好的靶点序列 Target 1（表 1，图 2-A、B），将其构建到表达载体中（图 1），并开展转基因实验。

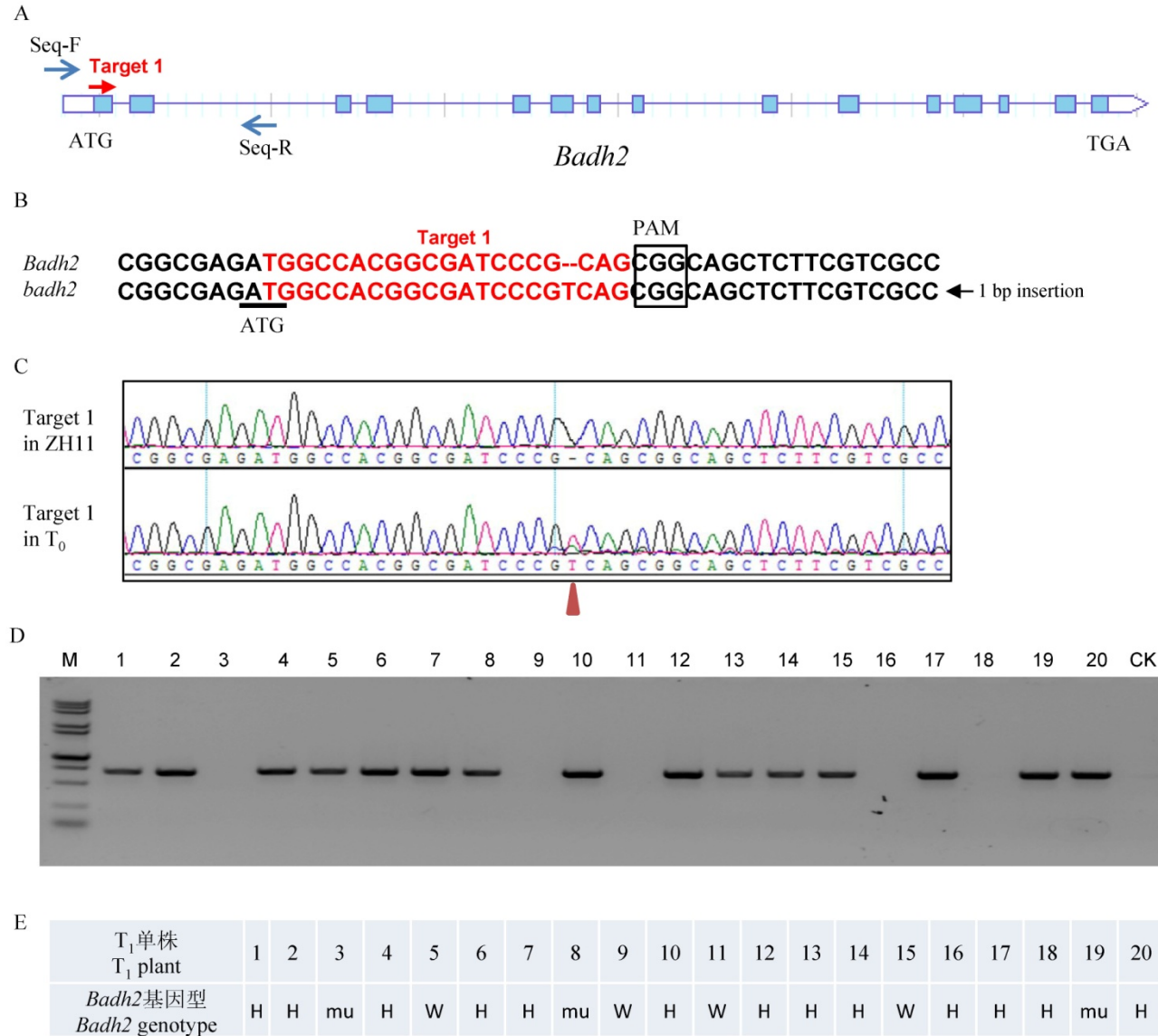
2.2 *Badh2* 的编辑及无标记后代的鉴定分析

首先我们获得了 8 个独立的 T<sub>0</sub> 代转基因植株，我们对每个转基因苗提取相应的 DNA，同时在表达载体上设计特异性引物 Vector-identify-F/R 对靶点序列进行了测序验证（表 1）。测序结果表明，我

们验证了靶点序列的载体已成功插入到植物基因组,通过利用设计特异性测序引物 Seq-F/R 对 *Badh2* 靶点位置的基因组序列进行了测序分析(表 1)。结果表明,其中 3 个独立转基因系材料在 PAM 附近发生了编辑,由于两个转基因系没有收到足够的种子,因此仅对其中一个转基因系进行了遗传研究(图 2-C)。

我们将 T<sub>1</sub> 代材料种植到转基因实验田,通过 DNA 提取及载体序列扩增,发现载体在后代中发生了分离(图 2-D)。此外,我们进一步对 T<sub>1</sub> 代植株

*Badh2* 进行了测序分析,发现在 *Badh2* 第一外显子上距离起始密码子 ATG 下游 18 bp 位置插入一个碱基 T,导致了蛋白质的移码,影响了 *Badh2* 蛋白的结构和功能(图 2-B)。通过对 T<sub>1</sub> 20 个单株 *Badh2* 编辑位点进行测序分析,发现了该基因突变位点也发生了分离(图 2-E)。通过 CRISPR-CAS9 技术对水稻中的香味基因进行编辑,希望获得剔除了载体骨架,同时还有香味的遗传材料,结合载体序列 PCR 鉴定和 *Badh2* 靶点测序结果,发现单株 3 中的载体骨架已经分离出去,而且还携带有突变形式的



A—*Badh2* 结构; B—*Badh2* PAM 序列及基因编辑; C—中花 11(ZH11)和 T<sub>0</sub> 植株在靶点位置测序结果; D—转基因 T<sub>1</sub> 代植株载体序列的分离; E—转基因 T<sub>1</sub> 代植株 *Badh2* 基因的分离; H—杂合基因型; mu—突变体; W—野生型。

A, *Badh2* structure; B, PAM sequence and *Badh2* editing; C, Target region sequencing in Zhonghua 11(ZH11) and T<sub>0</sub>; D, Segregation of vector sequence in T<sub>1</sub> generation; E, Segregation of edited *Badh2* in T<sub>1</sub> generation. H, Heterozygous genotype; mu, Mutant; W, Wild type. CK, H<sub>2</sub>O.

图 2 *Badh2* 及基因编辑

Fig.2. *Badh2* and its CRISPR-CAS9-mediated editing.

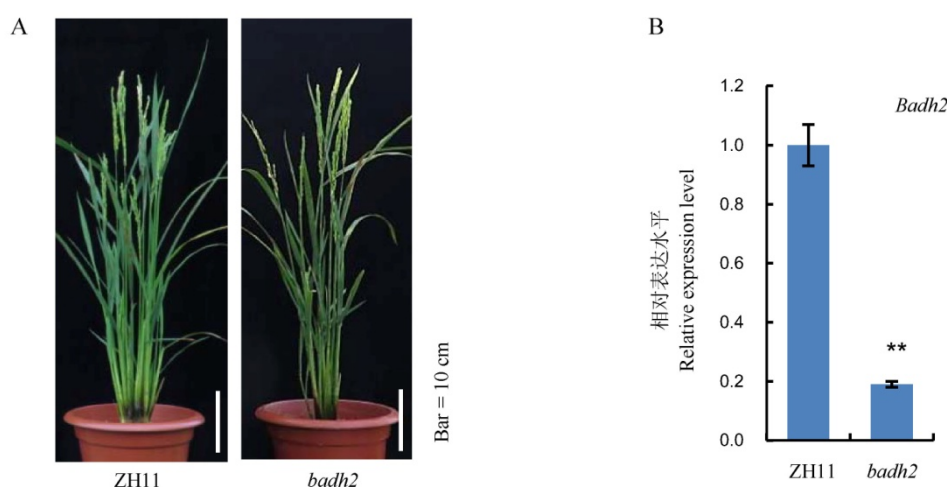
香味基因 *badh2*(图 2-D、E)。

### 2.3 转基因后代 *Badh2* RNA 水平检测及香味物质 2-AP 含量的测定

前期我们获得了一个转基因材料 *badh2*, 该材料中不包含载体序列且 *Badh2* 已被成功编辑, 野生型与 *badh2* 表现出相似的植株表型(图 3-A)。此外, 为了进一步研究香味基因在转基因后代中的功能, 我们对中花 11 和突变体材料中 *Badh2* RNA 表达水平进行了检测。前人已报道水稻苗期叶片适合于 *Badh2* RNA 检测<sup>[5]</sup>, 因此我们提取了两组材料苗期 14 d 左右叶片总 RNA, 然后通过 qRT-PCR 技术,

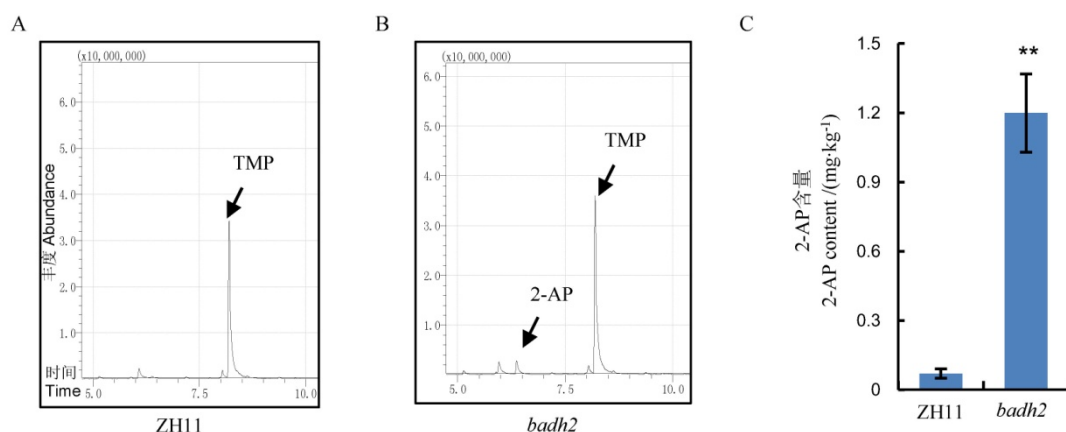
对 *Badh2* 进行了定量分析, 我们发现突变体材料中 *Badh2* 表达水平显著降低(图 3-B)。该结果表明香味基因第 1 外显子一个核苷酸的插入, 影响了该基因的转录水平, 导致该基因在突变体材料中表达显著下调。

与此同时, 我们进一步分析了该基因的突变及表达水平的降低是否与香味的产生相关。采用气相色谱-质谱联用技术对两份材料中花 11 及突变体材料籽粒中的 2-AP 含量进行了分析(图 4-A、B), 与野生型中花 11 对照相比, 突变体材料中的香味物质 2-AP 显著提高, 中花 11 中 2-AP 含量约 0.07



A, 中花 11 及 *badh2* 植株表现; B, 中花 11 及 *badh2* 中 *Badh2* RNA 水平  
A, Phenotype of Zhonghua 11 and *badh2*; B, *Badh2* RNA level in Zhonghua 11 and *badh2*.  
图 3 *Badh2* 基因编辑后代表型及 RNA 表达水平的检测

Fig. 3. Phenotype and *Badh2* RNA level of ZH11(Zhonghua 11) and *badh2*.



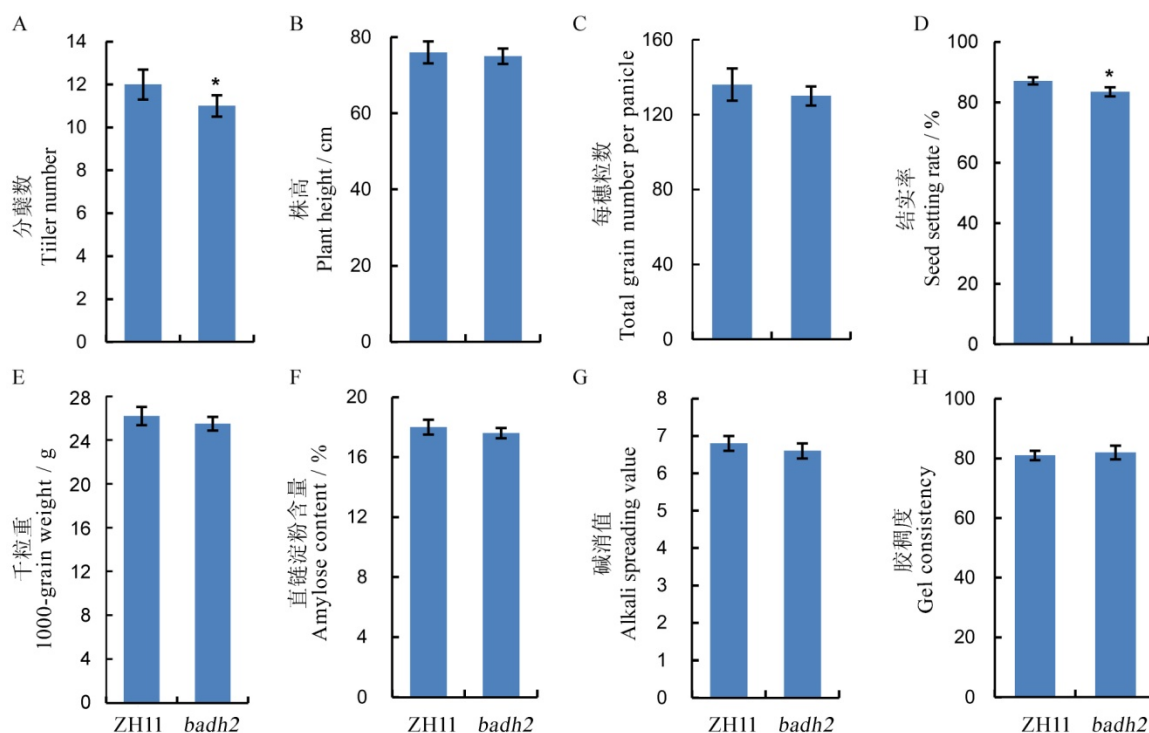
A 和 B—中花 11 和 *badh2* 2-AP 总离子色谱图及内标 2,4,6-三甲基吡啶; C—中花 11 及 *badh2* 2-AP 含量. 数据用平均数±标准差表示(n=3). \*\*表示在 0.01 水平上差异极显著 (*t* 检验)。ZH11—中花 11。

A-B, Total ion chromatograms(TIC) of 2-AP and TMP (as internal standard) in Zhonghua 11 and *badh2*; C, 2-AP content in Zhonghua 11 and *badh2*. Values are shown as mean±SD (n=3). \*\*presents significant difference at *P*<0.01 level by *t*-test. ZH11, Zhonghua 11.

图 4 中花 11 及 *badh2* 中总离子色谱分析及香味物质 2-AP 的含量

Fig. 4. Total ion chromatograms(TIC) and 2-acetyl-1-pyrroline(2-AP) content of Zhonghua 11 and *badh2*.





数据用平均数±标准差表示( $n=8$ ). \*表示在 0.05 水平上差异显著( $t$  检验)。ZH11—中花 11。

Values were shown as mean±SD ( $n=8$ ). \*presents significant difference at 0.05 level( $t$ -test). ZH11, Zhonghua 11.

图 5 水稻产量及蒸煮食味品质在野生型及突变体材料中的表现

Fig. 5. Performance of rice yield and cooking and eating quality in ZH11 and *badh2*.

mg/kg, 而突变体中则增加到 1.2 mg/kg (图 4-C), 因此, 我们的结果表明 *Badh2* 突变是引起香味的一个关键基因。

#### 2.4 *Badh2* 基因编辑后代产量性状的考查及蒸煮食味品质的测定

为了研究香味基因是否与水稻产量及稻米品质密切相关, 我们对中花 11 及其  $T_2$  代突变体材料中的产量性状及蒸煮食味品质等几项指标进行了考查及测定。产量性状主要包括株高、分蘖数、千粒重、每穗粒数及结实率, 而蒸煮食味品质主要包括直链淀粉含量、胶稠度及碱消值。通过生物统计分析, 我们发现除了分蘖数及结实率在两组材料中表现出显著差异外( $P<0.05$ ), 其余各项指标间都无显著差异(图 5)。因此, 通过以上数据的分析结果, 推断该基因并不影响稻米品质, 但是有可能影响水稻的产量。

### 3 讨论

全球香稻资源丰富、栽培历史悠久、种植范围分布广泛, 印度的 Basmati 系列、泰国的 KDML105、

日本的宫香、美国的 Della 都是颇有名气的香稻品种。我国也是香稻的主要种植区域, 种植历史悠久, 各水稻主产区都有适应当地气候的原始香稻类型, 如云南的螃蟹谷、贵州的香禾、广西有靖西香糯等。实际生产过程中, 传统香稻存在地域性强、生育期长、抗倒伏和抗病能力差、产量低等缺点, 使得香稻的推广和生产应用受到了较大的限制<sup>[15]</sup>。传统的香稻育种主要通过香型和非香型品种间杂交, 由于后代分离植株香味鉴定的不确定性, 以及香味基因可能与一些产量、品质或抗病基因存在连锁累赘, 因此成功选育成香型优良品种比较困难。

众所周知, 传统香稻育种还是主要通过传统的育种手段, 品种间杂交及后代鉴定筛选, 需要花费大量时间和精力, 因此, 前人已尝试通过转基因的技术, 直接对我们所培育品种中的香味基因 *Badh2* 进行敲除或编辑, 从而加快育种进程<sup>[12-14]</sup>。CRISPR-CAS9 系统是继 RNAi 技术、锌指核酸酶和 TALEN 核酸酶之后最新发展起来的另一个可精确定点编辑基因组 DNA 的新技术, 其具有设计构建简单快速等优点。该技术首先在动物中广泛利用, 随后科研人员将该技术应用于植物基因组编辑。我

们通过在 *Badh2* 基因 ORF 区域上设计特异性靶位点(图 2-A), 进行转基因特异性敲除实验, 成功获得了一个携带有香味且剔除了载体序列的突变体材料 *badh2*, 该基因第一外显子上发生了一个核苷酸 T 的插入(图 2-B), 不仅导致 *Badh2* RNA 水平显著降低(图 3-B), 而且引起了该蛋白质的移码, 突变后的 *Badh2* 不能发挥正常蛋白功能, 进而导致了香味的产生(图 4-C), 由于该材料未携带转基因元件, 可直接应用于育种研究, 培育新的香型水稻材料, 因此, 利用该转基因技术策略及特异性靶点, 可以直接对不同水稻品种的 *Badh2* 进行编辑, 创制香型遗传材料, 这将大大加速香稻品种的选育进程。

前人已报道香味基因与产量、品质及抗病性存在一定的关系, 我们通过对野生型材料中花 11 及转基因后代材料的产量及品质指标进行了统计分析, 发现香味基因的变异与稻米品质没有表现出一定的相关性, 只有分蘖数和结实率两项指标在中花 11 及突变体材料中表现出显著差异, 株高、千粒重、每穗粒数以及三项蒸煮食味品质指标在两组材料都无显著差异(图 5)。转基因植物容易导致植株变矮, 分蘖数变少及结实率降低, 所以我们推测该差异可能归因于脱靶或转基因过程中的组织培养, 因此, 我们目前将对突变体材料与野生型材料进行回交, 进一步研究香味基因与分蘖数及结实率的关系。

## 参考文献:

- [1] 胡培松, 唐绍清, 魏兴华. 泰国香米事件及启示. 中国稻米, 2006, 12(4): 1-2.  
Hu P S, Tang S Q, Wei X H. Thailand's aromatic rice incident and its revelation. *China Rice*, 2006, 12(4): 1-2. (in Chinese)
- [2] Ahn S N, Bollich, C N, Tanksley S D. RFLP tagging of a gene for aroma in rice. *Theor Appl Genet*, 1992, 84: 825-828.
- [3] Pinson S. Inheritance of aroma in six rice cultivars. *Crop Sci*, 1994, 34: 1151-1157.
- [4] Sakthivel K, Sundaram R M, Shobha Rani N, Balachandran S M, Neeraja C N. Genetic and molecular basis of fragrance in rice. *Biotechnol Adv*, 2009, 27: 468-473.
- [5] Chen S H, Yang Y, Shi W W, Ji Q, He F, Zhang Z D, Cheng Z K, Liu X N. *Badh2*, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance. *Plant Cell*, 2008, 20: 1850-1861.
- [6] Bradbury L M, Fitzgerald T L, Henry R J, Jin Q S, Waters D L. The gene for fragrance in rice. *Plant Biotechnol J*, 2005, 3: 363-370.
- [7] Bradbury L M, Gillies S A, Brushett D J, Waters D L, Henry R J. Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice. *Plant Mol Biol*, 2008, 68: 439-449.
- [8] Kovach M J, Calingacion M N, Fitzgerald M A, McCouch S R. The origin and evolution of fragrance in rice (*Oryza sativa* L.). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 14444-14449.
- [9] Shao G N, Tang S Q, Chen M L, Wei X J, He J W, Luo J, Jiao G A, Hu Y C, Xie L H, Hu P S. Haplotype variation at *Badh2*, the gene determining fragrance in rice. *Genomics*, 2013, 101: 157-162.
- [10] Shao G N, Tang A, Tang S Q, Luo J, Jiao G A, Wu J L, Hu P S. A new deletion mutation of fragrant gene and the development of three molecular markers for fragrance in rice. *Plant Breeding*, 2011, 130: 172-176.
- [11] Shi W W, Yang Y, Chen S H, Xu M L. Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties. *Mol Breed*, 2008, 22: 185-192.
- [12] Niu X L, Tang W, Huang W Z, Ren G J, Wang Q L, Luo D, Xiao Y Y, Yang S M, Wang F, Lu B R, Gao F Y, Lu T G, Liu Y S. RNAi-directed downregulation of OsBADH2 results in aroma (2-acetyl-1-pyrroline) production in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 100.
- [13] Chen M L, Wei X J, Shao, G N, Tang S Q, Luo J, Hu P S. Fragrance of the rice grain achieved via artificial microRNA-induced down-regulation of OsBADH2. *Plant Breeding*, 2012, 131: 584-590.
- [14] Shan Q W, Zhang Y, Chen K L, Zhang K, Gao C X. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the OsBADH2 gene using TALEN technology. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13: 791-800.
- [15] 余亚莹, 邵高能, 圣忠华, 蒋汉伟, 贺记外, 孙园园, 蔡怡聪, 胡培松, 唐绍清. 国内外香稻资源遗传多样性研究. 植物分类与资源学报, 2015, 37(6): 871-880.  
Yu Y Y, Shao G N, Sheng Z H, Jiang H W, He J W, Sun Y Y, Cai Y C, Hu P S, Tang S Q. Genetic diversity of global aromatic rice varieties. *Plant Div&Resour*, 2015, 37(6): 871-880. (in Chinese with English abstract)