DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.03037

研究简报

玉米光敏色素 *A1* 基因(*ZmPHYA1*)在棉花中的转化及分子鉴定

马燕斌^{1,**} 王霞^{2,**} 李换丽¹ 王平³ 张建诚¹ 文晋¹ 王新胜¹
宋梅芳³ 吴霞^{1,*} 杨建平^{4,*}

¹ 山西农业大学(山西省农业科学院)棉花研究所, 山西运城 044000; ² 运城学院生命科学系, 山西运城 044000; ³ 北京市辐射中心, 北京 100875; ⁴ 河南农业大学农学院, 河南郑州 450002

摘要: 为评价玉米 *ZmPHYA1* 基因在棉花种质资源改良中的价值, 本研究利用农杆菌介导法在陆地棉(*Gossypium hirsutum*) R15 材料中进行了玉米 *ZmPHYA1* 基因的遗传转化。经过愈伤组织诱导、抗性愈伤筛选、体细胞分化诱导后获得棉花转基因再生植株。通过田间草铵膦除草剂筛选鉴定抗性植株, 并利用 PCR 扩增其草铵膦抗性基因和目的基因 *ZmPHYA1* 进行分子鉴定, 发现阳性植株对草铵膦除草剂具较好抗性, 并可扩增到 256 bp 的草铵膦抗性基因和 217 bp *ZmPHYA1* 基因的特异条带。进一步通过免疫印迹检测表明, 3 个不同转基因株系中外源 *ZmPHYA1* 基因可正常表达约 170 kD 大小的蛋白, 且在不同组织中该外源蛋白均可正常表达。此外, 对转基因植株的不同农艺性状分析表明, 转基因株系株高明显低于受体对照, 而铃重和纤维长度等性状无明显差异。本研究成功获得具有草铵膦抗性和外源 *ZmPHYA1* 基因的棉花新种质材料, 为进一步利用光敏色素基因创新种质资源提供了材料来源。

关键词: 陆地棉; 玉米光敏色素 A1; 蛋白表达; 草铵膦抗性

Transformation and molecular identification of maize phytochrome *A1* gene (*ZmPHYA1*) in cotton

MA Yan-Bin^{1,**}, WANG Xia^{2,**}, LI Huan-Li¹, WANG Pin³, ZHANG Jian-Cheng¹, WEN Jin¹, WANG Xin-Sheng¹, SONG Mei-Fang³, WU Xia^{1,*}, and YANG Jian-Ping^{4,*}

¹ Institute of Cotton Research, Shanxi Agricultural University (Shanxi Academy of Agricultural Sciences), Yuncheng 044000, Shanxi, China; ² Department of Life Science, Yuncheng University, Yuncheng 044000, Shanxi, China; ³ Beijing Radiation Center, Beijing 100875, China; ⁴ College of Agronomy, Henan Agriculture University, Zhengzhou 450002, Henan, China

Abstract: In order to evaluate the potential value of maize phytochrome *A1* gene (*ZmPHYA1*) in the improvement of cotton germplasm resources, we transferred it into upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) R15 via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation with glufosinate-resistance gene as selection marker. The regenerated cotton plants were obtained through callus induction, antibiotic resistance screening and differentiation induction. After screening the regenerated plants by the herbicide glufosinate ammonium in the field, PCR detection confirmed that both the target bands, including 256 bp of the glufosinate gene and 217 bp band of *ZmPHYA1* gene, were detected in the homozygous transgenic plants. In addition, the exogenous *ZmPHYA1* protein of about 170 kD was also checked by immuno-blot in three transgenic cotton lines. The results showed that the specific proteins could be detected in different tissues, including leaves, flowers and stems in the transgenic Line 9. The plant height of transgenic Line 9, Line 14, Line 41 were significantly shorter than that of the wild type, while the differences of other

本研究由山西省重点研发计划子课题(201703D211007-3), 国家自然科学基金项目(31201253, 31871709), 国家转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08010-003), 山西省农业科学院应用基础研究计划(YGJPY2007)和运城学院博士科研启动项目(YQ-2017008)资助。

This study was supported by the Shanxi Province Key Research and Development Program (201703D211007-3), the National Natural Science Foundation of China (31201253, 31871709), the National Major Project for Developing New GM Crops (2016ZX08010-003), the Basic Research Program of Agricultural Sciences of Shanxi Academy (YGJPY2007), and the Doctoral Research Project of Yuncheng College (YQ-2017008).

* 通信作者(Corresponding authors): 杨建平, E-mail: jpyang@henau.edu.cn; 吴霞, E-mail: wuxiab8270@126.com

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 马燕斌, E-mail: myb0517@163.com

Received (收稿日期): 2020-06-15; Accepted (接受日期): 2020-11-13; Published online (网络出版日期): 2020-12-28.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20201228.0846.002.html>

yield-related agronomic traits were not observed between the transgenic lines and the wild type. In this study, new cotton germ-plasms with glufosinate resistance and *ZmPHYA1* gene were successfully obtained, which provided a material source for further utilization of phytochrome gene to innovate germplasm resources.

Keywords: *Gossypium hirsutum*; maize phytochrome *A1*; protein expression; glufosinate resistance

光敏色素是一类与植物发育密切相关的光信号受体蛋白,它能够通过介导光信号调控植物种子萌发、向光性、避荫性、茎秆伸长、叶绿体运动以及开花期等生长发育过程^[1-2]。光敏色素家族成员在单子叶和双子叶植物中均有报道。在拟南芥中光敏色素基因家族有 *PHYA*、*PHYB*、*PHYC*、*PHYD* 和 *PHYE* 共 5 个成员组成^[2]。而在禾本科植物中,光敏色素基因只存在 *PHYA*、*PHYB* 和 *PHYC* 3 个亚家族。其中,二倍体水稻中含有 *OsPHYA*、*OsPHYB* 和 *OsPHYC* 3 个单拷贝基因^[3-4],对 *OsPHYA*、*OsPHYB* 和 *OsPHYC* 基因的单缺失突变体和双缺失突变体研究证实,该基因与胚芽鞘伸长、根的向地性反应、幼苗去黄化以及开花时间等的调控相关^[5-6]。异源六倍体小麦中光敏色素基因家族中 *TaPHYA*、*TaPHYB* 和 *TaPHYC* 分别有 3 个拷贝^[7-8]。玉米由于远古种基因组经过了四倍体化的过程,造成基因组中 *ZmPHYA*、*ZmPHYB* 和 *ZmPHYC* 分别保留有 2 个拷贝^[9-10],其中,玉米中 *ZmPHYA1* 和 *ZmPHYA2* 在不同光条件下均可以正常表达,但 RNA 表达丰度存在一定差异^[11]。

光敏色素基因 *PHYA* 在调节作物农艺性状发育等方面具有一定作用。研究发现,在双子叶植物烟草和番茄中过表达单子叶植物燕麦的 *PHYA* 基因,均导致株高显著降低^[12-13],其中,在转基因烟草中茎和叶柄的微管组织中能检测到高浓度的燕麦 *PHYA*,表明微管组织是 *PHYA* 作用的一个可能位点^[13]。转拟南芥的 *PHYA* 或 *PHYB* 到水稻或马铃薯中可以分别促进水稻籽粒或马铃薯产量发生变化^[15-18]。除此以外,光敏色素 *PHYA* 和 *PHYB* 可通过 ABA 与茉莉酸的协同互作对耐盐性进行负向调控^[14]。由此可见,光敏色素与作物农艺经济性状等发育过程具有较为密切的关联性,在作物中过表达光敏色素基因对探讨作物改良具有一定的重要意义。

为探讨光敏色素基因在棉花种质资源创制中的利用价值,我们通过农杆菌介导法转化玉米 *ZmPHYA1* 基因到棉花中。我们的研究结果显示,外源蛋白在棉花中成功表达,该基因能有效降低棉花株高,表明利用光敏色素基因改良棉花具有一定的价值。

1 材料与方法

1.1 目的基因载体构建及棉花转化

利用克隆的玉米 *ZmPHYA1* 基因,与克隆载体 pMD18-T 载体链接,测序编码序列长度为 3393 bp^[11],双酶切后与 pJIM19-Bar 表达载体连接,融合 9×Myc 标签蛋白,该基因由 35S 启动子驱动,转化感受态细胞,卡纳霉素筛选获得阳性克隆后,提取质粒并酶切,经 PCR 检测目标基因。将构建好的 pJIM19-Bar-*ZmPHYA1*-Myc 二元表达载体转入 *GV3101* 农杆菌中备用。将该农杆菌菌株在含有利福平和卡纳的抗生素的 LB 液体培养基中 28℃ 摇床悬浮过夜培养至 OD₆₀₀ 值为 0.5,离心收集农杆菌后,倒去上清液,沉淀用 30 g L⁻¹ 的葡萄糖重新悬浮,将 OD₆₀₀ 值调整到 0.2 后进行侵染。

将 R15 棉花幼苗的下胚轴切成小段,用含有目标基因的农杆菌侵染茎段 15 min,共培养后诱导愈伤组织。诱导后的愈伤组织在含有草铵膦的培养基上筛选形成愈伤组织,愈伤形成后进行分化诱导获得棉花再生植株^[19]。

1.2 田间抗性检测

再生获得的棉花植株统一编号,嫁接成活后收获 T₀ 代种子,将 T₀ 代种子种植移栽,加代自交保纯获得 T₁ 代种子。后续世代苗期在三至四叶期连续 2 次叶面喷施 0.05% 的草铵膦除草剂,7 d 后筛选抗性转基因植株,自交后获得抗性植株种子。抗性植株与野生型植株种植在隔离网室,按照田间种植要求统一管理,连续自交至纯合,收获后用于后续试验。

1.3 转基因棉花 DNA 分子检测

采用改良 CTAB 法提取棉花材料 DNA^[20]。16 μL PCR 扩增反应体系:8 μL 的 2×GC buffer、0.5 μL dNTP Mix、0.5 μL 引物、0.1 μL ExTaq 酶、0.5 μL 模板 DNA 和 ddH₂O 补足 12 μL。反应程序为:95℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 40 s,61℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 45 s,循环 25 次;最后 72℃ 延伸 10 min,12℃ 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,凝胶成像系统照相保存。引物见表 1。

表 1 转基因棉花植株中用于目标基因的检测引物
Table 1 PCR primers of objective genes in transgenic cotton

引物 Primers	序列 Primer sequences (5'–3')	片段长度 Expected size (bp)
Basta-F	ACCATCGTCAACCACTACATC	256
Basta-R	GCTGCCAGAAA CCCACGTCAT	
<i>ZmPHYA1</i> -1641F	CAGCAGAAGGATGCACCCTAGGCTG	217
<i>ZmPHYA1</i> -1857R	CGCTTGCAGTTCGCGAGCCCATCA	

1.4 免疫印迹分析

取 PCR 检测为阳性的棉花植株的幼嫩叶片, 液氮研磨约 0.1 g 叶片, 加蛋白提取缓冲液: 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl、150 mmol L⁻¹ NaCl、1 mmol L⁻¹ EDTA、10%甘油、2 mmol L⁻¹ NaVO₄、0.05% Tween-20、25 mmol L⁻¹ 甘油磷酸和去离子水配制, 提取后转入 1.5 mL 灭菌离心管中, 离心提取上清液后, 分光光度计检测蛋白浓度, 均一化稀释备用。蛋白电泳上样前加 5×Loading buffer, 样品煮沸 10 min 变性, 取等量样品进行 SDS-PAGE 电泳; 电泳完成后, 切去浓缩胶及不规则边缘, 膜与胶、滤纸放置好后转膜 1.5 h、取出膜后利用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h、期间轻摇; 完成后保持膜湿润放入含有 Myc 抗体的 2% 脱脂奶粉中杂交 2 h, TBST 清洗后加二抗杂交 1.5 h, 清洗后磷酸缓冲液浸泡 5 min, 重新加入含有 NBT 和 BCIP 的混合

液染色, 显影后清洗晾干备用。

2 结果与分析

2.1 转 *ZmPHYA1* 基因植株的获得及鉴定

将浸染后的茎段在含有草铵膦筛选的诱导培养基上进行诱导并形成愈伤, 持续诱导分化形成块状愈伤(图 1-A, B)。持续诱导形成胚性愈伤后, 部分发育可得到体细胞胚(图 1-C), 挑选胚状体转接诱导分化形成再生植株(图 1-D)。再生株持续生长一段时间后, 将其嫁接到预先种植的健壮棉花幼苗砧木上, 成活后移入花盆中种植(图 1-E)。提取具有草铵膦抗性的候选再生株系的 DNA, 扩增草铵膦抗性基因。PCR 电泳结果表明, 草铵膦抗性基因目标条带大小为 256 bp, 表明抗性植株中该草铵膦抗性基因成功整合到转基因植株中(图 1-F)。

图1 外源 *ZmPHYA1* 基因的棉花转化与再生植株的草铵膦抗性基因检测

Fig. 1 Transformation of exogenous *ZmPHYA1* gene and the PCR detection of glufosinate-resistance genes in cotton plants

A: 农杆菌侵染后的愈伤筛选及诱导; B: 愈伤诱导增殖; C: 胚性愈伤分化形成的体细胞胚胎; D: 再生的幼苗; E: 再生的嫁接植株; F: 部分再生株草铵膦抗性基因的检测, 其中 1、2、4 分别为株系 Line 9、Line 14 和 Line 41, 3 为非转基因的再生株, “-”为受体对照, “+”为质粒阳性扩增, M: DNA marker。

A: callus screening and induction of cotton hypocotyl after *Agrobacterium* infection; B: callus induction and proliferation; C: somatic embryos formed from embryonic callus; D: regeneration plants; E: survived regenerated graft plants; F: PCR detection of glufosinate-resistance gene in some regenerated plants. Among them, Lane 1, 2 and 4 denote Line 9, Line 14, and Line 41, respectively, 3 denotes the non-transgenic regenerated plant, “-” denotes WT control, and “+” denotes plasmid positive amplification. M: DNA marker.

为了进一步确定转基因株系中的 *ZmPHYA1* 目的基因(图 2), 生育中期, 先利用草铵膦除草剂分别涂抹植株的幼嫩叶片进行抗性检测, 结果显示: 抗性植株的叶片颜色正常, 表现为明显的抗性(图 2-A~B), 而非抗性植株叶片, 则表现为明显的干枯斑块(图 2-C)。

对具有草铵膦抗性的再生植株进行 *ZmPHYA1* 基因的检测。研究结果表明, 共有 17 个转基因株系中可检测到 217 bp 长度的 *ZmPHYA1* 基因目标条带, 其中 Line 9、

Line 14 和 Line 41 共 3 个株系的片段大小如图 2-D 所示, 表明该 *ZmPHYA1* 基因成功整合到转基因植株中。

2.2 转基因植株外源基因 *ZmPHYA1* 的蛋白表达检测

为了检测株系中外源 *ZmPHYA1* 蛋白的表达, 我们分别提取受体 R15 和转基因株系中 Line 9、Line 14、Line 41 株系幼嫩叶片总蛋白进行分析, 利用 *ZmPHYA1* 融合标签蛋白 Myc 的特异抗体进行免疫印迹杂交, 结果表明, 在转基因株系 Line 9、Line 14 和 Line 41 中能够检测到约

图 2 转外源基因 *ZmPHYA1* 棉花草铵膦抗性株系的鉴定与 PCR 分子检测

Fig. 2 Glufosinate resistant identification and PCR detection of exogenous *ZmPHYA1* gene in cotton

A, B: 抗除草剂检测的不同阳性植株后代; C: 分离的非抗性植株后代; D: 部分抗性植株的 *ZmPHYA1* 基因的 PCR 检测, 其中“+”为质粒阳性扩增, 1 和 2 为 Line 9 株系的不同后代单株, 3 和 4 为 Line 14 株系的不同后代单株, 5 和 6 为 Line 41 株系的不同后代单株。“-”为受体对照; M: DNA marker。

A, B: different positive plant offspring detected for herbicide resistance; C: isolated offspring of non-resistant plants; D: PCR detection of *ZmPHYA1* in some resistant plants. Among them, “+” denotes plasmid positive amplification, 1 and 2 denote single progeny plant of Line 9, 3 and 4 denote single progeny plant of Line 14, 5 and 6 denote single progeny plant of Line 41. “-” denotes WT; M: DNA marker.

170 kD 左右的条带, 而对照 R15 和分离出的非抗植株中无目的条带(图 3-A)。该结果表明, *ZmPHYA1* 基因在 Line 9、Line 14 和 Line 41 株系中能够正常表达。我们同时在不同组织中检测了以上株系中 *ZmPHYA1* 的表达。免疫印迹结果表明, 转基因 Line 9 株系的叶、花和茎中, *ZmPHYA1* 均能正常表达(图 3-B)。

2.3 转基因植株不同农艺性状的分析

为了分析 *ZmPHYA1* 对棉花农艺性状的影响, 我们考察了转基因植株的株高、单铃籽棉重、衣分和纤维长度(图 4)。统计分析表明, 对照的株高测定平均值为 112 cm, 转基因株系 Line 9、Line 14 和 Line 41 的株高平均值依次为 105、103 和 104 cm, 明显低于对照植株。

而对照株、Line 9、Line 14 和 Line 41 的单铃籽棉重平均值依次为 5.6、5.4、5.1 和 5.1 g; 衣分平均值依次为 31.1%、31.5%、34.4%和 33.9%; 纤维长度依次为 2.93、2.96、2.92 和 2.99 cm, 分析可知, 单铃籽棉重、衣分、纤维长度性状差异不显著。综合以上结果分析表明: 过表达 *ZmPHYA1* 基因可导致转基因株系株高明显降低, 但对单铃籽棉、衣分和纤维长影响不明显。

3 讨论

虽然棉花是全世界重要的经济作物之一, 但是近年来, 由于用工投入多和经济效益低等原因, 棉花种植面积不断减少。持续培育棉花优良品种和提升栽培技术是保证

图 3 不同棉花转基因株系中外源 *ZmPHYA1* 蛋白表达的免疫印迹检测

Fig. 3 Immuno-blot detection of exogenous *ZmPHYA1* protein expression in transgenic cotton lines

M: 蛋白 marker; WT: 转基因棉花受体 R15; Isolated non-transgenic line: 转基因株系分离的非抗性株; #9、#14、#41 分别为转外源 *ZmphyA1* 基因的不同株系 Line 9、Line 14 和 Line 41。“+”为检测中利用转玉米中同源基因 *ZmPHYA2* (3393 bp) 的阳性棉花植株。

M: protein markers; WT: transgenic cotton receptor R15; non-transgenic line: non-resistant plants isolated from transgenic lines. Lane #9, #14, #41 represent Line 9, Line 14 and Line 41 of transformed exogenous *ZmPHYA1* gene plants. “+” is positive cotton plant using the homologous gene *ZmPHYA2* (3393 bp) in the transformed maize.

我国棉花的自给水平和稳定棉花种植面积的有效措施。草铵膦抗性基因和 *Epsps* (*aroA*) 等基因在转基因植株中分别表现出对草铵膦和草甘膦除草剂极好的抗性^[21-25]。创制抗草铵膦的棉花种质资源可以提高杂草防治效率, 从而达到生产简化、降低人力投入和提高杂草防治效率等目的^[21]。

在本研究中, 我们成功获得了具有草铵膦抗性的转基因棉花。通过分析其过程观测发现, 草铵膦筛选的愈伤诱导生长速度比使用卡那霉素筛选生长较慢, 相对试验周期较长, 但筛选诱导的阳性比率较优于卡那霉素筛选。另在幼苗期结合 PCR 检测和叶片抗性鉴定, 可较早的鉴定出阳性转化植株, 便于后续的管理。因此, 本试验在 T_0 种子收获后, 通过抗性鉴定, 后续种植可较快的鉴定出分离的抗性后代并自交直至纯合。因此, 通过对田间抗性鉴定和草铵膦抗性基因 PCR 检测二者相结合的方式, 可快速的纯合阳性植株, 同时, 该选择过程也可对转基因材料的抗草铵膦特性保持稳定。

多年来, 对棉花抗除草剂、抗逆、抗病、高产等性状相关的优良基因的不断发掘, 以及不同棉花基因组的测序完成, 极大的丰富了棉花分子遗传育种的理论依据^[8,25-26], 为持续改良棉花种质资源的有利农艺性状提供研究基础。

图 4 转基因植株不同农艺性状的分析比较

Fig. 4 Comparison of different agronomic traits in transgenic plants

A: 转基因株系的株高表型, 标尺为 10 cm; B 依次为 WT、#9 (Line 9)、#14 (Line 14)、#41 (Line 41) 株系纤维长度图, 标尺为 1 cm; C、D、E 和 F 分别为 WT、#9 (Line 9)、#14 (Line 14)、#41 (Line 41) 的株系平均株高、平均单铃籽棉重、衣分以及纤维长度。*表示 $P < 0.05$ 差异显著。

A: plant height phenotype of transgenic lines, Bar = 10 cm; B is the fiber length diagram of Line 9, Line 14 and Line 41, respectively, Bar = 1 cm. Histogram of C, D, E, and F represent the plant height, average weight of single boll seed cotton, lint percentage and fiber length of control (WT), Line 9, Line 14, and Line 41 lines, respectively. * indicates significant differences at $P < 0.05$.

光敏色素是与色素蛋白相关的一类蛋白, 在植物中过量表达 *PHYA* 基因能够引起多效作用, 如矮化、色素增加和延迟叶片衰老等。在不同作物中过表达 *PHYA* 基因证实, 其能够影响植物株高、籽粒产量等性状^[13,15-17]。本研究通过 DNA 水平和蛋白水平检测, 表明 *ZmPHYA1* 基因稳定插入棉花中, 可正常翻译成预期蛋白。选取其中 1 个材料进行不同组织的蛋白表达分析, 该蛋白可以在转基因植株的不同组织部位进行表达, 预示其可能在转基因株系中的不同组织均发挥一定的作用。另外, 预测蛋白大小约为 140 kD, 但从图 3 中可以看到实际蛋白条带约 170 kD,

大于预期预测, 分析可能是蛋白翻译后修饰等原因导致分子量变大, 所以杂交条带大于预期蛋白。而本研究中转基因植株株高测定表明, 过表达 *ZmPHYA1* 能够引起棉花株高的降低, *ZmPHYA1* 引起该表型相关的分子机制需要做进一步研究。

References

- [1] Schepens I, Duek P, Fankhauser C. Phytochrome-mediated light signalling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7: 564-569.
- [2] Wang H Y, Deng X W. Dissecting the phytochrome A-dependent

- signaling network in higher plants. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 172–178.
- [3] Basu D, Dehesh K, Schneider-Poetsch H J, Harrington S E, McCouch S R, Quail P H. Rice *PHYC* gene: structure, expression, map position and evolution. *Plant Mol Biol*, 2000, 44: 27–42.
 - [4] Dehesh K, Tepperman J, Christensen A H, Quail P H. phyB is evolutionarily conserved and constitutively expressed in rice seedling shoots. *Mol Gen Genet*, 1991, 225: 305–313.
 - [5] Takano M, Inagaki N, Xie X Z, Yuzurihara N, Hihara F, Ishizuka T, Yano M, Nishimura M, Miyao A, Hirochika H, Shinomura T. Distinct and cooperative functions of phytochromes A, B, and C in the control of deetiolation and flowering in rice. *Plant Cell*, 2005, 17: 3311–3325.
 - [6] Takano M, Kanegae H, Shinomura T, Miyao A, Hirochika H, Furuya M. Isolation and characterization of rice phytochrome a mutants. *Plant Cell*, 2001, 13: 521–534.
 - [7] Ogiwara Y, Shimizu H, Hasegawa K, Tsujimoto H, Sasakuma T. Chromosome assignment of four photosynthesis-related genes and their variability in wheat species. *Theor Appl Genet*, 1994, 88: 383–394.
 - [8] 王霞, 马燕斌, 宋梅芳, 孟凡华, 李秀全, 杨丽, 吴霞, 杨克诚, 杨建平. 小麦 *TaPHYA* 基因亚家族的克隆及表达分析. 作物学报, 2012, 38: 1354–1360.
Wang X, Ma Y B, Song M F, Meng F H, Li X Q, Yang L, Wu X, Yang K C, Yang J P. Isolation and expression patterns of *TaPHYA* gene subfamily in common wheat. *Acta Agron Sin*, 2012, 38: 1354–1360 (in Chinese with English abstract).
 - [9] Sheehan M J, Farmer P R, Brutnell T P. Structure and expression of maize phytochrome family homeologs. *Genetics*, 2004, 167: 1395–1405.
 - [10] Gaut B S, Doebley J F. DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 6809–6814.
 - [11] 马燕斌, 李壮, 蔡应繁, 周朋, 肖阳, 黄玉碧, 付凤玲, 潘光堂, 杨克诚, 杨建平. 玉米 2 个光敏色素 A 基因的克隆、蛋白结构与光诱导表达模式. 中国农业科学, 2010, 43: 1985–1993.
Ma Y B, Li Z, Cai Y F, Zhou P, Xiao Y, Huang Y B, Fu F L, Pan G T, Yang K C, Yang J P. Isolation and primary analysis of protein structures and expression patterns responding to different light treatments of two phytochrome A genes in maize (*Zea mays* L.). *Sci Agric Sin*, 2010, 43: 1985–1993 (in Chinese with English abstract).
 - [12] Boylan M T, Quail P H. Oat phytochrome is biologically active in transgenic tomatoes. *Plant Cell*, 1989, 8: 765–773.
 - [13] Jordan E T, Hatfield P M, Hondred D, Talon M, Zeevaert J A, Vierstra R D. Phytochrome A overexpression in transgenic tobacco: correlation of dwarf phenotype with high concentrations of phytochrome in vascular tissue and attenuated gibberellin levels. *Plant Physiol*, 1995, 107: 797–805.
 - [14] Yang T, Lv R, Li J H, Lin H H, Xi D. Phytochrome A and B negatively regulate salt stress tolerance of *Nicotiana glauca* via ABA-jasmonic acid synergistic cross-talk. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59: 2381–2393.
 - [15] Thiele A, Herold M, Lenk I, Quail P H, Gatz C. Heterologous expression of *Arabidopsis* phytochrome B in transgenic potato influences photosynthetic performance and tuber development. *Plant Physiol*, 1999, 120: 73–82.
 - [16] Garg A K, Sawers R J H, Wang H, Kim J K, Walker J M, Brutnell T P, Parthasarathy M V, Vierstra R D, Wu R J. Light-regulated overexpression of an *Arabidopsis* phytochrome a gene in rice alters plant architecture and increases grain yield. *Planta*, 2006, 223: 627–636.
 - [17] Kong S G, Lee D S, Kwak S N, Kim J K, Sohn J K, Kim I S. Characterization of sunlight-grown transgenic rice plants expressing *Arabidopsis* phytochrome A. *Mol Breed*, 2004, 14: 35–46.
 - [18] Iwamoto M, Kiyota S, Hanada A, Yamaguchi S, Takano M. The multiple contributions of phytochromes to the control of internode elongation in rice. *Plant Physiol*, 2011, 157: 1187–1195.
 - [19] 李燕娥, 朱祯, 陈志贤, 吴霞, 王伟, 李淑君, 朱玉, 焦改丽, 吴家和, 徐鸿林, 范小平, 孟晋红, 肖桂芳, 李向辉. 豇豆胰蛋白酶抑制剂转基因棉花的获得. 棉花学报, 1998, 10(5): 3–5.
Li Y E, Zhu Z, Chen Z X, Wu X, Wang W, Li S J, Zhu Y, Jiao G L, Wu J H, Xu H L, Fan X P, Meng J H, Xiao G F, Li X H. Obtaining transgenic cotton plants with cowpea trypsin inhibitor gene. *Cotton Sci*, 1998, 10(5): 3–5 (in Chinese with English abstract).
 - [20] Paterson A H, Brubaker C L, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Mol Biol Rep*, 1993, 11: 122–127.
 - [21] 王霞, 马燕斌, 吴霞, 沈志成, 林朝阳, 李朋波, 孙璇, 王新胜, 李燕娥, 李贵全. 转 *G10aroA* 棉花株系的获得及分子生物学鉴定. 中国农业科学, 2014, 47: 1051–1057.
Wang X, Ma Y B, Wu X, Shen Z C, Lin C Y, Li P B, Sun X, Wang X S, Li Y E, Li G Q. Molecular biology identification of transgenic cotton lines expressing exogenous *G10aroA* gene. *Sci Agric Sin*, 2014, 47: 1051–1057 (in Chinese with English abstract).
 - [22] Christ B, Hochstrasser R, Guyer L, Francisco R, Aubry S, Hörtensteiner S, Weng J K. Non-specific activities of the major herbicide-resistance gene *BAR*. *Nat Plants*, 2017, 3: 937–945.
 - [23] Siruguri V, Bharatraj D K, Vankudavath R N, Mendu V V R, Gupta V, Goodman R E. Evaluation of Bar, Barnase, and Barstar recombinant proteins expressed in genetically engineered *Brassica juncea* (Indian mustard) for potential risks of food allergy using bioinformatics and literature searches. *Food Chem Toxicol*, 2015, 83: 93–102.
 - [24] Carbonari C A, Latorre D O, Gomes G L G C, Velini E D, Owens D K, Pan Z Q, Dayan F E. Resistance to glufosinate is proportional to phosphinothricin acetyltransferase expression and activity in LibertyLink and WideStrike cotton. *Planta*, 2016, 243: 925–933.
 - [25] Hérouet C, Esdaile D G, Mallyon B A, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, Klis R J V D, Rouan D. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regul Toxicol Pharm*, 2005, 41: 134–149.
 - [26] Li F, Fan G, Lu C, Xiao G, Zou C, Kohel R J, Ma Z, Shang H, Ma X, Wu J, Liang X, Huang G, Percy R G, Liu K, Yang W, Chen W, Du X, Shi C, Yuan Y, Ye W, Liu X, Zhang X, Liu W, Wei H, Wei S, Huang G, Zhang X, Zhu S, Zhang H, Sun F, Wang X, Liang J, Wang J, He Q, Huang L, Wang J, Cui J, Song G, Wang K, Xu X, Yu J Z, Zhu Y, Yu S. Genome sequence of cultivated upland cotton (*Gossypium hirsutum* TM-1) provides insights into genome evolution. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 524–530.