DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.94154

铝毒胁迫下甘蓝型油菜种子萌发期相关性状的 QTL 定位

王瑞莉 王刘艳 叶 桑 郜欢欢 雷 维 吴家怡 袁 芳
孟丽姣 唐章林 李加纳 周清元* 崔 翠*

西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400715

摘 要: 随着土壤酸化的日益加重, 铝毒已成为影响作物种子萌发质量以及作物产量的重要胁迫因子之一。作物耐铝相关性状的 QTL 定位和候选基因筛选已有许多报道, 但铝胁迫下甘蓝型油菜萌发期相关性状的 QTL 定位报道较少。本文以 $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ 的铝胁迫浓度处理重组自交系(10D130×中双 11 号)群体进行种子萌发试验, 处理 3 d 时调查发芽势, 7 d 时调查发芽率, 测定其根长、芽长和干重, 并计算各性状相对值。基于 6K SNP 芯片, 结合高密度遗传连锁图谱对油菜萌发期的 5 个性状进行 QTL 定位, 共检测到 23 个 QTL。其中与相对发芽势、相对发芽率、相对根长、相对芽长和相对干重相关的 QTL 分别有 9 个、1 个、4 个、5 个和 4 个, 覆盖了 A、C 基因组, LOD 值介于 3.00~5.26, 可解释的表型变异为 7.70%~13.10%。根据各 QTL 置信区间序列筛选, 与铝胁迫相关的候选基因共 30 个。ALMT1 基因和 MATE 基因与有机酸的合成和分泌有关, 主要通过苹果酸、柠檬酸和草酸等有机酸的分泌来增强植物的耐铝性; STOPT1 基因、NAC 基因和 RAP2.4 基因均属于转录激活因子, 通过诱导耐铝基因的表达增强植株的抗性; ABC 转运蛋白、膜蛋白转运体、GDSL 脂肪酶通过减少有毒物质在质膜上的积累或将有毒物质排出体外等途径增强植物的耐铝性; 过氧化物酶和细胞色素 P450 均属于氧化胁迫相关基因, 具有防止植物细胞氧化损伤、抵御逆境胁迫的功能; 另外, 还有部分编码逆境蛋白的基因, 均在各种胁迫反应中起重要作用。本研究的结果将为培育耐铝油菜品种及后续基因的功能研究提供理论依据。

关键词: 甘蓝型油菜; 萌发期; 单核苷酸多态性; 铝胁迫; QTL; 候选基因筛选

QTL mapping of seed germination-related traits in *Brassica napus* L. under aluminum toxicity stress

WANG Rui-Li, WANG Liu-Yan, YE Sang, Gao Huan-Huan, LEI Wei, WU Jia-Yi, YUAN Fang, MENG Li-Jiao, TANG Zhang-Lin, LI Jia-Na, ZHOU Qing-Yuan*, and CUI Cui*

College of Agronomy and Biotechnology, Southwestern University, Chongqing 400715, China

Abstract: With the aggravation of soil acidification, aluminum toxicity has become one of the important stress factors that affect crop seed germination quality and crop yield. There have been many reports on QTL mapping and candidate gene screening for aluminum tolerance related traits in crops, but few reports on QTL mapping for aluminum tolerance during germination in *Brassica napus* L. The seed germination test was conducted on the recombinant inbred line population treated with $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ aluminum solution and with distilled water as control. Germination potential was investigated at 3 d, germination rate was investigated at 7 d, root length, bud length and dry weight were measured, and the relative values of various characters were calculated. Based on 6K SNP chip and combined with high density genetic linkage map, we detected 23 QTLs for five traits in rape germination period. QTLs for relative germination potential, relative germination rate, relative root length, relative bud length and relative dry weight were 9, 1, 4, 5, and 4 respectively, covering A and C genomes, with LOD values from 3.00 to 5.26, and interpretable phe-

本研究由国家重点研发计划项目(2018YFD0100500), 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-12)和重庆市技术创新与应用发展(cstc2019jcsx-msxmX0383)项目资助。

This study was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0100500), the China Agriculture Research System (CARS-12), and the Technological Innovation and Application Development in Chongqing (cstc2019jcsx-msxmX0383).

* 通信作者(Corresponding authors): 周清元, E-mail: qingyuan@swu.edu.cn; 崔翠, E-mail: cuicui@swu.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: 1525731297@qq.com

Received (收稿日期): 2019-10-16; Accepted (接受日期): 2020-01-15; Published online (网络出版日期): 2020-02-19.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200218.1918.005.html>

notypic variation from 7.70% to 13.10%. According to the confidence interval sequence of each QTL, 30 candidate genes related to aluminum stress were screened. *ALMT1* gene and *MATE* gene are related to the synthesis and secretion of organic acids, which mainly enhance the aluminum tolerance of plants through the secretion of organic acids such as malic acid, citric acid and oxalic acid. *STOPI* gene, *NAC* gene and *RAP2.4* gene all belong to transcription activation factors, which enhance the resistance of plants by inducing the expression of aluminum tolerance genes. ABC transporter, membrane protein transporter, GDSL lipase enhance aluminum tolerance of plants by reducing accumulation of toxic substances on plasma membrane or discharging toxic substances out of body. Peroxidase and cytochrome P450 are genes related to oxidative stress, which have the functions of preventing oxidative damage of plant cells and resisting stress. At the same time, many genes encoding stress proteins were found, which play an important role in various stress reactions. The results of this study provide a theoretical basis for the cultivation of aluminum-tolerant rape varieties and the functional research of subsequent genes.

Keywords: *Brassica napus* L.; germination; single nucleotide polymorphism; aluminum stress; QTL; candidate gene

铝毒是酸性土壤中制约植物生长的重要因素之一^[1]。在酸性土壤条件下(pH<5), 结合态铝解离成有毒离子态从而降低土壤中养分利用率, 抑制植物生长^[2], 使植物表现萎蔫矮小, 叶片黄化卷曲易老化、坏死等缺素症状^[3]。我国油菜种植区, 尤其是长江以南地区每年因为铝毒危害造成的油菜减产相当严重^[4]。在甘蓝型油菜的耐铝毒研究中, 前人主要分析甘蓝型油菜幼苗期或成株期的一些生理生化的变化, 包括油菜根系分泌的柠檬酸、苹果酸、有机酸以及相关代谢酶的活性^[5]、叶片的光合作用和有机物运输、抗逆生理指标^[6]等。种子萌发期作为作物生长发育重要的起始阶段, 直接影响作物的收获及其经济效益。郇欢欢等^[7]研究表明, 不同品种(系)油菜萌发期对铝毒的耐性具有显著性差异, 采用多种方法综合性评价铝毒对油菜相关性状的影响, 成功筛选出萌发期耐铝毒较强的油菜种质。针对油菜萌发期耐铝毒进行相关遗传因子研究和挖掘耐逆基因, 有助于了解油菜对铝胁迫的响应机制, 对筛选和培育耐铝油菜品种具有重要意义。随着分子生物学的发展, 分子标记遗传图谱广泛应用于数量性状基因研究。近年来, 研究者们利用分子标记技术, 通过全基因组关联分析和 QTL 定位, 对多种作物相关性状遗传机制进行研究, 并取得巨大进展^[8-13]。SNP 标记具有数量多, 分布广和规模化等优点, 已成功地应用于油菜复杂性状的 QTL 检测。在农艺性状方面, Yang 等^[8]采用 SNP 分子标记技术, 对 167 个油菜品系的双单倍体群体进行 QTL 分析, 鉴定出 45 个与油菜长角果相关性状的 QTL。荐红举等^[9]利用 2795 个 SNP 位点的遗传图谱, 准确定位了 5 种环境条件下甘蓝型油菜千粒重的 QTL, 共检测到影响油菜千粒重的 14 个 QTL, 并在置信区间内筛选到 16 个与粒重相关的基因。Liu 等^[10]利用油菜 60K SNP 芯片技术构建高密度遗传图谱, 在 4 种不同环境中, 对种子颜色与细胞壁纤维组分进行 QTL 定位, 共鉴定出与之相

关的 11 个 QTL。另外, SNP 标记也常被应用于逆境胁迫下油菜相关性状的 QTL 定位。Wan 等^[11]对 214 份油菜自交系萌发期的发芽率、根长、鲜重进行了耐盐性评价, 利用 GWAS 共鉴定出 110 个 SNP 位点和 56 个可能与盐胁迫相关的候选基因。侯林涛等^[12]利用高密度 SNP 连锁遗传图谱, 采用复合区间法, 对盐胁迫环境下油菜幼苗的鲜重和干重进行 QTL 定位, 共检测到与盐胁迫相关的 6 个 QTL, 并筛选到耐盐基因 8 个。Zhang 等^[13]在油菜种子苗期利用 SNP 标记对相对根长进行耐镉性检测, 通过 GWAS 找到 4 个与耐镉性状相关的 QTL, 并挖掘出 7 个与耐镉相关的候选基因。关于作物耐铝毒分子机制的研究是当今的热点问题, 缓解和克服作物铝毒害的最有效途径是筛选耐铝基因及培育耐铝性强的作物。植物上获得的第一个耐铝毒基因是 Sasaki 等^[14]用差减杂交技术, 在铝毒胁迫下从小麦(*Triticum aestivum* L.)根尖中分离得到的苹果酸转运蛋白基因 *Ta ALMT1*。Huang 等^[15]从铝敏感水稻(*Oryza sativa* L.)突变体中克隆到一种属于 ABC 家族的蛋白复合体基因 *STAR1*, 该基因是植物耐铝性相关的最重要的转录因子之一。Liu 等^[16]发现了 1 个与铝胁迫相关的 *Alp* 基因, 该基因是编码多药及毒性复合物排出转运蛋白家族 MATE, 且能够促进柠檬酸的分泌从而增强植株的耐铝性。铝毒是影响作物产量的重要因素。尽管前人通过种质资源筛选^[7]、生理指标测定^[5-6]、耐铝基因挖掘^[14-16]等方法揭示铝胁迫下油菜萌发期相关性状的遗传机理, 而利用 SNP 分子标记技术定位铝胁迫下油菜萌发期相关性状 QTL 及筛选抗性基因, 迄今还未见报道。本研究利用油菜 6K SNP 芯片构建高密度遗传连锁图谱, 通过 QTL 作图法对铝胁迫下油菜萌发期的相对发芽势、相对发芽率、相对根长、相对芽长和相对干重进行定位, 并将油菜基因序列与拟南芥序列比对分析, 根据基因功能注解筛选可能与铝胁迫相关的基因, 以期选育和筛选油菜耐

铝品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为 182 份重组自交系(recombinant inbred lines, RILs)及其亲本 10D130 和中双 11 号(简称: ZS11)。该群体以 10D130 为母本, ZS11 为父本进行杂交, 采用单粒传法连续自交 7 代获得。ZS11 是中国农业科学院油料作物研究所选育的常规优质油菜品种, 10D130 是由西南大学油菜工程技术研究中心通过羽衣甘蓝和芥菜型油菜种间杂交, 在后代中选育获得的衍生品系。2017—2018 年在重庆市北碚区歇马镇油菜试验基地种植实验材料, 在油菜初花期套袋自交, 种子完全成熟后收取每株系 5 株正常植株的种子, 自然风干后保存。所有材料均由西南大学油菜工程技术研究中心提供。

1.2 适宜铝胁迫浓度筛选

配制溶液的试剂为 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 设 0(CK)、20、40、60、80、100、120 和 140 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 8 个铝胁迫浓度。分别从 ZS11 与 10D130 两个亲本中选择大小均匀, 籽粒饱满的 20 粒种子进行铝胁迫试验。首先用 75% 浓度乙醇对供试种子消毒, 用蒸馏水清洗 3 次。然后将其均匀摆放在铺有 2 层滤纸的培养皿中, 分别加入 3 mL 不同浓度的铝毒溶液。每处理重复 3 次。每隔 2 d 更换培养皿中滤纸并补充相应浓度的铝胁迫溶液。将培养皿置光照培养箱萌发生长, 箱内温度 25℃, 相对湿度 85%, 光暗时间 16 h/8 h。7 d 后测定其胚根长度, 通过根长筛选耐铝胁迫的适宜浓度。

1.3 重组自交系群体耐铝性筛选

按照浓度筛选时的方法和培养条件对 182 份甘蓝型油菜用筛选出来的铝浓度进行种子萌发胁迫试验。处理 3 d 时统计发芽势, 7 d 时从每个培养皿中随机选择 10 株长势基本一致的幼苗统计发芽率、根长和芽长(下胚轴长), 并将这 10 株幼苗在 105℃下杀青 10 min, 75℃烘干 24 h 后测量干重。用于计算相对发芽势(relative germination vigor, RGV), 相对发芽率(relative germination rate, RGR)、相对根长(relative root length, RRL)、相对芽长(relative bud length, RBL)及相对干重(relative dry weight, RDW)值, 求取平均值。以蒸馏水处理种子萌发作为对照, 且对照和处理均设置 3 次重复。

各性状的相对值=胁迫下的性状测定值/对照性

状测定值。

1.4 数据处理和统计分析

运用 DPS 19.0^[17]对处理后的数据进行方差分析、相关性分析, 运用 SPSS 17.0^[18]对重组自交系的表型数据进行描述性统计, 计算其最大值、最小值、均差、标准差等。

1.5 遗传图谱的构建及 QTL 定位分析

从每个株系 5 个幼嫩植株取叶片混合样 0.15 g, 利用 DNA 提取试剂盒 DP321-03 (天根, 中国北京)提取 DNA 并稀释至 50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ 用于 SNP 标记分析。严格按照 Infinium HD Assay Ultra 操作说明书(Illumina Inc 公司)进行 DNA 样品的预处理(等位扩增、片段化及富集)、与芯片杂交、洗涤、安装流动室、单碱基延伸、染色及包埋。芯片准备好后运用 Illumina HiScan 扫描仪的 iScan Control Software 软件扫描, 然后利用 GenomeStudio genotyping software v2011 软件分析扫描结果, 获取各个样本的 SNP 基因型数据, 并为获得的 SNP 标记命名, 命名方法以 A-9550556 为例, A 表示 SNP, 95505568 代表 GenomeStudio genotyping software 生成的相应 SNP 位点索引号。构建连锁图谱采用 JoinMap 4.0 软件^[19], 选用 Kosambi^[20]函数将重组值转换为图距单位(cM), 取最小阈值 LOD2.0 对所有标记分组, 每个染色体上标记顺序通过两两标记之间最小重组频率计算, 构建用于 QTL 定位的遗传连锁图谱。

采用软件 Map QTL 对相对发芽势、相对发芽率、相对根长、相对芽长、相对干重进行 QTL 定位及效应检测。LOD=3 时, 即认为该区间可能存在一个 QTL。QTL 按照 McCouch 等^[21]的方法命名, 即小写字母“q”加上性状缩写名字、染色体和 QTL 序号。其中 QTL 的序号是指同一条染色体上多个 QTL 按 LOD 值的大小为标准进行排序, 如 *qRGV-A01-1* 表示相对发芽势在 A01 染色体上的第 1 个 QTL。

1.6 候选基因分析

将检测到的 QTL 的置信区间在甘蓝型油菜基因组上查询到对应的序列, 然后与 TAIR 网站上的拟南芥基因组序列进行 Blast 比对, E-value 阈值设置为 E^{-20} ^[22], 筛选出可能与铝胁迫相关的候选基因。

2 结果与分析

2.1 适宜铝胁迫浓度的筛选

由图 1 可以看出, 随着铝胁迫浓度增加, 两亲本的相对根长均呈下降趋势, 但两亲本的下降幅度

图 1 不同浓度铝对油菜相对根长的影响
Fig. 1 Effects of different concentrations of aluminum on root length of rapeseed

不同。铝胁迫浓度为 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 、40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 、60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 时，两亲本的相对根长下降幅度相近，无显著差异。铝胁迫浓度为 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 、140 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 时，10D130 受到严重抑制，部分根和芽萎蔫缩小甚至腐烂死亡，不利于品种间耐铝性差异筛选。但铝胁迫浓度在 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 、100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 时，ZS11 对铝胁迫的耐受能力明显比 10D130 强，根系的生长在亲本间受到的影响不同并能够较好地地区分品种间耐铝性差异。但是油菜在铝胁迫浓度 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 时的根长较 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 时易观察，更有利于后期试验。故选择 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 铝胁迫浓度为油菜萌发期耐铝毒种质资源筛选的适宜浓度。

2.2 亲本及重组自交系群体表型性状分析及相关性分析

在 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 铝胁迫条件下测定 182 份油菜的 5 个性状，并统计其相对值，结果如表 1。各性状变异系数为 13.40%~31.30%，其中相对发芽率变异系数最小，为 13.40%，相对根长的变异系数最大，为 31.30%。由图 2 可以看出，重组自交系群体各性状相对值均连续变化，适合于 QTL 分析。

铝胁迫下，相对发芽势与相对发芽率呈显著正

相关，相关系数为 0.404；相对根长与相对发芽率极显著负相关，相关系数为 0.252；相对干重与相对发芽势显著负相关，相关系数为 0.148。相对芽长与其他相关性状指标相关不显著(表 2)。

2.3 遗传连锁图谱

利用包含 5058 个标记的 6K SNP 芯片对 186 个 RILs 材料进行基因型鉴定，从中筛选出 1897 个高质量多态性的 SNP 标记，约占 37.5%。基于这些标记构建遗传连锁图谱。获得用于 QTL 定位的图谱覆盖甘蓝型油菜基因组 3214.19 cM，平均图距为 1.69 cM。每条染色体长度范围为 86.51~98.72 cM，平均长度为 169.17 cM。染色体标记数目在 24~153 之间，平均数目为 99.84 个。但各染色体分布不均，其中染色体 A03、C03 和 C04 上标记分布较多，分别为 139、147 和 153 个；而染色体 C05、C08 和 C09 上的标记数目较少，分别只有 48、26 和 24 个。此外各染色体标记密度也有较大差异，C04 密度最大，平均间距仅 1.10 cM，而密度最小的 C08 平均间距达 6.13 cM。

2.4 油菜耐铝相关性状 QTL 分析

检测到与铝胁迫相关的 QTL 23 个(图 3 和表 3)，分别位于 A01、A02、A03、A08、A09、A10、C01、C03、C04 和 C08 染色体上，A 基因组与 C 基因组分别有 17 个和 6 个，LOD 值介于 3.00~5.26，能够解释的表型变异为 7.70%~13.10%。

2.4.1 相对发芽势与相对发芽率的 QTL 铝胁迫条件下，检测到 9 个与相对发芽势相关的 QTL，分别位于 A01、A03、A08、C01、C03 染色体，可解释的表型变异为 7.70%~13.10%。其中 *qRGV-A08* 可解释的表型最高，为 13.10%，位于 A08 染色体，加性效应为-0.0402，增效基因来自于 ZS11。检测到 1 个与相对发芽率相关的 QTL，分布在 C04 染色体上，贡献率为 8.00%。

表 1 重组自交系群体及亲本油菜在铝胁迫环境下各性状的分布特征

Table 1 Distribution characteristics of relative traits in recombinant inbred lines and their parents rape under aluminum stress

相关性状 Relative trait	亲本 Parents		RIL 群体 RIL population			
	ZS11	10D130	均值 Mean	极差 Range	标准差 SD	变异系 CV(%)
相对发芽势 RGV	0.982	0.967	1.032**	1.667	0.230	22.3
相对发芽率 RGR	0.983	0.982	1.043**	1.030	0.140	13.4
相对根长 RRL	0.621	0.472	0.465**	0.733	0.146	31.3
相对芽长 RBL	0.955	0.987	0.994**	1.158	0.178	17.9
相对干重 RDW	0.987	0.990	0.920**	1.125	0.175	19.0

**表示在 0.01 水平差异显著。

** Significance at the 0.01 probability level. RGV: relative germination vigor; RGR: relative germination rate; RRL: relative root length; RBL: relative bud length; RDW: relative dry weight.

图 2 最适铝胁迫处理下油菜品系各性状相对值的频率分布图
Fig. 2 Frequency distribution of relative values of various characters of rape lines under optimum aluminum stress
RGV: 相对发芽势; RGR: 相对发芽率; RRL: 相对根长; RBL: 相对芽长; RDW: 相对干重。
RGV: relative germination vigor; RGR: relative germination rate; RRL: relative root length; RBL: relative bud length; RDW: relative dry weight.

表 2 油菜种子铝胁迫处理后各性状间的相关性分析
Table 2 Correlation analysis of various characters of rape seeds treated by aluminum stress

测定指标 Index	相对发芽势 RGV	相对发芽率 RGR	相对根长 RRL	相对芽长 RBL	相对干重 RDW
相对发芽势 RGV	1				
相对发芽率 RGR	0.404**	1			
相对根长 RRL	0.101	0.053	1		
相对芽长 RBL	-0.108	-0.109	0.062	1	
相对干重 RDW	-0.148*	-0.252**	-0.075	-0.020	1

*和**表示各性状间分别在 0.05 和 0.01 水平上显著相关。
* and ** show significant correlations among cultivars at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively. RGV: relative germination vigor; RGR: relative germination rate; RRL: relative root length; RBL: relative bud length; RDW: relative dry weight.

2.4.2 相对根长与相对芽长的 QTL 检测到与相对根长相关的 QTL 4 个, 分布在 A03、A09、C03 染色体上, 可解释的表型变异为 8.00%~8.60%。其中, *qRRL-A09* 可解释的表型最高, 位于 A09 染色体上。此外, 检测到与相对芽长相关的 QTL 有 5 个, 分布在 A03、A08、A09、C08 染色体上, 表型变异为 8.00%~11.90%。其中, 贡献率最大为 11.9%,

qRBL-C08 位于 C08 染色体上, 加性效应值为 0.0115。
2.4.3 相对干重的 QTL 检测到与相对干重相关的 QTL 有 4 个, 分布在 A09、A10 染色体上, 可解释表型变异 7.80%~10.30%。其中, *qRDW-A10-1* 可解释的表型变异最大, 贡献率为 10.30%, 位于 A10 染色体上。

表 3 利用复合区间作图法检测到油菜萌发期在铝胁迫下的 QTL
Table 3 QTL for rape germination under aluminum stress detected by composite interval mapping

性状 Trait	QTL	标记区间 Marker interval	LOD	表观贡献率 PVE (%)	加性效应 Additive effect	置信区间 Confidence interval (cM)
相对发芽势 RGV	<i>qRGV-A01-1</i>	AX-177912497-AX-179306831	4.33	10.90	-0.0282	37.410-43.975
	<i>qRGV-A01-2</i>	AX-182171878-AX-182150271	3.90	9.90	-0.0217	141.657-155.683
	<i>qRGV-A03-1</i>	AX-95507427-AX-177832788	4.20	10.60	0.0064	179.611-222.454
	<i>qRGV-A03-2</i>	AX-95504605-AX-177831059	3.74	9.50	0.0033	93.552-97.113
	<i>qRGV-A03-3</i>	AX-95681175-AX-95665748	3.23	8.20	-0.0236	121.496-124.157
	<i>qRGV-A08</i>	AX-95506362-AX-182175648	5.26	13.10	-0.0402	8.146-12.834
	<i>qRGV-C01-1</i>	AX-182087666-AX-95638042	3.43	8.70	-0.0123	160.226-163.199
	<i>qRGV-C01-2</i>	AX-177910610-AX86223402	3.00	7.70	-0.0072	1.826-6.674
	<i>qRGV-C03</i>	AX-95665064-AX-105309102	4.17	10.50	-0.0022	6.340-10.132
相对发芽率 RGR	<i>qRGR-C04</i>	AX-95636072-AX-182161180	3.12	8.00	0.0329	34.378-38.45
相对根长 RRL	<i>qRRL-A03-1</i>	AX-182087696-X-182147367	3.14	8.00	-0.0349	144.851-146.986
	<i>qRRL-A03-2</i>	AX-95509347-AX-95509401	3.11	8.00	-0.0366	207.579-211.5
	<i>qRRL-A09</i>	AX-95635531-AX-182177329	3.36	8.60	-0.0348	59.898-79.773
	<i>qRRL-C03</i>	AX-95662770-AX-177910217	3.23	8.20	-0.0274	218.487-221.508
相对芽长 RBL	<i>qRBL-A03</i>	AX-95636441-AX-177911244	3.12	8.00	-0.0038	32.513-47.814
	<i>qRBL-A08-1</i>	AX-95663434-AX-95506362	3.34	8.50	-0.0158	2.275-8.146
	<i>qRBL-A09-1</i>	AX-177912380-AX-177829538	4.07	10.30	0.0216	178.878-188.216
	<i>qRBL-A09-2</i>	AX-177832428-AX-182127697	3.53	9.00	0.0224	6.106-15.138
	<i>qRBL-C08</i>	AX-95665611-AX-86227922	4.75	11.90	0.0115	94.661-132.074
相对干重 RDW	<i>qRDW-A09-1</i>	AX-182158057-AX-182154686	3.60	7.80	0.0196	127.938-128.931
	<i>qRDW-A09-2</i>	AX-95682972-AX-182133711	3.05	9.10	0.0067	275.002-280.965
	<i>qRDW-A10-1</i>	AX-182087443-AX-65636575	4.09	10.30	0.0050	129.25-131.783
	<i>qRDW-A10-2</i>	AX-177829985-AX-182146546	3.90	9.90	0.0036	160.157-160.711

RGV: relative germination vigor; RGR: relative germination rate; RRL: relative root length; RBL: relative bud length; RDW: relative dry weight. PVE: phenotypic variance explained. effect.

2.5 候选基因的筛选

根据已经公布的甘蓝型油菜基因组测序结果，将 23 个 QTL 置信区间内的甘蓝型油菜序列与拟南芥的序列比对，并注释和分析候选基因功能，共筛选出 30 个可能与铝毒胁迫相关的候选基因(表 4)。

相对发芽势区间内筛出 12 个与铝毒胁迫相关的候选基因。A01 染色体上的基因 BnaA01g26740D 和 A08 染色体上的基因 BnaA08g26970D 分别与拟南芥基因 AT3G18440 和 AT1G08430 同源，均为多种酸的转运蛋白，主要通过分泌苹果酸来增强植株的耐铝性。A08 染色体上的基因 BnaA08g30510D 和基因 BnaA08g01910D 分别与拟南芥基因 AT1G24620 和 AT2G19600 同源，均参与植物生长发育中非生物胁迫的调控。A03 染色体上的基因 BnaA03g57410D

和 C01 染色体上的 BnaC01g23380D 分别与拟南芥基因 AT3G06130 和 AT3G51490 同源，均与

有害金属的结合或解毒有关，限制植物细胞的氧化损伤。A03 染色体上的基因 BnaA03g39800D、BnaA03g 03270D 与 C03 染色体上的基因 BnaC03g 08920D 分别与拟南芥基因 AT5G61240、AT5G11250 和 AT5G 18370 同源，均可增强植株的抗病性和防御功能。A03 染色体上的基因 BnaA03g13730D 与拟南芥基因 AT2G30140 同源，与乙酰氨基葡萄糖脱乙酰酶有关，响应于抗菌的反应。A03 染色体上的基因 BnaA03g14650D 与拟南芥基因 AT2G31660 同源，在大多数植物组织中表达，参与脱落酸激活反应。

相对发芽势的 QTL 置信区间内找到 1 个与铝毒胁迫相关的候选基因。在 C04 染色体上的基因 BnaC04g12580D 与拟南芥基因 AT2G27780 同源，是一种转录因子，通过诱导耐逆基因的表达增强植株的耐逆性。

图 3 甘蓝型油菜耐铝胁迫 QTL 在 SNP 连锁群上的分布情况

Fig. 3 Distribution of QTL for aluminum tolerance in *Brassica napus* on SNP genetic map

RGV: 相对发芽势; RGR: 相对发芽率; RRL: 相对根长; RBL: 相对芽长; RDW: 相对干重。

RGV: relative germination vigor; RGR: relative germination rate; RRL: relative root length; RBL: relative bud length; RDW: relative dry weight.

相对根长的 QTL 置信区间内找到 7 个与铝毒胁迫相关的候选基因。在 A03 染色体上的基因 BnaA03g54580D 和 C03 染色体上的基因 BnaC03g04310D 与拟南芥基因 AT1G34370 和 AT5G44050 同源, 与有机酸的分泌有关。位于 A09 染色体上的基因 BnaA09g14610D 与拟南芥基因 AT3G43570 同源, 是 GDSL 脂肪酶具有广泛底物特异性的水解酶。位于 A09 染色体上的基因 BnaA09g11920D 拟南芥基因 AT1G64065 同源, 与 LEA 蛋白有关。位于 A03 染色体上的基因 BnaA03g35920D 拟南芥基因 AT3G20750 同源, 属于锌指蛋白, 在调控植物生长发育和应对逆境胁迫过程中发挥着重要的作用。位于 C03 染色体上的基因 BnaC03g65810D 与拟南芥基因 AT4G34710 同源, 是一种精氨酸脱羧酶, 催化多胺生物合成, 参与植物的各种非生物胁迫响应。

相对芽长的 QTL 置信区间内找到 7 个与铝毒胁迫相关的候选基因。在 A03 染色体上的基因 BnaA03g39360D 与拟南芥基因 AT5G02490 同源,

属于热激蛋白。位于 A08 染色体上的基因 BnaA08g01480D 和 A09 染色体上的基因 BnaA09g30790D 与拟南芥基因 AT1G52490 和 AT1G22220 同源, 为 F-box 蛋白家族成员。位于 A09 染色体上的基因 BnaA09g02290D 和 A08 染色体上的基因 BnaA08g28220D 分别与拟南芥基因 AT3G28415 和 AT1G05250 同源, 前者属于 ABC 转运蛋白的多药抗性相关蛋白, 后者是过氧化物酶, 具有较强的防御措施。位于 A09 染色体上的基因 BnaA09g30810D 与拟南芥基因 AT1G22190 同源, 该基因编码一种假定的转录因子, 响应渗透胁迫及非生物胁迫。位于 C08 染色体上的基因 BnaC08g07240D 拟南芥基因 AT1G33110 同源, 属于多药及毒性复合物排出转运蛋白家族。

相对干重的 QTL 置信区间内找到 3 个与铝胁迫相关的候选基因。A09 染色体上的基因 BnaA09g48330D 与拟南芥基因 AT1G49360 同源, 为 F-box 蛋白家族成员, 调控植物的抗逆反应。A10 染色体上

的基因 BnaA10g24620D 与拟南芥基因 AT3G26180 04410 同源, 该基因作为转录激活因子可调节类黄酮生物合成, 增加植物类黄酮的含量, 能增强植物上的基因 BnaA10g25760D 与拟南芥基因 AT5G 抵御逆胁迫的能力。

表 4 甘蓝型油菜基因组中 QTL 置信区间候选基因与拟南芥逆境胁迫相关基因的比对
Table 4 Comparison between QTL confidence interval candidate genes in *Brassica napus* genome and *Arabidopsis* stress related genes

性状	物理区间	甘蓝型油菜基因编号	基因登录号	基因注释	参考文献
Trait	Physical interval	Gene ID in <i>B. napus</i>	Gene accession	Gene annotation	Reference
相对发芽势 RGV	18835423–22795371	BnaA01g26740D	AT3G18440	Aluminum-activated malate transporter 9 (<i>ALMT9</i>)	[14]
	20061150–26605700	BnaA03g57410D	AT3G06130	Heavy metal-associated domain (<i>HMA</i>)	[23]
		BnaA03g39800D	AT5G61240	Leucine-rich repeat (<i>LRR</i>) family protein	[24]
	14408144–15038093	BnaA03g03270D	AT5G11250	Disease resistance protein (<i>TIR-NBS-LRR</i> class)	[25]
		BnaA03g14650D	AT2G31660	Super sensitive to ABA and drought2 (<i>SAD2</i>)	
	11435749–11630658	BnaA03g13730D	AT2G30140	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	[26]
	1012939–2022032	BnaA08g30510D	AT4G19960	K ⁺ uptake permease 9 (<i>KUP9</i>)	[27]
		BnaA08g19190D	AT1G24620	EF hand calcium-binding protein family (<i>CML25</i>)	[28]
	676816–1129401	BnaA08g26970D	AT1G08430	Aluminum-activated malate transporter 1 (<i>ALMT1</i>)	[29]
		BnaC01g23380D	AT3G51490	Metallothionein 3 (<i>MT3</i>)	
BnaC01g01650D		AT4G37270	Response to toxic substance (<i>HMA</i>)		
3925832–4284222	BnaC03g08920D	AT5G18370	Disease resistance protein (<i>TIR-NBS-LRR</i> class) family	[30]	
相对发芽率 RGR	3627529–9882343	BnaC04g12580D	AT2G27780	Transcription factor IIS family protein	[31]
相对根长 RRL	17577932–2005963	BnaA03g35920D	AT3G20750	Zinc ion binding (<i>GATA</i>)	[32]
	24406111–29734315	BnaA03g35900D	AT5G26717	Putative membrane lipoprotein	[33]
		BnaA03g54580D	AT1G34370	Sensitive to proton rhizotoxicity 1 (<i>STOP1</i>)	[15]
	866809–2227131	BnaA09g11920D	AT1G64065	Late embryogenesis abundant (<i>LEA</i>)	[34]
		BnaA09g14610D	AT3G43570	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein	[35]
	51210223–55837858	BnaC03g04310D	AT5G44050	<i>MATE</i> efflux family protein	[16]
		BnaC03g65810D	AT4G34710	Response to osmotic stress (<i>ADC2</i>)	[36]
	3249677–4604524	BnaA03g39360D	AT5G02490	Heat shock protein 70 (<i>Hsp 70</i>) family protein	[37]
相对芽长 RBL	598224–1012939	BnaA08g01480D	AT1G52490	F-box associated interaction domain	[38]
	22081699–23394648	BnaA09g02290D	AT3G28415	ABC transporter family protein	[39]
		BnaA09g30790D	AT1G22220	F-box family protein	[40]
	BnaA09g30810D	AT1G22190	Response to toxic substance (<i>RAP2.4</i>)		
	575326–705822	BnaA08g28220D	AT1G05250	Peroxidase superfamily protein	[41]
	19580994–23049951	BnaC08g07240D	AT1G33110	<i>MATE</i> efflux family protein	[42]
	32408555–33029777	BnaA09g48330D	AT1G49360	F-box family protein	
相对干重 RDW	16531371–16654826	BnaA10g24620D	AT3G26180	Cytochrome P450 proteins	[42]
		BnaA10g25760D	AT5G04410	Regulation of flavonoid biosynthetic process (<i>NAC</i>)	[43]

RGV: relative germination vigor; RGR: relative germination rate; RRL: relative root length; RBL: relative bud length; RDW: relative dry weight.

3 讨论

3.1 表型及 QTL 定位分析

土壤中积累过多的离子态铝对油菜的生长发育具有显著影响,尤其对植物根部损害极大^[44]。研究表明不同作物间或同一作物不同品种间的耐铝性均存在差异^[45],因此适宜的铝胁迫浓度是筛选油菜萌发期耐性资源的关键。根据前人经验^[46],本试验设计了 8 个浓度梯度进行铝胁迫浓度筛选,最后筛选出与郇欢欢等^[7]研究结果相近的 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 铝溶液作为种子萌发期的处理浓度,并以该溶液处理 182 份油菜种子,综合分析相对发芽势、相对发芽率、相对根长、相对芽长、相对干重 5 个性状,这些相对性状均表现出广泛的表型变异,且数据呈现连续性分布,符合数量性状遗传特征,适宜于 QTL 分析。

近年来,分子标记技术多被用于研究作物耐逆性状,在筛选优质、高产、多抗育种中发挥着重要作用^[47]。过去常用于遗传连锁图谱构建的第二代分子标记主要是 RFLP、AFLP、RFLP、ISSR 和 SSR 等,但这些传统的标记构建的高密度遗传连锁图谱是有限的,而且耗时耗力。随着高通量测序技术的发展,SNP 因具有良好的多态性和极高的丰度成为植物遗传育种研究中的理想遗传标记^[48],众多研究者利用 SNP 标记对多种作物进行遗传连锁图谱构建。如周清元等^[49]运用全基因关联分析,研究苯磺隆残留对油菜种子萌发的影响,检测到 16 个 SNP 位点,筛选出了 25 个可能与苯磺隆相关的候选基因。卫银可等^[50]利用 SNP 标记研究了盐胁迫下甘蓝型油菜种子萌发的影响,共检测到 24 个与表型相关的位点。

关于作物响应铝胁迫的分子机理方面,研究者已经利用分子标记在水稻(*Oryza sativa* L.)^[51]、小麦(*Triticum aestivum* L.)^[52]、玉米(*Zea mays* L.)^[53]中检测到多个耐铝毒相关的 QTL 和候选基因,这些结果为多方面挖掘耐铝基因,完善作物耐铝毒评价体系提供一定的参考。本研究利用高密度 SNP 遗传图谱,对铝毒胁迫处理下的 182 份油菜种子的相对发芽势、相对发芽率、相对根长、相对芽长、相对干重进行 QTL 定位分析,共检测到 23 个 QTL,分布于 A01、A02、A03、A08、A09、A10、C01、C03、C04 和 C08 染色体上。其中,在 A03 染色体上同时检测到相对发芽势、相对芽长以及相对根长相关 QTL。同样,A08、A09、C01、C03 染色体上的同一区域均存在 2 个或 2 个以上相对性状的 QTL,即热区现象^[54]。另外,本研究在 A08 染色体 2.275~12.834

cM 处连续检测到相对发芽势 *qRGV-A08* 与相对发芽率位点 *qRBL-A08-1*,在 A03 染色体 179.611~222.454 cM 处检测到的相对发芽势 *qRGV-A03-1* 和相对根长 *qRRL-A03-2* 重叠,表明这些 QTL 具有“一因多效”作用。

3.2 候选基因筛选

植物的耐铝性能主要与外部排斥和内部耐受机制有关。外部排斥主要通过细胞壁与铝的结合形成沉淀物^[55]、质膜对铝的选择透性^[56]、根际周围较高的 pH 值^[57]、根冠细胞分泌出的粘性物及根系磷酸的分泌^[58]等阻止植株吸收大量的铝从而减轻铝毒害,内部耐受机制主要与细胞内有机酸螯合^[59]、逆境蛋白质^[60]、抗铝酶的诱导及酶活性的提高^[61]有关,使植物根系将已吸收的离子态铝转化成结合态的铝,从而缓解体内铝毒害作用。目前,有机酸的分泌被认为是植物耐铝最重要的一个机制^[62]。铝胁迫下植物分泌的有机酸主要有苹果酸、柠檬酸和草酸。本文中,*ALMT1* 和 *MATE* 基因在多个 QTL 区间内出现。在相对发芽势的物理区间内检测到 *ALMT1* 基因,其主要通过分泌的苹果酸来增强植株的抗逆性^[14]。相对根长和相对芽长的物理区间内检测到的 *MATE* 基因属于多药及毒性复合物排出转运蛋白家族,该基因主要通过控制 Al^{3+} 激活柠檬酸的释放来增强植株的耐铝性^[16]。相对根长的物理区间内检测到的 *STO1* 基因,在植株受到铝胁迫时被活化,激活的 *STO1* 蛋白进一步诱导植物体内其他的耐铝基因转录分泌更多的有机酸来增强植株的抗性^[15]。

植物受到逆境胁迫时会激活一系列分子途径并调控相关基因表达和生理反应来适应逆境^[63]。如植物体内会诱导一些酶产生。本文中,在 A09 染色体上的基因 BnaA09g14610D 编码 GDGL 脂肪酶^[35],于 A08 染色体上的基因 BnaA08g28220D 编码过氧化物酶^[41],均在多种植物的防御反应中起作用。此外,植物体内会通过一些激活因子调节某些化合物的生成来维持正常的生理生化代谢。如植物体内生成的黄酮类化合物,通过消耗过剩的磷酸丙糖、ATP 和 NADPH 形成能量安全阀,从而减轻非生物胁迫造成的损伤^[43]。本文在 A10 染色体上筛选到一个 BnaA10g25760D 基因,该基因作为一种转录激活因子调节植物体内黄酮类生物合成。此外还找出多种与逆境胁迫相关的蛋白,如在 A09 染色体筛选到的基因 BnaA09g30790D 编码 F-box 蛋白,该蛋白多数情况下以 SCF 复合体泛素化蛋白降解逆境蛋白的方式调控植物的抗逆反应^[38]。位于 A09 染色体上的基

因 BnaA09g11920D 编码的 LEA 蛋白, 是一组含有大量甘氨酸的亲水性极强蛋白, 对多种非生物胁迫具有很强的抵抗能力^[34]。位于 A03 染色体上的基因 BnaA03g20750 和 BnaA03g39360D 分别编码热击蛋白^[32]和锌指蛋白^[37], 均与植物的逆境胁迫有关。

4 结论

共检测到铝胁迫下 23 个油菜种子萌发相关性状的 QTL, 覆盖 A、C 基因组, 贡献率超过 10% 的有 9 个, 最大贡献率是 13.10%。得到 30 个耐逆相关基因, 这些基因可能主要通过有机酸的分泌、转录因子诱导耐铝基因的表达和抗氧化防御来促进油菜对铝胁迫的抗逆性。

References

- [1] Abedi M, Bartelheimer M, Poschlo P. Aluminium toxic effects on seedling root survival affect plant composition along soil reaction gradients—a case study in dry sandy grasslands. *J Veg Sci*, 2013, 24: 1074–1085.
- [2] Balkovic J, Kollar J, Simonovic V, Zarnovican H. Plant assemblages respond sensitively to aluminium solubility in acid soils. *Community Ecol*, 2014, 15: 94–103.
- [3] Blancaflor E B, Jones D L, Gilroy S. Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiol*, 1998, 118: 159–172.
- [4] Kochian L V, Hoekenga O A, Pineros M A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 459–493.
- [5] Tomonori K, Takashi O, Hiroyuki K, Takuya S, Tetsuo H. Characterization of NADP-isocitrate dehydrogenase expression in a carrot mutant cell line with enhanced citrate excretion. *Plant Soil*, 2003, 248: 145–153.
- [6] 崔雪梅, 简君萌, 李春生. 铝胁迫对油菜根系及叶片生理生化指标的影响. *江苏农业科学*, 2015, 43(12): 107–109.
Cui X M, Jian J M, Li C S. Effect of aluminum stress on the physiological and biochemical index of rapeseed root system and blade. *J Jiangsu Agric Sci*, 2015, 43(12): 107–109 (in Chinese with English abstract).
- [7] 郇欢欢, 叶桑, 王倩, 王刘艳, 王瑞莉, 陈柳依, 唐章林, 李加纳, 周清元, 崔翠. 甘蓝型油菜种子萌发期耐铝毒特性综合评价及其种质筛选. *作物学报*, 2019, 45: 1416–1430.
Gao H H, Ye S, Wang Q, Wang L Y, Wang R L, Chen L Y, Tang Z L, Li J N, Zhou Q Y, Cui C. Screening and comprehensive evaluation of aluminum-toxicity tolerance during seed germination in *Brassica napus* L. *Acta Agron Sin*, 2019, 45: 1416–1430 (in Chinese with English abstract).
- [8] Yang Y, Shen Y, Li S, Ge X. High density linkage map construction and QTL detection for three silique-related traits in *Orychophragmus violaceus* derived *Brassica napus* population. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1512.
- [9] 荐红举, 魏丽娟, 李超, 唐章林, 李加纳, 刘列钊. 基于 SNP 遗传图谱定位甘蓝型油菜千粒重 QTL 位点. *中国农业科学*, 2014, 47: 3953–3961.
- [10] Jian H J, Wei L J, Li C, Tang Z L, Li J N, Liu L Z. QTL mapping of 1000-Seed weight in *Brassica napus* by using the high density SNP genetic map. *Sci Agric Sin*, 2014, 47: 3953–3961 (in Chinese with English abstract).
- [11] Liu L Z, Qu C M, Wittkop B, Yi B, Xiao Y, He Y J, Snowdon R J, Li J N. A high-density SNP map for accurate mapping of seed fibre QTL in *Brassica napus* L. *PLoS One*, 2013, 8: e83052.
- [12] Wan H, Wei Y, Qian J, Qian J, Gao Y, Wen J, Yi B, Ma C, Tu J, Fu T, Shen J. Association mapping of salt tolerance traits at germination stage of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Euphytica*, 2018, 214: 190.
- [13] 侯林涛, 王腾岳, 荐红举, 王嘉, 李加纳, 刘列钊. 甘蓝型油菜盐胁迫下幼苗鲜重和干重 QTL 定位及候选基因分析. *作物学报*, 2017, 43: 179–189.
Hou L T, Wang T Y, Jian H J, Wang J, Li J L, Liu L Z. QTL mapping for seedling dry weight and fresh weight under salt stress and candidate genes analysis in *Brassica napus* L. *Acta Agron Sin*, 2017, 43: 179–189 (in Chinese with English abstract).
- [14] Zhang F, Xiao X, Yan G, Hu J, Cheng X, Li L, Li H, Wu X. Association mapping of cadmium-tolerant QTLs in *Brassica napus* L. *Environ Exp Bot*, 2018, 155: 420–428.
- [15] Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ahn S J, Ryan P R, Del-haize E, Matsumoto H. A wheat gene encoding an alumi-activated malate transporter. *Plant J*, 2004, 37: 645–653.
- [16] Huang C F, Yamaji N, Ma J F. Knockout of a bacterial-type ATP-binding cassette transporter gene, *At STAR1*, results in increased aluminum sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2010, 153: 1669–1677.
- [17] Liu J, Li Y, Wang W, Gai J, Li Y. Genome-wide analysis of MATE transporters and expression patterns of a subgroup of MATE genes in response to aluminum toxicity in soybean. *BMC Genomics*, 2016, 17: 223.
- [18] Tang Q Y, Zhang C X. Data Processing System (DPS) software with experimental design, statistical analysis and data mining developed for use in entomological research. *Insect Sci*, 2013, 20: 254–260.
- [19] Kim Y O, Kang H, Ahn S J. Overexpression of phytochelatin synthase *AtPCS2* enhances salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol*, 2019, 240: 153011.
- [20] Van Ooijen J W. JoinMap® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. *Kyazma BV, Wageningen*, 2006, 33: 1371.
- [21] Kosambi D D. The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugenics*, 1944, 12: 172–175.
- [22] McCouch S R. Report on QTL nomenclature. *Rice Genet Newsl*, 1997, 14: 11–13.
- [23] 荐红举, 肖阳, 李加纳, 马珍珍, 魏丽娟, 刘列钊. 利用 SNP 遗传图谱定位盐、旱胁迫下甘蓝型油菜种子发芽率的 QTL. *作物学报*, 2014, 40: 629–635.
Jian H J, Xiao Y, Li J N, Ma Z Z, Wei L J, Liu L Z. QTL Mapping for germination percentage under salinity and drought stresses in *Brassica napus* L. using a SNP genetic map. *Acta Agron Sin*, 2014, 40: 629–635 (in Chinese with English abstract).

- metal-binding domain from the Menkes copper-transporting ATPase. *Nat Struct Boil*, 1998, 5: 47.
- [24] Rothberg J M, Jacobs J R, Goodman C S, Artavanis-Tsakonas S. slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Gene Dev*, 1990, 4: 2169–2187.
- [25] 刘红娟, 刘洋, 刘琳. 脱落酸对植物逆境性影响的研究进展. *生物技术通报*, 2008, (6): 7–9.
Liu H J, Liu Y, Liu L. Progress of research on the influence of abscisic acid in plant resistance. *Biol Technol Bull*, 2008, (6): 7–9 (in Chinese with English abstract).
- [26] Barb A W, Leavy T M, Robins L I, Guan Z, Six D A, Zhou P, Bertozzi C R, Raetz Christian R H. Uridine-based inhibitors as new leads for antibiotics targeting *Escherichia coli* LpxC. *Biochemistry*, 2009, 48: 3068–3077.
- [27] Bobulescu I A, Moe O W. Na^+/H^+ Exchangers in Renal Regulation of Acid-Base Balance. *Semin Nephrol*, 2006, 5: 334–344.
- [28] McCormack E, Tsai Y C, Braam J. Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs. *Trends Plant Sci*, 2005, 10: 383–389.
- [29] Lee S J, Koh J Y. Roles of zinc and metallothionein-3 in oxidative stress-induced lysosomal dysfunction, cell death, and autophagy in neurons and astrocytes. *Mol Brain*, 2010, 3: 30.
- [30] Van Der Biezen E A, Jones J D G. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biol Sci*, 1998, 23: 454–456.
- [31] Kanai A, Kuzuhara T, Sekimizu K, Natori S. Heterogeneity and tissue-specific expression of eukaryotic transcription factor S-II-related protein mRNA. *J Biochem*, 1991, 109: 674–677.
- [32] Klug A. Zinc finger peptides for the regulation of gene expression. *J Mol Biol*, 1999, 293: 215–218.
- [33] Booth V, Koth C M, Edwards A M, Arrowsmith C H. Structure of a conserved domain common to the transcription factors TFIIIS, elongin A, and CRSP70. *J Biol Chem*, 2000, 275: 31266–31268.
- [34] Hand S C, Menze M A, Toner M, Boswell L, Moore D. LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. *Annu Rev Physiol*, 2010, 73: 115–134.
- [35] Akoh C C, Lee G C, Liaw Y C, Huang T H, Shaw J F. GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog Lipid Res*, 2004, 43: 534–552.
- [36] Sandmeier E, Hale T I, Christen P. Multiple evolutionary origin of pyridoxal-5'-phosphate-dependent amino acid decarboxylases. *Eur J Biochem*, 1994, 221: 997–1002.
- [37] Klundert F A J M, Smulders R H P H, Gijzen M L J. The mammalian small heat-shock protein Hsp20 forms dimers and is a poor chaperone. *Eur J Biochem*, 1998, 258: 1014–1021.
- [38] Skowyra D, Craig K L, Tyers M, Elledge S J, Harper J W. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell*, 1997, 91: 209–219.
- [39] Brûle S, Smart C C. The plant PDR family of ABC transporters. *Planta*, 2002, 216: 95–106.
- [40] Broglie K E, Biddle P, Cressman R, Broglie R. Functional analysis of DNA sequences responsible for ethylene regulation of a bean chitinase gene in transgenic tobacco. *Plant Cell*, 1989, 1: 599–607.
- [41] Schuller D J, Ban N, Huystee R B, McPherson A, Poulos T L. The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure*, 1996, 4: 311–321.
- [42] Gotoh O. Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem*, 1992, 267: 83–90.
- [43] Aida M, Ishida T, Fukaki H. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell*, 1997, 9: 841–857.
- [44] Siecińska J, Nosalewicz A. Aluminium toxicity to plants as influenced by the properties of the root growth environment affected by other co-stressors: a review. *Rev Environ Contam Toxicol*, 2017, 243: 1–26.
- [45] Yang Z M, Sivaguru M, Horst W J. Aluminum tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). *Physiol Plant*, 2001, 110: 72–77.
- [46] Liu Y G, Feng H Q, Sun K. Effects of different aluminum stress on the growth of rice roots. *Bull Bot Res*, 2011, 31: 293–299.
- [47] Hom N H, Becker H C, Möllers C. Non-destructive analysis of rapeseed quality by NIRS of small seed samples and single seeds. *Euphytica*, 2007, 153: 27–34.
- [48] Kim C, Yoon U, Lee G, Park S, Seol Y J, Lee H, Hahn J. An integrated database to enhance the identification of SNP markers for rice. *Bioinformation*, 2009, 4: 269.
- [49] 周清元, 王倩, 叶桑, 崔明圣, 雷维, 郇欢欢, 赵愉风, 徐新福, 唐章林, 李加纳, 崔翠. 苯磺隆胁迫下油菜萌发期相关性状的全基因组关联分析. *中国农业科学*, 2019, 52: 399–413.
Zhou Q Y, Wang Q, Ye S, Cui M S, Lei W, Gao H H, Zhao Y F, Xu X F, Tang Z L, Li J N, Cui C. Genome-wide association analysis of tribenuron-methyl tolerance related traits in *Brassica napus* L. under germination. *Sci Agric Sin*, 2019, 52: 399–413 (in Chinese with English abstract).
- [50] 卫银可. 甘蓝型油菜种子萌发期耐盐性状的关联分析. 华中农业大学硕士学位论文, 湖北武汉, 2016.
Wei Y K. Genome-wide Association Mapping of Salt Tolerance Trait in the Germination Period in *Brassica napus* L. MS Thesis of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [51] 薛永. 水稻耐铝毒 QTL 分析与精细定位. 南京农业大学博士学位论文, 江苏南京, 2006.
Xue Y. QTL Analysis and Fine Mapping for Aluminum Tolerance in Rice. PhD Dissertation of Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu, China, 2006 (in Chinese with English abstract).
- [52] Riede C R, Anderson J A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. *Crop Sci*, 1996, 36: 905–909.
- [53] Sibov S T, Gaspar M, Silva M J. Two genes control aluminum tolerance in maize: genetic and molecular mapping analyses. *Genome*, 1999, 42: 475–482.
- [54] Cartwright D A, Brady S M, Orlando D A, Sturmfels B, Benfey P N. Reconstructing spatiotemporal gene expression data from partial observations. *Bioinformatics*, 2009, 25: 2581–2587.
- [55] Akazawa T, Hara-Nishimura I. Topographic aspects of biosynthesis, extracellular secretion, and intracellular storage of proteins in plant cells. *Annu Rev Plant Physiol*, 1985, 36: 441–472.
- [56] Clarkson D T. The effect of aluminium and some other trivalent metal cations on cell division in the root apices of *Allium cepa*.

- Ann Bot*, 1965, 29: 309–315.
- [57] Ryan P R, Reid R J, Smith F A. Direct evaluation of the Ca^{2+} -displacement hypothesis for Al toxicity. *Plant Physiol*, 1997, 113: 1351–1357.
- [58] Degenhardt J, Larsen P B, Howell S H. Aluminum resistance in the *Arabidopsis* mutant alr-104 is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. *Plant Physiol*, 1998, 117: 19–27.
- [59] Shen R, Ma J F. Distribution and mobility of aluminium in an Al-accumulating plant, *Fagopyrum esculentum* Moench. *J Exp Bot*, 2001, 52: 1683–1687.
- [60] Lindberg S, Szynekier K, Greger M. Aluminum effects on transmembrane potential in root cells of spruce in relation to pH and growth temperature. *J Plant Nutr*, 1998, 21: 975–985.
- [61] Watanabe T, Osaki M, Tadano T. Effects of nitrogen source and aluminum on growth of tropical tree seedlings adapted to low pH soils. *Soil Sci Plant Nutr*, 1998, 44: 655–666.
- [62] 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. *Plant Physiol*, 2003, 132: 2205–2217.
- [63] 付三雄, 周晓婴, 戚存扣. 苯磺隆对甘蓝型油菜的杀雄效果及其对靶标 ALS 活性的影响. *江西农业学报*, 2019, 31(2): 8–12.
- Fu S X, Zhou X Y, Qi C K. Male-sterile-inducing efficiency of tribenuron-methyl and its effect on activity of acetolactate synthase in *Brassica napus* L. *Acta Agric Jiangxi*, 2019, 31(2): 8–12 (in Chinese with English abstract).