

# 植物铝离子胁迫的研究方法综述

汤 华<sup>1,2</sup>, 向福英<sup>3</sup>, 柳晓磊<sup>1,2</sup>, 帅爱华<sup>4</sup>

(1. 海南大学生命科学与农学院, 海口 570228; 2. 热带生物资源教育部重点实验室, 海口 570228;

3. 海南大学人事处, 海口 570228; 4. 湖北省恩施州职业技术学院, 湖北恩施 445000)

**摘 要:** 酸性土壤上,植物的生长受到很大的抑制,铝对植物的毒害是最主要的问题。为了揭示植物铝离子胁迫反应及其耐铝性的机理,科学家们进行了大量研究,取得了许多喜人的进展。根据前人研究,对植物铝离子胁迫的研究方法进行了综述。在试验材料的处理方面介绍了大田栽培、室外盆栽、室内盆栽、营养液栽培等方法;在耐铝性鉴定方面介绍了受害症状、根相对伸长率等直接鉴定法和化学染色、有机酸分泌量等间接鉴定法;在铝离子胁迫基因研究方面,介绍了基因定位技术、基因差异表达研究技术、蛋白质差异表达研究技术及转基因技术等研究方法。

**关键词:** 植物; 铝胁迫; 研究方法

中图分类号: Q945.78

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)05-0494-06

## A Review of Research Methods on Plant Aluminum Stress

TANG Hua<sup>1,2</sup>, XIANG Fu-Ying<sup>3</sup>, LIU Xiao-Lei<sup>1,2</sup>, SHUAI Ai-Hua<sup>4</sup>

(1. College of Life Science and Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Key Lab of Tropic Biological Resource, Ministry of Education, Haikou 570228, China; 3. Personnel Department, Hainan University, Haikou 570228, China;

4. College of Enshi Professional Technology, Enshi, Hubei 445000, China)

**Abstract:** The growth of plant was strongly inhibited in acid soil, and aluminum toxicity was the most important reason. Scientists have done extensive research work on aluminum-stress responses and aluminum-tolerant mechanism of plant for a long time, and have made lots of remarkable progress. In this article, a review about research methods of plant aluminum-stress was made. For material treatment methods of experiment, it introduced field cultivating, pot-planting outdoors, pot-planting indoors, and nutrient solution culture. For aluminum-tolerance identification, it introduced direct-identification methods including toxic symptoms, root relative elongation and so on, indirect-identification methods such as chemical staining and organic acid secretion. In gene research of aluminum-stress, many methods were introduced about gene mapping, gene differential expression, protein differential expression, transgenic techniques, and so on.

**Key words:** Plant; Aluminum stress; Research method

### 1 研究植物铝离子胁迫的必要性

酸性土壤影响着全世界 40% 耕地的作物产量, 主要分布在热带、亚热带及温带地区的发展中国家<sup>[1]</sup>, 在中国, 酸性土壤分布遍及 14 个省区, 主要在我国南方地区, 总面积达 203 万 km<sup>2</sup>, 约占全国耕地的 21%<sup>[2]</sup>。在酸性土壤上, 植物的生长发育受到很大的抑制, 农作物的产量潜力不能充分发挥出来, 导致农业生产产量低、经济效益差。酸性土壤影响作物生长的土壤因素有铝毒、锰毒、H<sup>+</sup> 毒(高 H<sup>+</sup> 浓度)及营养元素的缺乏。由于铝占土壤阳离子交换总量的 20% ~ 80%, 在 pH < 5 的酸性条件下, 土壤

中可溶性的铝(主要是 Al<sup>3+</sup>)对大多数作物都会产生严重毒害, 影响产量, 铝害是酸性土壤的最主要障碍因子。

目前, 耕地面积正日益减少, 土壤环境日趋恶化, 而人口还在不断增加, 粮食安全问题面临很大的压力。为了保障粮食安全, 一方面要严格控制现有耕地面积的减少, 遏制耕地土壤质量的下降或恶化; 另一方面要提高耕地的单位面积生产力水平, 提高土地的利用效率。为了提高单位面积的生产力水平, 发掘现有耕地的生产潜力和农作物的遗传改良是重中之重<sup>[3]</sup>。由于酸性土壤耕地的生产潜力还有很大的上升空间, 因此, 提高酸性土壤上的农作物

产量,已经引起了广泛的重视。运用现代生物技术选育耐酸性土壤的农作物品种,是人类开发和利用酸性土壤最可依赖、也最有希望的出路。对植物铝离子胁迫进行深入研究,对于揭示植物铝离子胁迫的生理机制和分子机理十分重要,对植物耐铝的分子育种也有积极的推动作用。

## 2 铝离子胁迫研究的材料处理方法

要研究植物的铝离子胁迫,就必须对遗传材料进行铝离子胁迫处理,根据实验的目的和要求,选择适当的材料处理方法十分重要。一般而言,材料处理方法包括大田栽培、室外盆栽、室内盆栽、营养液栽培、细胞培养等。

### 2.1 大田栽培

大田栽培是最早采用的处理方法,将材料直接种植在酸性土壤大田中,通过对其全生育期的田间生长长势、生育期、产量及株高等多种农艺性状进行考察评价,判断其耐铝性的好坏<sup>[4]</sup>。大田栽培为自然胁迫,对植物耐铝性进行评估能给出直观和贴近生产实际的结论,但由于容易受天气、病虫害、栽培管理等多种不可控制因素影响,不可能跨季节或跨年度创造一致的胁迫条件,给准确评估和连续性工作造成了困难;有工作量大,周期长、费用高的缺点。对于植物耐铝的遗传改良而言,大田栽培是必不可少的步骤。

### 2.2 室外盆栽

在实际研究过程中,某些研究单位离酸性土壤的大田栽培地点较远,存在交通不便、试验管理困难、实验取材和性状观察不便等诸多限制因素。针对这种情况,产生了室外盆栽方法,即将含铝的酸性土壤取到就近的场地,用容器对材料进行种植和栽培<sup>[5]</sup>。室外盆栽的好处是管理方便及时,能对水肥等条件进行有效的控制,性状的考察和数据采集便利。室外盆栽的缺点是在处理大量材料时工作量大,往往会出现场地受限的情况,另外,受天气和季节的影响大,暴风暴雨对试验有影响,冬季试验无法开展。

### 2.3 室内盆栽

针对室外栽培存在的缺点,室内盆栽方法开始体现出优越性,即在温室或者实验室进行小规模的材料栽培,采用容积相对较小的容器,以酸性土壤为基质,种植和处理材料<sup>[6]</sup>。该方法的优点是管理更加方便,对营养元素可进行更准确的控制,排除了天气的干扰和季节的限制,一年四季都可进行试验。

### 2.4 营养液栽培

为了方便取材,保证实验处理的可操作性和一致性,耐铝研究开始采用营养液栽培的方式处理材料<sup>[7]</sup>。营养液栽培是使用化学营养液栽培作物的方法,又叫水培法。营养液中包括作物必需的所有营养元素,即氮(N)、磷(P)、钾(K)、钙(Ca)、镁(Mg)、硫(S)等大量元素和铁(Fe)、锰(Mn)、硼(B)、锌(Zn)、铜(Cu)、钼(Mo)等微量元素。不同的作物和品种,同一作物不同的生育阶段,对各种营养元素的实际需要有很大的差异。所以,在选配营养液时,要先了解各类作物,各个生育阶段,对各类营养元素的需要量,以此为依据来确定营养液的组分和比例。

耐铝研究中,一般将营养液的pH值设为4.3,设置加铝的胁迫处理和不加铝的对照处理,铝离子浓度可根据研究的需要进行设定<sup>[8]</sup>,通常配好pH 4.3的1.0 mol/L的 $\text{AlCl}_3$ 的溶液,在完成对植物材料的营养液预培养后加入,常用的浓度范围是100~300 mmol/L。耐铝研究采用营养液栽培有很多的优点:①能对营养元素的含量进行精确控制,包括铝离子的含量;②能减少试验误差,增强试验数据的可靠性;③能避免病虫害的影响和破坏;④不受地区、土质、环境等条件的限制。在实践过程中,研究者可根据实验和研究的客观需要对上述方法进行选择。当然,营养液栽培法也有缺点,主要是不利于进行全生育期栽培,难以完全模拟出酸性土壤的实际情况等。将营养液栽培法和土壤盆栽法相结合,能很好地解决这个问题。目前,已在玉米<sup>[8,9]</sup>,小麦<sup>[10,11]</sup>等植物的耐铝性研究方面应用广泛,取得了较为理想的结果。

## 3 植物耐铝性的鉴定方法

在植物铝离子胁迫研究中,对植物材料的耐铝性进行可靠而准确的鉴定十分重要,这是后续研究工作开展的根本保障。采用的方法可以分为直接鉴定法和间接鉴定法两大类。

### 3.1 直接鉴定法

根据铝离子胁迫下,植物农艺性状的变化来鉴定耐铝性的强弱,即为直接鉴定法。受害症状是最直接的依据。在铝离子胁迫下,根系和地上部生长受阻,根部的受害表现为根伸长受到抑制,根尖膨大,表皮脱落等;植株地上部分的受害症状表现为茎、叶的干物质重量减少,叶片数减少,叶片变小变黄,叶缘卷曲,叶尖枯黄。苗期受害严重的,叶片前

端会出现水渍状萎焉症状;对于成株期受害而言,主要表现为植物生长不够健壮,植株的生物量减少,产量大幅下降<sup>[1]</sup>。通过受害症状,可对植物的耐铝性作出定性判断。

为了直接作出定量的判断,也可对相应的指标进行测量。采用大田栽培时,可对植物的生物量、产量等进行定量评价。采用室外盆栽、室内盆栽和营养液栽培时,可以对株高、地上部鲜重、根系鲜重、地上部干重、根系干重、受害症状的级别等农艺性状和指标进行考察鉴定<sup>[4]</sup>。采用营养液栽培时,还可对根长、侧根数、根相对伸长率等指标进行精细测定<sup>[12]</sup>,用于耐铝性的判定。对于这些直接鉴定法的指标,最好以铝胁迫和无铝胁迫的相对百分率为最终参数进行评价。铝离子毒害植物的首要部位是根系,针对根系进行耐铝性研究时,一般采用土壤盆栽与营养液栽培相结合的方法。

### 3.2 间接鉴定法

间接鉴定法是通过相对复杂的物理、化学、生理生化乃至分子生物学手段,测定间接的指标和参数,对植物的耐铝性进行评价。间接鉴定法过程较复杂,但被测定的指标往往与植物铝离子胁迫反应的生理生化过程密切相关。在植物耐铝性研究中,采用较多的间接鉴定法有:根的化学染色法、根的酶活力测定,根系分泌物的测定、根的显微结构观察等。

植物受到铝离子胁迫时,根尖细胞的内外会产生不同程度的铝离子积累。桑色素(morin)或者苏木精(hematoxylin)能够特异性地与铝离子结合,形成有颜色的复合物,因此通过这两种染料染色,根据染色的深浅就可判断细胞中铝离子积累的程度<sup>[13,14]</sup>。大量的研究表明<sup>[13-16]</sup>,铝离子在根尖的积累量与植物的铝离子敏感性呈高度正相关,与耐铝性呈高度负相关。一般而言,耐铝基因型的苏木精、桑色素染色程度较低。根系TTC还原强度测定,即采用氯化三苯基四氮唑(TTC)法测定的是根系的脱氢酶的活性,脱氢酶的活性与根系的活力呈正相关。在铝离子胁迫时,根系TTC还原强度越高,其耐铝性就越强,反之越弱<sup>[17,18]</sup>。

植物在铝离子胁迫下,根尖会分泌大量的有机酸,螯合 $Al^{3+}$ ,降低根际周围 $Al^{3+}$ 的浓度和活性。有机酸的分泌量越高,其耐铝性越强,因此,对有机酸的含量进行测定,可用于鉴定耐铝性。在铝离子的胁迫诱导下,不同的植物分泌不同种类的有机酸,豆科植物主要分泌柠檬酸<sup>[19]</sup>,玉米主要分泌柠檬酸<sup>[20]</sup>和苹果酸<sup>[9]</sup>,烟草分泌柠檬酸<sup>[21,22]</sup>,小麦主要

分泌苹果酸<sup>[23]</sup>,荞麦<sup>[24]</sup>和芋头<sup>[25]</sup>主要分泌草酸。不同种类的有机酸解除铝离子毒害的能力是不一样的,其中以柠檬酸的能力最强,其次为草酸,苹果酸。

## 4 植物铝胁迫基因的研究方法进展

随着分子生物学技术的发展和广泛运用,已经从基因水平对植物的铝离子胁迫展开了卓有成效的研究,取得了很多喜人的进展。采用的研究方法主要包括如下几种:

### 4.1 基因定位技术

在很多植物中,耐铝性是一种数量性状,受多基因控制。QTL定位技术是在20世纪80年代后期,随着分子生物学技术的兴起而发展起来的一种研究数量遗传的方法,其基本原理是利用适当的分离群体,构建较高密度的、均匀覆盖全基因组的分子标记连锁图,然后结合分离群体中各个体的标记基因型及性状表型值,通过特定的专业软件进行统计运算,将控制数量性状的基因位点,即QTL定位在分子标记连锁图上,并分析其遗传效应。

要进行QTL定位,首先要构建一个目标性状的分离群体。QTL定位要求目标性状在群体中分离明显,符合正态分布,故在选择亲本时,应尽可能选择性状表现差异大和亲缘关系较远的材料。目前在QTL定位中常用的群体有 $F_2$ 群体、回交群体、回交自交系群体、双单倍体群体、重组自交系群体,永久 $F_2$ 群体,近等基因系群体等。不同的群体具有不同的特点,可根据研究的基础和要求进行选择。其次是进行分子标记实验,DNA分子标记的种类很多,在QTL定位中运用较多的是RFLP、RAPD、AFLP、SSR等。最后就是选取恰当的方法和专业软件,完成QTL定位。QTL定位的方法主要有单标记分析法<sup>[26]</sup>,区间作图法<sup>[27]</sup>,复合区间作图法<sup>[28]</sup>和多区间作图法<sup>[29]</sup>等。

目前,QTL定位技术已大量运用到植物耐铝基因的研究中。Riede等将小麦耐铝基因定位在4D染色体的长臂上(4DL),命名为 $AluBH^{[30]}$ 。Luo和Dvorak将中国春小麦耐铝基因定位于4DL,命名为 $Alu2^{[31]}$ 。此后,相继在黑麦<sup>[32]</sup>、大麦<sup>[33]</sup>、高粱<sup>[34]</sup>等作物上对耐铝基因作了定位。Magalhaes等对禾本科作物的耐铝基因定位的比较研究发现,小麦( $AluBH$ )、黑麦( $Alu3$ )和大麦( $Alp$ )的耐铝基因位点定向同源<sup>[34]</sup>。Wu等以相对根长作为生理抗铝指标,将水稻的耐铝QTL定位在1、3、9和12号染色体上<sup>[35]</sup>;Ma等定位了3个水稻耐铝QTL,分别位于

染色体1、2、6号上<sup>[36]</sup>。Kobayashi等在拟南芥中也发现了两个耐铝QTL,定位于染色体1号和5号<sup>[37]</sup>。在玉米中,在染色体2、6、8号上定位了5个QTL<sup>[38]</sup>。

#### 4.2 基因差异表达研究技术

植物耐铝性的差异,从本质上说是基因差异表达的结果,在相同胁迫下,不同的材料会表达不同的基因;对于同一个材料,在不同的胁迫下,也会表达不同的基因。生物随时有成千上万的基因表达,当目的基因不清楚时,要分离目的基因十分困难。比较不同材料或相同材料在不同生理状态下的基因表达上的差异,有助于研究基因的表达模式和功能,并且能够分离克隆特异性表达的基因。因此,基因差异表达研究技术被大量运用在植物铝离子胁迫研究中。目前最常用的方法包括消减杂交、DDRT-PCR、cDNA-RDA、cDNA-AFLP、SSH、基因芯片和SAGE等<sup>[39]</sup>。

Cruz-Ortega构建cDNA文库研究小麦的铝胁迫反应,获得了1,3-p-葡聚糖酶和一个类微丝结合蛋白的cDNA克隆,并认为植物的铝毒反应会引起细胞防御相关基因的上调表达<sup>[40]</sup>。Hamel等对小麦中铝诱导基因的研究发现,检测的大部分基因是植物对其它生物和非生物胁迫的共同响应基因<sup>[41]</sup>。Richards构建拟南芥的铝胁迫cDNA文库,鉴定了5个前期快速上升表达的基因,4个中后期上升表达的基因,还有两个抑制表达的基因,认为 $Al^{3+}$ 胁迫诱导了拟南芥根系的氧胁迫反应,氧胁迫反应可能是植物铝离子胁迫反应的核心组成部分<sup>[42]</sup>。Milla等采用SAGE技术对黑麦中的铝诱导基因作了详细的研究<sup>[43]</sup>。Watt采用抑制消减杂交(SSH)的方法,构建甘蔗的消减文库,发现了14个与信号传导及基因表达调控有关的基因,28个未知功能基因,其中的23个是其它禾本科植物抗逆研究已经发表的EST序列<sup>[44]</sup>。通过SSH技术,已经在玉米<sup>[8]</sup>、拟南芥<sup>[45]</sup>等植物上创建了消减cDNA文库,并分离了铝诱导基因。

#### 4.3 蛋白质表达研究技术

蛋白质是生理功能的执行者,是生命现象的直接体现者,对蛋白质结构和功能的研究将直接阐明生物在不同生理条件下的变化机制。研究不同时期细胞蛋白质组成的变化,如蛋白质在不同环境下的差异表达,可以发现差异的蛋白质。蛋白质研究技术涉及到蛋白质的样品准备、蛋白质分离提取、蛋白质电泳技术、蛋白质层析技术、蛋白质定量检测、

蛋白质测序技术及蛋白质的生物信息分析技术等。将蛋白质研究技术运用到铝离子胁迫的研究中,分离鉴定与铝离子胁迫相关的关键蛋白,是一个重要的发展趋势。

Taylor等发现铝离子能诱导两个51 kD疏水蛋白在耐铝小麦中表达,而在铝敏感品种不表达,分析表明它们与液泡膜上的 $H^+$ -ATPase上的B亚基以及线粒体膜上的 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基同源<sup>[46]</sup>。Li等将拟南芥中 $Mg^{2+}$ 转运蛋白(*AtMGT*)互补到酵母缺陷体中,使酵母恢复了耐铝性<sup>[47]</sup>。Hamilton等研究了小麦中一个与耐铝基因型共分离的蛋白质,与液泡的 $H^+$ -ATPase(V-ATPase)B亚基以及线粒体ATPase(F1F0-ATPase)的A、B亚基具有很高的同源性,并证明能提高小麦的耐铝性<sup>[48]</sup>。Sasaki等分离了一个铝激活的苹果酸运输蛋白基因*ALMT1*(aluminum-activated malate transporter),在耐铝小麦品种ET8和铝敏感品种ES8根尖中的表达明显不同,能诱导的苹果酸释放增强<sup>[49]</sup>。杨建立等研究发现,在小麦中有11种蛋白与耐铝品种有专一性<sup>[50]</sup>。

当前蛋白质组研究的核心技术就是双向凝胶电泳-质谱技术,即通过双向凝胶电泳将蛋白质分离,然后利用质谱对蛋白质逐一进行鉴定,高通量、高灵敏度和高精度是三个关键指标。随着蛋白质组学的兴起,植物铝离子胁迫的研究必然向蛋白质组学的方向发展。

#### 4.4 转基因技术

将转基因技术运用到植物耐铝研究中具有两个方面的作用,一是对获得的耐铝候选基因进行功能证实,二是通过转基因技术,进行植物耐铝的分子育种,获得耐铝的转基因植物材料。目前,转基因技术主要包括基因枪法,农杆菌介导法,花粉管通道法,子房注射法等。

De la Fuente等运用农杆菌介导法将柠檬酸合成酶基因转入烟草中过量表达,使其耐铝能力增强,这是人类首次采用转基因技术提高植物耐铝性的尝试<sup>[21]</sup>。Ezaki等将拟南芥铜蓝结合蛋白基因(*AtBCB*)、烟草谷胱甘肽硫转移酶基因(*parB*)、烟草过氧化物酶基因(*NtPox*)、和烟草GDP解离抑制物基因(*NtGDI*)分别转入拟南芥,得到4种耐铝性增强的转基因植株,检测后发现,*AtBCB*基因可能抑制铝的吸收,*NtGDI*基因促进拟南芥根尖 $Al^{3+}$ 的释放;*parB*基因和*NtPox*基因可缓解铝毒引起的氧胁迫;这4种植物杂交出的 $F_1$ 代具有更强的耐铝能力,说明这4种基因具有协同效应<sup>[51]</sup>。Tesfaye等将含有

CaMV 35S 启动子的 *MDH* 和 *PEPC* 的嵌合基因分别导入到苜蓿 (*Medicago sativa*) 中,使苹果酸脱氢酶活性提高 1.6 倍,根中有机酸含量增加 4.2 倍,有机酸分泌量也随之增加了 7.1 倍,该结果证明:增加有机酸合成可能是植物适应酸性土壤和抵抗铝毒的有效方式<sup>[52]</sup>。Anoop 等将拟南芥的柠檬酸合成酶基因 (*CS*) 导入油菜中过量表达,转基因植株中 *CS* 活性提高,根中柠檬酸含量提高,根对柠檬酸释放量也增加 2 倍,耐铝能力增强,说明与柠檬酸合成或分解相关的酶可能与植物耐铝机制有关<sup>[53]</sup>。Delhaize 等将 *ALMT1* 基因转化大麦,转基因植株的苹果酸分泌能力和耐铝能力都有显著地提高,该结果证明:*ALMT1* 是小麦等有机酸快速分泌型植物的耐铝能力强的主要原因<sup>[54]</sup>。可见,转基因技术在植物耐铝基因的功能鉴定和植物耐铝种质的创建方面,其作用不可替代。

## 5 结语

植物铝离子胁迫的研究日益受到重视,研究方法和手段也不断提高和改进,特别是受整个生命科学领域的新技术、新学科、新思路的影响很大。目前生命科学的研究主要向功能基因组学、代谢组学、生物信息学、蛋白质组学等方向发展,并且相互交叉渗透,因此,可以预见,植物铝离子胁迫的研究将会有更多新方法和新思路产生,引领植物铝离子胁迫研究取得更大突破。

## 参考文献:

- [1] Delhaize E, Ryan P R. Aluminum toxicity and tolerance in plants [J]. *Plant Physiol*, 1995, **107**: 315–321.
- [2] 熊毅, 李庆远. 中国土壤 [M]. 北京: 科学出版社, 1987. 39.
- [3] Khush G S. Green revolution: preparing for the 21st century [J]. *Genome*, 1999, **42**: 646–655.
- [4] 汤华. 玉米产量和农艺性状的遗传研究及玉米铝离子胁迫下的基因差异表达研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2005. 67–77.
- [5] 贺立源, 徐尚忠, 李建生. 玉米自交系苗期耐酸的生物学和营养学特性 [J]. 作物学报, 2002, **26**(2): 205–209.
- [6] Urrea-Gomez R, Ceballos H, Pandey S, Bahia-Filho A F C, Leon L A. A greenhouse screening technique for acid soil tolerance in maize [J]. *Agron J*, 1996, **88**: 806–812.
- [7] Magnavaca R, Clark R B, Clark R B. Evaluation of Inbred Maize Lines for Aluminum Tolerance in Nutrient Solution [M]. Hague Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 255–265.
- [8] 汤华, 郑用琰, 贺立源, 李建生. 玉米耐铝毒基因的分离 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, **31**(5): 507–514.
- [9] 李德华, 贺立源, 刘武定. 耐铝的和对铝敏感的玉米自交系根系的有机酸分泌 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, **29**(2): 114–120.
- [10] Shen Z G, Wang J L, Guang H Y. Effect of aluminum and calcium on growth of wheat seedlings and germination of seeds [J]. *J Plant Nutr*, 1993, **16**: 2135–2148.
- [11] 何龙飞, 沈振国, 刘友良. 铝胁迫对小麦根系液泡膜 ATP 酶、焦磷酸酶活性和膜脂组成的影响 [J]. 植物生理学报, 1999, **25**(4): 350–356.
- [12] Llugany M, Massot N, Wissemeier A H, Poschenrieder C, Horst W J, Barcelo' J. Aluminum tolerance of maize cultivars as assessed by callose production and root elongation [J]. *J Plant Nutr Soil Sci*, 1994, **157**: 447–451.
- [13] Larsen P B, Tai C Y, Kochian L V, Howell S H. *Arabidopsis* mutants with increased sensitivity to aluminum [J]. *Plant Physiol*, 1996, **110**: 743–751.
- [14] Cancado G M A, Loguercio L L, Martins P R. Hematoxylin staining as a phenotypic index for aluminum tolerance selection in tropical maize (*Zea mays* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, **99**: 747–754.
- [15] Delhaize E, Craig S, Beaton C D, Bennet R J, Jagdish V C, Randall P J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) I. Uptake and distribution of aluminum in root apices [J]. *Plant Physiol*, 1993, **103**(3): 685–693.
- [16] Va'zquez M D, Poschenrieder C, Corrales I, Barcelo' J. Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety [J]. *Plant Physiol*, 1999, **119**: 435–444.
- [17] Delhaize E, Ryan P R. Aluminum toxicity and tolerance in plants [J]. *Plant Physiol*, 1995, **107**(2): 315–321.
- [18] 李德华, 贺立源, 刘武定. 玉米根系活力与耐铝性的关系 [J]. 中国农学通报, 2004, **26**(1): 161–164.
- [19] Miyasaka S C, Buta J G, Howell R K, Foy C D. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans: root exudation of citric acid [J]. *Plant Physiol*, 1991, **96**: 737–743.
- [20] Pellet D M, Grunes D L, Kochian L V. Organic acid exudation as aluminum tolerance mechanism in maize [J]. *Planta*, 1995, **196**: 788–795.
- [21] De la Fuente J M, Ramirez-Rodriguez V, Caberra-Ponce J L, Herrera-Estrella L. Aluminium tolerance in transgenic plant by alteration of citrate synthesis [J]. *Science*, 1997, **276**: 1566–1568.
- [22] Delhaize E, Hebb D M, Ryan P R. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux [J]. *Plant Physiol*, 2001, **125**(4): 2059–2067.
- [23] Ryan P R, Delhaize E, Randall P J. Malate efflux from root apices and tolerance to aluminum are correlated highly in wheat [J]. *Aust J Plant Physiol*, 1995, **122**: 531–536.
- [24] Zheng S J, Ma J F, Matsumoto H. High aluminum resistance in buckwheat. I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips [J]. *Plant Physiol*, 1998, **117**: 745–751.
- [25] Ma Z, Miyasaka S C. Oxalate exudation by taro in response to Al

- [J]. *Plant Physiol*, 1998, **118**: 861–865.
- [26] Edwards M D, Stuber C W, Wendel J F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution and types of gene action [J]. *Genetics*, 1987, **116**(1): 113–125.
- [27] Lander E S, Botstein D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps [J]. *Genetics*, 1989, **121**: 185–199.
- [28] Zeng Z B. Precision mapping of quantitative trait loci [J]. *Genetics*, 1994, **136**: 1457–1468.
- [29] Kao C H, Zeng Z B, Teasdale R D. Multiple interval mapping for quantitative trait loci [J]. *Genetics*, 1999, **152**: 1203–1216.
- [30] Riede C R, Anderson J A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat [J]. *Crop Sci*, 1996, **36**: 905–909.
- [31] Luo M, Dvorak J. Molecular mapping of an aluminum tolerance locus on chromosome 4D of Chinese spring wheat [J]. *Euphytica*, 1996, **91**: 31–35.
- [32] Callego F J, Calles B, Benito C. Molecular markers linked to the aluminium tolerance gene *alt1* in rye (*Secale cereale* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, **97**: 1104–1109.
- [33] Tang Y, Sorrells M E, Kochian L V, Garvin D G. Identification of RFLP markers linked to barley aluminum tolerance gene [J]. *Alp Crop Sci*, 2000, **40**: 778–782.
- [34] Magalhaes J V, Garvin D F, Wang Y, Sorrells M E, Klein P E, Schaffert R E, Li L, Kochian L V. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the poaceae [J]. *Genetics*, 2004, **167**: 1905–1914.
- [35] Wu P, Liao C Y, Hu B, Yi K K, Jin W Z, Ni J J, He C. QTLs and epistasis for aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) at different seedling stages [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, **100**: 1295–1303.
- [36] Ma J F, Shen R, Zhao Z, Wissuwa M, Takeuchi Y, Ebitani T, Yano M. Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait loci for Al tolerance [J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, **43**: 652–659.
- [37] Kobayashi Y, Koyama H. QTL analysis of Al tolerance in recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, **43**: 1526–1533.
- [38] Ninamango-Cárdenas F E, Guimaraes C T, Martins P R, Martins P R, Parentoni S N, Carneiro N P, Lopes M A, Moro J R, Paiva E. Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize [J]. *Euphytica*, 2003, **130**: 223–232.
- [39] 汤华, 帅爱华, 向福英. 植物基因差异表达的研究方法及进展 [J]. 海南大学学报(自然科学版), 2006, **24**(3): 309–316.
- [40] Cruz-Ortega R, Cushman J C, Ownby J D. cDNA clones encoding 1, 3-b-glucanase and a fimbrin-like cytoskeletal protein are induced by Al toxicity in wheat roots [J]. *Plant Physiol*, 1997, **114**: 1453–1460.
- [41] Hamel F, Breton C, Houde M. Isolation and characterization of wheat aluminum-regulated genes: Possible involvement of aluminum as a pathogenesis response elicitor [J]. *Planta*, 1998, **205**: 531–538.
- [42] Richards K D, Schott E J, Sharma Y K, Davis K R, Gardner R C. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol*, 1998, **116**: 409–418.
- [43] Milla M A, Butler E, Huete A R, Wilson C F, Anderson O, Gustafson J P. Expressed sequence tag-based gene expression analysis under aluminum stress in rye [J]. *Plant Physiol*, 2002, **130**: 1706–1716.
- [44] Watt D A. Aluminium-responsive genes in sugarcane: Identification and analysis of expression under oxidative stress [J]. *J Exp Bot*, 2003, **54**: 1163–1174.
- [45] Finkelstein D, Ewing R, Gollub J, Sterky F, Cherry J M, Somerville S. Microarray data quality analysis: Lessons from the AFGC project arabidopsis functional genomics consortium [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, **48**: 119–131.
- [46] Taylor G J, Basu A, Basu U, Slaski J J, Zhang G, Good A. Al-induced, 51-kilodalton, membrane-bound proteins are associated with resistance to Al in a segregating population of wheat [J]. *Plant Physiol*, 1997, **114**: 363–372.
- [47] Li L, Tutone A F, Drummond R S, Gardner R C, Luan S. A novel family of magnesium transport genes in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2001, **13**: 2761–2775.
- [48] Hamilton C A, Good A G, Taylor G J. Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase by aluminum in an aluminum-resistant cultivar of wheat [J]. *Plant Physiol*, 2001, **125**: 2068–2077.
- [49] Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ahn S J, Ryan P R, Delhaize E, Matsumoto H. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter [J]. *Plant J*, 2004, **37**(5): 645–653.
- [50] 杨建立, 俞雪辉, 刘强, 郑绍建. 铝胁迫对小麦根尖细胞蛋白质及苹果酸分泌的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 2005, **11**(3): 390–393.
- [51] Ezaki B, Katsuhara M, Kawamura M, Matsumoto H. Different mechanisms of four aluminum (Al)-resistant transgenes for Al toxicity in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2001, **127**: 918–927.
- [52] Tesfaye M, Temple S J, Allan D L, Vance C P, Samac D A. Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum [J]. *Plant Physiol*, 2001, **127**: 1836–1844.
- [53] Anoop V M, Basu U, McCammon M T, McAlister-Henn L, Taylor G J. Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase [J]. *Plant Physiol*, 2003, **132**(4): 2205–2217.
- [54] Delhaize E, Ryan P R, Hebb D M, Yamamoto Y, Sasaki T, Matsumoto H. Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(42): 15249–15254.