

Slutrapport HT 2008 för projektnr. H0533392

Mekanismen bakom låg kadmiumackumulering i vetekärna.

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

Bakgrund

Kadmium (Cd) är toxiskt och är känt för att ge lungkancer, njurskador och kan leda till benskörhet. 43% av det Cd som intas dagligen kommer från veteprodukter. Vissa arealer för veteproduktion har förhöjda växttillgängliga Cd halter. Olika vetesorter ackumulerar olika mycket Cd i sina kärnor och dessvärre är det oftast vete med hög proteinhalt som har den högsta Cd nivån. På grund av hälsorisker 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 brödvete och durumvete och mekanismerna bakom låg Cd ackumulering är möjlig att definiera genom att jämföra Cd upptag och fördelning i hög och låg ackumulerande vete. Vi fann att vinterdinkel (*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.

Målet

Målet är att förstå hur Cd ackumuleringen i vetekorn regleras och genom denna kunskap kunna minska kadmiumhalterna i vetekorn samtidigt som vi kan behålla en hög proteinnivå i framtiden.

Förklaring i fallet med vete: Med låg och hög ackumulerande vete menas det Cd som ackumuleras i kärnan. Kadmiumackumuleringen är därför inte identisk med Cd upptaget, vilket annars är normalfallet när man pratar om hög respektive låg ackumulerande

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.

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. Detta fenomen återfinns i hög Cd ackumulerare.
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 lågackumulerande vete beroende på stärkelse och/eller aminosyrasammansättningen.

Material och metoder.

Sju sorter av dinkelvete (*Triticum spelta*) har uppodlats kontrollerat i näringslösning till ax och halten av Cd i kärna har jämförts (tabell 1) mellan sorter samt även med andra vetetyper. De Dinkel-sorter som använts kommer från Lantmännen, Hildegards Dinkelcentrum på Gotland och Warbro Kvarn AB, Sörmland. Samtliga sorter är av höstvetetyp. Övrigt vete kommer från Svalöf-Weibull AB. Koncentrationen av Cd i Dinkel-kärnor är anmärkningsvärt låg (tab. 1), faktum är att halten ligger lägre hos alla Dinkelsorter, utom Schwabekorn, än hos samtliga höst-, vår- och durum-sorter. Halten är så pass låg som ner till 1/3-del av de lägsta höst-, vår- och durum-sorterna.

Biomassa och odlingstid varierar hos Dinkel på liknande sätt som hos vanligt höstvete och är av samma storleksordning.

Tabell 1. Vetesorter i denna studie och dess ackumulering av Cd i kärnan efter odling hydroponiskt med 0.5 μM Cd. Kadmium-ackumulationskapaciteten (inom varje vetetyp) anges med Låg, Medium eller Hög. Medelvärden med 4 (Dinkel) eller 12 replikat \pm SE.

Vetetyp	Sort	Cd i kärna, mg kgTS. ⁻¹	Cd ackumuleringskapacitet
Vårvete			
	Vinjett	1.140 \pm 0.103	Låg
	Thasos	1.319 \pm 0.129	Låg
	Kadett	1.795 \pm 0.141	Medium
	Hanno	1.956 \pm 0.182	Hög/ Medium
	Dragon	1.960 \pm 0.114	Hög/ Medium
	Tjalve	2.244 \pm 0.254	Hög
Vintervete			
	Tarso	1.079 \pm 0.082	Låg
	Stava	1.515 \pm 0.195	Låg
	Folke	1.652 \pm 0.143	Låg
	Starke II	1.894 \pm 0.216	Medium
	Mjölner	1.994 \pm 0.190	Medium
	Rental	2.294 \pm 0.224	Hög
	Kosack	2.654 \pm 0.137	Hög
Durumvete			
	Helidur	1.430 \pm 0.113	Låg
	Astrodur	1.442 \pm 0.124	Låg
	Extradur	4.310 \pm 0.326	Hög
	Grandur	4.500 \pm 0.407	Hög
Dinkelvete			
	Oberklümer Rotkorn	0.534 \pm 0.059	Låg
	Ostro	0.571 \pm 0.030	Låg
	Neerland Spelt	0.880 \pm 0.049	Medium
	Bauländer Spelt	0.961 \pm 0.047	Medium
	Frankenkorn	1.062 \pm 0.015	Medium
	Südenkorn	1.136 \pm 0.020	Medium
	Schwabekorn	2.811 \pm 0.055	Hög

Frisättningen av Cd från jordpartiklar

Rotexudat—plantor odlades i ”rhizoboxsystem” där rötter avskiljdes från jord med tunt nylonnät. Exudat samlades upp från rotytan och analyserades på organiska syror, pH, fytosideroforer, Cd.

Rötternas katjonutbyteskapacitet (CEC) — Utbyte av Ba-joner analyserades i rötter (enl. Heintz 1961).

Kadmiumupptag från näringslösning — Upptag av isotop ^{109}Cd analyserades efter olika tidsperioder (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).

Applicering av Cd på flaggblad — Isotop ^{109}Cd applicerades på flaggblad varefter Cd analyserades i olika plantdelar vid full mognad.

Transport av Cd i plantan — Försök 1. En 30x2 mm ”tunga” skars ut strax under flaggbladsnoden (enl. Herren och Feller 1997). ”Tungan” doppades i en lösning med ^{109}Cd , ^{85}Sr (markör för xylemtransport) och ^{86}Rb (markör för floemtransport) under 3 dagar efter antesen. Halten ^{109}Cd , ^{85}Sr och ^{86}Rb analyserades efter 1 och 6 dygn i rot, flaggblad och kärna. Försök 2. Isotop ^{109}Cd tillsattes till flaggblad samtidigt icke-isotop Cd tillsattes till rötter i olika koncentrationer. ^{109}Cd analyserades i kärnan.

Fördelningen av Cd i småaxet — Isotop ^{109}Cd tillsattes till rot och småaxet delades upp vid full mognad och delarna analyseras på Cd.

Transporten av Cd i xylem och floem till kärna

Inverkan av CEC i roten på transporten av Cd till skottet — CEC analyserades enl ovan och jämfördes med Cd-transporten.

Transport in och ut ur kärnan, fördelning av Cd i kärnan — Försök 1. Isotop ^{109}Cd injicerades in i kärnan vid mjölk-mognadsstadiet. ^{109}Cd i kärna, ax och planta jämfördes med ^{109}Cd applicerat till skärmfjäll. Försök 2. 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 — Försök 1. Plantor kapades 10 mm från roten och placerades i näringslösning med isotop ^{109}Cd varefter xylemet samlades in från snittytan under 3 timmar. ^{109}Cd analyserades. Försök 2. Insamlad xylemsaft analyserades på ligander mha HPLC-separering och detektion med UV-detektor och isotop-detektor.

Uppbindning av Cd i kärna

Komplexbildare mellan Cd och substanser i kärnan — Fytokelatin, glutation och fytat analyserades med HPLC.

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

Kadmiums bindningskapacitet till kärnans proteiner samt till dess stärkelse — Kärnor maldes till mjöl och detta delades upp i olika proteinfraktioner och till stärkelsefraktioner (amylos och amylopectin). Cd tillsattes och konduktiviteten analyserades för att uppskatta uppbundet Cd i fraktionerna.

Kadmiumanalys.

Isotop ^{109}Cd analyserades m.h.a scintillator. Total Cd halt analyserades med AAS.

Växtmaterialet våtförbrändes innan analys i $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$.

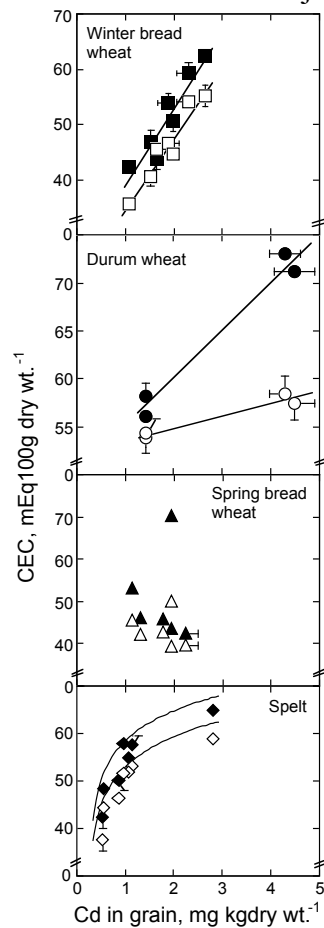
Resultat och diskussion

Frisättningen av Cd från jordpartiklar

Rotexudat — från plantor i trebladsstadiet, där hög och lågackumulerare av de olika vetetyperna testades. Under exuderingsperioden var jord med eller utan Cd närvarande. Rotexudatet analyserades på fyto sideroforer men vi fann inga skillnader överensstämmande med Cd ackumulering i kärna. Dinkelvete liknade durum och höstbrödvete genom att det ökade pH-värdet, succinathalten och minskade citrat och lactat halten i exudatet i närvaro av Cd.

Rötternas katjonutbyteskapacitet (CEC)

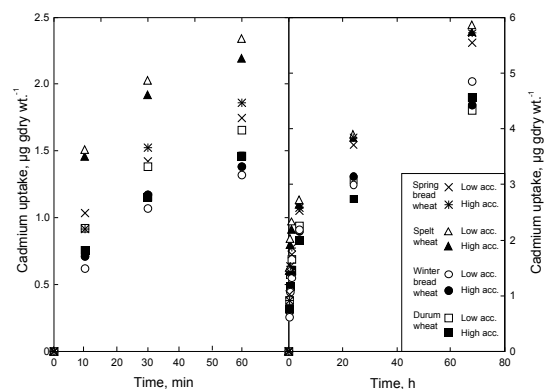
(Fig. 1)— testades och där fann vi att den ökade i alla vetetyper utom vårbrödvete med ökad ackumuleringsförmåga av Cd. Däremot ökade CEC i alla vetetyper rötter vid tillförelse av Cd till jorden.



Figur 1. Katjonutbyteskapacitet (CEC) hos obehandlade och kadmiumbehandlade rötter i olika sorter med olika Cd-ackumuleringsförmåga hos 4 vetetyper, i närvaro av Cd, svarta symboler

Kadmiumupptaget från näringslösning

(Fig. 2) — skiljer sig inte signifikant mellan hög och lågackumulerare. Däremot finns tendenser att dinkel och vårbrödvete har högre Cd upptagning från näringslösning än de andra två vetetyperna.



Figur 2. Upptag av ¹⁰⁹Cd från näringslösning i låg och högackumulerande sorter av 4 vete typer.

Förhållandet mellan Cd i rot och Cd i skott:

Fördelningsmönstret — hos höst-, vår- och durum-vete 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). Detta mönster finns även hos Dinkel, dock med ett tydligt undantag, Schwabenkorn. Denna Dinkelsort, som har den högsta halten i kärnan, har den lägsta fördelningen av Cd till skottet (25%). Cd-halten i kärnan hos denna sort är i samma storleksordning som i dess blad, något som även återfinns i högackumuleraren Grandur.

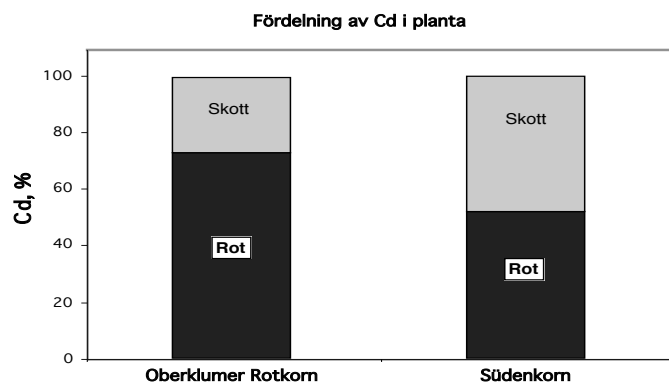


Fig. 3. Fördelning av kadmium mellan rot och skott hos en hög (Oberklumer Rotkorn) och en lågackumulerare (Südenkorn) (Dinkel-vete).

Applicering av Cd på flaggblad — ger samma fördelningsmönster hos Dinkel som hos höst-, vår- och durum-sorterna, likaså Cd-giva vid olika utvecklingsstadier (trebladsstadiet och anthesen). Detta indikerar att även Dinkel har den omfattande omfördelningen av Cd i plantan enligt ett visst mönster, som höst-, vår- och durum-sorterna har. Flaggbladet tycks inte heller ha någon särskild roll hos Dinkel.

Transport av Cd i plantan — Det kan visas att Cd transporteras i floemet och xylemet. Storleken av Cd-transport i floemet har god korrelation med Cd-halten i kärnan (dock ej för vårvete). 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 — hos dinkel är mycket lik den som finns hos höst-, vår- och durum-sorterna. 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 i endospermet och lägre i grodden hos högackumulerare, samma mönster som hos höstvete.

Transporten av Cd i xylem och floem till kärna:

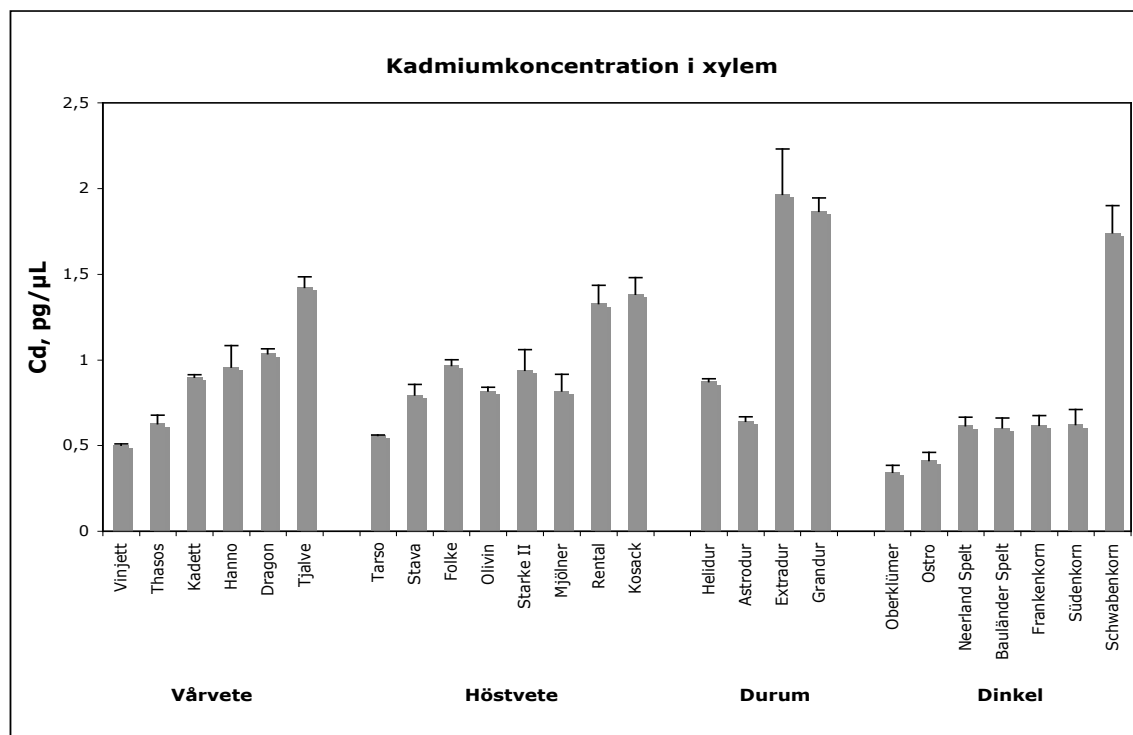
Inverkan av CEC i roten på transporten av Cd till skottet. — Våra försök visar inget negativt, snarare ett positivt samband mellan rotCEC och Cd halten i skottet eller kärnan,

vilket inte kan visa på att Cd hålls kvar i roten med ett högre CEC och därmed minska transporten till skottet av Cd.

Data visar att **transport in och ut ur kärnan** — är enkelriktad (in i kärnan) även hos Dinkel. Sambandet mellan det låga utflödet (0-3 %) vs. kärnans ackumulering som kan observeras hos höst-, vår- och durum-sorterna (högre utflöde hos lågackumulerare) är en ickesignifikant trend hos dinkel ($P=0.09$).

Autoradiografistudier visar att **fördelning av Cd i kärnan** — är anmärkningsvärt lika i de olika dinkelsorterna. Ingen skillnad kan observeras mellan hög och lågackumulerare hos dinkel, vilket skiljer från de andra vetetyperna. Nya autoradiografistudier indikerar dock att vid högre Cd-givor fördelas Cd till kärnans periferi, särskilt i högackumulerare (alla vetetyper).

Xylemsaftens (prov taget strax ovanför roten) **koncentration av kadmium** — har studerats och vi fann en signifikant korrelation mellan halten i xylemsaften och halten i kärnan hos alla vetetyper (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. Ytterligare studier bör göras här.



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

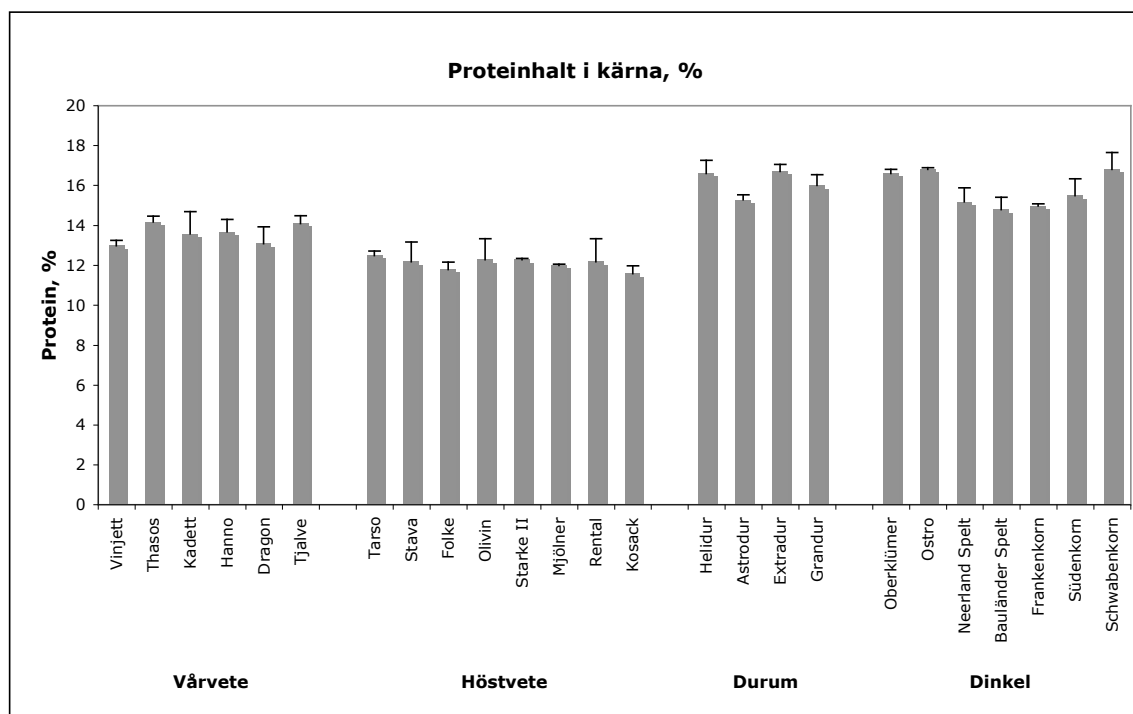
Xylemsaften har undersökts på eventuella komplexbildare — Data visar att huvuddelen (>99 %) av Cd i xylemet inte är bundet i komplex. Potentiella komplexbildare som t.ex. GSH tycks alltså spela en underordnad roll vid xylemtransport.

Uppbindning av Cd i kärna

Studier av möjliga **komplexbildare mellan Cd och substanser i kärnan** — visar inget samband för GSH eller thiolrika peptider med Cd-ackumuleringskapaciteten. Inte heller den potentiella komplexbildaren fytat är korrelerad med Cd-ackumulering i kärna.

Proteinhalten i vetekärnor — (samtliga 25 testade sorter) visar inget samband med kärnans Cd-ackumuleringskapacitet (Fig.5) vilket är tydligt hos durumsorterna (jfr Tabell 1). Notera att Dinkelsorterna har relativt hög proteinhalt men ändå låg Cd-halt.

Fraktionering av proteinerna i fem fraktioner har gjorts. Dessa proteinfraktioner har separerats på HPLC-C18 och SDS_PAGE. 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 samtliga dinkel-, höst-, vår- och durum-sorter. De 10 proteinerna är ännu ej identifierade och deras roll i Cd-ackumulering är ännu ej känd. Halten av proteinerna påverkas inte av storleken på Cd-givan d.v.s dessa proteiner induceras inte av Cd.



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

Kadmiums bindningskapacitet till kärnans proteiner samt till dess stärkelse — Med fraktionering av kärnan har kunnat konstateras att en del Cd binds till stärkelsefraktionen i vetekärnan (både amylos och amylopektin). Denna bindning är troligen mycket svag men har betydelse pga den höga halten stärkelse. Kadmiumbindningen till stärkelse korrelerar med kärnans ackumuleringskapacitet (även i Dinkel) och kan därför vara en delförklaring till hur kadmium lagras i kärnan. Även albumin-fraktioner (proteinfraktion) visar korrelation med ackumuleringen av Cd i kärnan men det påverkar inte det faktum att proteiner inte korrelerar till vetesorternas Cd-ackumuleringskapacitet i kärnan.

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 ha betydelse för den Cd-ackumuleringen i kärnan. Med undantaget för några av mekanismerna hos vårvede, återfinns mekanismerna i alla fyra vetetyperna. Dinkelsorternas mekanismer relaterade till Cd-ackumuleringsförmågan i kärnan överensstämmer därför väl med det flesta av det vi finner i sorterna av brödvete och durumvete. Eftersom dinkelsorterna skiljer sig från de övriga 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. Mekanismer för låg ackumulering i kärnan kan således summeras;

- Låg påverkan av organiska syror och pH i rotlösning av plantan.
- Lågt rot-CEC.
- Låg translokering av Cd till skottet från roten.
- Hög omfördelning av Cd till roten från skottet via floemet.
- Låg laddning av Cd till 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.

Publikationer och övrig resultatförmedling till näringen hittills.

Manus under tryckning.

Greger, M. and Landberg, T. 2008 "Role of rhizosphere mechanisms in Cd uptake by various wheat cultivars Plant and Soil XX:XX-XX

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.

Landberg T., Göthberg A., Neuschütz C., Nyquist J., Dabrowska B. & Greger M. 2007. Metal uptake in food plants and in phytoremediation. — Abstract. JSPS colloquium "Frontiers in plant biotechnology" Stockholm, October, 2007.

Andra möten

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

Referenser.

- Heintze, S.G. 1961. Studies on cation-exchange capacities of roots. Plant Soil 13: 365-381.
- Herren, T. and Feller, U. 1997. Transport of cadmium via xylem and phloem in maturing wheat shoots: Comparison with the translocation of zink, strontium and rubidium. Ann. Bot. 80: 623-628.