

Slutrapport VT 2009 för projektnr. V0733248

Mekanismen bakom låg kadmiumackumulering i vetekärna.

Maria Greger och Tommy Landberg,
Botaniska institutionen, Stockholms Universitet, 106 91 Stockholm

Bakgrund

Kadmium (Cd) är toxiskt för människor och 43% av det Cd som intas dagligen kommer från veteprodukter. Vissa odlingsarealer för veteproduktion har förhöjda växttillgängliga Cd halter. Olika vetesorter ackumulerar olika mycket Cd i sina kärnor och dessvärre är det oftast sorter med hög proteinhalt som har de högsta Cd nivåerna. På grund av hälsoriskerna är det viktigt att sänka kadmiumnivån i vetekärna och för att göra detta behöver vi förstå de bakomliggande mekanismerna för låg Cd upptagning och ackumulering i vetekärna.

Upptaget av Cd varierar mellan olika sorter av både brödvete och durumvete och vi har dessutom funnit att Dinkel (*Triticum spelta* L.) har en mycket låg Cd ackumulering i kärnan, 18 µg/gTS, jämfört med 40-90 i brödvete och 175-500 i durumvete. Eftersom man vill ha ett vete med låg Cd halt och hög proteinhalt i kärna är dinkel med sitt höga proteinvärde och låga Cd ackumuleringsförmåga ytterst lämplig att studera och jämföra med högackumulerande durumvetesorter för att förstå mekanismerna bakom den låga resp. höga kadmiuminlagringen.

Den höga Cd nivån i vetekärnan kan bero på 1) högt Cd upptag från jorden, 2) hög transport från rot till skott 3) och/eller en omfördelning i skottet under mognadsprocessen mot vetekärnan.

Kisel (Si) är det näst vanligast förekommande elementet i jorden och kisel frigörs till jordlösningen med ca 1-200 mg L⁻¹ (0,1-0,6mM) och tas upp som SiO₄²⁻. Kisel tas företrädesvis upp i monokotyledoner och då oftast hos gräs (0,3-1,2 % per TS), med mycket hög Si-ackumulering (10 % hos ris). Kisel är nödvändigt för vetets välmående. Kisel binds hårt i cellväggarna vilket stärker växtvävnaden, reducerar vattentranspirationen och svampinfektioner.

Hos vissa arter, dock ej vete, har man funnit att Si kan minska Al toxiciteten genom bildning av immobiliserade hydroxyaluminiumsilikater. Även fytotoxiska effekter orsakade av As och Ge minskar med Si.

Kiseltillförsel skulle kunna leda till en stor minskning av Cd i vetekärna samtidigt som avkastningen skulle öka.

Målet

Målet är att förstå hur Cd ackumuleringen i vetekorn regleras samt kiselns betydelse. Genom denna kunskap kan kadmiumhalterna minskas i vetekorn samtidigt som vi kan behålla en hög proteinnivå i framtiden.

Syfte

Syftet med detta projekt är att ta reda på de bakomliggande mekanismerna som gör att Cd ackumuleringen skiljer sig åt mellan hög och låg ackumulerande sorter genom att speciellt jämföra lågackumulerande spelt vete med högackumulerande durum. Samt undersöka kisels inverkan på Cd-upptag, transport och fördelning.

Hypoteser som har testats

1. Frisättningen av Cd från jordpartiklar: Kadmium frisätts från jord i högre grad i hög än i låg Cd ackumulerande vete och använder sig av antingen fytosideroforer eller organiska syror, medan låg Cd ackumulerande vete använder en höjning av pH runt rötterna för att minska Cd frisättningen från jordpartiklarna.
2. Förhållandet mellan Cd i rot och Cd i skott: Kadmium hålls kvar i rötterna i högre grad hos låg än hos högackumulerande vete vilket ger en låg transport av Cd till skottet. Detta beror på graden av CEC i rötterna och där lågackumulerande sorter borde ha en hög CEC.
3. Transporten av Cd i xylem och floem till kärna: Kadmiumtransporten till kärna via floemet och xylemet är relativt sett högre i xylem än i hög Cd ackumulerande sorter. Högre Cd nivåer i xylemet kan bero på att Cd binds där till ligander som hjälper transporten av Cd till skottet utan att hindras av CEC.
4. Uppbindning av Cd i kärna: Det är flödet av kolhydrater från blad till kärna som driver Cd transporten in i kärnan, och där är den främjad av uppbindningsförmågan till protein och stärkelse som hjälper till att avladda Cd från flödet. Därför är bindningskapaciteten högre i hög- än i låg-ackumulerande vete beroende på stärkelse och/eller aminosyrasammansättningen.
5. Kisels inverkan på Cd ackumulering i kärna: Kisel minskar transporten av Cd från rot till kärna med ca 50 % i alla vetetyper och sorter, troligtvis mest i högackumulerande sorter. Kisel påverkar inte proteinsammansättningen men däremot ökar proteinmängden.

Material och metoder.

I denna studie har särskilt högackumulerande durumvete (upp till 4,5 µg/g Cd i kärna) jämförts med lågackumulerande Dinkelsorter (ned till 0,53 µg/g Cd i kärnan). Dessutom användes även 24 olika vetesorter av 4 typer (Vårvete, Höstvete, Durum, Dinkel). Vetesorterna har olika Cd-ackumuleringskapacitet.

Frisättningen av Cd från jordpartiklar

Rotexudat, Exudat samlades upp från rotytan och analyserades i ”rhizobox”-system. **Rötternas katjonutbyteskapacitet (CEC).** Utbyte av Ba-joner analyserades i rötter. **Kadmiumupptag från näringslösning.** Upptag av ¹⁰⁹Cd analyserades (10 min - 60 h).

Förhållandet mellan Cd i rot och Cd i skott

Fördelningsmönstret. Isotop ^{109}Cd tillsattes till rot eller flaggblad och fördelningen av Cd analyserades i plantans olika delar efter olika tidsintervall (10 minuter - full mognad).

Transport av Cd i plantan. Flera försök. En 30x2 mm ”tunga” skars ut strax under flaggbladsnoden. ”Tungan” doppades i en lösning med ^{109}Cd , Sr (markör för xylemtransport) och Rb (markör för floemtransport) under 3 dagar efter anthesis. Halten ^{109}Cd , Sr och Rb analyserades efter 1 och 6 dygn i rot, flaggblad och kärna. Försök2. Isotop ^{109}Cd tillsattes till flaggblad samtidigt icke-isotop Cd tillsattes till rötter i olika koncentrationer.

Fördelningen av Cd i småaxet. Isotop ^{109}Cd tillsattes till rot och småaxet delar analyserades.

Transporten av Cd i xylem och floem till kärna

Inverkan av CEC i roten på transporten av Cd till skottet. CEC analyserades enl ovan.

Transport in och ut ur kärnan, fördelning av Cd i kärnan. Flera försök. Isotop ^{109}Cd injicerades in i kärnan vid mjölkmodningsstadiet. Cd i kärna, ax och planta jämfördes med ^{109}Cd applicerat till skärmfjäll. Försök2. Isotop ^{109}Cd gavs till rot. Kärnor snittades vid fullmognad och fosforluminiscensavtryck av snitten micro-scannades för autoradiografiavbildning och fördelningen av Cd i kärnan kunde visuellt analyseras.

Xylemsaftens koncentration av Cd samt kadmiumkomplexbindare. Försök1. Plantor kapades 10 mm från roten och placerades i näringslösning med isotop ^{109}Cd varefter xylemet samlades in från snittytan under 3 timmar. Cd analyserades. Försök2. Insamlat xylemsaft analyserades på komplex mha HPLC-separering och detektion med UV-detektor och isotop-detektor.

Uppbindning av Cd i kärna

Komplexbildare mellan Cd och substanser i kärnan. HPLC-analys av phytohelatin, GSH, och fytat.

Proteinhalten i vetekärnor. Proteiner fraktionerades till 5 fraktioner och proteinsammansättningen analyserades med HPLC och SDS-PAGE.

Kadmiums bindningskapacitet till kärnans proteiner samt till stärkelse. Vetemjöl delades upp i olika proteinfraktioner och i stärkelse (amylos och amylopectin). Cd tillsattes och konduktiviteten analyserades för att uppskatta uppbundet Cd i fraktionen.

Analys av kisels påverkan av Cd i planta

Upptag och fördelning av Cd och Si. Isotop ^{109}Cd (0,034 nM) tillsattes med eller utan 0,5 μM icke-märkt Cd till rot. Samtidigt tillsattes 0 eller 500 μM K_2SiO_4 . Plantor odlades till full mognad och delades upp i olika delar.

Faktoriellt försök. Åtta vetesorter representerande hög- och låg-ackumulerande sorter av de fyra olika vetetyperna användes. Plantorna behandlades med samtliga kombinationer av; 34, 100 och 500 nM Cd vs 0, 100, 500 och 1000 μM Si. Plantorna odlades, skördades och analyserades enligt ovan.

Proteinhalten i vetekärnor. Se ovan.

Isotop ^{109}Cd analyserades m.h.a scintillator.

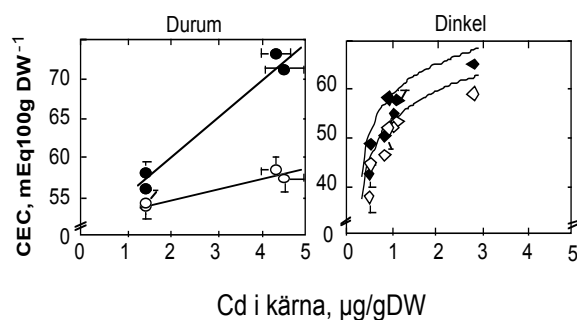
Omärkt Cd samt Si analyserades med atomabsorptionspektrofotometri.

Resultat och diskussion

Frisättningen av Cd från jordpartiklar

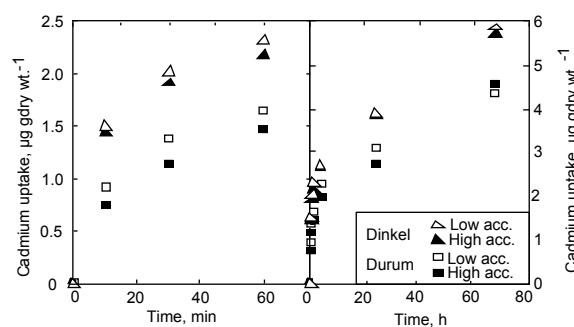
Rotexudat — Vi fann inget som tyder på att en minskad mängd organiska syror, fytosideroforer eller pH förändringar är involverade i en minskad frisättning av Cd från jordkolloiderna hos lågackumulerande dinkel.

Rötternas katjonutbyteskapacitet (CEC) (Fig. 1) — var lägre i lågackumulerande sorter än i högackumulerare. CEC i rötterna ökade med ökad Cd i jorden. Mönstren är olika hos durum och dinkel där behandling med Cd ger ett jämförelsevis starkt ökad CEC hos durum.



Figur 1. Katjonutbyteskapacitet (CEC) hos obehandlade (vita symboler) och kadmiumbehandlade (svarta symboler) rötter i durum- och dinkel-sorter.

Kadmiumupptaget från näringslösning (Fig. 2) — skiljer signifikant mellan dinkel och durum där dinkel har högre Cd upptagning från näringslösning än durum.



Figur 2. Upptag av ¹⁰⁹Cd från näringslösning hos durum och dinkel.

Förhållandet mellan Cd i rot och Cd i skott:

Fördelningsmönstret — dinkel och durum visade ett tydligt samband mellan Cd-fördelning från rot till skott och halten Cd i kärnan (hög fördelning till skott ger hög halt i kärnan) (ex i Fig. 3).

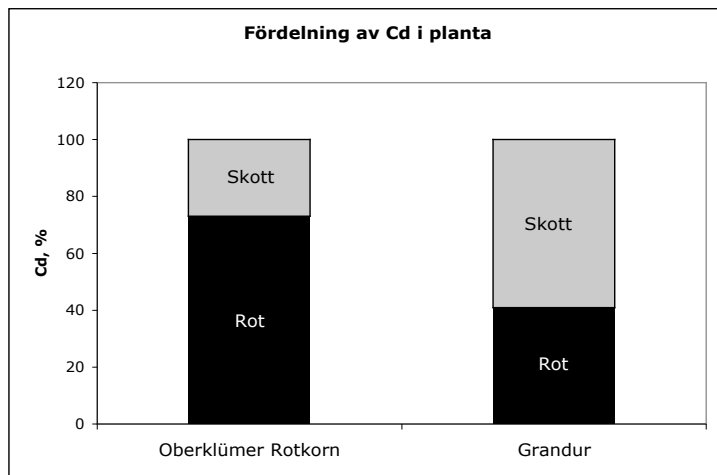


Fig. 3. Fördelning av kadmium mellan rot och skott hos en låg- (Oberklümer Rotkorn, Dinkel) och en hög-ackumulerare (Grandur, Durum).

Applicering av Cd på flaggblad — ger samma fördelningsmönster som Cd-giva till rot, både hos dinkel och durum. Detta gäller även när Cd ges vid olika utvecklingsstadier (trebladsstadiet och anthesen). Detta indikerar en omfattande omfördelningen av Cd i plantan enligt ett visst mönster.

Transport av Cd i plantan — Det kan visas att Cd transporteras i både floemet och xylemet. Storleken av Cd-transport i floemet har god korrelation med Cd-halten i kärnan både i dinkel och durum. Kadmium transporteras i alla riktningar i plantan, även till roten. Denna omfördelningen av Cd i plantan görs troligen i huvudsak via floemet. Dock kunde konstateras att xylemtransporten av Cd påverkar floemtransporten (hämmande), vilket indikerar att Cd i kärnan är en funktion av både xylem och floemtransport.

Fördelningen av Cd i småaxet — Koncentrationen är högst i grodden men den största mängden Cd finns i endospermet. Här finns en svag korrelation med Cd-ackumuleringskapaciteten, att fördelningen är högre till endospermet och lägre till grodden hos högackumulerare. Durum och dinkel är mycket lika.

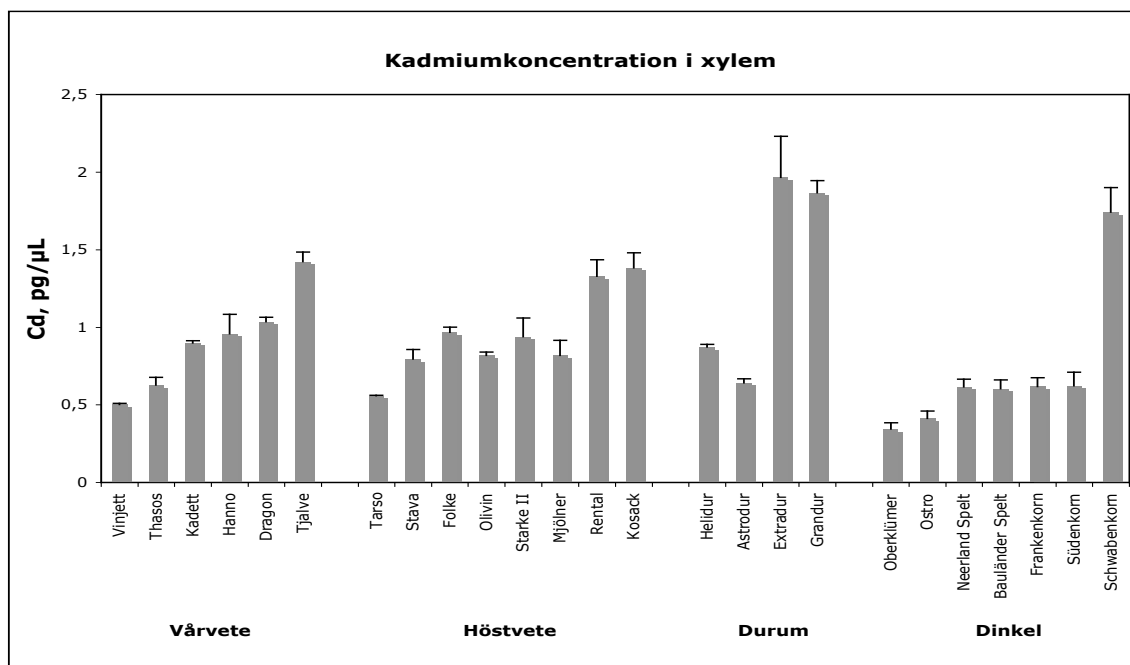
Transporten av Cd i xylem och floem till kärna:

Inverkan av CEC i roten på transporten av Cd till skottet. — Våra försök visar inget negativt, snarare ett positivt samband mellan rotCEC och Cd halten i skottet eller kärnan, vilket inte kan visa på att Cd hålls kvar i roten med ett högre CEC och därmed minska transporten till skottet av Cd.

Transport in och ut ur kärnan — det som transporteras in i kärnan stannar kvar i högre grad hos lågackumulerande dinkel än hos högackumulerande durum.

Autoradiografistudier visar att **fördelning av Cd i kärnan** — är anmärkningsvärt lika i de olika dinkelsorterna, ingen skillnad kan observeras mellan hög och lågackumulerare. Vilket å andra sidan är tydligt i durum där högackumulerare har betydligt mer Cd i kärnans periferi.

Xylemsaftens (prov taget strax ovanför roten) **koncentration av kadmium** —vi fann en signifikant korrelation mellan halten i xylemsaften och halten i kärnan hos både dinkel och durum (Fig. 4). Dock vid studier av xylem taget strax nedanför axet fås inte alls samma goda samband ($P = 0,08 - 0,23$), någonting händer på vägen.



Figur 4. Xylemsaftens Cd-koncentration. Vetesorterna är sorterade efter Cd-ackumuleringskapacitet (låg -> hög; vänster->höger) för vardera vete-typ.

Xylemsaften har undersökts på eventuella komplexbildare — Data visar att huvuddelen (>99 %) av Cd i xylemet inte är bundet i komplex. Potentiella komplexbildare tycks alltså spela en liten roll vid xylemtransport.

Uppbindning av Cd i kärna

Cd-komplexbildande substanser i kärnan — visar inget samband för fytat, GSH eller thiolrika peptider med Cd-ackumuleringskapaciteten.

Proteinhalten i vetekärnor — (samtliga 24 testade sorter) visar inget samband med kärnans Cd-ackumuleringskapacitet vilket är tydligt hos durumsorterna.

Dinkelsorterna har relativt hög proteinhalt men ändå låg Cd-halt.

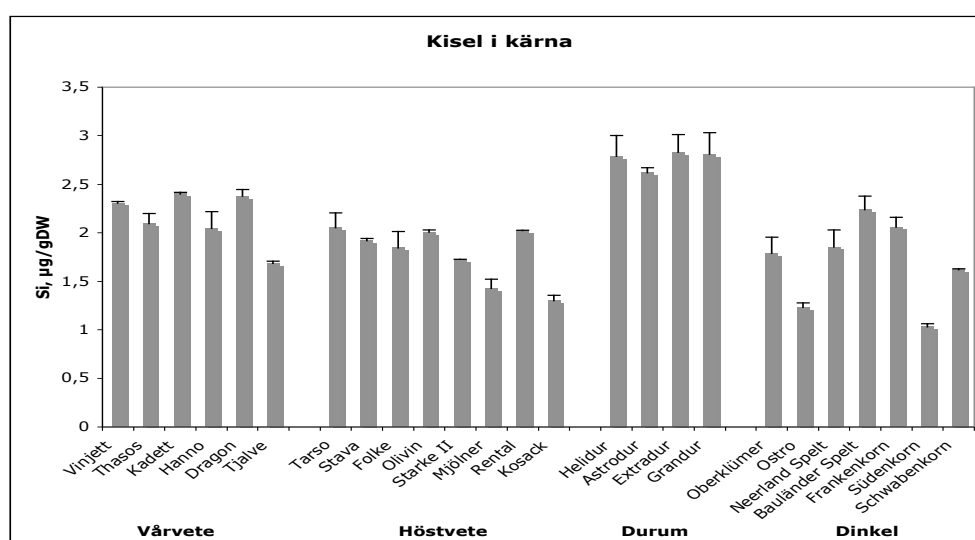
Proteinsammansättningen och dess halter varierar kraftigt mellan vetesorterna. Bland c:a 150 detekterade proteiner visar 10 st ett starkt samband med kärnans Cd-ackumuleringskapacitet. Dessa 10 proteiner återfinns hos både hos dinkel och durum.

Kadmiums bindningskapacitet till kärnans proteiner samt till dess stärkelse — En del Cd binds till stärkelsefraktionen i vetekärnan (både amylos och amylopektin). Bindningen är troligen svag men har betydelse pga den höga halten stärkelse. Kadmiumbindningen till stärkelse korrelerar med kärnans ackumuleringskapacitet och kan därför vara en delförklaring till hur kadmium lagras i kärnan. Detta gäller i lika hög grad hos dinkel som durum.

Kisels inverkan på Cd ackumulering i kärna

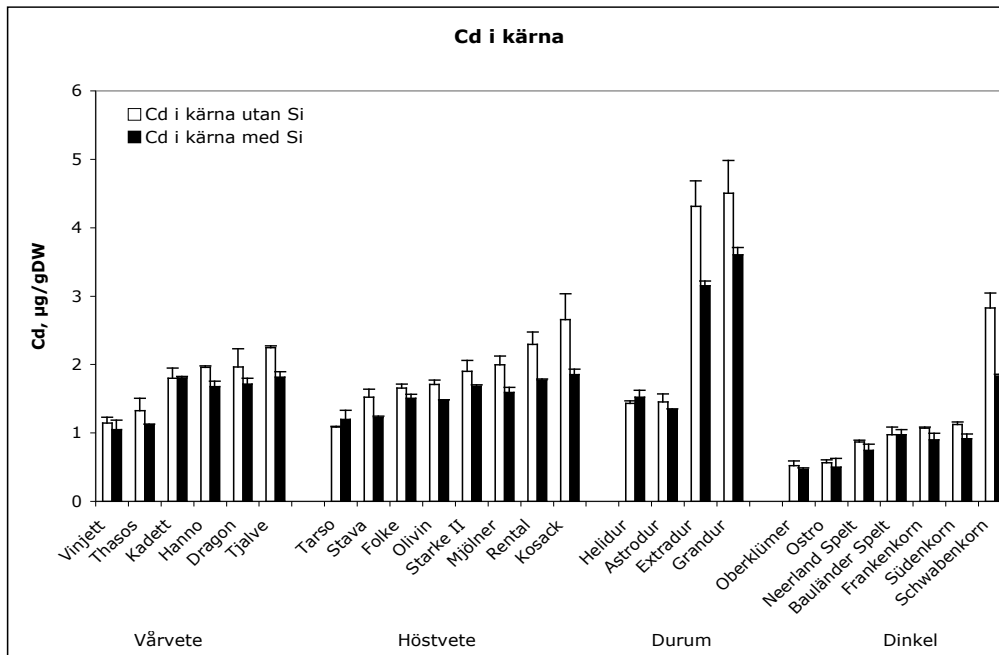
Biomassa - Biomassatillväxten ökar med tillsats av kisel. I denna studie ökade plantans vikt 12 - 22 % och kärnan 5 - 16 %. Kiselgivans storlek har betydelse, större kiselgiva ger större biomassaökning. Biomassaökningen är inte relaterat till Cd-ackumuleringskapaciteten hos vetesorterna, inte heller de olika vetetyperna. Det bör även noteras att kisel påverkar vetets känslighet mot höga halter Cd, d.v.s. kisel förbättrar vetets Cd-tolerans.

Kiselupptag och Kisel i planta och Kärna - Nettoupptag av kisel och kiselkoncentrationen i olika delar av plantan visar inget samband med vetesorternas Cd-ackumuleringskapacitet (Figur 5). Dock tycks dinkelvete lagra högre halt av Si i plantan än andra sorter medan durumvetet tenderar till att lagra jämförelsevis högre halter i kärnan. Cd behandling påverkar inte upptag och fördelning av kisel.

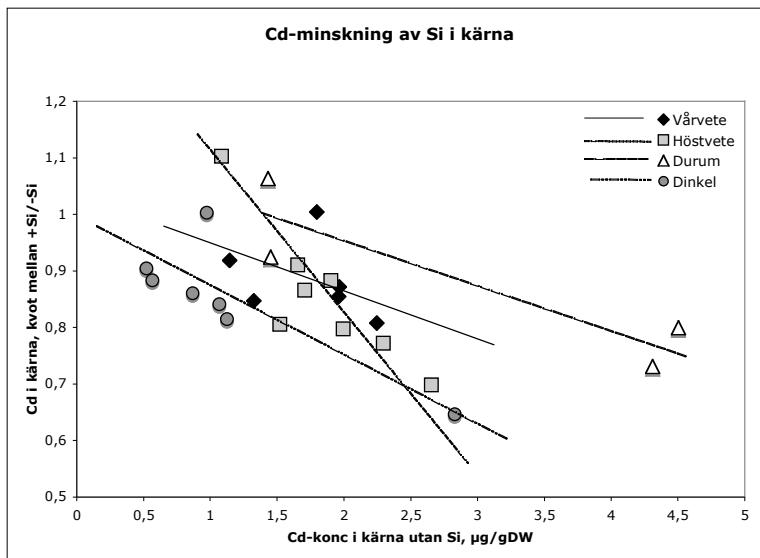


Figur 5. Koncentration av kisel i kärna. Vetesorterna är sorterade efter Cd-ackumuleringskapacitet (låg -> hög; vänster->höger) för vardera vete-typ.

Cd i planta - Kisel minskar koncentrationen Cd i plantan. Detta är dock troligen en utspädningseffekt p.g.a. den ökade biomassatillväxten, upptaget av Cd påverkas inte av kisel. Däremot minskas Cd i kärnan av Si (Figur 6). Effekten är tydligare i de sorter som har hög Cd-ackumulering (Figur 7).

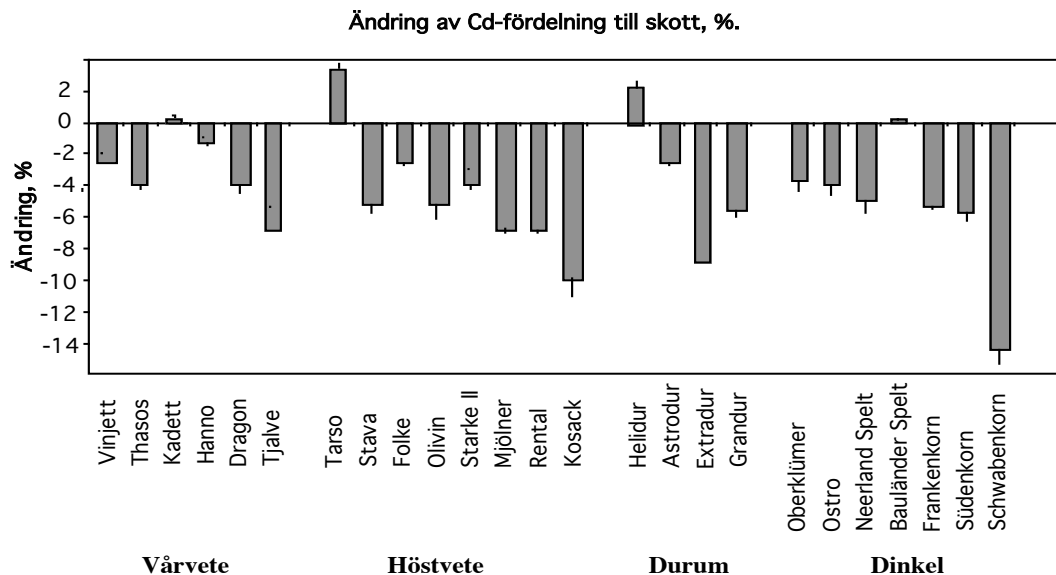


Figur 6. Cd-konc i vetekärnor. Vetesorterna är sorterade efter Cd-ackumuleringskapacitet (låg -> hög; vänster->höger) för vardera vete-typ.



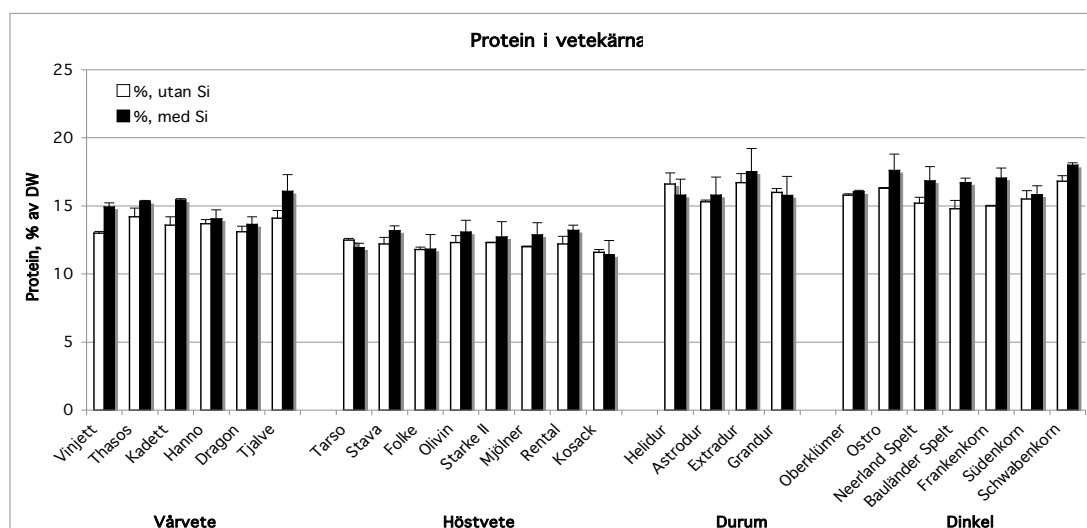
Figur 7. Relation av Cd-halt i plantor med och utan Si-behandling. Olika vetetyper är indikerade.

Cd fördelning - Kisel påverkar fördelningen av Cd i rot och skott (Figur 8). Generellt ökar andelen av Cd i roten. Detta är den troliga förklaringen till att Cd minskas i kärnan i närvaro av Si. Kisel binder upp Cd i roten som därför blir otillgänglig för kärnan. Notera att effekten av kisel är tydligare i sorter med hög Cd-ackumuleringskapacitet.



Figur 8. Ändring av Cd-fördelningen rot-skott av kiselbehandling. Vetesorterna är sorterade efter Cd-ackumuleringskapacitet (låg -> hög; vänster-> höger) för vardera vete-typ.

Proteiner - Kisel höjer halten protein i vete (i procent av DW). Procenthalten uppgår till 17,5 % för vissa durum och dinkelsorter (Figur 9).



Figur 9. Andel protein i plantor med eller utan Si. Vetesorterna är sorterade efter Cd-ackumuleringskapacitet (låg -> hög; vänster-> höger) för vardera vete-typ.

Slutsats

De bakomliggande mekanismerna som gör att Cd ackumuleringen skiljer sig åt mellan hög och låg ackumulerande sorter är flera och återfinns i hela växten och alla verkar tillsammans ha betydelse för Cd-ackumuleringen i kärnan.

Eftersom dinkelsorterna skiljer sig från de övriga sorterna genom en generellt hög proteinhalt samt att inget samband mellan proteinhalt och Cd-ackumulering i kärna har påträffats, är det högst troligt att mekanismerna för Cd-ackumuleringen är helt skilda från proteinbildning och ackumulering i kärnan. Baserade på jämförelsen mellan lågackumulerande dinkel och högackumulerande durum kan mekanismer för låg ackumulering i kärnan således summeras;

- Lågt rot-CEC som minskar Cd frisättningen från jordkolloiderna.
- Högt upptag av Cd från jordlösningen, men som fastläggs i roten.
- Låg translokering av Cd till skottet från roten.
- Hög omfördelning av Cd till roten från skottet via floemet.
- Låg laddning av Cd in i xylemet.
- Högt utflöde av Cd ur kärnan.
- Låg halt av Cd-bindande stärkelse i kärnan

Med kontroll på dessa mekanismer torde halten av Cd kunna reduceras kraftigt i nya vetesorter. Vad det är som binder upp kadmium i roten hos lågackumulerare är dock något som måste undersökas närmare.

Vi kan konstatera att kisel minskar halten Cd i kärnan, upp till 50%, ju högre Si-giva desto tydligare. Kislets effekt är störst i de vetesorter som har hög Cd-ackumulering i kärna, ett resultat som ger en hint om en mekanism som behöver studeras närmare. Även kiselhalten i kärnan ökar, men nivåerna är inte exceptionellt höga ca 1,5-2 ggr högre än i fält. Kiselackumuleringen är inte relaterad till vetesorternas Cd-ackumuleringskapacitet. Dessutom ökar halten protein i kärnan, något som måste anses positivt och visar att Cd-ackumuleringen i vetekärnan inte beror på proteinhalten.

Publikationer och övrig resultatförmedling till näringen hittills.

Abstrakt

- Greger M. & Landberg T. 2007. Rhizosphere interaction at Cd uptake by various wheat cultivars. — Abstract. Scientific workshop on Phytotechnologies to promote sustainable land use and improve food safety, COST Action 859 workshop, Vilnius, June 2007.
- Greger M. & Landberg T. 2007. Rhizosphere interaction at Cd uptake by various wheat cultivars. — Abstract. Rhizosphere 2 Int. Conference, Montpellier, August 2007.
- Greger M. & Landberg T. 2008. Influence of Si on Cd in wheat. Abstract. Scientific workshop on Contaminants and nutrients: availability, accumulation/exclusion and plant-microbia-soil interactions, COST Action 859 workshop, Smolenice, May 2008.
- Greger M. & Landberg T. 2008. INFLUENCE OF SILICON ON CADMIUM IN WHEAT. Abstract. 4th Int. conf. on Silicon in agriculture, West coast sun, South Africa, October 2008.
- Greger M. & Landberg T. 2008. INFLUENCE OF SILICA ON CD CONTENT IN AND EFFECT ON WHEAT. Abstract. Challenges on improving quality and safety of food crops, COST Action 859 workshop, Lillehammer, September 2008.

Andra möten

Resultaten har kommunicerats på ett par av kadmiumrådets (numera kadmiumforum) möten.