

李启彪,李路,胡承孝,等. 冬小麦对过量钼胁迫的代谢响应与耐钼机制[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(5): 54-61.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.05.008

冬小麦对过量钼胁迫的代谢响应与耐钼机制

李启彪¹, 李路^{1,2}, 胡承孝¹, 谭启玲¹, 孙学成¹

1. 华中农业大学资源与环境学院/微量元素研究中心, 武汉 430070;

2. 西藏自治区农牧科学院农业质量标准与检测研究所, 拉萨 850032

摘要 以正常钼与过量钼水平水培种植的冬小麦为试验材料, 通过分析过量钼供给下小麦亚细胞组分钼含量及叶片代谢物的变化来探究冬小麦耐受过量钼的生理机制。结果显示, 在过量钼水平下, 根系亚细胞组分细胞壁、可溶性部分、细胞器、原生质体/叶绿体钼含量分别是地上部的 219、38、25 和 62 倍; 根部和地上部的可溶性部分中钼的积累比例分别为 71.85% 和 88.54%; 在过量钼胁迫下小麦叶片苹果酸、延胡索酸的含量分别上升了 2.08 倍和 2.07 倍, β -丙氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-谷氨酰胺的含量分别上升了 2.78、1.89、1.67 和 1.91 倍。结果表明, 根系具有阻控过量钼向地上部运输的作用, 植物液泡是过量钼存储的主要部位, 过量胁迫下产生的有机酸、氨基酸可能在液泡中与钼螯合以降低其生物毒性, 增强小麦的耐过量钼能力。

关键词 钼胁迫; 冬小麦; 亚细胞; 钼污染; 代谢组学分析; 植物修复; 耐受机制; OPLS-DA

中图分类号 S 512.11; S 572 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)05-0054-08

钼是对人类、动物和植物正常生长发育至关重要的一种营养元素, 其参与合成的钼辅因子在生物代谢活动中起着不可替代的作用, 但生物对钼的需求量很低, 且从缺乏到适宜的浓度范围非常小^[1]。岩石圈中钼的平均含量为 2.3 mg/kg, 但钼矿的开采活动产生的尾矿与废渣会增加钼在环境中的浓度, 并在矿区附近造成土壤、地下水和农田污染^[2-5]。现普遍认为当土壤中钼含量高于 10 mg/kg 即会造成污染, 但在我国的葫芦岛市、赤峰市、闽东地区, 美国的加利福尼亚州以及加拿大哥伦比亚省等地区的钼矿区已发生的钼污染都远超该限值, 如我国葫芦岛矿区周边果园土壤的平均钼含量高达 720.61 mg/kg^[6-10]。

大量研究表明, 过量的钼会使植物受到氧化胁迫进而影响生长和产量^[11-12], 会扰乱类囊体排列并抑制光合作用^[13], 还会引起其他矿质营养元素如 Mn、Mg 的缺乏等症^[11]。同时许多植物对高浓度的钼有着较强的耐受能力, 即使在受到钼污染的环境下也没有表现出毒性性状。据报道, 黑麦草、玉米即使在含有 1 000 mg/kg 钼的土壤中也正常生长^[14], 白菜幼苗暴露在 10 mmol/L 的钼酸钠下时

叶绿素含量也没有明显变化^[15], 而小麦在土壤钼含量高达 1 000 mg/kg 下长势与产量也不受明显影响, 说明小麦也拥有较强的耐钼能力^[16-17]。

小麦作为世界产量最高、分布最广的粮食作物, 部分小麦产区已有土壤钼污染的报道, 如我国陕西省洛南县黄龙浦钼矿区的小麦农田土壤钼含量可达 193 mg/kg^[18], 但目前过量钼胁迫对小麦生长的影响及其机制尚未明确。本研究以小麦作为试验材料, 研究过量钼在小麦中的亚细胞分布并结合 LC-MS 代谢组学分析钼胁迫下的差异代谢物, 探明小麦对土壤钼污染的代谢响应和耐受机制, 以为植物耐受过量钼胁迫的机制提供理论支持, 并为植物修复土壤钼污染提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为华中农业大学微量元素研究中心自繁留种的冬小麦品种 97014, 在前期的土壤盆栽试验中发现小麦在钼含量 0.15 mg/kg 至 1 000 mg/kg 的高钼环境下也能保持产量与长势未显著下降^[16], 因此设置了正常钼水平 (1 μ mol/L) 和过量钼水平

收稿日期: 2021-02-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(41171240; 42077095)

李启彪, E-mail: li-qibiao@qq.com

通信作者: 孙学成, E-mail: sxccn@mail.hzau.edu.cn

(1 mmol/L)2个处理,以钼酸铵 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 为肥源,作4次重复。

采用营养液培养小麦,其中大量元素采用的Hogland营养液含有4 mmol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、6 mmol/L KNO_3 、1 mmol/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、2 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;微量元素采用的无钼Arnon营养液含有100 $\mu\text{mol/L}$ EDTA-Fe、46.2 $\mu\text{mol/L}$ H_3BO_3 、9.1 $\mu\text{mol/L}$ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.8 $\mu\text{mol/L}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和0.3 $\mu\text{mol/L}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,营养液均使用去离子水配制(电阻率 $>18.25 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$,25 $^\circ\text{C}$)。

所用试剂均为分析纯级别,试验所有器皿均用2 mol/L HNO_3 浸泡48 h,再用去离子水冲洗干净。质谱级乙腈、色谱级甲醇均购于Merck(Dannstadt, Gemany),甲酸购于CNW(Duesseldorf, Germany),其余试剂均为分析纯,过程所用水均为去离子水。

1.2 培养方案

小麦种子用0.5%次氯酸钠溶液消毒30 min后用去离子水冲洗干净,播于湿润的医用纱布上25 $^\circ\text{C}$ 恒温催芽。待芽长约1 cm时,于2015年10月18日选择大小相对一致的小麦幼苗25株,移植于盛有10 L营养液的方盒并放置在人工气候室中,人工气候室条件为20 $^\circ\text{C}$ /18 $^\circ\text{C}$ (16 h/8 h),光照强度为100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。首先将小麦幼苗用1/2浓度营养液培养5 d,再用全量浓度营养液培养,每5 d更换1次营养液。正常钼水平(1 $\mu\text{mol/L}$)培养15 d后,设正常钼水平(1 $\mu\text{mol/L}$)和过量钼水平(1 mmol/L)2个处理,继续培养10 d后收获测定地上部、地下部及其亚细胞的钼含量,并对叶片进行代谢组学分析。

1.3 钼含量的测定方法

小麦亚细胞钼含量的测定在Liu等^[19]的方法基础上进行修改,称取0.5 g鲜样于液氮预冷的研钵中,用5 mL提取液将其研磨成匀浆,提取液使用1 mmol/L二硫赤藓糖醇、50 mmol/L Tris-HCl、5.0 mmol/L抗坏血酸、250 mmol/L蔗糖和10 g/L聚乙烯吡咯烷酮(PVP),并调节pH值至7.5。使用240 μm 的尼龙网过滤所得残渣为细胞壁部分,将上清液在4 448 r/min下离心20 min,所得残渣为地上部的叶绿体或是地下部的原生质体,将后续上清液在10 896 r/min下继续离心35 min,所得残渣为细胞膜以及细胞器组分,而最后的上清液为可溶性部分,该过程所有步骤均保持在4 $^\circ\text{C}$ 下进行。将各

亚细胞组分与混酸($\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4 = 4 : 1, \text{V/V}$)混合后在180~230 $^\circ\text{C}$ 下消化,用去离子水转移定容并过滤后使用石墨炉(日立,Z-2000)进行钼含量的测定。

1.4 代谢产物的测定方法

本试验代谢产物的测定采用LC-MS(Ultimate 3000LC, Thermo)平台,色谱柱为Hypergod C18(100 mm \times 4.6 mm,3 μm)。色谱分离条件设置为:流速0.3 mL/min、柱温40 $^\circ\text{C}$;流动相组成为A:水+0.1%甲酸,B:乙腈+0.1%甲酸;流动相的梯度洗脱程序见表1。进样量为4 μL ,自动进样器的温度为4 $^\circ\text{C}$ 。

表1 流动相梯度

Table 1 The gradient of mobile phase

时间/min Time	流动速度/ (mL/min) Flow rate	流动相 A/% Mobile phase A	流动相 B/% Mobile phase B
0	0.30	95.0	5.0
2	0.30	95.0	5.0
12	0.30	5.0	95.0
15	0.30	5.0	95.0
17	0.30	95.0	5.0

质谱参数:正模式,加热器温度300 $^\circ\text{C}$,辅助气流速15 mL/min,扫描气体流速1 mL/min,鞘气流速45 mL/min,喷雾电压3.0 kV,毛细管温度350 $^\circ\text{C}$,透镜电压水平30%;负模式,加热器温度300 $^\circ\text{C}$,辅助气流速15 mL/min,扫描气体流速1 mL/min,鞘气(N_2)流速45 mL/min,喷雾电压3.2 kV,毛细管温度350 $^\circ\text{C}$,透镜电压水平60%。

1.5 数据处理

使用Microsoft Excel 2010进行数据整理计算,Origin 2018绘图,SPSS 20.0进行方差分析,各处理平均值的多重比较采用独立样本 t 检验($P < 0.05$)。

LC-MS数据使用SIEVE软件进行预处理后使用Microsoft Excel 2010软件进行归一化处理和后期编辑,并将最终数据组织成二维数据矩阵,其中包含有变量(rt_mz)、相对分子质量(Comp MW)、观察量(样本)和峰强。此项目样本在正模式下共获得2 146个特征峰,在负模式下共得到1 394个特征峰,将编辑完成的数据矩阵导入SIMCA-P(13.0)软件进行后续分析,将得到的差异代谢物导入MetaboAnalyst 3.0以获得差异代谢物参与的代谢通路。

2 结果与分析

2.1 钼污染对冬小麦亚细胞中钼含量的影响

为了解正常与过量钼水平下冬小麦各个亚细胞的钼含量及分布,对根系及地上部样品进行了亚细胞分级,结果表明,正常钼水平(1 $\mu\text{mol/L}$)下小麦根系亚细胞钼含量表现为可溶性部分>细胞膜+细胞器>原生质体>细胞壁;过量钼(1 mmol/L)水平下则表现为可溶性部分>细胞壁>原生质体>细胞膜+细胞器。2个钼水平下钼在可溶性部分中的含量及分配比例均为最高(图1)。

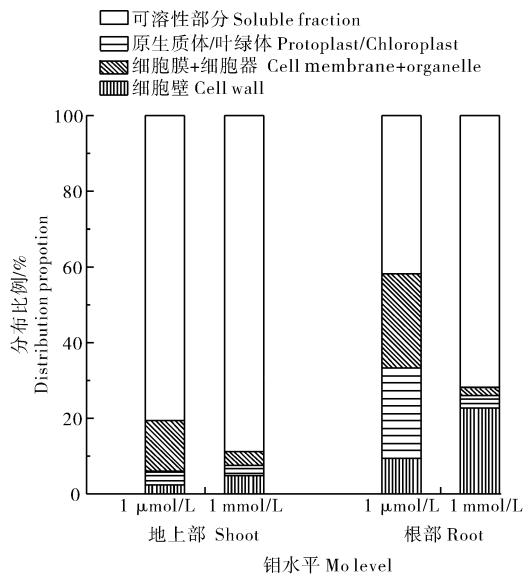


图1 冬小麦亚细胞中钼的分布

Fig.1 Subcellular distribution of molybdenum in winter wheat

由表2可知,当培养介质中的钼含量从1 $\mu\text{mol/L}$ 上升到1 mmol/L时,根部可溶性部分、细胞壁、细胞膜+细胞器及原生质体中的钼含量分别上升了1 300、1 815、62、105倍,其中可溶性部分的钼含量最高,达533.0 mg/kg;从钼在各亚细胞组分所占比例来看,在钼过量条件下,钼在细胞壁和可溶性部分分配比例分别增加了13.3%和30.2%,总体占比可达22.8%和71.8%,可见过量钼水平下小麦根系中绝大部分的钼存储在液泡和细胞壁中,而液泡则是最主要的储存部位。

小麦地上部亚细胞钼含量在正常钼水平(1 $\mu\text{mol/L}$)下表现为:可溶性部分>细胞膜+细胞器>叶绿体>细胞壁;过量钼水平(1 mmol/L)下表现为:可溶性部分>细胞壁>细胞膜+细胞器>叶绿体;2个钼水平下钼在可溶性部分中的含量均为最高。当介质(营养液)中的钼含量从1 $\mu\text{mol/L}$ 上升到1 mmol/L时,可溶性部分、细胞壁、细胞膜+细胞器及叶绿体中的钼含量分别上升了19、35、5、12倍,也是可溶性部分中钼含量最高,达13.76 mg/kg;从钼在各亚细胞组分所占比例来看,在过量钼水平下,钼在可溶性部分的分配比例增加了8.0%,总体占比高达88.5%。由此可知,在2个钼水平下钼小麦地上部吸收的钼均主要存储在液泡中,其中过量钼水平下在液泡中的分配比例要更高。

2.2 过量钼对冬小麦叶片代谢物的影响

为进一步分析过量钼对冬小麦代谢的影响,采

表2 冬小麦亚细胞中的钼含量

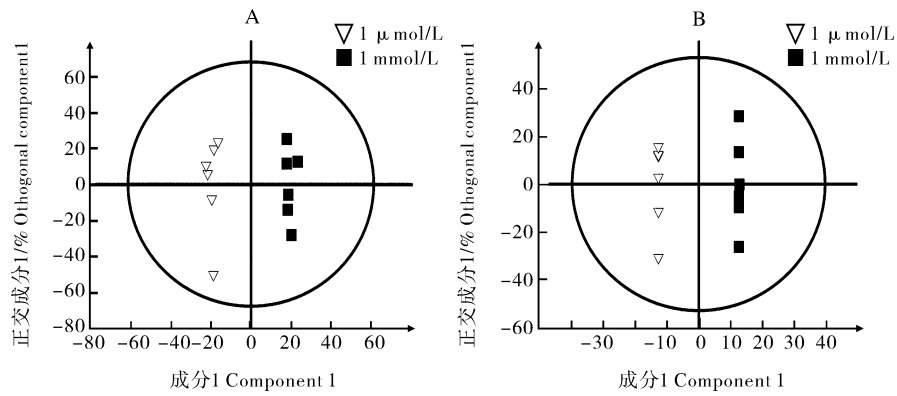
Table 2 Subcellular Mo content in winter wheat

mg/kg

项目 Item	处理 Treatment	细胞壁 Cell wall	原生质体/叶绿体 Protoplast/ Chloroplast	细胞膜+细胞器 Cell membrane+ organelle	可溶性部分 Soluble fraction
根部 Root	1 $\mu\text{mol/L}$	0.093	0.235	0.246	0.410
	1 mmol/L	168.810	24.690	15.340	533.000
地上部 Shoot	1 $\mu\text{mol/L}$	0.022	0.033	0.123	0.734
	1 mmol/L	0.771	0.401	0.609	13.760

用LC-MS方法分析了正常钼(1 $\mu\text{mol/L}$)和过量钼(1 mmol/L)处理下冬小麦叶片代谢物的变化,使用OPLS-DA模型筛选差异代谢物,在正模式下共获得3个主成分与1个正交成分, $R_x^2 = 0.67$, $R_y^2 = 0.99$, $Q^2 = 0.58$;在负模式下共获得6个主成分与1个正交成分, $R_x^2 = 0.873$, $R_y^2 = 1$, $Q^2 = 0.756$,参数

中的 R_y^2 为模型的解释率,而 Q^2 为模型的预测率,一般而言该参数大于0.4时即可说明该模型可靠(图2)。差异代谢物的筛选标准为:VIP(variable importance in the projection)值>1、 $P < 0.05$ 、变化倍数(fold change) ≥ 1.50 或 ≤ 0.67 ,筛选获得的差异性代谢物数据如表3所示。



A: 正模式; B: 负模式。A: Positive mode; B: Negative mode.

图 2 正常钼和过量钼两组处理的 OPLS-DA 得分图

Fig.2 Score plots of OPLS-DA of normal molybdenum and excess molybdenum treatment

表 3 过量钼下的冬小麦的差异代谢物

Table 3 Discriminatory metabolites of winter wheat under excess-Mo

化学种类 Chemical taxonomy	物质(模式) Matter (Mode)	相对分子质量 Comp MW	VIP	t-Test	变化倍数 Fold change
氨基酸及其衍生物 Amino acids and amino acids derivatives	β-丙氨酸 β-Alanine(+)	89.05	1.37	0.039	2.78
	鸟氨酸 Ornithine(+)	132.09	1.46	0.025	1.58
	L-丝氨酸 L-Serine(+)	105.04	1.37	0.040	1.89
	L-谷氨酰胺 L-Glutamine(+)	146.07	1.65	0.008	1.91
	γ-氨基丁酸 γ-Aminobutyric acid(+)	103.06	1.63	0.009	1.67
	谷氨酸 Glutamate(-)	147.05	1.66	0.045	0.29
	L-苏氨酸 L-Threonine(+)	119.06	1.44	0.028	1.67
有机酸 Organic acids	L-磷脂酸 L-Phosphatidic acid(+)	596.37	1.48	0.023	1.70
	柠羧酸 Citramalic acid(-)	148.04	1.65	0.045	1.67
	苹果酸 Malic acid(-)	134.02	1.79	0.027	2.08
	延胡索酸 Fumaric acid(-)	116.01	1.84	0.021	2.07
	酒石酸 Tartaric acid(-)	150.02	1.65	0.046	0.65
	对香豆酸 p-Coumaric acid(-)	164.05	2.07	0.007	2.65
脂肪酸及其衍生物 Fatty acids and fatty acid derivatives	9S-羟基-10E,12Z,15Z-十八碳三烯酸 9(S)-HOTrE(+)	294.22	1.75	0.004	1.85
	亚油酰胺 Linoleamide(+)	279.26	1.45	0.027	1.93
	油酸酰胺 Oleamide(+)	281.27	1.41	0.034	0.64
	单酰基甘油 MG(0:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/0:0)(+)	350.24	1.54	0.017	1.85
	单酰基甘油 MG(0:0/18:3(6Z,9Z,12Z)/0:0)(+)	350.24	1.54	0.017	1.85
	单酰基甘油 MG(18:0/0:0/0:0)(+)	358.31	1.47	0.024	1.54
	单酰基甘油 MG(0:0/20:3(5Z,8Z,11Z)/0:0)(+)	380.29	1.47	0.024	1.54
	单酰基甘油 MG(0:0/22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)/0:0)(-)	404.29	1.71	0.037	3.04
	cis-9-棕榈油酸 cis-9-Palmitoleic acid(-)	254.22	2.69	0	0.53
	亚麻油酸 Stearidonic acid(-)	276.21	2.39	0.001	0.40

续表 3 Continued Table 3

化学种类 Chemical taxonomy	物质(模式) Matter(Mode)	相对分子质量 Comp MW	VIP	t-Test	变化倍数 Fold change
磷脂 Phospholipids	二酯酰甘油 DG(14:1(9Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)(+)	610.46	1.76	0.004	1.88
	二酯酰甘油 DG(18:3(9Z,12Z,15Z)/16:1(9Z)/0:0)(+)	588.47	1.53	0.017	1.67
	二酯酰甘油 DG(14:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0)(+)	586.46	1.58	0.013	1.77
	磷脂酰甘油 PG(13:0/15:1(9Z))(+)	664.43	1.57	0.014	2.11
	磷脂酰甘油 PG(15:1(9Z)/0:0)(+)	468.25	1.64	0.009	2.01
	磷脂酰甘油 PG(15:0/13:0)(+)	666.45	1.71	0.005	2.13
	磷脂酰甘油 PG(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/0:0)(-)	504.25	1.94	0.014	0.52
	磷脂酰甘油 PG(18:3(9Z,12Z,15Z)/0:0)(-)	506.26	2.58	0	0.45
	磷脂酰甘油 PG(18:2(9Z,12Z)/0:0)(-)	508.28	1.73	0.034	0.55
	磷脂酰甘油 PG(16:0/0:0)(-)	484.28	2.49	0	0.53
	磷脂酰甘油 PG(18:1(9Z)/0:0)(-)	510.30	1.73	0.034	0.34
	磷脂酰乙醇胺 LysoPE(0:0/20:3(11Z,14Z,17Z))(-)	503.30	1.89	0.017	0.66
	核苷酸 Nucleotide	次黄嘌呤 Hypoxanthine(+)	136.04	1.86	0.001
环磷酸鸟苷 cGMP(-)		345.05	2.10	0.006	0.64
环磷酸腺苷 cAMP(-)		329.05	1.86	0.020	0.57
2-脱氧-D-核糖 2-Deoxy-D-ribose(-)		134.06	1.87	0.019	2.35
其他 Others	皮质脂酮 Corticosterone(+)	346.21	1.97	0	2.86
	雄甾酮 Androsterone(+)	290.22	1.86	0.001	3.59
	吲哚乳酸 Indolelactic acid(+)	205.08	1.56	0.014	2.97
	愈伤激素 Traumatol(+)	212.14	2.16	0	1.74
	烯酸 Colnelenic acid(+)	292.20	1.87	0.001	2.07
	磷酸胆碱 Phosphocholine(+)	183.07	1.68	0.007	1.62
	创伤激素 Traumatol(-)	212.14	2.67	0	1.50

正常钼与过量钼小麦叶片共鉴定出 48 个差异代谢物,其中有 34 个代谢物上调,14 个代谢物下调。代谢物中大部分的氨基酸、有机酸、脂肪酸及其衍生物均有显著上调,而磷脂和核苷酸类代谢物则是部分下调,在 34 种上调代谢物中包含 6 种氨基酸

及其衍生物,5 种有机酸。将得到的差异代谢物导入 MetaboAnalyst 3.0 软件后得到这些差异代谢物所处的代谢通路(图 3),可发现过量钼促进了冬小麦叶片中氨基酸的合成与代谢过程,并促进了 TCA 循环中有机酸的合成过程。

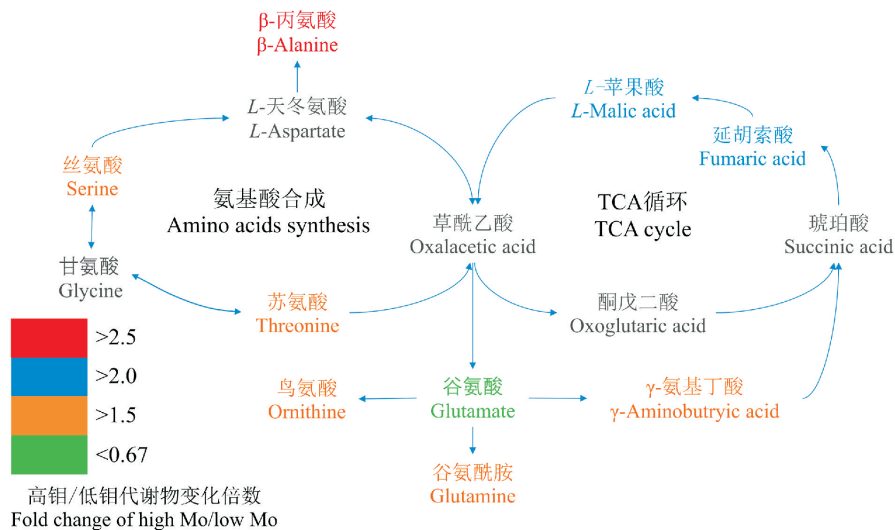


图 3 过量钼胁迫下的冬小麦叶片的代谢通路分析

Fig.3 Discriminatory metabolites of winter wheat under excess-Mo

3 讨论

植物对钼的耐性较强,如小麦、玉米在钼含量 1 000 mg/kg 的土壤中生长,叶片中的钼含量分别可达 4 000 mg/kg 和 400 mg/kg,而作物生长也未表现出显著抑制^[15-17,20]。较早的研究发现,在钼污染环境,植物根系钼含量通常远高于地上部,如在土壤钼含量 1 000 mg/kg 时,小麦根部钼含量是地上部的 3 倍,而在玉米、大豆、黑麦草等植物上也能观察到相同的趋势^[14-16]。本试验基于前期土壤盆栽试验中发现小麦在钼添加量高达 1 000 mg/kg 的环境下也能维持正常产量的结果^[16],设置了 100 mg/L 的过量钼水培试验以探究小麦的耐钼机制,结果表明在过量钼水平下,过量钼处理大幅增加了小麦根系亚细胞组分钼含量,细胞壁、可溶性部分、细胞器、原生质体/叶绿体的钼含量分别是地上部各亚细胞组分的 219、38、25 和 62 倍。前人在大豆、玉米、油菜等植物上的研究也表明,高钼介质中生长的作物根系钼含量分别能达到地上部钼含量的 49、3 和 5 倍^[15,21-22]。这些结果说明小麦根部在过量钼环境下能够吸收并积累更多的钼,这是阻止过量钼向地上部迁移的第一道屏障。

将过量金属进行亚细胞区隔化以降低游离过量金属离子是植物重要的耐受机制之一,一些植物会将吸收的过量金属区隔在细胞壁中,如茶树能在过量钼环境下将 69.8% 的钼固定在细胞壁中,并将其与果胶和半纤维素结合^[23];而液泡则是植物区隔金属离子的另一个重要部位,植物在吸收过量金属离子后能将其与氨基酸、有机酸和植物螯合素结合后转运储存在细胞的液泡中^[24],如 Vögeli-Lange 等^[25]报道了暴露在高钼环境下烟草细胞中的钼能与植物螯合素络合后转运至液泡中。本研究发现,正常钼水平下的钼在冬小麦根系及地上部的可溶性部分中分配比例分别为 41.6% 和 80.5%,当钼水平从正常(1 $\mu\text{mol/L}$) 上升到过量(1 mmol/L) 时,钼在根系及地上部的可溶性部分分配比例分别上升了 30.2 和 8.0 个百分点,达到 71.8% 和 88.5%,说明无论是在正常钼水平还是过量钼水平下,液泡都是冬小麦中钼的主要储存部位,且过量钼水平下钼在液泡中的储存比例更大。Xu 等^[26]在大豆上的研究结果也显示,当营养液质量浓度为 1 mg/L 时,钼在根系及地上部可溶性部分中的分配比例为 26.4% ~ 46.3%,当营养液钼质量浓度从 1 mg/L 上升到 100 mg/L 时,钼在大豆根系及叶片可溶性部分中储存

比例达到 66.3% ~ 72.2%。Qin 等^[21]在油菜上的研究表明,当营养液中钼浓度从 1 $\mu\text{mol/L}$ 上升到 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,钼在根系液泡中的分配比例从 47.3% 上升到 59.5%,在叶片液泡中的分配比例从 41.2% 上升到 62.8%。综上得出结论,小麦在面对过量钼胁迫时能将吸收的过量钼固定在根部以防止其向地上部运输,并把大部分的钼转运储存在根部的液泡中,相比于其他作物,小麦要更依赖于液泡对过量钼的区隔作用。

液泡是细胞中各种有机酸、氨基酸及各种金属离子的存储中心,氨基酸、有机酸、植物螯合素等有机物通常会在液泡中与游离金属离子发生螯合作用,这是植物耐受重金属的另一个重要机制^[27]。代谢组分析结果表明,在钼胁迫下冬小麦中氨基酸的合成代谢和 TCA 循环过程被显著促进,参与该过程的苹果酸、延胡索酸含量分别上升了 2.08 倍和 2.07 倍,而许多有机酸如柠檬酸、苹果酸、延胡索酸、草酸等能够和 Mo、Ni、Cd 等金属离子螯合^[28-31],另外本研究还发现过量钼处理使小麦的 β -丙氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-谷氨酰胺的含量分别上升了 2.78、1.89、1.67 和 1.91 倍,已有大量研究表明植物体内的脯氨酸、谷氨酰胺等氨基酸能螯合 Zn、Cd 等金属离子^[27,32-33];还有报道表明,钼与 L-丝氨酸、L-丙氨酸、L-苏氨酸、L-天冬氨酸等氨基酸在体外反应体系下能形成配合物^[34]。因此,我们推测小麦在过量钼环境下增加合成的延胡索酸、苹果酸、L-丝氨酸、L-丙氨酸和 L-苏氨酸能在液泡中与钼酸根离子反应形成络合物,从而降低过量钼对小麦细胞的毒害。

在过量钼环境下,小麦亚细胞中的钼主要分布于细胞壁和可溶性部分,且根部的液泡在过量钼的固持过程中起主要作用,过量钼促进了小麦氨基酸合成代谢与 TCA 循环过程,该路径中多种氨基酸(β -丙氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-谷氨酰胺)和有机酸(苹果酸、延胡索酸)的含量都显著增加,推测这些氨基酸与有机酸能与钼进行络合并固定在液泡中,从而增强小麦对过量钼的耐受能力。

参考文献 References

- [1] MCBRIDE M B, RICHARDS B K, STEENHUIS T, et al. Molybdenum uptake by forage crops grown on sewage sludge-amended soils in the field and greenhouse[J]. Journal of environmental quality, 2000, 29(3): 848-854.
- [2] KAISER B N, GRIDLEY K L, NGAIRE BRADY J, et al. The role of molybdenum in agricultural plant production[J]. Annals

- of botany, 2005, 96(5):745-754.
- [3] KARGAR M, KHORASANI N, KARAMI M, et al. Study of aluminum, copper and molybdenum pollution in groundwater sources surrounding (Miduk) Shahr-e-Babak copper complex tailings dam[J]. International journal of environmental and ecological engineering, 2011, 5(4):278-282.
- [4] SMEDLEY P L, KINNIBURGH D G. Molybdenum in natural waters: a review of occurrence, distributions and controls[J]. Applied geochemistry, 2017, 84:387-432.
- [5] 王小庆, 曲洋, 王国峰, 等. 两种有机废弃物对钼矿区农田污染土壤的修复效果研究[J]. 地学前缘, 2019, 26(6):89-94. WANG X Q, QU Y, WANG G F, et al. Molybdenum immobilization efficiency of two kinds of organic waste materials for molybdenum contaminated agricultural soils[J]. Earth science frontiers, 2019, 26(6):89-94 (in Chinese with English abstract).
- [6] AUBÉ B C, STROIAZZO J. Molybdenum treatment at Brenda mines[C]//Proceedings of the 5th International Conference on Acid Rock Drainage. Denver, Colorado, USA; Society for Mining, Metallurgy, and Exploration (SME), 2000.
- [7] LIAN J J, XU S G, CHANG N B, et al. Removal of molybdenum (VI) from mine tailing effluents with the aid of loessial soil and slag waste[J]. Environmental engineering science, 2013, 30(5):213-220.
- [8] ZHANG Y Q, AMRHEIN C, FRANKENBERGER W T Jr. Effect of arsenate and molybdate on removal of selenate from an aqueous solution by zero-valent iron[J]. Science of the total environment, 2005, 350(1/2/3):1-11.
- [9] 肖振林, 丛俏, 曲蛟. 钼矿区周边果园土壤重金属污染评价及对水果品质的影响[J]. 科学技术与工程, 2010, 10(23):5831-5834. XIAO Z L, CONG Q, QU J. Assessment of soil heavy metal pollution in orchards around molybdenum mining area and its effect on fruit quality[J]. Science technology and engineering, 2010, 10(23):5831-5834 (in Chinese with English abstract).
- [10] 邹光海, 王晨昇, 陈鸿汉. 内蒙古废弃钨钼矿区周围土壤重金属污染生态环境评价及成因分析[J]. 中国地质, 2020, 47(6):1838-1852. WU G H, WANG C S, CHEN H H. Eco-environmental assessment and genetic analysis of heavy metal pollution in the soil around the abandoned tungsten-molybdenum mine area in Inner Mongolia[J]. Geology in China, 2020, 47(6):1838-1852 (in Chinese with English abstract).
- [11] ANJUM N A, SINGH H P, KHAN M I R, et al. Too much is bad: an appraisal of phytotoxicity of elevated plant-beneficial heavy metal ions[J]. Environmental science and pollution research, 2015, 22(5):3361-3382.
- [12] KUMCHAI J, HUANG J Z, LEE C Y, et al. Proline partially overcomes excess molybdenum toxicity in cabbage seedlings grown *in vitro* [J]. Genetics and molecular research, 2013, 12(4):5589-5601.
- [13] BALDISSEROTTO C, FERRONI L, PANTALEONI L, et al. Comparison of photosynthesis recovery dynamics in floating leaves of *Trapa natans* after inhibition by manganese or molybdenum; effects on photosystem II[J]. Plant physiology and biochemistry, 2013, 70:387-395.
- [14] MCGRATH S P, MICÓ C, ZHAO F J, et al. Predicting molybdenum toxicity to higher plants: estimation of toxicity threshold values[J]. Environmental pollution, 2010, 158(10):3085-3094.
- [15] SHI Z Y, ZHANG J C, WANG F Y, et al. Arbuscular mycorrhizal inoculation increases molybdenum accumulation but decreases molybdenum toxicity in maize plants grown in polluted soil[J]. RSC advances, 2018, 8(65):37069-37076.
- [16] 李路, 胡承孝, 谭启玲, 等. 钼污染对冬小麦光合作用特性及产量的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(4):620-626. LI L, HU C X, TAN Q L, et al. Effects of Mo pollution on photosynthesis characteristics and yields of winter wheat[J]. Journal of agro-environment science, 2016, 35(4):620-626 (in Chinese with English abstract).
- [17] 李路. 冬小麦对土壤钼污染的响应及其耐钼机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016. LI L. The response characteristics of winter wheat to molybdenum pollution in soil and mechanisms for resistance[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [18] HAN Z X, WAN D J, TIAN H X, et al. Pollution assessment of heavy metals in soils and plants around a molybdenum mine in central China[J]. Polish journal of environmental studies, 2018, 28(1):123-133.
- [19] LIU T T, LI F, ZHANG X, et al. Tracing intracellular localization and chemical forms of copper in *Elsholtzia splendens* with cluster analysis[J]. Biological trace element research, 2014, 160(3):418-426.
- [20] YIN K J, SHI Z Y, ZHANG M G, et al. Effects of mining on the molybdenum absorption and translocation of plants in the Luanchuan molybdenum mine [J/OL]. Peer J, 2020, 8: e9183 [2021-02-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32518726/>. DOI:10.7717/peerj.9183.
- [21] QIN S Y, SUN X C, HU C X, et al. Effects of tungsten on uptake, transport and subcellular distribution of molybdenum in oilseed rape at two different molybdenum levels[J]. Plant science, 2017, 256:87-93.
- [22] XU S J, HU C X, HUSSAIN S, et al. Metabolomics analysis reveals potential mechanisms of tolerance to excess molybdenum in soybean seedlings[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2018, 164:589-596.
- [23] GAO H J, ZHAO Q, ZHANG X C, et al. Localization of fluoride and aluminum in subcellular fractions of tea leaves and roots[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2014, 62(10):2313-2319.
- [24] THAKUR S, SINGH L, WAHID Z A, et al. Plant-driven removal of heavy metals from soil: uptake, translocation, tolerance mechanism, challenges, and future perspectives[J]. Environmental monitoring and assessment, 2016, 188(4):1-11.
- [25] VÖGELI-LANGE R, WAGNER G J. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves: implication of a transport function for cadmium-binding peptides

- [J]. *Plant physiology*, 1990, 92(4):1086-1093.
- [26] XU S J, HU C X, TAN Q L, et al. Subcellular distribution of molybdenum, ultrastructural and antioxidative responses in soybean seedlings under excess molybdenum stress[J]. *Plant physiology and biochemistry*, 2018, 123:75-80.
- [27] SINGH S, PARIHAR P, SINGH R, et al. Heavy metal tolerance in plants; role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics[J/OL]. *Frontiers in plant science*, 2016, 6:1143[2021-02-23]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>.
- [28] MATHYS W. The role of malate, oxalate, and mustard oil glucosides in the evolution of zinc-resistance in herbage plants[J]. *Physiologia plantarum*, 1977, 40(2):130-136.
- [29] KRÄMER U, PICKERING I J, PRINCE R C, et al. Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species[J]. *Plant physiology*, 2000, 122(4):1343-1354.
- [30] SARRET G, SAUMITOU-LAPRADE P, BERT V, et al. Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*[J]. *Plant physiology*, 2002, 130(4):1815-1826.
- [31] WICHARD T, MISHRA B, MYNENI S C B, et al. Storage and bioavailability of molybdenum in soils increased by organic matter complexation[J]. *Nature geoscience*, 2009, 2(9):625-629.
- [32] ALVES M, CHICAU P, MATIAS H, et al. Metabolic analysis revealed altered amino acid profiles in *Lupinus albus* organs as a result of boron deficiency[J]. *Physiologia plantarum*, 2011, 142(3):224-232.
- [33] ZHU G X, XIAO H Y, GUO Q J, et al. Effects of cadmium stress on growth and amino acid metabolism in two Compositae plants[J]. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2018, 158:300-308.
- [34] BROWN D H, MACPHERSON J. Molybdenum (V) and (VI) complexes with some naturally occurring ligands[J]. *Journal of inorganic and nuclear chemistry*, 1972, 34(5):1705-1710.

Metabolic response and molybdenum tolerance mechanism of winter wheat to excess molybdenum stress

LI Qibiao¹, LI Lu^{1,2}, HU Chengxiao¹, TAN Qiling¹, SUN Xuecheng¹

1. College of Resource & Environment of Huazhong Agricultural University, Microelement Research Center, Wuhan 430070, China;

2. Institute of Agriculture Product Quality Standard and Testing Research, Tibet Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Lhasa 850032, China

Abstract Molybdenum (Mo) is one of the essential nutrient element for the plant growth, but excess Mo will cause physiological toxicity to plant. With the increase of mining area, many events of Mo pollution have been reported in the world. Meanwhile, many studies have found that some plants show strong tolerance to excessive Mo, but there are few studies on the Mo tolerance mechanisms. Therefore, we analyzed the changes of Mo content in subcellular components and leaf metabolites of wheat under excess Mo supply, and to further explore the physiological mechanism. The Mo content in cell wall, soluble part, organelle, protoplast/chloroplast of root subcellular components was 219, 38, 25 and 62 times higher than that in shoot respectively; The accumulation proportion of Mo in soluble fraction of root and shoot was 71.85% and 88.54%. Under excess Mo, the contents of malic acid and fumaric acid in wheat leaves were increased by 2.08 and 2.07 times, and the contents of β -alanine, *L*-serine, *L*-threonine and *L*-glutamine were increased by 2.78, 1.89, 1.67 and 1.91 times, respectively. These results indicate that root system can prevent and control the transportation of excess Mo to shoot, and vacuole can be the main storage site of excess Mo, and organic acids and amino acids produced may chelate with Mo in vacuole to reduce its biological toxicity. This study provided theoretical basic for the mechanism of plant tolerance to excess Mo stress, and supplied the technical support for plant remediation of soil Mo pollution.

Keywords molybdenum stress; winter wheat; subcellular; molybdenum pollution; metabolomics analysis; phytoremediation; tolerability mechanism; OPLS-DA

(责任编辑:赵琳琳)