

大豆 *GmAYI* 基因的克隆及初步功能预测

周淑莉,李冬梅,杨玉莹,张伟娜,李文滨,张彬彬

(东北农业大学 大豆生物学教育部重点实验室/农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:根据拟南芥 *At1G74730* 基因的保守序列设计引物,利用 RT-PCR 技术在大豆中克隆得到 *GmAYI* 基因。对 *GmAYI* 基因的结构域和启动子元件进行分析,结果表明:大豆 *GmAYI* 基因位于 4 号染色体上,含跨膜结构域,属于膜蛋白。该基因启动子区域含有激素相关应答元件和胚乳表达所必须的顺式作用元件。推测该基因可能参与调控大豆生长发育及外界环境胁迫应答等过程。进而对 14 个大豆品种中 *GmAYI* 基因的转录水平进行了定量分析,对 *GmAYI* 基因在 14 个大豆品种中的转录水平与单株粒数、单株粒重、百粒重、株高等产量相关性状进行相关性分析,结果表明:*GmAYI* 基因的表达量与百粒重呈显著负相关,推测 *GmAYI* 可能是参与大豆产量相关性状调控的基因。

关键词:大豆;*GmAYI* 基因;相关性;荧光定量 PCR

中图分类号:S565. 1 **文献标识码:**A **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2016. 06. 1037

Molecular Cloning and Preliminary Functional Prediction of *GmAYI* in Soybean

ZHOU Shu-li , LI Dong-mei , YANG Yu-ying, ZHANG Wei-na, LI Wen-bin, ZHANG Bin-bin

(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education/Key Laboratory of Soybean Biology and Breeding/Genetics of Chinese Agriculture Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The primers were designed according to the conserved sequence of *Arabidopsis At1G74730* gene. The *GmAYI* gene was cloned from soybean by RT-PCR. The *GmAYI* gene domain and the promoter element were analyzed. The results showed that the *GmAYI* gene of soybean was located on chromosome 4, which contained transmembrane domain and belonged to membrane protein. The promoter region of the gene contained a hormone-related response element and a cis-acting element necessary for endosperm expression. The results suggested that the gene may be involved in the regulation of soybean growth, development and environmental stress response process. The transcript levels of *GmAYI* gene in 14 soybean cultivars were quantitatively analyzed. Based on the correlation analysis of *GmAYI* gene transcripts in 14 soybean cultivars with seeds number per plant, seeds weight per plant, 100-seed weight and plant height, the expression of *GmAYI* gene was negatively correlated with 100-seed weight, suggested that the *GmAYI* gene may be involved in the regulation of soybean yield-related traits.

Keywords: Soybean; *GmAYI* gene; Correlation; Quantitative PCR

大豆是我国主要农作物之一,具有高经济性与营养性。大豆在饲料、食用等多方面都具有广泛的用途,在国际市场上的需求也日益增多^[1-4]。提高大豆产量一直是育种的重要目标之一,产量相关基因的标记、克隆以及鉴定为育种家选择高产量大豆品种提供了更为快速高效的途径^[5-6]。目前,关于与产量相关基因的研究报道较少。研究表明 *At1G74730* 在拟南芥中作为一个转录因子与产量呈负相关,菜豆中 *BnMicEmUp* 是拟南芥中 *At1G74730* 的同源基因,利用 PCR 和 RT-PCR 方法在大豆基因组序列设计引物,得到一种位于叶绿体中的转录因子 (cbZIP),在一些豆类品种叶片中该转录因子表达水平大多与种子产量呈负相关。而且,*BnMicEmUp*、*Glyma04g34330*、*Glyma06g20240* 都属于一个基因家族^[7],有报道大豆产量相关的 QTL 位点就在 *Glyma04g34330* 和 *Glyma06g20240* 区间^[8-9]。因此

初步推测 *GmAYI* 在植物中可能调控与产量相关基因的表达。

本研究以拟南芥中 *At1G74730* 基因的保守序列设计引物,利用 RT-PCR 技术在大豆中克隆得到 *GmAYI* 基因。对 *GmAYI* 基因的结构域和启动子元件进行分析,进而确定 *GmAYI* 基因在染色体上的位置及具有的表达元件,同时对黑河 43、黑河 45、克豆 28 等 14 个大豆品种 (品系) 的 *GmAYI* 基因转录水平进行了表达分析,并与产量相关性状进行相关性分析,初步预测 *GmAYI* 基因的功能。为今后通过过表达技术和基因敲除技术研究 *GmAYI* 基因的功能、验证其与产量的相关性等提供分子水平理论基础。

1 材料与方法

1. 1 大豆 *GmAYI* 基因的生物信息学分析

通过 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/por->

收稿日期:2016-07-09
基金项目:黑龙江省博士后基金 (LBH-Z12047); 抗逆转基因大豆新品种培育 (2016ZX08004-002); 黑龙江省教育厅一般项目 (10531012)。
第一作者简介:周淑莉 (1990-), 女, 硕士, 主要从事大豆基因克隆及功能验证等研究。E-mail:571729894@qq.com。
通讯作者:张彬彬 (1977-), 女, 博士, 副教授, 主要从事大豆基因克隆、功能验证、转基因安全评价等方面研究工作。E-mail:bbzhang77@126.com。

tal.html#!search?show=BLAST) 比对基因在染色体上的位置。利用 ExPasy 软件包 (<http://web.expasy.org/protparam/>), 分析编码氨基酸的个数, 理论等电点及分子量。根据 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析跨膜结构。利用 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 网站分析信号肽结构。利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对于启动子元件预测分析。同源比对、进化树分析应用 MEGA 5.0 软件。序列比对应用 DNAMAN 软件。

1.2 植物材料、试剂和主要仪器

供试的大豆品种垦丰 16、黑河 43、黑河 45、克豆 28、东农 48、东农 50、黑农 61、东农 52、绥农 28, 品系 wyb99、wyb88、wyb4、wyb93、wyb163 和 wyb90 均由东北农业大学大豆研究所提供; Trizol 购自 Invitrogen 公司; PCR 引物、荧光定量 PCR 引物由哈尔滨适合生物技术有限公司合成; DNase I、SYBRPrime Script™ RT-PCR Kit II、大肠杆菌菌株、XCM1 酶均购自 Takara 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒为 Axy GEN 产品; 荧光定量 PCR 仪为 MX3000P (Stratagene)。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 提取 使用 Trizol 试剂提取总 RNA。为了避免来自基因组 DNA 的污染, 所有的 RNA 样品在提取时都要进行 DNase I 消化。通过琼脂糖凝胶电泳和测量 OD 值检测 RNA 的完整性、纯度和浓度。

1.3.2 反转录合成 cDNA 按试剂盒说明书在超净台中配制 RT 反应液: 5 × Prime Script™ Buffer (for Real Time) 2 μL, Prime Script TMRT Enzyme Mix I 0.5 μL, Oligo dT Primer (50 μmol · L⁻¹) 0.5 μL, Random6 mers (100 μmol · L⁻¹) 0.5 μL, 总 RNA 500 ng, 加入 RNase Free ddH₂O 至 10 μL。70℃ 5 min 进行反转录反应, 95℃ 5 min 使反转录酶的失活。

1.3.3 引物设计与合成 根据拟南芥中的同源序列预测的大豆 *GmAYI* 基因 (*Glyma04g34330*) 全长序列两端设计引物 GmAYI-F: GCAACCTCGTCCCAACAAC 和 GmAYI-R: CACCACCGAACCACCCATT, 依据大豆 *GmAYI* 的基因片段设计用于荧光定量 PCR 目标基因引物为 GmAYI-S: 5'-CCATTGTGCTCATTC-CCG-3' 和 GmAYI-A: 5'-ACCACTTCGCAACCATCT-3'。参照基因 *actin* 的引物 actin-F: GTGTCAGC-CATACTGTCCCATTT 和 actin-R: GTTTCAGCTCT-TGCTCGTAATCA。引物均由哈尔滨适合生物技术有限公司合成, 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 检

验引物是否满足荧光定量 PCR 的要求。

1.3.4 实时荧光定量 PCR PCR 反应体系: SYBR Premix R Ex Taq TM II (2 ×) 10 μL, PCR Forward Primer (10 μmol · L⁻¹) 0.5 μL, PCR Reverse Primer (10 μmol · L⁻¹) 0.5 μL, ROX Reference Dye II (50 ×) 0.4 μL, 模板 (cDNA 溶液) 1 μL, 加入 ddH₂O 补足到 20 μL。Real Time PCR 反应条件: 95℃ 3 min; 95℃ 7 s, 57℃ 15 s, 72℃ 15 s, 40 个循环; 95℃ 1 min, 55℃ 30 s, 95℃ 30 s。 *GmAYI* 基因表达量以参照基因 (*actin*) 作为标准进行相对定量, 相对定量方法采用 2^{-ΔΔCT} 法^[10-11]。

1.3.5 扩增产物电泳鉴定 上述扩增结束后, 从 *GmAYI* 和 *actin* 扩增产物及未加模板的阴性对照中各取 5 μL 产物, 在 1% 琼脂糖上电泳, 观察扩增结果。

1.4 数据分析

采用 SPSS 20 进行数据处理及分析。

2 结果与分析

2.1 大豆 *GmAYI* 基因克隆

使用 Trizol 试剂提取大豆品种垦丰 16 叶片的总 RNA (图 1), 经琼脂糖凝胶电泳检测所示: 5S、18S 和 28S RNA 条带清晰正确, 适用于后续试验。反转录成 cDNA, 根据拟南芥中的同源序列预测的大豆 *GmAYI* 基因 (*glyma04g174400*) 全长序列两端设计引物 GmAYI-F 和 GmAYI-R, 使用引物 GmAYI-F, GmAYI-R 扩增 *GmAYI* 全长序列, 获得大小为 585 bp 的 DNA 片段 (图 2), 与预测的目的片段大小基本一致。将扩增所得的 DNA 片段分别与 pCXSNC 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5α, 经菌液 PCR 验证, 挑取阳性克隆送哈尔滨博士生物公司测序。应用 DNAMAN 软件比对测序序列与 *Glyma04g34330* 一致, 同源率为 100%。经测序表明该基因为大豆 *GmAYI* 基因。

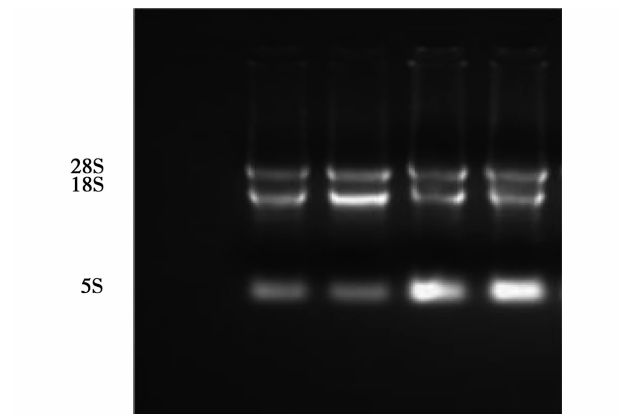


图 1 大豆垦丰 16 总 RNA 的提取

Fig. 1 Total RNA extraction from soybean Kenfeng 16

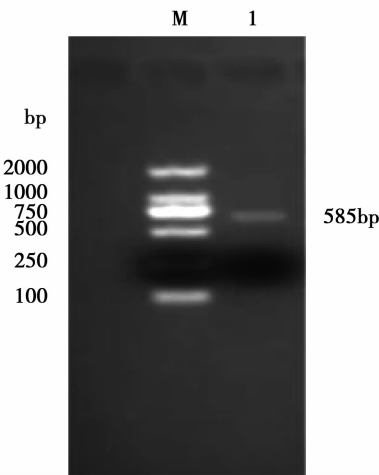


图2 *GmAYI* cDNA 合成
Fig. 2 cDNA synthesis of *GmAYI*

2.2 *GmAYI* 基因序列分析

利用 NCBI 的 ORF Finder 软件对获得 *GmAYI* 进行分析,分析结果表明 *GmAYI* 序列的开放阅读长度为 585 bp,编码 194 个氨基酸(图 3)。

2.3 *GmAYI* 基因的结构域分析

大豆 *GmAYI* 基因位于 4 号染色体上,具有 1 个外显子和 1 个内含子,CDS 序列全长 585 bp,编码 194 个氨基酸,理论 pI9.10,估计分子量 20 385.7 Da;有跨膜结构(图 4),属于膜蛋白。没有信号肽结构(图 5)。

为了了解 *GmAYI* 基因与其它物种的亲缘关系,将获得的氨基酸序列与拟南芥、水稻、玉米、马铃薯、高粱、蓖麻、菜豆、番茄、杨树、苹果、碧桃、葡萄进行系统树分析,结果发现大豆 *GmAYI* 基因与葡萄具有较高的相似性(图 6)。

```
1      ATGGCGGTCC CTGCTACATC CTCAGCCCTT GTCCTTCGAC CCATCCGCAC CAATCACTCC
61     TTCTCTTCCC CTTTCCGCTC TCTCCCTCT CCCGCCGCCA GAAAACCCCT AACCGTCTTC
121    GCCATGCCCC CCAAAAAGAA GGTGAACAAG TACAATGATA AGTGAAGAA GGAGTGGTTT
181    GGAGCGGGGA TATTCTACGA GGAAGCGAG GAGGTGGAGG TGGAC GTGTT CAAGAAGATA
241    GAGAAGAGGA AGGTTTTGAG CAACGTGGAG AAAGCTGGCT TGCTCTCCAA GGCAGAGGAC
301    TTGGGATTCA CGCTCTCTTC CATAGAGAAG CTCGGCGTCT TCTCAAAGC CGAGGAGCTC
361    GGCTTGCTCA GCTTGCTCGA CCGAGCCGCC AGCTTCTCCC CCTCCCTCCT CGCCTCCGCC
421    GCCCTCCCG CCTTCGTCGC TGCCATTGCC GCCATTGTGC TCATTCCCGA CGACTCTGCC
481    ACCCTCGTCG CCGTCCAGGC TGTGTTGCT GCCGCGCTCG GCGTCGAGC CGTCGGGCTT
541    TTCGTTGGCT CCGTCGTGCT CGGCGGCTTG CAAGAGGCTG ATTGA
```

图3 *GmAYI* 的 cDNA
Fig. 3 Nucleotide of *GmAYI*

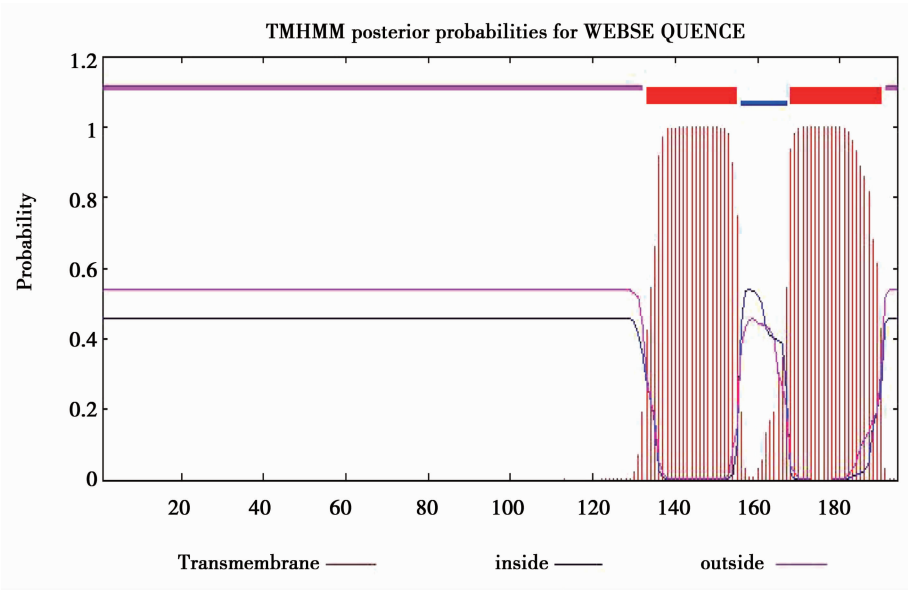


图4 *GmAYI* 基因的跨膜结构分析
Fig. 4 Transmmbrane structure analysis of *GmAYI* gene

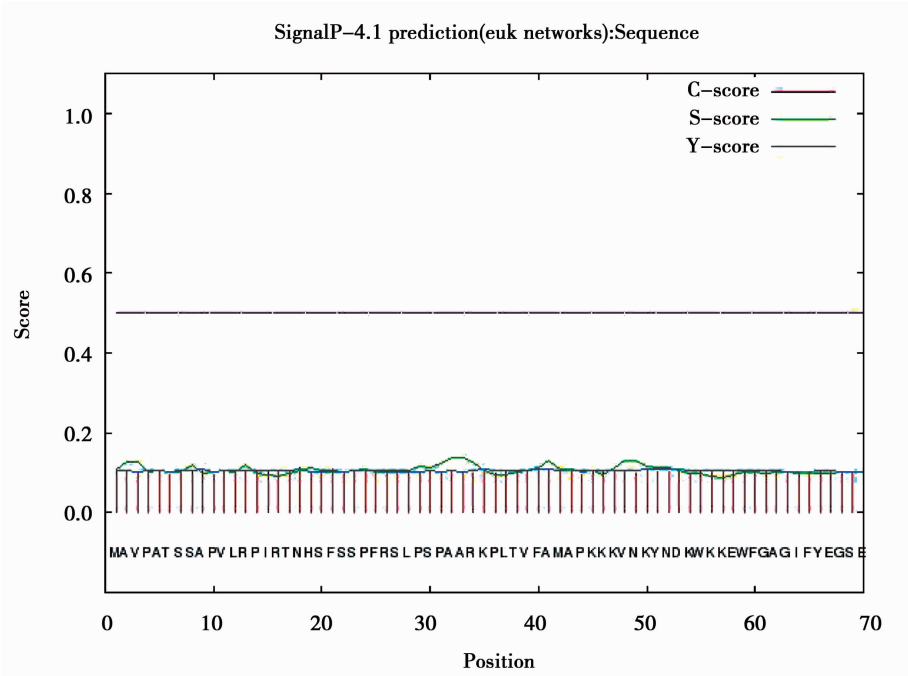


图5 *GmAYI* 基因的信号肽分析

Fig. 5 Signal peptide analysis of *GmAYI* gene

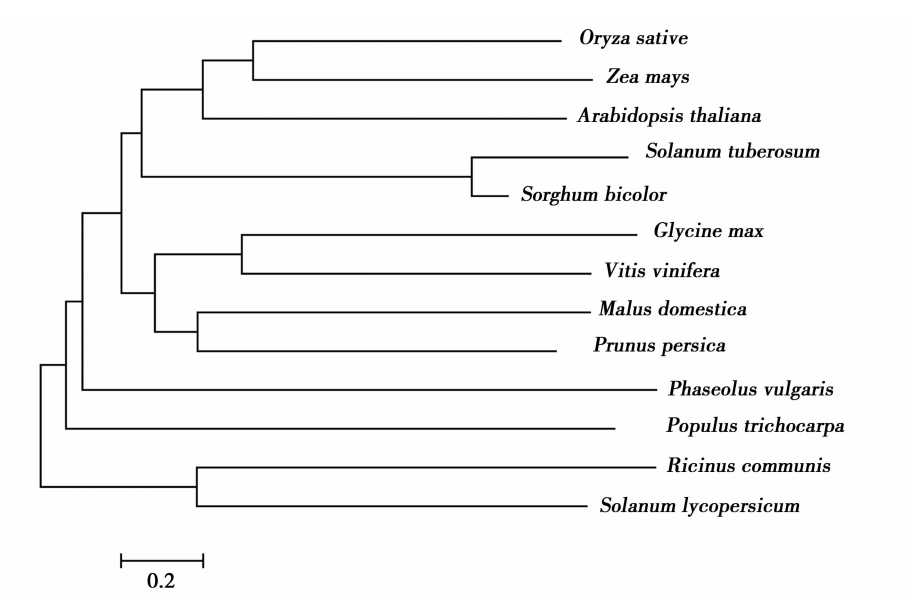


图6 大豆 *GmAYI* 基因进化树分析

Fig. 6 Phylogenic tree analysis of soybean *GmAYI* gene

2. 4 *GmAYI* 基因的启动子分析

基因功能的特异性除了具有特异性的蛋白结构域外,启动子上面作用元件的特异性分布在一定程度上也决定了基因的特定功能。对该基因上游1 500 bp 序列进行启动子序列分析,该启动子区域含有激素应答元件,如脱落酸响应元件、水杨酸响应元件等,以及厌氧感应顺势元件等环境胁迫响应元件,此外还有参与胚乳表达所必须的顺式作用元件等细胞特异表达元件。推测该基因可能参与调

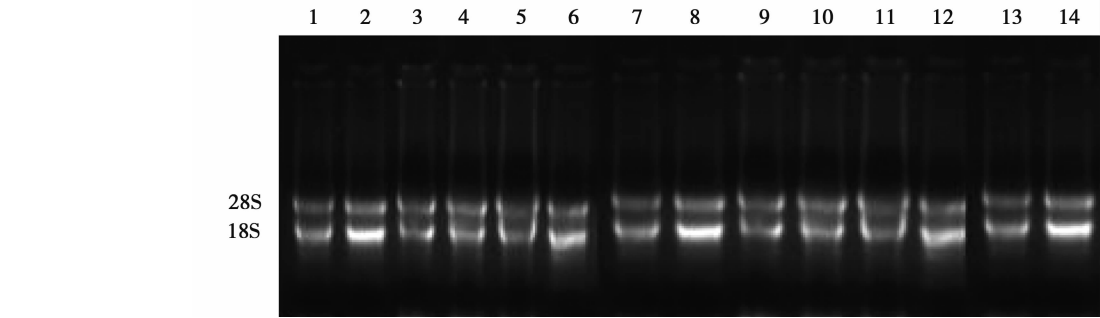
控大豆生长发育及外界环境胁迫响应等过程(表1)。

2. 5 大豆品种(系)总 RNA 的提取

使用 Trizol 试剂分别提取 14 个大豆品种(品系)的总 RNA。14 个样品的 RNA 琼脂糖凝胶电泳(图 7),结果显示 RNA 中 28S 和 18S 两条带清晰且亮度比接近 2:1,表明 RNA 完整性较好。经分光光度计检测,其 OD260/OD280 比值均在 1.85 左右,说明 RNA 的纯度较高。

表 1 *GmAYI* 基因的启动子元件
Table 1 Promoter elements of *GmAYI* gene

名称 Name	数量 Amount	功能 Function
ABRE	2	参与脱落酸反应 Cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness
ACE	1	光响应性元件 Cis-acting element involved in light responsiveness
ARE	1	厌氧感应顺式作用元件 Cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction
ATCT-motif	3	部分光响应元件 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
AuxRR-core	1	生长素响应元件 Cis-acting regulatory element involved in auxin responsiveness
Box 4	3	部分光响应元件 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
Box-W1	2	真菌诱导子响应元件 Fungal elicitor responsive element
CATT-motif	1	部分光响应元件 Part of a light responsive element
CG-motif	1	部分光响应元件 Part of a light responsive element
CGTCA-motif	1	茉莉酸甲酯响应元件 Cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
RY-element	1	种子特异性表达相关元件 Cis-acting regulatory element involved in seed-specific regulation
Skn-1_motif	4	参与胚乳表达顺式作用元件 Cis-acting regulatory element required for endosperm expression
TCA-element	1	水杨酸响应元件 Cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness
TCT-motif	1	部分光响应元件 Part of a light responsive element
TGACG-motif	1	茉莉酸甲酯响应元件 Cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness



1: 克豆 28; 2: 东农 48; 3: 东农 52; 4: 品系 wyb163; 5: 品系 wyb88; 6: 东农 50; 7: 品系 wyb90; 8: 绥农 28; 9: 黑农 61; 10: 黑河 43; 11: 黑河 45; 12: 品系 wyb99; 13: 品系 wyb4; 14: 品系 wyb93。
1: KD28; 2: DN48; 3: DN52; 4: Line wyb163; 5: Line wyb88; 6: DN50; 7: Line wyb90; 8: SN28; 9: HN61; 10: Heihe 43; 11: Heihe 45; 12: Line wyb99; 13: Line wyb4; 14: Line wyb93。

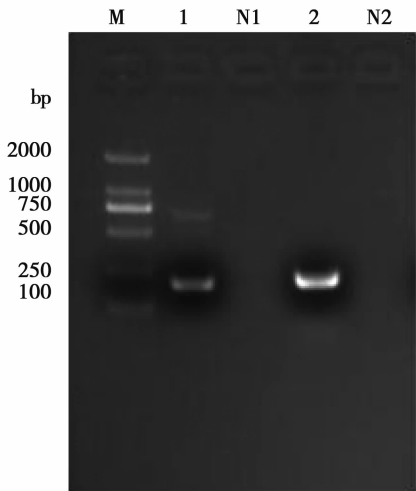
图 7 14 个大豆品种(品系)总 RNA 的提取
Figure 7 Total RNA extraction of 14 soybean varieties(lines)

2.6 扩增产物凝胶电泳分析

以合成的 cDNA 为模板进行扩增,每对引物的 qPCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳显示只扩增出 1 条符合预期长度的明亮条带(图 8):*GmAYI* 和 *actin* 基因片段的扩增产物大小在 190 和 200 bp 片段附近,与预期结果一致,没有产生引物二聚体,引物满足试验要求。

2.7 *GmAYI* 基因在大豆品种中的初步功能分析

利用实时荧光定量 PCR 技术,对 14 个大豆品种(品系)*GmAYI* 基因的转录水平表达进行了定量分析,在叶片中均可检测到 *GmAYI* 基因的表达。相关性分析结果表明,这些大豆品种的 *GmAYI* 基因的表达量与株高呈正相关;与单株粒数、单株粒重呈负相关,但相关不显著;与百粒重呈显著性负相关。由于大豆中的百粒重、单株粒数、单株粒重与产量呈极显著正相关,因此初步预测 *GmAYI* 基因可能参与大豆产量性状的调控,且可能是产量负调控因子,这与前人在拟南芥中的研究相吻合。



M: DL20000; 1: *GmAYI*; 2: *actin*; N1, N2: *GmAYI* 及 *actin* 阴性对照。
M: DL20000; 1: *GmAYI*; 2: *actin*; N1, N2: Negative controls for *GmAYI* and *actin*.

图 8 qPCR 扩增产物凝胶电泳
Fig. 8 Electrophoresis of qPCR products

表 2 *GmAYI* 表达量与大豆品种性状相关性分析
Table 2 Correlation analysis between *GmAYI* expression and characters of soybean varieties

	表达量 Expression level	株高 Plant height	单株粒数 Seeds number per plant	单株粒重 Seeds weight per plant	百粒重 100-seed weight
表达量 Expression level	1	0.366	-0.212	-0.308	-0.488 *
株高 Plant height		1	0.361	0.648 **	0.508 *
单株粒数 Grain number per plant			1	0.456	-0.111
单株粒重 Single plant weight				1	0.818 **
百粒重 100-grain weight					1

3 结论与讨论

基因启动子表达分析结果显示,该启动子区域含有激素应答元件,并且参与胚乳表达所必须的顺式作用元件等细胞特异表达元件。由此推测该基因可能参与调控大豆生长发育及外界环境胁迫响应等过程。

由于 *GmAYI* 基因是根据拟南芥 *At1G74730* 基因克隆得到,而拟南芥中 *At1G74730* 同源基因是一个在甘蓝型油菜孢子胚胎发育中的上调基因,在拟南芥中作为一个转录因子与产量呈负相关^[12-13]。本研究中,在 14 个大豆品种(品系)在叶片中均可

检测到 *GmAYI* 基因的转录水平表达,且进行了相关分析,结果表明 *GmAYI* 基因的表达量与百粒重呈显著负相关性,因此预测 *GmAYI* 基因可能参与大豆产量性状的调控,是产量负调控因子。

通过对大豆 *GmAYI* 基因的生物信息学分析,推测该基因可能参与调控大豆生长发育及外界环境胁迫响应等过程。在以后的研究中,将利用基因敲除技术创制大豆 *GmAYI* 基因突变体,同时利用农杆菌介导大豆子叶节法过表达转化大豆 *GmAYI* 基因突变体,进一步验证 *GmAYI* 基因的功能,为研究大豆高产提供理论基础。

(下转第 1051 页)

3 结 论

大豆出苗主要受温度和湿度的影响,在海南出苗日数多为3~7 d,而在北京春播为13 d,北京夏播则为9 d,进入夏季,气温升高,所以夏播比春播出苗快,因海南温度比北京高所以在海南出苗天数普遍比北京快。无论是长日照还是短日照,高温均缩短了出苗~始花的天数,在海南出苗~始花期的时间为23~31 d,而在北京春播则为16~64 d,而北京夏播则为30~60 d,海南的高温缩短了出苗的始花期的时间。从春播至夏播,随着播期的推迟,出苗至开花、出苗至成熟的时间逐渐缩短。野生大豆材料因直立和蔓生特性不同株高差异较大,但是由于2016年北京降雨量比往年高20%~30%,所以株高普遍高于往年。

参考文献

[1] 张志民,王帅兵,徐淑霞,等. 不同大豆品系的产量比较[J]. 大豆科技,2014(4):18-21. (Zhang Z M, Wang S B, Xu S

X, et al. Yield comparison of different soybean lines[J]. Soybean Science & Technology, 2014(4):18-21.)

[2] 梁福琴,王晓霞,刘琦,等. 不同播种期对大豆产量及相关农艺性状的影响[J]. 作物杂志,2015(6):155-158. (Liang F Q, Wang X X, Liu Q, et al. Effects of sowing date on yield and agronomic characters of soybean[J]. Crop Journal, 2015(6):155-158.)

[3] 庄炳昌. 中国野生大豆生物学研究[M]. 北京:科学出版社,1999. (Zhuang B C. Biology of Chinese wild soybean[M]. Beijing: Science Press,1999.)

[4] 王岚. 野生与栽培大豆某些性状的比较及其在大豆育种中的利用[J]. 大豆科学, 2010, 29(4):575-579. (Wang L. Comparison of several character between *Glycine soja* and *Glycine max* and its utilization in soybean breeding[J]. Soybean Science, 2010, 29(4):575-579.)

[5] 陈文杰,梁江,汤飞跃,等. 不同播期对广西春大豆品种农艺性状、产量及品质的影响[J]. 大豆科学, 2015, 34(6):993-999. (Chen W J, Liang J, Tang F Y, et al. Effects of different planting time on agronomic characters, yield and seed quality of two spring soybean varieties[J]. Soybean Science, 2015, 34(6):993-999.)

(上接第1042页)

参考文献

[1] Maughan P J, Saghai M A, Buss G R. Molecular-marker analysis of seed-weight; Genomic locations, gene action, and evidence for orthologous evolution among three legume species[J]. Theoretical Applied Genetics, 1996, 93: 574-579.

[2] Orf J H, Chase K, Jarvik T, et al. Genetics of soybean agronomic traits: I. Comparison of three related recombinant inbred populations[J]. Crop Science, 1999, 39: 1642-1651.

[3] Mian M A R, Bailey M A, Tamulonis J P, et al. Molecular markers associated with seed weight in two soybean populations[J]. Theoretical Applied Genetics, 1996, 93: 1011-1016.

[4] Zhang W K, Wang Y J, Luo G Z, et al. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers[J]. Theoretical Applied Genetics, 2004, 108: 1131-1139.

[5] Blair M W, Iriarte G, Beebe S. QTL analysis of yield traits in an advanced backcross population derived from a cultivated Andean × wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cross [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 112: 149-1163.

[6] Galeano C H, Fernandez A C, Gomez M, et al. Single strand conformation polymorphism based SNP and indel markers for genetic mapping and syntenic analysis of common bean[J]. BMC Genomics, 2009, 10: 629.

[7] Qi Y Z. Characterization of a putative yield-related gene in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [D]. Ontario: The University of Guelph, 2015

[8] Li D, Pfeiffer T W, Cornelius P L. Soybean QTL for yield and yield components associated with *Glycine soja* alleles [J]. Crop Science, 2008, 48: 571-581.

[9] Koo A J K, Ohlrogge J B. The predicted candidates of *Arabidopsis plastid* inner envelope membrane proteins and their expression profiles[J]. Plant Physiology, 2002, 130: 823-836.

[10] Gianluca B, Lucia R, Franco D, et al. Development of reverse transcription (RT)-PCR and real time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeast and molds contaminating yogurts and pasteurized food products[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 4116-4122.

[11] Lerat S, Vincent M L, Vincent M L. Real-time polymerase chain reaction quantification of the transgenes for roundup ready corn and roundup ready soybean in soil samples[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(5): 1337-1342.

[12] Konsens I, Ofir M, Kigel J. The effect of temperature on the production and abscission of flower and pods in snap bean [J]. Annals of Botany, 1991, 67: 391-399.

[13] Papa R, Bellucci E, Rossi M, et al. Tagging the signatures of domestication in common bean by means of pooled DNA samples [J]. Annals of Botany, 2007, 100: 1039-1051.