

基于 CRISPR/Cas9 技术创制优质香味粳稻品系

段敏¹ 谢留杰¹ 岳雅妮¹ 黄善军^{1,*}

(¹台州市农业科学研究院, 浙江 台州 318000; *通信作者, email: sjhuang219@126.com)

Development of High-quality Aromatic *japonica* Rice Lines by Using CRISPR/Cas9 Technology

DUAN Min¹, XIE Liujiel¹, YUE Yani¹, HUANG Shanjun^{1,*}

(¹Taizhou Academy of Agricultural Sciences, Taizhou 318000, China; *Corresponding author, email: sjhuang219@126.com)

Abstract: 【Objective】Fragrance is an important trait of rice eating quality. In this study, the fragrance gene *Badh2* in rice was edited using CRISPR/Cas9 technology to create a high-quality aromatic *japonica* rice line. 【Method】Two target sequences located in the third and fourth exons of *Badh2* were selected as target sites for constructing the binary expression vector pHUE411-*Badh2*-gRNA. The high-quality *japonica* rice line Tai 20-29 was used as the transformation material. 【Result】Twenty T₀ transgenic plants were obtained after transformation. Through propagation, PCR, and sequencing verification, six homozygous mutants with different base alterations in the third and fourth exons of *Badh2* were identified. Except for a slightly lower seed setting rate and a higher grain number per panicle, the six mutants(*bh62*, *bh64*, *bh65*, *bh67*, *bh68*, and *bh74*) showed similar agronomic traits such as panicle length, grain length, grain width, and 1000-grain weight compared with the wild-type Tai 20-29. The mutants showed a significantly lower seed setting rate and a higher grain number per panicle compared to Tai 20-29. The 2-AP content in brown rice of mutants *bh62*, *bh64*, *bh65*, and the wild type was determined by GC-MS. The results showed that the 2-AP content in the mutants increased significantly, reaching 24.27, 33.89, and 38.96 mg/kg, respectively, which was much higher than that in Tai 20-29. 【Conclusion】We successfully generated a high-quality aromatic *japonica* rice line by editing the *Badh2* gene using CRISPR/Cas9 technology.

Key words: rice; hygromycin; CRISPR/Cas9; fragrance gene; 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP)

摘要: 【目的】香味是水稻重要的食味品质性状。本研究选择优质粳稻品系台 20-29 为研究对象, 利用 CRISPR/Cas9 技术对其香味基因 *Badh2* 进行编辑, 以期获得具有香味的优质粳稻品系。【方法】选择香味基因 *Badh2* 第 3、第 4 外显子上的 2 段序列作靶位点, 构建双元表达载体 pHUE411-*Badh2*-gRNA 并转入台 20-29 获得转基因植株。【结果】20 株 T₀ 植株经过加代、潮霉素标记检测、测序比对, 共计获得 22 个 T₁ 代无载体纯合突变株, 包括 6 种突变类型, 每种突变体在第 3、第 4 外显子上存在不同程度的碱基变化。6 个香味突变体 *bh62*、*bh64*、*bh65*、*bh67*、*bh68*、*bh74* 在穗长、粒长、粒宽、千粒重等方面与野生型台 20-29 基本一致, 结实率有所下降, 每穗粒数稍有提升, 稻米品质没有明显变化。利用气相色谱-质谱技术检测突变体 *bh62*、*bh64*、*bh65* 的糙米中香味物质 2-AP 含量, 结果表明糙米中 2-AP 含量较台 20-29 极显著提高, 分别达到 24.27、33.89、38.96 mg/kg。【结论】对水稻香味基因 *Badh2* 进行编辑可以高效获得具有香味的水稻优质品系。

关键词: 水稻; 潮霉素; CRISPR/Cas9; 香味基因; 2-乙酰-1-吡咯啉

水稻是我国最主要的粮食作物之一, 香味性状是衡量大米品质的一个关键指标^[1]。随着人们生活水平的提高, 消费者对大米的食味品质要求逐年提

高, 软香米日益受到青睐。在世界范围内, 香稻也受到广泛欢迎, 不仅是因为香气, 更有报道指出, 香稻中的铁元素和锌元素比普通水稻高出 70%左

收稿日期: 2025-01-10; 修改稿收到日期: 2025-04-01。

基金项目: 浙江省农业新品种选育重大科技专项(2021C02063-5-5); 台州市农业计划科技项目(23nya09); 浙江省基础公益研究计划资助项目(LQ24C60003)。

右^[2], 香稻价格比普通大米也要高出许多。因此, 香稻品种选育越发受到育种者的重视。

香型稻谷中有 300 多种挥发性化合物, 研究发现香味化合物 2-乙酰-1-吡咯啉(简称 2-AP)是香稻主要香气贡献物^[3]。2-AP 的形成与积累受遗传因素、环境条件、施肥、收获时期、加工精度等影响^[4]。多数研究者认为, 香稻中香味的遗传受到单个隐性基因控制, 位于 8 号染色体上的隐形基因 *fgr* 与香味有密切联系^[5-6]。进一步研究表明, *fgr* 基因编码甜菜碱醛脱氢酶 (Betaine aldehyde dehydrogenase homologue 2, *Badh2*), 包含 15 个外显子和 14 个内含子, 编码 503 个氨基酸^[7]。抑制 *fgr* 基因的表达或敲除 *fgr* 基因, 均会使 *Badh2* 酶功能缺失, 2-AP 含量提高, 使水稻产生香味^[8]。

基因编辑是在基因组水平上对 DNA 序列进行定向改造的技术, 目前普及最广的即 CRISPR/Cas9, 一种由导向 RNA 介导的基因组定向编辑技术^[9,10]。近年来, 陆续有研究者利用 CRISPR/Cas9 技术对水稻香味基因 *Badh2* 进行编辑, 以期在短时间内创制出具有香味的不同类型水稻品系, 如邵高能等^[11]对中花 11 中的 *Badh2* 第 1 外显子上的序列定点编辑, 获得了一个剔除载体骨架且第 1 外显子上插入 1 个碱基 T 的突变体材料。周文甲等^[12]对第二积温带主栽品种绥粳 14 的抽穗期基因 *Hd2*、香味基因 *Badh2* 同时进行编辑, 获得了改良的抽穗期缩短香米品种。

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术, 以优质粳稻品系台 20-29 为研究对象, 对香味基因 *Badh2* 进行编辑, 以期获得无载体的优质香味粳稻新品系, 为加快创制香味品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水稻材料台 20-29 是以粳稻江苏 G56 为母本、春江 157 为父本杂交后, 通过花药培养筛选出的优质粳稻品系。该品系具有株高适中、中抗白叶枯病、米质优良等特征。本研究使用的 CRISPR/Cas9 载体

表 1 本研究中涉及的 PCR 扩增引物

Table 1. Primers used in this study

引物名称 Name of prime	寡核苷酸序列 (5'-3') Oligonucleotide sequence (5'-3')
HYG-F	GCGTCTGCTGCTCCATACAA
HYG-R	TGACATTGGGGAGTTTAGCG
Bad-IF	TAGCCTTCCAGTCTAAATGACA
Bad-IR	CAACTACACCGATAGGCTCTT

pHUE411 及中间载体 pCBC-MT1T2 由南京农业大学张红生实验室馈赠。

1.2 靶位点的选择及载体构建

水稻香味基因 *LOC_Os08g32870* DNA 全长 5860 bp, 包含 15 个外显子, 编码一个由 503 个氨基酸组成的蛋白产物。登录 CRISPR-PLANT 网站(<http://www.genome.arizona.edu/crispr/CRISPRsearch.html>)进行靶点分析, 选择第 3、第 4 外显子的 2 段序列作为靶位点, 并利用 CRISPR GEN TOOLS 网站(<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>)网站评估脱靶情况。

双元表达载体 pHUE411-*Badh2*-gRNA 构建的方法参考 Chen 等^[13], 稍作修改, 构建好的载体质粒送至南京思普金生物公司测序。测序正确的质粒转化农杆菌 EHA105, 通过农杆菌侵染台 20-29 的愈伤组织创制转基因植株, 一共获得 20 株 T₀ 代转基因幼苗。目标编辑序列见图 1。

1.3 T₁ 代转基因阳性验证及纯合突变体靶点分析

所有 T₀ 代转基因幼苗移栽 1 个月后单株取样, 利用改良 CTAB 法提取 DNA, 扩增载体标记潮霉素基因进行阳性验证。阳性的单株继续加代, T₁ 代种子播种成苗后, 继续扩增潮霉素基因以寻找不含载体的无 Cas9 单株。

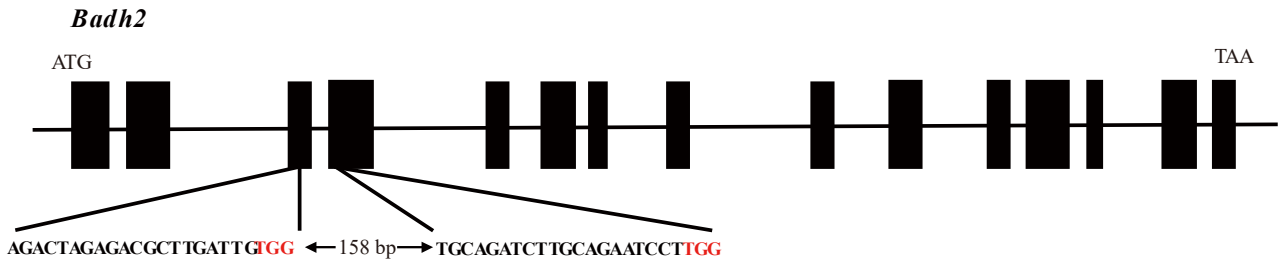
针对所有无载体单株, 设计特异性引物 Bad-IF/IR, 扩增包含靶位点在内的基因片段并测序, 与野生型台 20-29 进行比对, 寻找纯合突变的单株。潮霉素扩增引物 HYG-F/R、特异性引物 Bad-IF/IR 序列见表 1。

1.4 T₂ 代香味粳稻突变体农艺性状统计

利用浓度为 1.7% 的 KOH 溶液浸泡 T₁ 代突变株成熟期叶片, 初步辨别是否具有香味^[14]。叶片含香味的突变株系继续加代, 获得的 T₂ 代香味粳稻突变体用于性状观察及鉴定。2024 年正季, 所有香味突变体与野生型台 20-29 种植于台州市农业科学院新桥综合试验站基地, 每个株系种 4 行, 每行 7 株, 单本插, 成熟期时随机取中间 5 株统计农艺性状。

1.5 香味物质 2-AP 检测方法

将 *Badh2* 纯合突变体、野生型台 20-29 的成熟



红色碱基表示 PAM 序列；黑色方框表示外显子。
Red letters represent protospacer adjacent motif (PAM) sequence; Black boxes represent exons.

图 1 *Badh2* 基因结构及 gRNA 靶位点位置
Fig. 1. Schematic diagram of *Badh2* and target sites

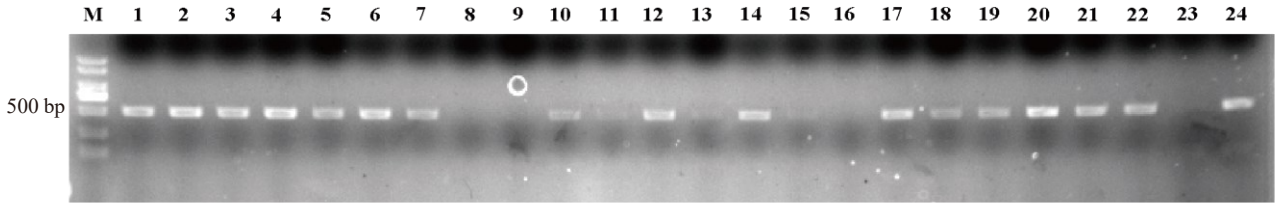


图 2 部分 T₁ 代单株潮霉素标记第二次检测结果
Fig. 2. Identification result of hygromycin in T₁ generation transgenic plants (partial) in the second test

期种子去壳成糙米后各自称取 8 g，送至武汉普奈斯检测技术有限公司，以 Thermo TSQ 8000 EVO 质谱仪检测糙米中香味物质 2-AP 含量。检测方法参考张丽等^[15]，数据使用 Excel 进行分析。

2 结果与分析

2.1 基因编辑载体构建

水稻香味基因 *LOC_Os08g32870* DNA 全长 5860 bp，包含 15 个外显子；cDNA 全长 1807 bp，编码一个由 503 个氨基酸组成的蛋白产物。登录 CRISPR-PLANT 网站 <http://www.genome.arizona.edu/crispr/CRISPRsearch.html>，选择第 3、第 4 外显子的 2 段 20 nt 的寡核苷酸作为靶点，2 个靶点之间相距 158 bp(图 1)。利用 Golden gate cloning 的方法构建双元表达载体 pHUE411-*Badh2*-Cas9。

2.2 转基因株系阳性验证

包含载体 pHUE411-*Badh2*-gRNA 的农杆菌侵染台 20-29 愈伤组织，转化后获得 20 株 T₀ 代幼苗，经 PCR 检测全部能够扩增出潮霉素标记基因。2023 年正季继续加代，对 288 株 T₁ 代单株进行潮霉素标记检测。经过 2 轮 PCR 检测，确定有 49 株不含潮霉素标记，即无 Cas9 单株(图 2)。

2.3 香味粳稻突变体序列分析

针对所有无 Cas9 单株，利用特异性引物 Bad-IF/IR 扩增包含靶位点在内的基因片段并测序，与野

生型台 20-29 进行 DNA 序列比对。49 个单株中共获得 22 株纯合突变株，包括 6 种突变类型。每 1 种突变体在第 3、第 4 外显子上有不同程度的碱基插入或缺失，其余碱基序列没有明显变化。如突变体 *bh62*，第 3 外显子缺失 4 个碱基，第 4 外显子上插入 1 个碱基。突变体 *bh65* 的突变方式比较特殊，其在靶序列 1、2 之间大约有 180 个碱基与原序列存在极大差异(图 3)。

2.4 香味粳稻突变体农艺性状统计及香味鉴定

所有突变体的剑叶经过碱溶液浸泡后，能挥发出浓郁的香味，而野生型台 20-29 没有香味。

2024 年正季在大田种植 T₂ 香味代突变体与野生型台 20-29，成熟期时随机选取中间 5 株统计农艺性状。6 个突变体中有 3 个株高降低，与野生型相比差异显著或极显著。突变体的穗长、粒宽、粒长、千粒重与台 20-29 基本一致。对于有效穗数，除 *bh68* 略有下降，其余突变体均高于台 20-29，且差异达到极显著水平。*bh62*、*bh64*、*bh65*、*bh67* 的每穗粒数增多，相比野生型分别达到显著或极显著差异。突变体的结实率降低，从台 20-29 的近 90% 下降至 80% 左右，差异显著(图 4)。

6 个突变体中，选择 *bh62*、*bh64*、*bh65* 等 3 个作为主要研究对象进行分析。*bh62*、*bh64*、*bh65* 在成熟期时的表型与野生型基本无异(图 5)。野生型台 20-29 的米质达到部颁二等水平，将其 *Badh2* 基因编辑之后发现突变体稻米的透明度佳，与野生型基

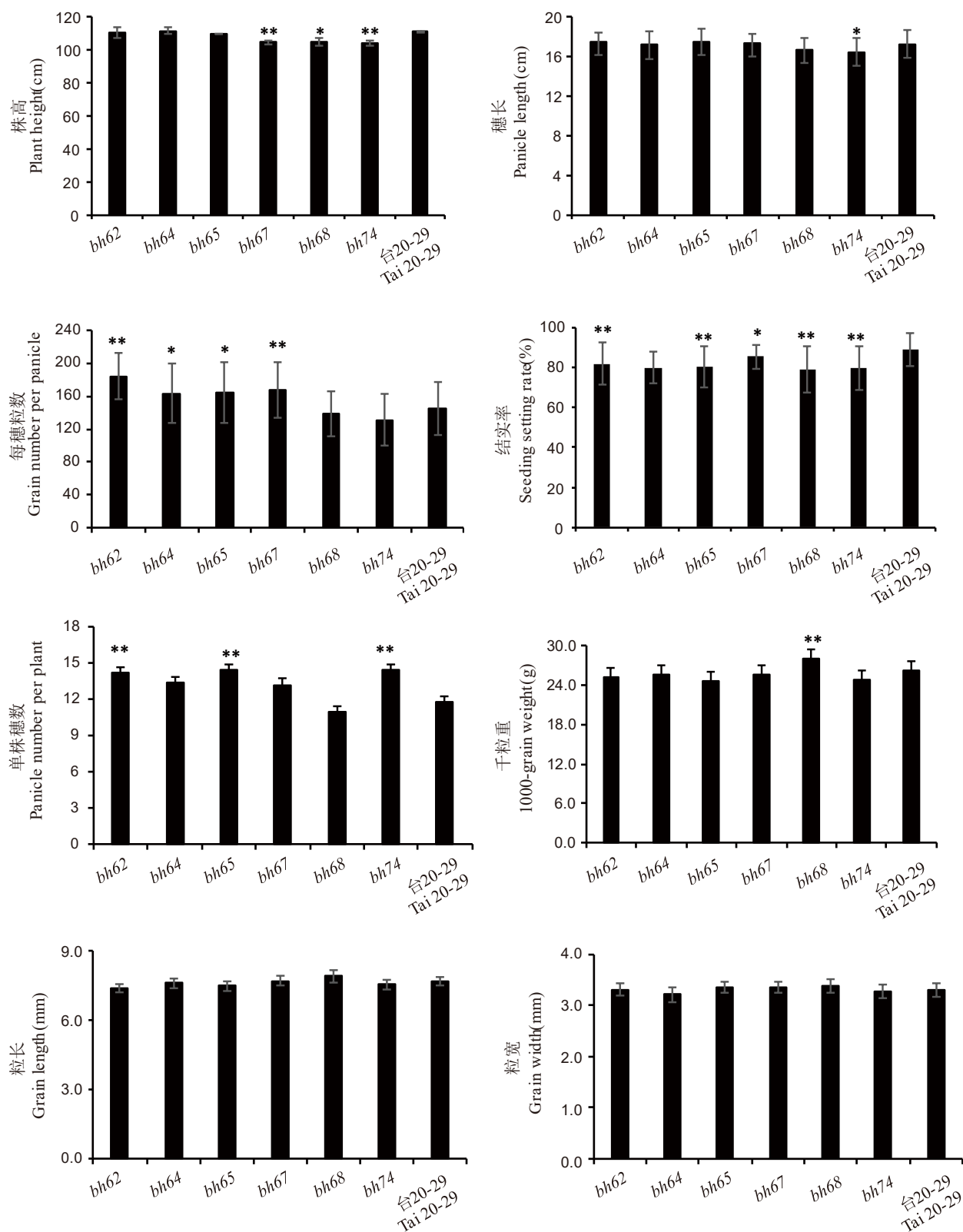


红色横线标出 PAM 序列，箭头表示突变碱基位置。
Red lines display protospacer adjacent motif (PAM) sequence. Arrows show the location of mutant bases.

图 3 6 种香味突变体与野生型靶位点序列比对
Fig. 3. Comparison of target sequences between six aromatic mutants and wild type

本一致(图 6-A)，说明香味基因编辑没有改变稻米自身品质。
进一步利用气相色谱-质谱联用技术对野生型

及突变体糙米中的 2-AP 含量进行测定分析，结果发现野生型台 20-29 糙米中 2-AP 的含量极低，仅有 0.57 mg/kg，而突变体 bh62、bh64 及 bh65 的 2-

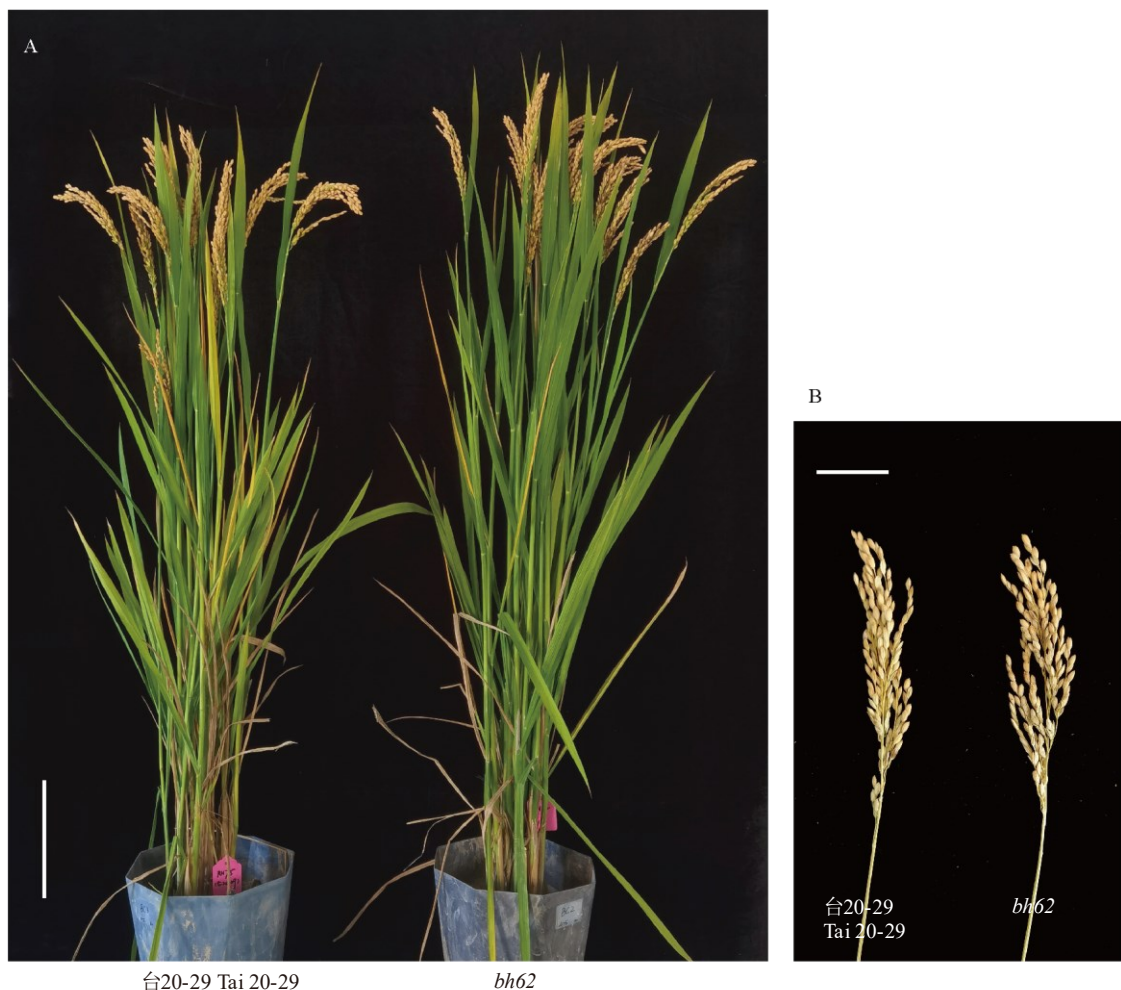


数据用平均数±标准差表示，株高、每株穗数、千粒重的样本量 $n=5$ ，其余参数统计时 $n=15$ 。**, * 分别表示突变体与野生型相比差异达显著 ($P < 0.01$) 和极显著水平 ($P < 0.05$)。

Values are shown as mean±SD. Sample sizes $n=5$ for plant height, panicle number per plant and 1000-grain weight, $n=15$ for the rest factors. ** and * indicate significant difference between mutants and the wild type at 0.01 and 0.05, respectively.

图 4 6 种香味突变体的农艺性状

Fig. 4. Agronomic traits of six aromatic mutants and wild type



A, 单株对比, 比例尺=20 cm; B, 穗型对比, 比例尺=5 cm。

A, Plant comparison, bar=20 cm; B, Panicle comparison, bar=5 cm.

图 5 突变体 *bh62* 与野生型台 20-29 成熟期时的表型对比

Fig. 5. Phenotypic comparison during mature stage between the mutant *bh62* and its wild type Tai 20-29

AP 水平显著提高, 分别达到 24.27、33.89、38.96 mg/kg(图 6-B)。该结果表明, *Badh2* 基因的突变是引起稻米产生香味的关键, 对该基因进行编辑能有效获得具有香味性状的新品系。

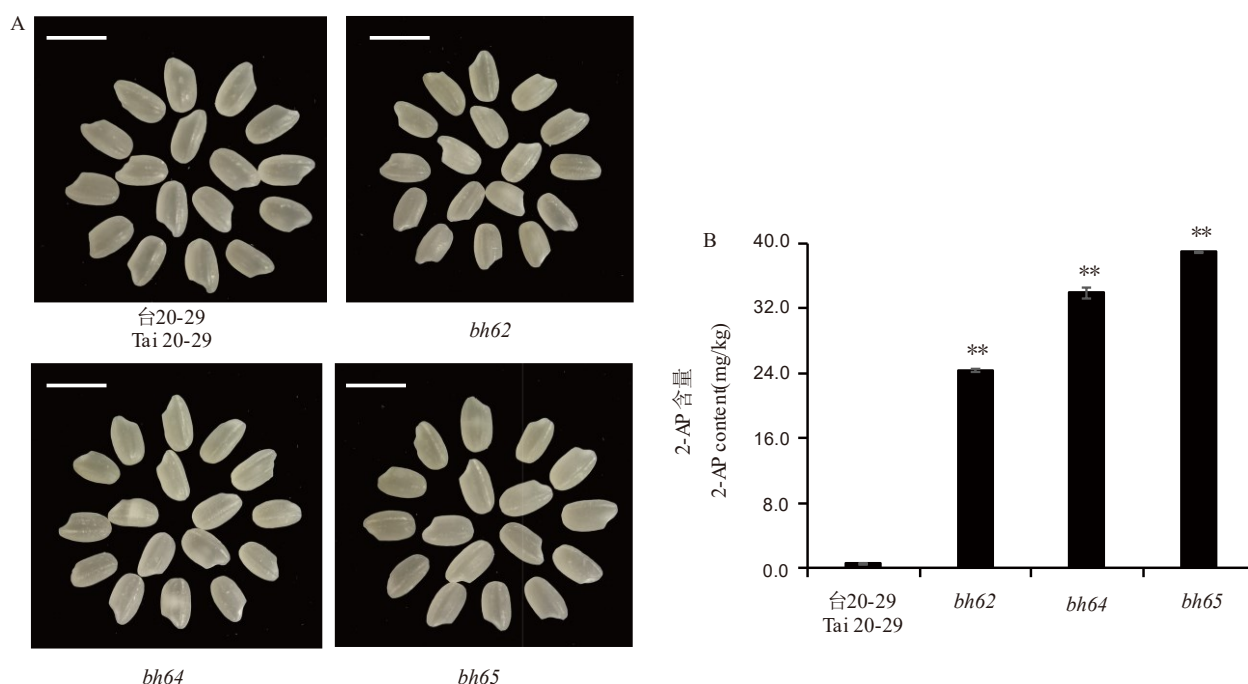
3 讨论

香稻是栽培稻的特殊类型, 其在南亚和东南亚地区的栽培范围广, 栽培历史悠久^[16], 中国古代的“贡米”即为香米, 被视为稻米中的珍品^[12]。香稻虽然营养价值高, 广受欢迎, 但由于其具有地域性强、生育期长、抗病及抗倒伏能力差、产量低等缺陷, 传统香稻的生产应用受到极大的限制^[17]。因此, 充分发掘和利用现有种质资源, 结合传统杂交育种手段与分子标记辅助育种技术、基因编辑等前沿技术, 是目前选育抗病性强、米质优且产量稳定的香

稻新品种的重要途径。

对于水稻香味的产生, 目前普遍认可的看法是编码甜菜碱脱氢酶基因 *Badh2* 在第 7 外显子上有 8 bp 碱基缺失和 3 个 SNP 差异导致翻译提前终止, 使得甜菜碱脱氢酶结构改变, 造成 2-AP 含量积累产生香味^[5, 7, 18]。近年来有研究表明, 不同的香稻品种在 *Badh2* 基因至少存在 17 个变异位点^[8], 如第 2 外显子上 7 bp 的缺失, 第 4 和第 5 外显子之间存在 803 bp 的缺失^[19-21], 第 1、10、13、14 外显子均存在不同类型的变异^[18, 19, 22]等。本研究中, 选择 *Badh2* 基因第 3、第 4 外显子的部分序列作为编辑位点, 获得的突变体存在不同类型的碱基缺失或插入(图 3), 且 2-AP 含量显著提高(图 6)。该结果证实了不仅第 7 外显子, 其他外显子序列的变化也能够改变 *Badh2* 酶的结构, 使得水稻产生香味。

香稻的检测方法包括咀嚼法、热水法、蒸煮法、



比例尺为 1 cm。B 图中数据测定重复 3 次，**表示与野生型相比， $P < 0.01$ 。

Bar=1 cm. Values are shown as mean $\pm$ SD, $n=3$. **represents $P < 0.01$ compared with wild type.

图 6 香味突变体与野生型的稻米表型 (A) 及糙米中 2-AP 含量 (B)

Fig. 6. Rice phenotype (A) and 2-AP content of brown rice (B) in mutants and the wild type

氢氧化钾法、气相色谱-质谱法等^[23,24]。咀嚼法、热水法、蒸煮法在鉴定时，水稻中的 2-AP 导出速度慢，影响香味快速检测，且叶绿素气味容易与 2-AP 混合，增加误测概率^[15]。氢氧化钾浸泡叶片或稻米时，能够选择性地释放香味从而排除叶绿素的干扰，提高测定准确性。本研究在获得 T_1 代无载体突变体后，先用 1.7% 氢氧化钾溶液浸泡突变体剑叶，快速检测出所有突变体叶片都能释放出浓郁香气。后续对 *bh62*、*bh64*、*bh65* 的 2-AP 含量进行 GC-MS 测定，其结果也验证了氢氧化钾溶液浸泡法快速、可靠。在气相色谱-质谱法测定成本昂贵的前提下，使用氢氧化钾溶液浸泡释放香气可作为检测香稻的主要方法。

普通稻米中的 2-AP 含量极低，一般用 GC-MS 方法检测不到或者含量约为 0.03 mg/kg^[21]，即便是苏香粳这样的早熟型香粳，其 2-AP 含量也仅有 1.0 mg/kg 左右^[13,25]。多数研究者利用 TALEN 或 CRISPR/Cas 等方法对不同水稻材料的 *Badh2* 进行编辑，得到的突变体 2-AP 含量从 0 提升到 0.2, 0.3, 1.2 mg/kg 不等，个别能够达到香稻米的水平^[11,21,26,27,28]。本研究中，野生型台 20-29 的香味基因 *Badh2* 序列完整，检测 2-AP 含量为 0.57 mg/kg，已经超越多数编辑材料的水平，推测台 20-29 类似我国云南和缅甸的一些籼稻，可能受非

Badh2 等位基因控制产生一定的香味^[29]。突变体 *bh62*、*bh64*、*bh65* 的 2-AP 含量跃升到 24.27、33.89、38.96 mg/kg，说明改变 *Badh2* 的第 3、第 4 外显子序列，特别是大片段的碱基变化(图 3)能够大量积累 2-AP，显著增强了台 20-29 稻米香气，使其变成名副其实的优质香稻。

本研究中突变体的农艺性状与野生型比较接近，仅结实率下降比较明显，相较野生型下降约 10%(图 4)。由于结实率是影响水稻产量的重要因素之一，因此在后续的研究中，可以将突变体与台 20-29 杂交获得 F_1 ，在自交的 F_2 代中通过测序寻找编辑位点为纯合突变的单株。将这些单株收种后继续加代，得到的纯合株系在成熟期时考察田间农艺性状，选育出结实率高、综合性状接近台 20-29 的香味粳稻品系。

谢辞：感谢南京农业大学张红生教授实验室提供本研究中的载体 pHUE411、pCBC-MT1T2 以及相应的技术支持。

参考文献：

- [1] 唐傲，邵高能，胡培松. 水稻香味基因的研究进展[J]. 中国稻米, 2009, 15(4): 1-4.
Tang A, Shao G N, Hu P S. Research progress on aromatic

- gene in rice[J]. *China Rice*, 2009, 15(4): 1-4. (in Chinese)
- [2] 张俊宝, 潘惠文, 刘海英. 水稻香味基因的遗传和研究进展[J]. *生物技术世界*, 2016(3): 9, 11.
Zhang J B, Pan H W, Liu H Y. Inheritance and research progress of rice flavor genes[J]. *Biotech World*, 2016(3): 9, 11. (in Chinese)
- [3] 赵国超. 香稻分子育种及香味形成分子机理的初步研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2010.
Zhao G C. Preliminary study on molecular breeding of aromatic rice and molecular mechanism of fragrance formation [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2010. (in Chinese with English abstract)
- [4] 田华, 段美洋, 黎国喜, 唐湘如. 香稻香气的研究进展[J]. *种子*, 2008, 27(7): 51-54.
Tian H, Duan M Y, Li G X, Tang X R. Research progress on aroma of aromatic rice[J]. *Seed*, 2008, 27(7): 51-54. (in Chinese)
- [5] Bradbury L M T, Fitzgerald T L, Henry R J, Jin Q, Waters D L E. The gene for fragrance in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2005, 3(3): 363-370.
- [6] Chen S H, Wu J, Yang Y, Shi W W, Xu M L. The *fgr* gene responsible for rice fragrance was restricted within 69 kb [J]. *Plant Science*, 2006, 171: 505-514.
- [7] Chen S H, Yang Y, Shi W W, Ji Q, He F, Zhang Z D, Cheng Z K, Liu X N, Xu M L. *Badh2*, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance [J]. *Plant Cell*, 2008, 20: 1850-1861.
- [8] 彭波, 孙艳芳, 陈报阳, 孙瑞萌, 孔冬艳, 庞瑞华, 李先文, 宋晓华, 李慧龙, 李金涛, 周棋赢, 柳琳, 段斌, 宋世枝. 水稻香味基因及其在育种中的应用研究进展[J]. *植物学报*, 2017, 52(6): 797-807.
Peng B, Sun Y F, Chen B Y, Sun R M, Kong D Y, Pang R H, Li X W, Song X H, Li H L, Li J T, Zhou Q Y, Liu L, Duan B, Song S Z. Research progress of fragrance gene and its application in rice breeding [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2017, 52(6): 797-807. (in Chinese with English abstract)
- [9] 徐华山, 李培德, 戴凤美, 刘凯, 杨国才, 李三和, 阚文俊, 周雷, 陈志军. 基因组编辑技术研究进展及其在植物中的应用[J]. *安徽农学通报*, 2015, 21(18): 15-19.
Xu H S, Li P D, Dai F M, Liu K, Yang G C, Li S H, Zha W J, Zhou L, Chen Z J. Research progress of genome editing technology and its application in plants[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2015, 21(18): 15-19. (in Chinese)
- [10] 段敏, 谢留杰, 高秀莹, 唐海娟, 黄善军, 潘晓飏. 利用 CRISPR/Cas9 技术创制广亲和水稻温敏雄性不育系[J]. *中国水稻科学*, 2023, 37(3): 233-243.
Duan M, Xie L J, Gao X Y, Tang H J, Huang S J, Pan X B. Creation of thermo-sensitive genic male sterile rice lines with wide compatibility based on CRISPR/Cas9 technology[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2023, 37(3): 233-243. (in Chinese with English abstract)
- [11] 邵高能, 谢黎虹, 焦桂爱, 魏祥进, 圣忠华, 唐绍清, 胡培松. 利用 CRISPR/CAS9 技术编辑水稻香味基因 *Badh2*[J]. *中国水稻科学*, 2017, 31(2): 216-222.
Shao G N, Xie L H, Jiao G A, Wei X J, Sheng Z H, Tang S Q, Hu P S. CRISPR/CAS9-mediated editing of the fragrant gene *Badh2* in rice[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2017, 31(2): 216-222. (in Chinese with English abstract)
- [12] 周文甲, 田晓杰, 任月坤, 魏祥进, 高扬, 谢黎虹, 刘华招, 卜庆云, 李秀峰. 利用 CRISPR/Cas9 创造早熟香味水稻[J]. *土壤与作物*, 2017, 6(2): 146-152.
Zhou W J, Tian X J, Ren Y K, Wei X J, Gao Y, Xie L H, Liu H Z, Bu Q Y, Li X F. Breeding of early-maturating and fragrant rice via CRISPR/Cas9 mediated genome editing[J]. *Soils and Crops*, 2017, 6(2): 146-152. (in Chinese with English abstract)
- [13] Chen Y Y, Wang Z P, Ni H W, Xu Y, Chen Q J, Jiang L J. CRISPR/Cas9-mediated base-editing system efficiently generates gain-of function mutations in *Arabidopsis* [J]. *Science China Life Sciences*, 2017, 60(5): 520-523.
- [14] 张丽, 朱勇良, 叶亚新, 谢裕林, 胡翠英, 程宏英, 金璵, 乔中英, 李庆魁. 不同农艺措施对苏香粳3号中2-乙酰-1-吡咯啉(2-AP)含量的影响[J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(3): 78-82.
Zhang L, Zhu Y L, Ye Y X, Xie Y L, Hu C Y, Cheng H Y, Jin J, Qiao Z Y, Li Q K. Effects of different agronomic measures on the content of 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) in Suxiangjing No.3[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2016, 44(3): 78-82. (in Chinese)
- [15] 黄永相, 郭建夫, 李伟, 李东, 祝敏丹. 一种水稻香味快速检测方法: CN109490478A[P]. 2019-03-19.
Huang Y X, Guo J F, Li W, Li D, Zhu M D. A rapid detection method for rice fragrance: CN109490478A[P]. 2019-03-19.
- [16] 张涛, 郑家奎, 徐建第, 蒋开锋, 吴先军, 汪旭东. 香稻品种的遗传多样性研究[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(3): 625-635.
Zhang T, Zheng J K, Xu J D, Jiang K F, Wu X J, Wang X D. Genetic diversity of aromatic rice varieties based on markers of functional genes and SSR[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(3): 625-635. (in Chinese with English abstract)
- [17] 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[J]. 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[J]. *Plant Diversity and Resources*, 2015, 37(6): 871-880. (in Chinese with English abstract)
- [18] Shi W W, Yuang 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[J]. *Molecular Breeding*, 2008, 22(2): 185-192.
- [19] Kovach M J, Calingacion M N, Fitzgerald M A, McCouch S R. The origin and evolution of fragrance in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(34): 14444-14449.
- [20] 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[J]. *Plant Breeding*, 2011, 130(2): 172-176.
- [21] 祁永斌, 王建军, 张礼霞, 王林友, 宋建. 一种 CRISPR/Cas9 编辑水稻香味基因 *Badh2* 的方法: CN110592135A[P]. 2019-12-20.
- [22] Amarawathi Y, Singh R, Singh A K, Singh V P, Mohapatra T, Sharma T R, Singh N K. Mapping of quantitative trait loci for basmati quality traits in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Molecular Breeding*, 2008, 21(1): 49-65.
- [23] 赵志鹏, 李刚, 吴书俊, 陆家安. 香稻研究进展[J]. 上海农业学报, 2009, 25(2): 110-114.
- Zhao Z P, Li G, Wu S J, Lu J A. Progress of study on aromatic rice [J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2009, 25(2): 110-114. (in Chinese with English abstract)
- [24] 张羽, 冯志峰, 吴升华, 陈雪燕. 陕西汉中地区水稻主要推广品种的香味分析[J]. 陕西农业科学, 2008, 54(3): 18-20.
- Zhang Y, Feng Z F, Wu S H, Chen X Y. Flavor analysis of main rice varieties in Hanzhong, Shaanxi Province[J]. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 2008, 54(3): 18-20. (in Chinese)
- [25] 胡翠英, 朱勇良, 叶亚新, 乔中英, 程宏英. Nafion/PDDAC 固相微萃取富集测定大米中 2-乙酰基吡咯啉[J]. 苏州科技学院学报: 自然科学版, 2014(4): 42-45, 61.
- Hu C Y, Zhu Y L, Ye Y X, Qiao Z Y, Cheng H Y. Preconcentration and determination of 2-acetyl pyrrolidine in rice based on Nafion and PDDAC coated solid-phase microextraction[J]. *Journal of Suzhou University of Science and Technology: Natural Science Edition*, 2014(4): 42-45, 61. (in Chinese with English abstract)
- [26] 齐金岗, 陈颖, 刘开强, 王小姣, 李林娟, 赵丽冰, 李孝琼, 郭嗣斌. 利用 CRISPR-Cas9 技术编辑 *OsBADH2* 基因改良优质恢复系桂恢 852 的香味品质[J]. 南方农业学报, 2024, 55(7): 2058-2068.
- Qi J G, Chen Y, Liu K Q, Wang X J, Li L J, Zhao L B, Li X Q, Guo S B. Improving the aroma quality of high-quality restorer line Guihui 852 by editing *OsBADH2* gene with CRISPR-Cas9 technology[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2024, 55(7): 2058-2068. (in Chinese with English abstract)
- [27] 孙慧宇, 宋佳, 王敬国, 刘化龙, 孙健, 莫天宇, 徐善斌, 郑洪亮, 邹德堂. 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑 *Badh2* 基因改良粳稻香味[J]. 华北农业学报, 2019, 34(4): 1-8.
- Sun H Y, Song J, Wang J G, Liu H L, Sun J, Mo T Y, Xu S B, Zheng H L, Zou D T. Editing *Badh2* gene to improve the fragrance of japonica rice by CRISPR/Cas9 Technology [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2019, 34(4): 1-8. (in Chinese with English abstract)
- [28] 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[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13(6): 791-800
- [29] 张江丽, 李苏洁, 李娟, 普世皇, 普玉娇, 张亮, 谭亚玲, 陈丽娟, 谭学林, 金寿林, 文建成. 不同来源水稻种质资源香味基因 *badh2* 位点的鉴定[J]. 分子植物育种, 2015, 13(4): 727-733.
- Zhang J L, Li S J, Li J, Pu S H, Pu Y J, Zhang L, Tan Y L, Chen L J, Tan X L, Jin S L, Wen J C. Identification of the fragrant gene *badh2* locus in rice germplasm resources original from different area [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13(4): 727-733. (in Chinese with English abstract)