

无选择标记基因的优质香稻新品系培育

冯梦诗¹, 叶俊¹, 侯莉莉¹, 李明¹, 唐丁², 张建祥², 王为云²,
徐志豪², 李亚飞², 顾铭洪¹, 程祝宽², 于恒秀¹

(1. 扬州大学, 江苏省植物功能基因组学重点实验室, 江苏 扬州 225001;

2. 中国科学院 遗传与发育生物学研究所, 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101)

摘要:香味是稻米食味品质的主要性状之一, 为培育无抗性选择标记基因的优质香稻新品系, 以携带有超双元载体 O_sBADH2 -RNAi 的农杆菌菌株 EHA105 介导, 将 O_sBADH2 基因的 RNA 干扰结构和潮霉素抗性选择标记 (HPT) 基因同时导入优质粳稻武育粳 3 号成熟胚来源的愈伤组织中, 经过在含有潮霉素的培养基上筛选和分化, 获得了 54 个独立转化子, 其中 36 个转化子同时含目的基因和 HPT 基因, 共转化频率为 66.7%; 从这些转化子的后代中共筛选获得 25 个去除 HPT 基因的转化子, 去标记频率为 69.4%; 通过 KOH 法等 4 种方法进行香味的鉴定, 获得 15 个具有香味的株系。实时定量 PCR 分析结果表明, 具香味株系中的 O_sBADH2 基因的表达受到了明显抑制, 进一步证明了香味的产生是由于 O_sBADH2 基因被干扰而引起。农艺性状调查表明, 抑制 O_sBADH2 基因的表达对水稻产量相关性状, 包括株高、千粒质量、穗粒数和结实率影响不明显。

关键词: 水稻; 香味; O_sBADH2 基因; RNAi; 无选择标记

中图分类号: Q78; S511.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2015)05-0092-05

doi: 10.7668/hbxb.2015.05.015

Breeding of Marker-free Fragrant Rice Via Transgenic Approach

FENG Meng-shi¹, YE Jun¹, HOU Li-li¹, LI Ming², TANG Ding², ZHANG Jian-xiang²,
WANG Wei-yun², XU Zhi-hao², LI Ya-fei², GU Ming-hong¹, CHENG Zhu-kuan², YU Heng-xiu¹

(1. State Key Laboratory of Plant Functional Genomics of the Ministry of Education, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China; 2. State Key Laboratory of Plant Genomics and Center for Plant Gene Research, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: In order to generate marker-free fragrant transgenic rice, O_sBADH2 -RNAi and hygromycin phosphotransferase gene (HPT) were transferred to calli derived from a *japonica* rice cultivar, Wuyujing 3, mediated with a *Agrobacterium* strain EHA105 harboring a single twin T-DNA binary vector. After selected and regenerated on the media with hygromycin, 54 independent transgenic lines were generated. According to PCR results, we got 36 co-transformation lines harboring both HPT gene and O_sBADH2 gene RNAi structure. The frequency of co-transformation was 66.7%. After two generation selections, we got 25 HPT gene free T_2 lines harboring O_sBADH2 gene RNAi structures. The frequency was 69.4%. 15 fragrance lines were screened from these transgenic lines using four kind methods detecting fragrance. Real-time quantitative PCR results showed that O_sBADH2 gene expression level was reduced significantly in these transgenic fragrance lines. We found that there was no obvious difference between the transgenic lines and the wild type, in the main agronomy characteristics, including plant height, 1000-grain weight, grain number of per spike, and seed setting rate.

Key words: Rice; Fragrant; O_sBADH2 ; RNAi; Marker-free

水稻是我国主要的粮食作物之一。一直以来, 我国育种家都注重提高水稻产量, 而对于品质方面的研究起步较晚。随着经济的发展和人民生活水平的

提高, 人们对稻米品质的要求越来越高。品质的优劣直接影响了水稻的种植推广和商品价值, 所以优质的水稻品种不仅要丰产, 而且加工成的稻米外观

收稿日期: 2015-07-16

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2008ZX08001-006)

作者简介: 冯梦诗 (1991-), 女, 江苏扬州人, 在读硕士, 主要从事作物遗传育种研究。

通讯作者: 于恒秀 (1965-), 女, 江苏连云港人, 博士, 教授, 主要从事作物遗传育种研究。

要好看,具有较好的口感和食味。香味是食味品质的主要性状之一,香米因其独特的香味而使其具有较高的经济价值,在市场上受到了普遍欢迎,因此香味品种的培育是水稻遗传育种的重要目标之一^[1-2]。

对香稻挥发性成分的研究始于 20 世纪 80 年代。Yajima 等^[3]研究表明,香米散发出的香味物质中有 114 种挥发性化合物^[3]。Buttery 等^[4]和 Paule 等^[5]报道指出 2-乙酰基-1-吡咯啉(2-acetyl-1-pyrroline,2AP)是稻米香味气体的主要成分,并证实了不同香稻品种香味强弱由 2AP 浓度的差异造成。2AP 可以使稻米具有爆米花型的香味,广泛存在于各种香稻品种中^[6-11]。水稻中 *O_sBADH2* 蛋白不仅具有很高的甜菜碱醛脱氢酶活性,催化甜菜碱醛(Betaine aldehyde, Bet-ald)生成甘氨酸甜菜碱(Glycine betaine,GB),而且 *BADH2* 还可以催化 4-氨基丁醛(Betaine aldehyde,4-aminobutyraldehyde, AB-ald)和 3-氨基丙醛(3-aminopropionaldehyde, AP-ald)等的氧化反应。AB-ald 是 2AP 生物合成的前体,在香稻中由于 *O_sBADH2* 基因内部核苷酸的变异在其编码区

出现缺失,结果导致翻译提前终止,产生无功能的 *BADH2* 蛋白,导致香味主要化合物 2AP 的积累^[6,11-13],使稻米具有香味。因此,我们可以通过抑制水稻中 *BADH2* 基因的表达来培育香稻新品种^[14]。本试验就是通过抑制优质粳稻品种武育粳 3 号中 *BADH2* 基因的表达培育优质香稻新品系。

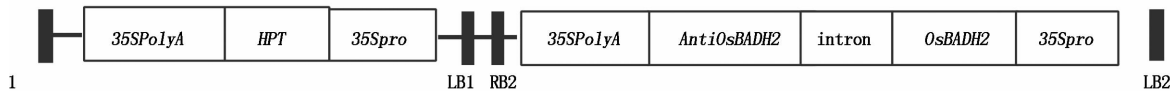
1 材料和方法

1.1 水稻材料

用于本研究的水稻为粳稻(*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*)品种武育粳 3 号。所用水稻材料是在扬州大学实验田种植,按常规方法进行栽培管理。

1.2 *O_sBADH2*-RNAi 载体

用于转化水稻的载体 *O_sBADH2*-RNAi 为超双元载体(Twin T-DNA binary vector),其中一个 T-DNA 区含有潮霉素抗性选择标记 *HPT* 基因,另一个 T-DNA 区含有目的基因 *O_sBADH2* 的 RNA 干扰结构(*O_sBADH2*-RNAi)。载体 T-DNA 区的结构如图 1 所示。



HPT: 潮霉素磷酸转移酶基因;LB1、RB1. 第 1 个 T-DNA 区的左右边界;LB2、RB2. 第 2 个 T-DNA 区的左右边界。
HPT: The hygromycin phosphotransferase gene;LB1、RB1. Left and right borders of the first T-DNA region;LB2、RB2. Left and right borders of the second T-DNA region.

图 1 超双元载体 *O_sBADH2*-RNAi T-DNA 区的结构

Fig.1 The structure of T-DNA region in the twin T-DNA binary vector *O_sBADH2*-RNAi

1.3 农杆菌介导法转化水稻

取水稻成熟胚诱导愈伤组织,并用于随后的转化。水稻愈伤组织的诱导培养及其与农杆菌的浸染、抗性愈伤组织的筛选及其再生等参照于恒秀等^[15]的方法进行。

1.4 转基因水稻 PCR 分析

1.4.1 *O_sBADH2* RNAi 结构的 PCR 扩增 *O_sBADH2* 基因 RNAi 结构的 PCR 扩增引物为:MX-F:5'-CACTGGAAGTTGCTGGAAAA-3'和 MX-R:5'-CCTCCAAATTTGCATTGATG-3',可扩增出 402 bp 的 DNA 片段。反应条件:95 ℃,4 min;95 ℃,40 s,51 ℃,40 s;72 ℃,30 s;35 个循环;72 ℃,5 min。

1.4.2 潮霉素抗性基因 *HPT* 的 PCR 扩增 潮霉素抗性基因编码区片段的 PCR 扩增引物为 HYG-F:5'-GCTTCTGCGGCGATTGTGT-3'和 HYG-R:5'-GGTTCGCGGAGGCTATGGATGC-3',可扩增出 660 bp 的 DNA 片段。反应条件:95 ℃ 4 min;95 ℃ 50 s,58 ℃ 50 s,72 ℃ 50 s,32 个循环;72 ℃ 4 min。

1.5 转基因稻米香味的鉴定

1.5.1 咀嚼法 分别取亲本植株以及转基因植株

上 16 粒成熟饱满籽粒,将米粒嚼碎随后吸一下气,香气便通过鼻呼出。品尝 4 粒以上都有香味的证明该单株具有香味。

1.5.2 KOH 法 取转基因植株及亲本对照的叶片约 4 g 置于培养皿(9 cm×9 cm)中,加入 15~20 mg 1.7% KOH 溶液,加盖密封,然后在室温下(约 25 ℃)浸泡 20 min,打开培养皿,由 4~5 位鉴定者逐个闻其气味,进行香味的比较鉴定。

1.5.3 热水法 一是将转基因植株和亲本对照植株的成熟籽粒放在装有 45~50 ℃ 温水的密闭器皿内加热 5 min,然后打开瓶塞嗅其香味。二是将 20~30 粒新收获的种子出精后放在盛有 20 mg 蒸馏水的试管中,然后用试管盖盖住并放入沸水浴中煮 10 min,移出试管冷却后评定香味。该过程以泰国香米作为香味评定和比较标准。

1.5.4 蒸煮法 将转基因植株和亲本对照出精后的稻米 50 g 放于铝盒中,加水 50~60 mg,加盖放入电饭锅中,蒸煮 40 min 后取出至室温,待冷却至 40 ℃ 以下后品尝,嗅其香气,食其香味。以泰国香米作评定标准。

1.6 Real-time PCR 分析

1.6.1 总 RNA 的提取 水稻叶片总 RNA 的提取:在水稻分蘖盛期,从未转化亲本植株和 *O_sBADH2-RNAi* 的 4 个独立转化子植株上分别取 3 张叶片。水稻叶片总 RNA 的提取采用 Invitrogen 公司 TRIzol 法提取(货号 15596-018)。

水稻种子 RNA 的提取:选取开花后 15 d 的水稻未成熟种子 30 粒,液氮速冻后研磨成粉末,RNA 的提取采用天根提取试剂盒(货号 DP419)。

1.6.2 实时定量 PCR 分析 cDNA 反转录使用 Invitrogen 公司的试剂盒(货号 18080-044)。实时荧光定量 PCR (Real-time fluorescence quantitative PCR)利用米香基因特异引物 *BADH2*RT-F/R(*BADH2* RT-F:5'-CCTAAGCGTCAAGCAAGT-3', *BADH2* RT-R:5'-TTTCCAGGCTCAGCACAT-3')进行扩增,内参基因为 *Actin*(引物序列为 *Actin*-F:5'-CCAAGGCCAATCGTGAGAAGA-3'; *Actin*-R:5'-AATCAGTGAGATCAGCCCCAG-3')。

1.7 农艺性状调查

在水稻成熟期对未转化亲本植株和具有香味转基因植株的产量相关性状如株高、千粒质量、穗粒数、实粒数和结实率进行调查,SPSS 软件进行方差分析。

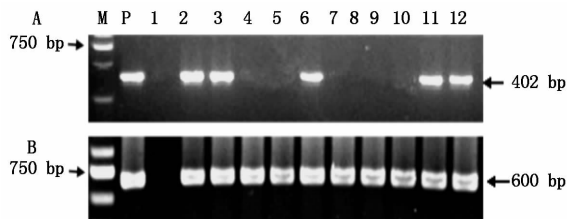
2 结果与分析

2.1 无选择标记转基因水稻的培育

2.1.1 农杆菌介导目的基因与潮霉素抗性选择标记基因的共转化 以粳稻武育梗 3 号成熟胚的愈伤组织作为转化受体,以携带有超双元载体 *O_sBADH2-RNAi* 的农杆菌介导的共转化法,经过在含有潮霉素的培养基上筛选和分化,获得了 54 个含有潮霉素抗性选择标记基因的独立转化子,通过 PCR 分析,其中 36 个转化子中同时含有 *O_sBADH2-RNAi* 结构和 *HPT* 基因,如图 2 中的 2,3,6,11 和 12 号单株为同时含有 *HPT* 基因和 *O_sBADH2-RNAi* 结构的共转化植株。共转化频率为 66.7%。

2.1.2 无选择标记转基因水稻的培育 让同时含有 *O_sBADH2-RNAi* 和 *HPT* 基因的共转化植株自交,对其后代植株进行 PCR 分析,以获得含有 *O_sBADH2-RNAi* 但没有 *HPT* 基因的植株。图 3 所示为来源于同一转化子 *T₂* 不同单株中 *O_sBADH2-RNAi* 和 *HPT* 基因的 PCR 扩增结果。从图 3 可以看出,在该转化子中,在 *T₂* 中 *O_sBADH2-RNAi* 和 *HPT* 基因发生遗传分离,其中第 4 和 7 号植株为有 *O_sBADH2-RNAi* 而无 *HPT* 基因的转基因植株,即为目的植株。按该

方法,在 25 个转化子的后代中获得了去除 *HPT* 基因的转基因植株,去标记频率为 69.4%。进一步种植 *T₃* 具有目的基因但没有 *HPT* 基因的植株,并对目的基因进行 PCR 分析。图 4 为 *T₃* 一个株系不同单株的 *O_sBADH2-RNAi* 和 *HPT* 基因 PCR 扩增结果,在所检测的单株中均含有 *O_sBADH2-RNAi* 而无 *HPT* 基因,从而筛选到获得含有目的基因的纯系。

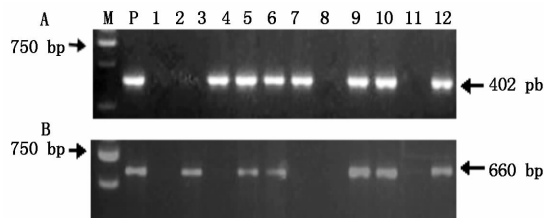


A. *O_sBADH2-RNAi* 的 PCR 分析;B. *HPT* 基因的 PCR 分析;M. 分子量标记 DL2000;P. 质粒 *O_sBADH2-RNAi*;1. 武育梗 3 号;2~12. 来源于 11 个独立转化子的 *T₀* 转基因水稻植株。

A. PCR analysis of *O_sBADH2-RNAi*;B. PCR analysis of *HPT* gene;M. Molecular marker DL2000;P. Plasmid *O_sBADH2-RNAi*;1. Wuyujing 3;2~12. 11 plants from 11 independent transformants of *T₀* transgenic rice lines.

图 2 *T₀* 转基因植株的 PCR 分析

Fig. 2 PCR analysis of the *T₀* transgenic rice plants

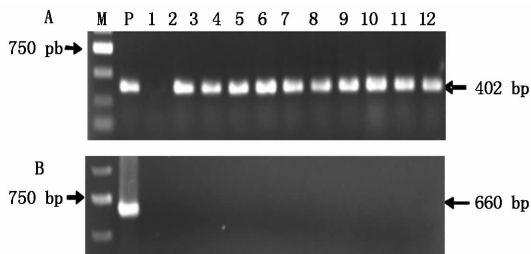


A. *O_sBADH2-RNAi* 的 PCR 分析;B. *HPT* 基因的 PCR 分析;M. 分子量标记 DL2000;P. 质粒 *O_sBADH2-RNAi*;1. 武育梗 3 号;2~12. 来源于同一转化子的 11 个 *T₂* 转基因水稻植株。

A. PCR analysis of *O_sBADH2-RNAi*;B. PCR analysis of *HPT* gene. M. Molecular marker DL2000;P. Plasmid *O_sBADH2-RNAi*;1. Wuyujing 3;2~12. 11 plants from one transgenic line in *T₂*.

图 3 *T₂* 转基因植株的 PCR 分析

Fig. 3 PCR analysis of the *T₂* transgenic rice plants



A. *O_sBADH2-RNAi* 的 PCR 分析;B. *HPT* 基因的 PCR 分析;M. 分子量标记 DL2000;P. 质粒 *O_sBADH2-RNAi*;1. 武育梗 3 号;2~12. 来源于同一转化子的 11 个 *T₃* 转基因水稻植株。

A. PCR analysis of *O_sBADH2-RNAi*;B. PCR analysis of *HPT* gene. M. Molecular marker DL2000;P. Plasmid *O_sBADH2-RNAi*;1. Wuyujing 3;2~12. 11 plants from one transgenic line in *T₃*.

图 4 *T₃* 转基因植株的 PCR 分析

Fig. 4 PCR analysis of the *T₃* transgenic rice plants

2.2 转基因稻米香味的鉴定

对已得到的 25 个纯系转化子的种子先用咀嚼

法鉴定,发现 15 转化子具有明显香味,具有香味的频率为 60%。然后再用 KOH 浸泡法鉴定,发现咀嚼法尝到有香味的株系用 KOH 浸泡法检测同样也有香味的产生,而未转化的亲本植株没有香味。随后对相对应的种子用热水法以及蒸煮法进行验证,结果一致。说明抑制 *O_sBADH2* 基因表达使武育梗 3 号的稻米具有了香味。

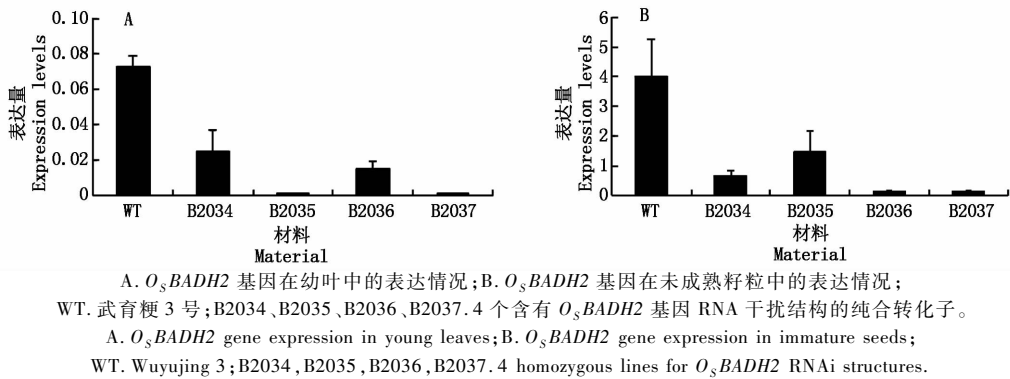


图 5 转基因水稻中 *O_sBADH2* 基因的实时定量 PCR 分析
Fig. 5 Real-time PCR analysis of *O_sBADH2* gene expression in the transgenic rice plants

2.4 抑制 *O_sBADH2* 基因表达对水稻产量性状的影响

为明确抑制 *O_sBADH2* 基因表达是否会影响水稻产量,选取了 4 个 T₃ *O_sBADH2* 基因表达受到抑

2.3 转基因植株中目的基因的表达分析

为了进一步证明香味的产生与抑制 *O_sBADH2* 基因表达有关,提取了未转化亲本植株和 4 个具有香味的独立转化子植株叶片和未成熟种子中的 RNA 并进行实时定量 PCR 分析,结果列于图 5,从图中可以看出,这 4 个转化子叶片和种子中 *O_sBADH2* 基因的表达量均较未转化对照明显降低。

制的株系和未转化对照,调查其株高、千粒质量、穗粒数和结实率等农艺性状。结果列于表 1,从表中结果可以看出,转基因水稻与亲本植株的产量性状无明显差异。

表 1 转基因水稻的产量性状表现

Tab. 1 Performance of the main agronomic traits of the transgenic lines				
材料 Material	株高/cm Plant height	千粒质量/g 1000-grain brown rice weight	穗粒数/粒 Grain No. per panicle	结实率/% Seed-setting rate
武育梗 3 号 Wuyujing3	95.08 ± 2.29	27.83 ± 0.40	135.33 ± 7.77	88.75 ± 2.46
B2034	94.02 ± 1.29	28.00 ± 0.70	136.67 ± 6.66	88.14 ± 5.97
B2035	95.52 ± 1.78	28.17 ± 0.91	138.00 ± 6.56	86.84 ± 4.29
B2036	96.58 ± 1.13	27.27 ± 0.32	135.67 ± 8.08	87.58 ± 2.69
B2037	96.84 ± 1.24	28.20 ± 0.46	132.33 ± 3.51	88.63 ± 3.62

3 讨论与结论

随着人们膳食结构的改善,对稻米的品质要求越来越高,目前进口香米在中国占有很大的市场份额,所以优质香稻新品种已成为我们水稻育种的一个重要方向。我国香稻育种起步较晚,且通过常规育种手段选育香稻新品种通常需要经过多代的回交,耗时长。通过转基因技术,干扰 *O_sBADH2* 基因的表达可以较常规育种方法快速培育香稻品种^[14],但如转基因水稻中含有抗性选择标记基因,给转基因水稻的进一步生产应用带来障碍。因为随着转基因作物种植面积不断增加,转基因作物的环境与食用安全性等问题,尤其是抗生素或除草剂抗性选择标记基因的存在已引起人们的广泛关注^[14,16-19]。解决转基因植物中抗性选择标记基因安全性问题的根本出路在于培育无抗性选择标记的转基因植

物^[20-24]。因此,不含抗性选择标记基因是培育转基因作物的重要目标之一,尤其是对于作为粮食作物的水稻显得更为突出,因为水稻是全世界半数以上人口的主食。本研究利用超二元载体介导的共转化技术,将 *O_sBADH2* 基因的 RNA 干扰结构和 *HPT* 基因同时导入优质梗稻武育梗 3 号中,从其后代中获得了去除选择标记基因的具香味的武育梗 3 号品系。所用的目的基因片段来自水稻本身,所以,该优质品系排除了抗性选择标记的潜在影响,具有很好的应用前景。

已有研究表明,水稻 *O_sBADH2* 基因编码的 BADH2 蛋白具有甜菜碱醛脱氢酶活性,所以该基因可能与水稻的渗透调节相关。Niu^[14] 和 Fitzgerald^[16] 的研究表明 *O_sBADH2* 基因的表达降低会导致水稻抗盐能力降低。但本研究的结果表明,在正常的生长条件下,干扰武育梗 3 号 *O_sBADH2* 基因的

表达,并不影响水稻的产量性状。我们对转基因水稻苗期抗盐处理,也未显示出显著差异(数据未列)。因此,本研究培育的转基因香稻品系在正常条件下种植,可以达到和亲本相近的产量,即 O_sBADH2 基因的功能缺失并没有给水稻产量带来负面的影响。泰国香稻品种 Khao Dawk Mali 105 在干旱区域生长也是良好的^[17-18],也说明香稻对逆境也有很好的适应性。分析其原因,可能是由于水稻体内存在其他编码甜菜碱脱氢酶的基因。因为水稻基因组中除了位于第 8 染色体上的 O_sBADH2 基因外,至少还有 3 个 $BADH$ 基因,一个是位于 4 号染色体上的 $BADH1$,以及 2 个位于第 7 号染色体上 $BADH$ ^[11]。而且已经证明 $BADH1$ 基因可以赋予水稻对盐的抗性^[19,25]。因此,一个 $BADH$ 基因功能丧失后,其功能可以由另外的 $BADH$ 基因补偿。

本研究利用转基因技术,通过超双元载体介导将 O_sBADH2 基因的 RNA 干扰结构和 HPT 基因同时导入优质粳稻品种武育粳 3 号中,共转化频率为 66.7%;并从此后代筛选获得无 HPT 基因但具有香味的转基因水稻新品系,去标记频率为 69.4%。在正常的生长条件下,这些转基因水稻的主要农艺性状与未转化对照无明显差别。因此,通过抑制 O_sBADH2 基因的表达获得的香型武育粳 3 号,提高了其食味品质,但不影响其产量性状。

参考文献:

- [1] 胡培松,唐绍清,顾海华,等. 水稻香味的遗传研究与育种利用[J]. 中国稻米,2006,12(6):1-5.
- [2] 于艳敏,王永华. 水稻香味研究现状[J]. 黑龙江农业科学,2010:115-7.
- [3] Yajima I, Yanai T, Nakamura M, et al. Volatile flavor components of cooked Kaorimai (Scented Rice, *O. Sativa Japonica*) [J]. Agr Biol Chem Tokyo, 1979, 43: 2425-9.
- [4] Buttery R G, Ling L C, Juliano B O. 2-acetyl-1-pyrroline-an important aroma component of cooked Rice [J]. Chem Ind-London, 1982: 958-959.
- [5] Paule C M, Powers J J. Sensory and chemical examination of aromatic and nonaromatic rice [J]. J Food Sci, 1989, 54: 343-6.
- [6] Bradbury L T, Gillies S A, Brushett D J, et al. Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice [J]. Plant Molecular Biology, 2008, 68(4/5): 439-449.
- [7] Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, Narayan M S, et al. In vitro culture of *Pandanus amaryllifolius* and enhancement of 2-acetyl-1-pyrroline, the major flavouring compound of aromatic rice, by precursor feeding of L-proline [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85(15): 2527-2534.
- [8] Yoshihashi T, Nguyen T T, Kabaki N. Area dependency of 2-acetyl-1-pyrroline content in an aromatic rice variety, Khao Dawk Mali 105 [J]. JARQ-Japan Agricultural Research Quarterly, 2004, 38(2): 105-109.
- [9] Lin C F, Hsieh T C Y, Hoff B J. Identification and quantification of the popcorn-like aroma in Louisiana aromatic rice (*Oryza-Sativa* L.). [J] Food Sci, 1990, 55: 1466-1467.
- [10] Jianming G. Identification of 2-acetylpyridine in Xiangjing-8618 rice and in Yahankaoluo leaves [J]. Food Chemistry, 2002, 78(2): 163-166.
- [11] Chen S, Yang Y, Shi W, et al. Badh2, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance [J]. The Plant Cell, 2008, 20(7): 1850-1861.
- [12] Shao G, Tang S, Chen M, et al. Haplotype variation at *Badh2*, the gene determining fragrance in rice [J]. Genomics, 2013, 101(2): 157-162.
- [13] Jiamsomboon K, Treesuwan W, Boonyalai N. Dissecting substrate specificity of two rice *BADH* isoforms: Enzyme kinetics, docking and molecular dynamics simulation studies [J]. Biochimie, 2012, 94(8): 1773-1783.
- [14] Niu X L, Tang W, Huang W Z, et al. RNAi-directed downregulation of *OsBADH2* results in aroma (2-acetyl-1-pyrroline) production in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Bmc Plant Biol, 2008, 8.
- [15] 于恒秀, 刘巧泉, 王玲, 等. 根癌农杆菌介导转化水稻成熟胚及转 *Meir* 基因植株的获得 [J]. 遗传, 2005(5): 772-778.
- [16] Fitzgerald T L, Waters D L, Brooks L O, et al. Fragrance in rice (*Oryza sativa*) is associated with reduced yield under salt treatment [J]. Environmental and Experimental Botany, 2010, 68(3): 292-300.
- [17] Bradbury L M T, Fitzgerald T L, Henry R J, et al. The gene for fragrance in rice [J]. Plant Biotechnol J, 2005, 3: 363-70.
- [18] Yoshihashi T, Huong N T T, Kabaki N. Quality evaluation of Khao Dawk Mali 105, an aromatic rice variety of northeast Thailand [J]. JIRCAS Working Report, 1999, 30: 151-60.
- [19] Hasthanasombut S, Supaibulwatana K, Mii M, et al. Genetic manipulation of Japonica rice using the *OsBADH1* gene from Indica rice to improve salinity tolerance [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2011, 104(1): 79-89.
- [20] Shirong J. Safety evaluation of marker genes in transgenic food plants [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1997, 2.
- [21] Miki B, McHugh S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety [J]. Journal of Biotechnology, 2004, 107(3): 193-232.
- [22] Ramessar K, Peremarti A, Gomez-Galera S, et al. Biosafety and risk assessment framework for selectable marker genes in transgenic crop plants: a case of the science not supporting the politics [J]. Transgenic Res, 2007, 16: 261-80.
- [23] Bai X, Wang Q, Chu C. Excision of a selective marker in transgenic rice using a novel Cre/loxP system controlled by a floral specific promoter [J]. Transgenic Research, 2008, 17(6): 1035-1043.
- [24] Micheline E, Simoni P, Cevenini L, et al. New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: an update [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008, 392(3): 355-367.
- [25] Hasthanasombut S, Ntui V, Supaibulwatana K, et al. Expression of indica rice *OsBADH1* gene under salinity stress in transgenic tobacco [J]. Plant Biotechnology Reports, 2010, 4(1): 75-83.