

转磷酸甘露糖变位酶基因提高水稻维生素 C 含量

高利芬^{1,2} 夏志辉^{2,3} 张继¹ 王道文² 翟文学^{2,*}

(¹ 江汉大学 系统生物学院, 武汉 430056; ² 中国科学院 遗传与发育生物学研究所, 北京 100101; ³ 海南大学 生命科学研究院, 海口 570228; * 通讯联系人, E-mail: wxzhai@genetics.ac.cn)

Transgenesis of the Phosphomannomutase Transgene Increases Vitamin C Content in Rice

GAO Li-fen^{1, 2}, XIA Zhi-hui^{2, 3}, ZHANG Ji¹, WANG Dao-wen², ZHAI Wen-xue^{2, *}

(¹ Institute for Systems Biology, Jiangnan University, Wuhan 430056, China; ² Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; ³ Institute of Life Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China;

* Corresponding author, E-mail: wxzhai@genetics.ac.cn)

GAO Lifan, XIA Zhihui, ZHANG Ji, et al. Transgenesis of the phosphomannomutase transgene increases vitamin C content in rice. *Chin J Rice Sci*, 2016, 30(4): 441–446.

Abstract: VC (vitamin C) is an essential nutrient to human health. Due to lack of *L*-gulonolactone oxidase, the last enzyme involved in VC synthesis pathway, human could not synthesize VC by themselves. Rice is an important food crop and its nutritional value could be greatly improved by increasing the VC content in rice seeds. Phosphomannomutase (PMM) is an important enzyme in VC synthesis pathway, catalyzing the interconversion from mannose 6-phosphate from mannose 1-phosphate. In this study, *Oryza* PMM gene (*OsPMM*) that was under the control of seed-specific expressed promoter Bx14 was transferred into ‘C418’, a restorer line of three-line japonica hybrid rice, using the double right-border vector pMNDRBBin6 through an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated system. Molecular analysis revealed that *OsPMM* was integrated into the genome of transgenic ‘C418’, and the homozygous and marker-free transgenic line was obtained in the T₂ generation. Gene expression analysis of transgenic lines showed the expression level of *OsPMM* was significantly increased in seeds, and accordingly, the VC content in the seeds of transgenic plant also increased by 25–50%.

Key words: vitamin C; phosphomannomutase; double right-border vector system; marker-free; transgenic line

高利芬, 夏志辉, 张继, 等. 转磷酸甘露糖变位酶基因提高水稻维生素 C 含量. 中国水稻科学, 2016, 30(4): 441–446.

摘要: 维生素 C (VC) 是人体健康所必需的营养元素。人类由于缺乏 VC 合成途径中的最后一种酶(*L*-古洛糖酸内酯氧化酶), 自身不能合成 VC。水稻是重要的粮食作物, 增加水稻种子中 VC 含量, 能够提高其营养价值。磷酸甘露糖变位酶(PMM)是 VC 合成通路中一种重要的酶, 催化甘露糖-6-磷酸到甘露糖-1-磷酸的转变。将水稻 PMM 基因(*OsPMM*)构建在双右边界二元载体 pMNDRBBin6 上, 并用种子特异表达的启动子 BX14 驱动其表达。通过农杆菌介导的转化系统, *OsPMM* 基因被转入粳型三系恢复系 C418 中。通过分子检测, 在 T₂ 代筛选到了无选择标记的转基因植株。对 *OsPMM* 基因在转基因植株中的表达进行分析, 发现 *OsPMM* 基因在转基因水稻种子内的表达水平明显提高, 相应地, 转基因系种子中的 VC 含量也提高了 25%~50%。

关键词: 维生素 C; 磷酸甘露糖变位酶; 双右边界二元载体系统; 无选择标记; 转基因系

中图分类号: Q786; S511.0353

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2016)04-0441-06

维生素 C(VC)又名抗坏血酸(*L*-ascorbic acid, AsA), 是动植物体内一种重要的抗氧化剂, 参与了人体的心血管功能、免疫细胞发育、结缔组织和铁离子的利用等生理进程。植物和大多数动物可以合成

VC, 人类由于缺乏 VC 合成途径中的最后一种酶 *L*-古洛糖酸内酯氧化酶(*L*-gulonolactone oxidase), 自身不能合成 VC, 加上 VC 不能在体内长期贮存, 人类必须每天从膳食中获取足够 VC。

收稿日期: 2015-08-21; 修改稿收到日期: 2015-10-20。

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX08001-002); 国家自然科学基金资助项目(31300999); 湖北省教育厅项目(B2015229); 武汉市科学技术局项目(2014072704011250); 江汉大学科研启动项目(3003-06000043)。

水稻是重要的粮食作物,增加水稻种子中 VC 含量,能够提高其营养价值。到目前为止,已经在植物体内发现了多条 VC 生物合成途径和一条循环利用途径,其中 VC 生物合成途径包括 *L*-半乳糖(*L*-galactose)途径(Wheeler-Smirnoff 途径)^[1-3]、*L*-古洛糖(*L*-gulose)途径^[4]、肌醇(myo-inositol)途径^[5]和 *D*-半乳糖醛酸(*L*-galactonic acid)途径^[6]等。

通过对 VC 合成和代谢通路上的酶进行基因操作,可以提高或降低植物体内的 VC 水平。在土豆中的研究表明,反义抑制 GDP-甘露糖焦磷酸化酶导致了 VC 含量的大幅下降^[7]。在拟南芥中反义抑制 *L*-半乳糖脱氢酶,在强光下生长的转基因植株的 VC 含量比野生型要降低很多^[8]。在烟草中,抑制 *L*-半乳糖醛酸-1,4-内酯脱氢酶的活性,导致了转基因株系 VC 含量较对照减少 30%^[9]。而 Tokunaga 等^[10]在烟草悬浮细胞内过量表达 *L*-半乳糖醛酸-1,4-内酯脱氢酶,使得总 VC 含量提高了 2 倍左右。不仅如此,一些研究还发现,在植物内表达异源的 VC 合成或代谢通路上的酶,也能对 VC 的含量进行调控。在拟南芥中过量表达草莓的 *D*-半乳糖醛酸还原酶导致 VC 的含量增加 2~3 倍^[6]。*L*-古洛糖是动物体内 VC 合成的前体物质,在莴苣和烟草中过量表达老鼠的古洛糖内酯氧化酶使 VC 含量提高达 7 倍^[11];在拟南芥中表达此酶也使 VC 含量提高了 3 倍多^[12]。脱氢抗坏血酸还原酶(Dehydroascorbate reductase, DHAR)参与了 VC 在植物体内的循环^[13],在烟草和玉米中过表达来自小麦的脱氢抗坏血酸还原酶,其表达水平在烟草和玉米中分别达到原来的 32 倍和 100 倍,相应地,叶片和谷粒中的 VC 水平也提高了 2~4 倍^[13]。

磷酸甘露糖变位酶(PMM)催化 VC 合成通路中甘露糖-6-磷酸到甘露糖-1-磷酸的转化,此反应是可逆的。对植物 PMM 的转基因操作发现,在烟草叶片中抑制 PMM 的表达可导致烟草 VC 含量降低,而增加 PMM 在叶片中的表达能使 VC 含量提高 20%~50%。在拟南芥中过表达拟南芥 PMM 也导致了 VC 含量提高 25%~33%^[14]。在烟草中过表达来自樱桃的 PMM 基因,烟草的 VC 含量提高了两倍,且 VC 含量的提高和 PMM 基因的转录水平和酶活性正相关^[15]。

以上报道表明,增加植物体内 VC 合成通路或循环通路中酶的表达,可以提高受体的 VC 含量。水稻是重要的粮食作物,暂未有通过基因工程提高

水稻 VC 含量的报道。水稻 PMM 基因(*OsPMM*, LOC_Os04g58580)位于水稻第 4 染色体,基因组全长 3033 bp, cDNA 全长 747 bp, 编码含 249 个氨基酸的磷酸甘露糖变位酶,催化 VC 合成通路中甘露糖-6-磷酸到甘露糖-1-磷酸的转化,所催化的反应是可逆的。

为了提高水稻种子的 VC 含量,本研究将 *OsPMM* 的全长 cDNA 和种子特异表达的启动子 Bx14 融合,构建成了表达载体 pDRBOsPMM。转基因质粒的骨架选择的是双右边界双元载体 pMN-DRBBin6,利用此载体,在转基因系后代的分离过程中可以筛选到无选择标记的转基因植株,无标记转基因植株的分离步骤可参见 Lu 等^[16]的报道。通过农杆菌介导的转化,将 *OsPMM* 整合到水稻杂交稻骨干亲本 C418 中,在 T₂代筛选获得了无选择标记且种子 VC 含量明显提高的 C418 转基因纯合系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

转基因受体材料是生产中常用的粳型恢复系 C418。之所以选择 C418,是因为 C418 是籼型遗传成分较高、形态偏籼且有特异亲和力的粳型恢复系,是起着“籼粳架桥”作用的品种。C418 与粳稻杂交子一代结实正常,与籼稻杂交子一代结实率 40%~65%。经与多个不育系配组,其所配组合具有高产、优质、抗病、抗倒、高光效、高结实率、高配合力等诸多特点,在生产中具有重要的应用价值^[17]。

1.2 质粒构建和水稻转化

转基因质粒 pDRBOsPMM 是将 *OsPMM* 的全长 cDNA 序列和来自小麦高分子量麦谷蛋白(HMW glutenin)Glu-1B-1Bx 基因的种子特异表达启动子 Bx14 融合构建而成的双元表达载体,由中国科学院遗传与发育生物学研究所王道文研究员提供。通过农杆菌介导的转化,*OsPMM* 基因被转入到 C418 品种中,水稻组织培养的方法参见 Zhai 等^[18]的报道。

1.3 转基因植株的分子检测

在转基因植株生长到高分蘖期时,采集叶片分别提取 DNA 和 RNA 进行转基因植株的分子检测。DNA 提取采用 CTAB 法;RNA 的提取采用 Trizol 法,脱氧核糖核酸酶 I 处理后,用 Promega 公司的 M-MLV 反转录酶,以 Olig(dT)₁₅ 为引物进行 cDNA 第 1 链的合成,具体过程参照厂家说明书。通

表 1 转基因植株分子检测所用引物

Table 1. Primers used for molecular detection of transgenic plants.

引物名称	引物序列
Primer name	Primer sequence(5'-3')
<i>OsPMM</i> -F/R	F:CACGCTTCATTACATTGCTG R:TATGTCCAATTGTCCGGTC
<i>Hpt</i> -F/R	F:TAGGAGGGCGTGGATATGTC R:TACACAGCCATCGGTCCAGA
<i>Actin</i> -F/R	F:AGCAACTGGGATGATATGGA R:CAGGGCGATGTAGGAAAGC

过对 T₀、T₁ 和 T₂ 代转基因植株的 *OsPMM* 和标记基因 *Hpt*（潮霉素抗性基因, Hygromycin），进行连续的 PCR 检测来筛选无选择标记的转基因纯合系；目标基因在转基因纯合系种子中的表达通过实时定量 PCR 进行检测，实时 PCR 检测使用的是 Transgene 公司的定量 PCR 混合液（TransStart TipTop Green qPCR SuperMix），反应体系和反应程序按照相应的产品说明书进行，反应于 ABI 7900 实时 PCR 仪上扩增检测。以内源的 *Actin* 基因为参照基因，转基因受体材料 C418 为参照样本，对 *OsPMM* 在转基因植株种子部位的表达进行相对定量分析。2^{-ΔΔCT} 法^[19] 用于计算基因表达的相对变化，实验设置 3 次技术重复。转基因植株的分子检测所用的引物及引物序列如表 1 所示。

1.4 VC 含量的测定

在水稻收割晒干后，随机抽取 10 粒水稻种子，用研钵充分研磨后，进行水稻种子中总 VC 含量的测定，检测方法参照 Gillespie 等^[20] 的报道进行，3 次重复。

2 结果与分析

2.1 无选择标记转 *OsPMM* 基因纯合系的获得

为了提高水稻种子的 VC 含量，将 *OsPMM* 基因的全长 cDNA 和种子特异表达的启动子 Bx14 融合，以双右边界二元载体 pMNDRBBin6 为骨架，构建成了转基因质粒 pDRBOsPMM，其中标记基因

Hpt 位于载体的两个右边界 RB1 和 RB2 之间，而目标基因 *OsPMM* 位于 RB2 和 LB 之间，转基因质粒 T-DNA 区的线形图见图 1。

通过农杆菌介导的转化，将 *OsPMM* 基因转入 C418 中，T₀ 代共获得 26 个独立的转基因株系。在苗期提取 T₀ 代植株叶片的 DNA，用 *OsPMM* 基因特异检测引物 *OsPMM*-F/R 和标记基因 *Hpt* 基因特异检测引物 *Hpt*-F/R，对以上 26 个单株进行转基因阳性植株的 PCR 筛选。在转基因系中，*OsPMM*-F/R 能扩增出 814 bp 和 377 bp 两个条带，其中 814 bp 的条带是以基因组中的 *OsPMM* 基因组序列为模板扩增所得，而 377 bp 则是以转入的 cDNA 序列为模板扩增而来。在非转基因系中，没有额外整合的 *OsPMM* cDNA 序列，故只能扩出一条 814 bp 的带。在含潮霉素标记基因的转基因单株中，*Hpt*-F/R 能扩增出 1035 bp 的条带（图 2）。通过对 T₀ 代检测，共有 10 个单株既能够扩增出 *OsPMM* 基因特异的条带，又能够扩增出 *Hpt* 基因特异的条带（图 2）。此 10 个单株即为转基因阳性植株，用于后续研究。

在 T₀ 代植株生长成熟后，对以上 10 个转基因阳性植株单株套袋收种，并在下一个水稻种植季继续种植 T₁ 代种子，每个株系种植 30~50 个单株。待水稻生长至分蘖期，采集叶片，微量提取以上材料的叶片总 DNA。以提取的 DNA 为模板，对 T₁ 代单株分别进行 *OsPMM* 基因和 *Hpt* 基因的 PCR 检测，*OsPMM* 基因检测阳性而 *Hpt* 基因检测阴性的单株即为无选择标记转 *OsPMM* 基因植株。经过检测，T₀ 代 10 个株系中，2 号、3 号和 7 号株系分别能分离出 2 个、3 个和 3 个无标记转基因单株，依据来源将这些单株分别命名 2-1、2-2、3-1、3-2、3-3、7-1、7-2 和 7-3。

对以上 8 个 T₁ 代单株套袋收种，继续种植 T₂ 代种子，每个系种植 30 个单株，并在水稻生长到分蘖期后，提取叶片 DNA 再次对每个株系的单株进

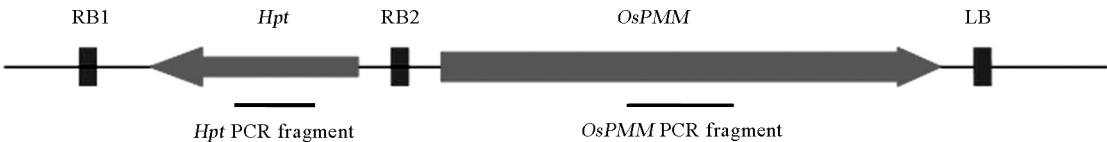
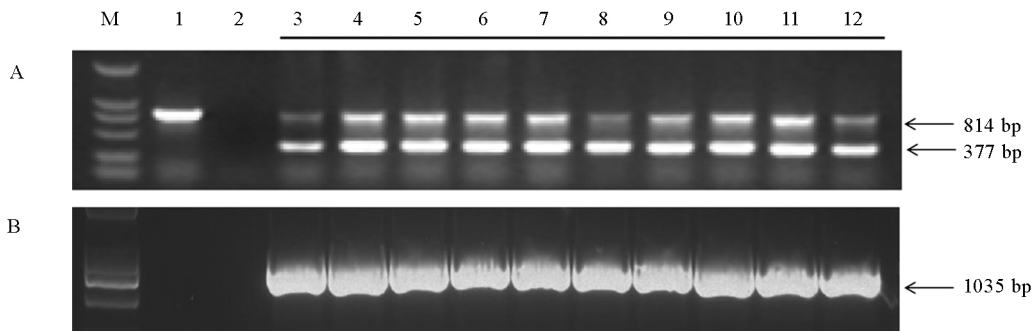
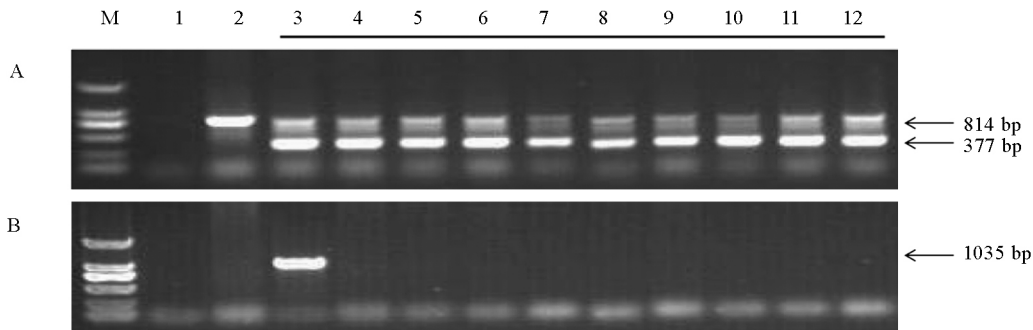


图 1 转基因质粒 pDRBOsPMM T-DNA 区的线形结构
Fig.1. Linear structure of transgenic plasmid pDRBOsPMM T-DNA zone.



M—DL2000 标记; 1—非转基因对照; 2—空白水对照; 3~12—转基因阳性植株。
M, DL2000 marker; 1, Non-transgenic control; 2, PCR control with water as template; 3-12, Transgenic-positive plants.

图 2 T₀代转基因阳性植株的 *OsPMM* 基因(A)和 *Hpt* 基因(B)的 PCR 鉴定
Fig. 2. PCR analysis of the *OsPMM* gene(A) and *Hpt* gene (B) in T₀transgenic-positive plants.



M—DL2000; 1—PCR 体系对照; 2—非转基因对照; 3—转基因阳性对照; 4~12—部分 T₂代转基因纯合单株。
M, DL2000; 1, PCR control with water as template; 2, Transgenic-negative control; 3, Transgenic-positive control; 4-12, Partial transgenic T₂ plants.

图 3 无标记转基因系 2-1 部分 T₂代单株的 *OsPMM* 基因(A)和 *Hpt* 基因(B)的 PCR 鉴定
Fig. 3. PCR analysis of the *OsPMM* gene (A) and *Hpt* gene (B) in partial T₂ progenies of marker-free transgenic line 2-1.

行 *OsPMM* 基因和 *Hpt* 基因的 PCR 鉴定,从中筛选无选择标记的转基因纯合系。经过鉴定,上述 8 个株系中,有 3 个株系的 T₂代单株均显示为 *OsPMM* 基因阳性且 *Hpt* 基因阴性,为无选择标记的 *OsPMM* 转基因纯合系。以上 3 个株系分别来自于 T₁编号为 2-1、3-1 和 7-1 的单株。图 3 为 2-1 部分 T₂代单株的检测结果。

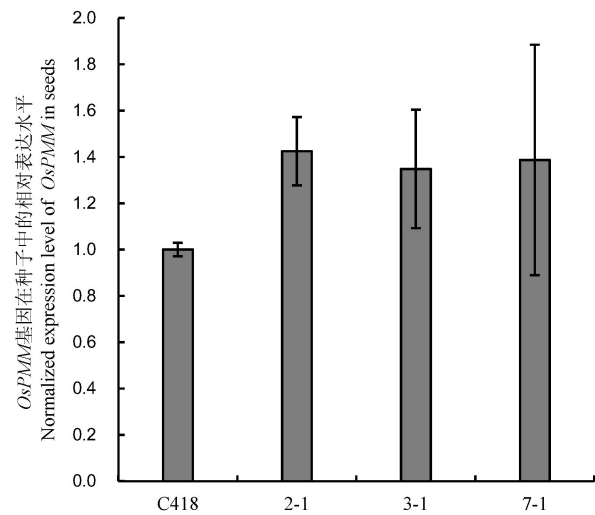
2.2 *OsPMM* 基因在转基因纯合系种子部位的表达水平明显提高

待种子成熟时,单株套袋收获以上 T₂代转基因纯合系的种子。待种子晒干后,随机抽取部分种子,提取种子部位的 RNA,以 *Actin* 基因为内参,以转基因受体 C418 品种为对照,对 *OsPMM* 基因在 3 个无标记转基因系 2-1、3-1 和 7-1 中的表达进行相对定量分析,发现 *OsPMM* 在转基因系中的表达水平有明显的提高(图 4)。

2.3 转基因纯合系种子中的 VC 含量显著提高

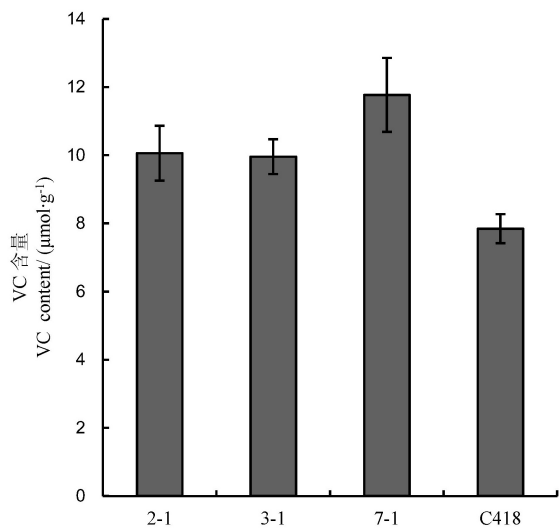
OsPMM 基因在转基因纯合系种子中的 VC 转录水平显著提高,为了检验转基因系种子部位的 VC 含量是否提高,我们将对照系和 3 个转基因系的种子部位的总 VC 含量进行了测定。对检测结果进行统计分析发现,对照 C418 的 VC 含量约 8 μmol/g,而转基因系的 VC 含量为 10~12 μmol/g,与对照 C418 相比,3 个转基因纯合系种子中的 VC 含量提高了 25%~50%(图 5)。

通过对 *OsPMM* 在转基因系种子中 RNA 水平的相对表达分析,以及种子部位的 VC 含量测定,发现调节 *OsPMM* 基因的转录水平可以影响水稻种子中的 VC 含量。本研究结果表明,在水稻中,通过提高 *OsPMM* 基因的表达水平来增加水稻种子的 VC 含量是行之有效的。



2-1, 3-1 和 7-1 为转基因纯合系；C418 为转基因阴性对照。
2-1, 3-1 and 7-1, Transgenic homozygous lines; C418, Transgenic-negative control.

图 4 *OsPMM* 基因在转基因纯合系种子中的相对表达水平
Fig. 4. Relative expression level of *OsPMM* gene in seeds of transgenic homozygous lines.



2-1, 3-1 和 7-1 为转基因系；C418-转基因阴性对照。
2-1, 3-1 and 7-1, Transgenic lines; C418, Transgenic-negative control.

图 5 转基因纯合系种子中的 VC 含量分析
Fig. 5. VC content in seeds of transgenic homozygous rice lines.

3 讨论

水稻作为重要的粮食作物,是我国南方地区食用的主食。VC 是植物体内重要的抗氧化剂^[21],也是人体每天需求量最多的维生素。人类不能合成

VC,需要从每天的膳食中来摄取 VC,因而提高水稻的 VC 含量,对补充人体的 VC 有很大帮助。对植物 PMM 基因的转基因操作发现,通过调节植物中 PMM 基因的表达,可以改变受体的 VC 含量。在烟草和拟南芥中过表达 PMM 都能提高受体的 VC 含量^[14];在烟草中过表达来自樱桃的 PMM 基因,也能提高受体 VC 的含量^[22]。对于水稻而言,水稻种子是食用的部分,对水稻的改良重点应是提高水稻种子的 VC 含量。为了特异地提高水稻种子的 VC 含量,我们采取了构建融合基因的策略,使用种子特异表达的启动子 Bx14 驱动 *OsPMM* 基因的表达。改造好的基因构建到表达载体上,通过转基因的途径转入到水稻品种中。结果和我们预期一致, *OsPMM* 基因在转基因水稻种子中的表达量相对于对照明显提高,相应地,水稻种子中的 VC 含量也有一定程度的提高。

在本研究中,我们之所以通过转基因的途径将 *OsPMM* 基因转入到 C418 水稻品种中,一是要使 *OsPMM* 基因在种子中特异高表达,使用种子特异表达的启动子驱动 *OsPMM* 基因的表达是最有效途径,这需要对 *OsPMM* 基因进行基因工程改造,然后通过转基因技术转入到受体水稻中;二是转基因技术是进行作物改良的一个有效途径,相比较于传统的回交转育育种技术,转基因技术的一个明显优势是特异地将含有目标基因的 T-DNA 区转入到受体中,减少了“连锁累赘”对目标性状的影响,能够在短时间内(一到两年)获得除目标性状外,其他性状和受体保持一致的改良系^[23]。三是对转基因和回交转育技术选育的玉米、小麦和水稻等作物的研究发现,在转录组学水平上,通过这两种技术选育的植物具有实质等同性,转基因技术并不会比传统的回交育种技术带来更多的基因表达变化^[24-26]。本研究通过对 T₀、T₁ 和 T₂ 代转基因水稻进行连续的分子鉴定,在 T₂ 代便筛选得到了主要农艺性状和对照一致且种子 VC 含量提高的转基因纯合系。由于在构建转基因表达载体上采用了双右边界双元载体作为骨架,所筛选到的转基因纯合系无选择标记基因。另外,目标基因 *OsPMM* 来源于水稻,其所用种子特异表达启动子来自于禾本科植物小麦。因此,本研所得到的高 VC 含量的转基因水稻在育种实践中具有重要的应用价值。

参考文献:

[1] Wheeler G L, Jones M A, Smirnov N. The biosynthetic path-

- way of vitamin C in higher plants. *Nature*, 1998, 393(6683): 365-369.
- [2] Smirnoff N, Wheeler G L. Ascorbic acid in plants: Biosynthesis and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2000, 35(4): 291-314.
- [3] Smirnoff N, Conklin P L, Loewus F A. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: A renaissance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52: 437-467.
- [4] Wolucka B A, van Montagu M. GDP-mannose 3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. *J Biol Chem*, 2003, 278(48): 47483-47490.
- [5] Lorence A, Chevone B I, Mendes P, et al. Myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiol*, 2004, 134(3): 1200-1205.
- [6] Agius F, Gonzalez-Lamothe R, Caballero J L, et al. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(2): 177-181.
- [7] Keller R, Renz F S, Kossmann J. Antisense inhibition of the GDP-mannose pyrophosphorylase reduces the ascorbate content in transgenic plants leading to developmental changes during senescence. *Plant J*, 1999, 19(2): 131-141.
- [8] Gatzek S, Wheeler G L, Smirnoff N. Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis. *Plant J*, 2002, 30(5): 541-553.
- [9] Tabata K, Oba K, Suzuki K, et al. Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Plant J*, 2001, 27(2): 139-148.
- [10] Tokunaga T, Miyahara K, Tabata K, et al. Generation and properties of ascorbic acid-overproducing transgenic tobacco cells expressing sense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Planta*, 2005, 220(6): 854-863.
- [11] Jain A K, Nessler C L. Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants. *Mol Breed*, 2000, 6(1): 73-78.
- [12] 李坤岚. 转小鼠古洛糖酸内酯氧化酶基因拟南芥的评估. 上海: 复旦大学, 2010.
- Li K L. Evaluation of mouse gulonolactone oxidase gene transformed *Arabidopsis thaliana*. Shanghai: Fudan University, 2010.
- [13] Chen Z, Young T E, Ling J, et al. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(6): 3525-3530.
- [14] Qian W, Yu C, Qin H, et al. Molecular and functional analysis of phosphomannomutase (PMM) from higher plants and genetic evidence for the involvement of PMM in ascorbic acid biosynthesis in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant J*, 2007, 49(3): 399-413.
- [15] Badejo A A, Eltelib H A, Fukunaga K, et al. Increase in ascorbate content of transgenic tobacco plants overexpressing the acerola (*Malpighia glabra*) phosphomannomutase gene. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(2): 423-428.
- [16] Lu H J, Zhou X R, Gong Z, X, et al. Generation of selectable marker-free transgenic rice using double right-border (DRB) binary vectors. *Aust J Plant Physiol*, 2001, 28(3): 241-248.
- [17] 杨振玉, 张宗旭, 魏耀林, 等. 梗型特异亲和恢复系 C418 的选育及其特性. 杂交水稻, 1998, 13(3): 31-32.
- Yang Z Y, Zhang Z X, Wei Y L, et al. Breeding and characteristics of japonica type wide compatibility line C418. *Hybrid Rice*, 1998, 13(3): 31-32.
- [18] Zhai W X, Li X B, Tian W, et al. Introduction of a rice blight resistance gene, *Xa21*, into five Chinese rice varieties through an *Agrobacterium*-mediated system. *China C:Life Sci*, 2000, 43(4): 361-368.
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] Gillespie K M, Ainsworth E A. Measurement of reduced, oxidized and total ascorbate content in plants. *Nat Protocols*, 2007, 2(4): 871-874.
- [21] Noctor G, Foyer C H. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49: 249-279.
- [22] Badejo A A, Eltelib H A, Fukunaga K, et al. Increase in ascorbate content of transgenic tobacco plants overexpressing the acerola (*Malpighia glabra*) phosphomannomutase gene. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(2): 423-428.
- [23] Gao L, Xia Z, Jiang G, et al. Generation of marker-free, bacterial blight-resistant transgenic sterile line and hybrid rice with *Xa21*. *Plant Breed*, 2011, 130(4): 438-443.
- [24] Gao L, Cao Y, Xia Z, et al. Do transgenesis and marker-assisted backcross breeding produce substantially equivalent plants? A comparative study of transgenic and backcross rice carrying bacterial blight resistant gene *Xa21*. *BMC Genom*, 2013, 14: 738-750.
- [25] Baudo M M, Lyons R, Powers S, et al. Transgenesis has less impact on the transcriptome of wheat grain than conventional breeding. *Plant Biotechnol J*, 2006, 4(4): 369-380.
- [26] Coll A, Nadal A, Collado R, et al. Gene expression profiles of MON810 and comparable non-GM maize varieties cultured in the field are more similar than are those of conventional lines. *Transgenic Res*, 2009, 18(5): 801-808.