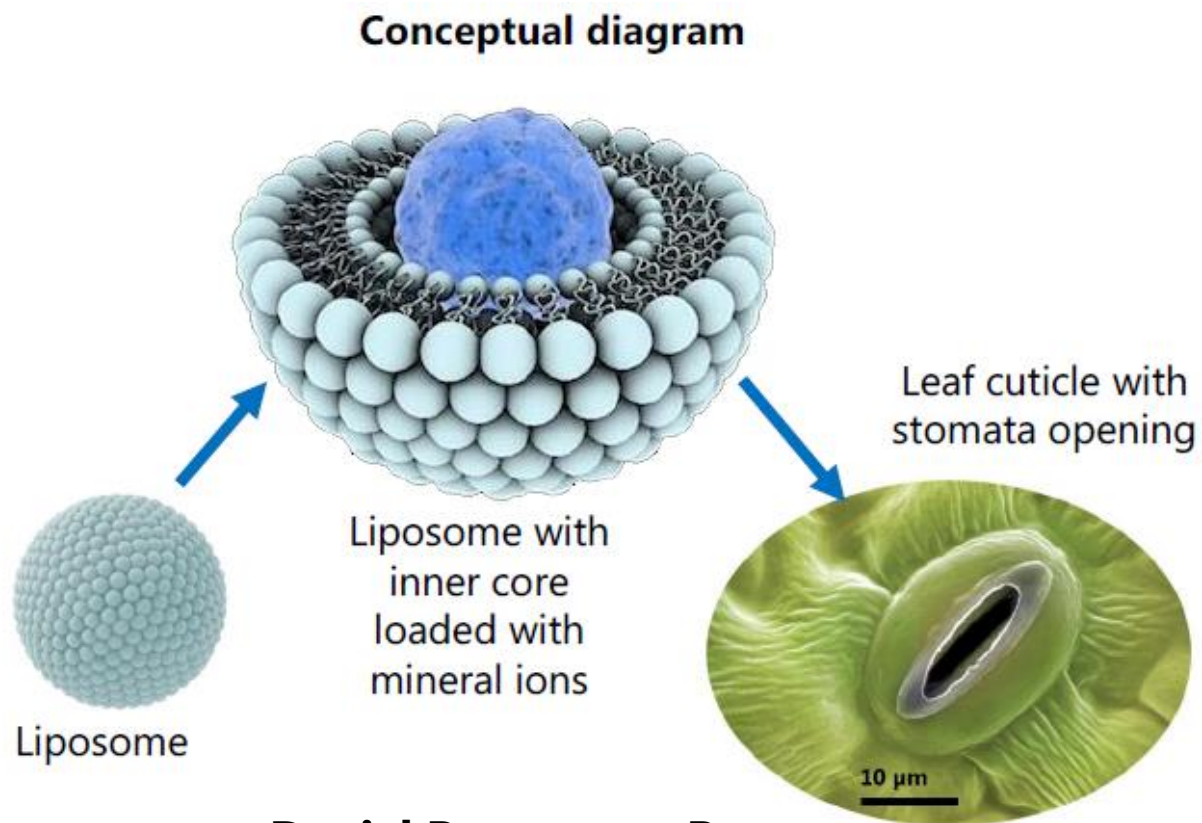
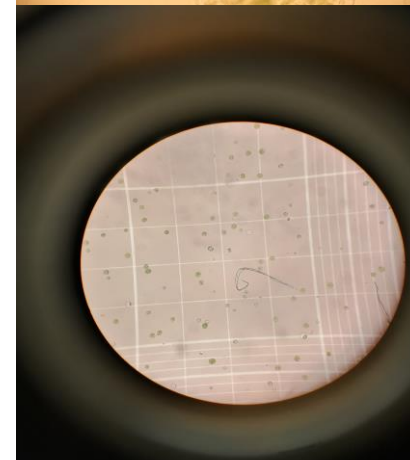
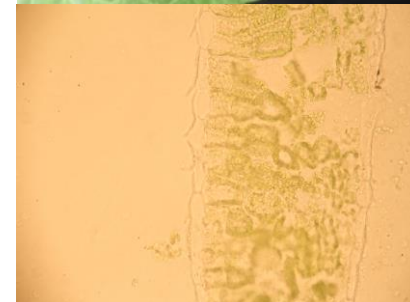


# Kan liposomer øge effektiviteten af bladgødskning?



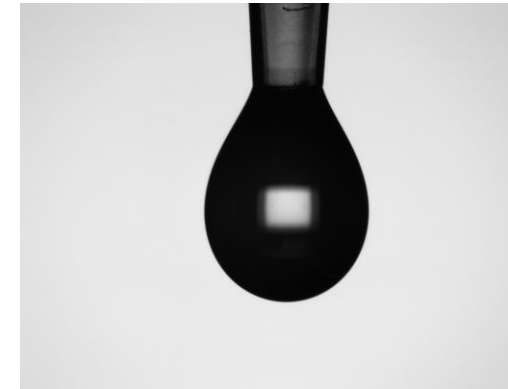
**Daniel Pergament Persson**  
**Lektor, Plant and Soil section, Københavns universitet**

**Industripartnere: Flex Fertilizer Aps, Vesoe Aps and Aage Christensen Aps**

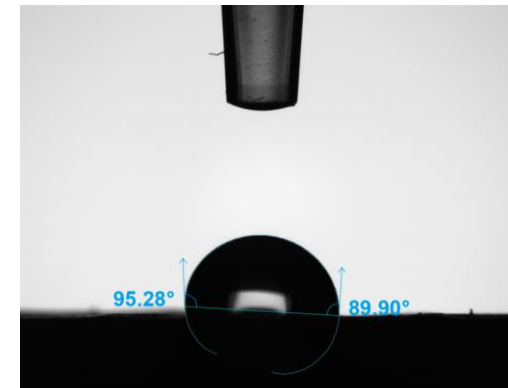


# Hvilke udfordringer er der med bladgødskning?

- **Der skal bruges et klæbe-sprede middel (detergent)**
  - hvordan måler vi effektiviteten af forskellige detergenter?
  - er detergenten miljøfarlig/biologisk nedbrydeligt?
  - hvad koster den?
- **Der kan kun sprøjtes en begrænset mængde ud, grundet:**
  - opløselighed af næringsstoffet
  - risiko for svedning og/eller toksisitet
- **For næringsstoffer med lav mobilitet inde I planten skal der sprøjtes kontinuerligt**
  - dårlig dokumentation og forståelse af hvilke processer som er afgørende for mobiliteten



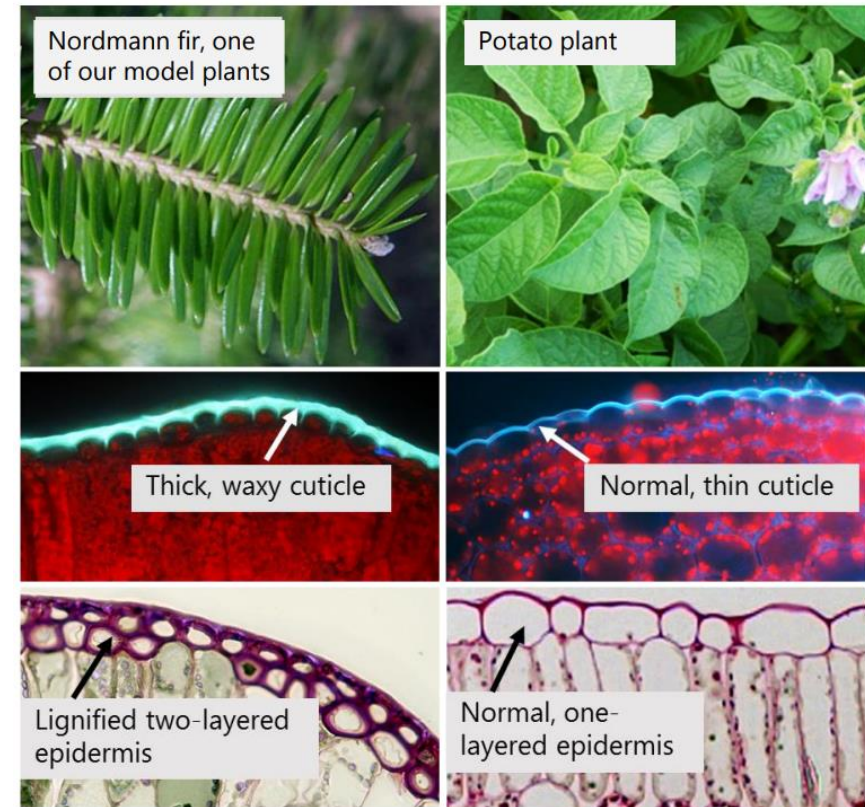
Overfladespænding



Kontaktvinkel

# Hvilke udfordringer er der med bladgødskning?

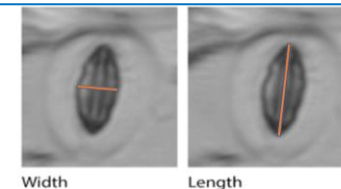
- **Alle bladoverflader er forskellige:**
  - den kemiske sammensætning af bladvokset (kutikulaen)
  - tykkelse og topografi af kutikula
  - tykkelsen af cellevæggen lige under kutikula (epidermis)
- **Alle planters spalteåbninger (stomata) er forskellige:**
  - densitet – spalteåbninger per arealenhed
  - størrelse; længde og bredde
- **Udtørring/genopfugtning**
  - Kan der dannes en vandfilm mellem overfladen og ind igennem stomata?



## Stomata density and morphology

50 stomata/mm<sup>2</sup> adaxial

85 stomata/mm<sup>2</sup> abaxial

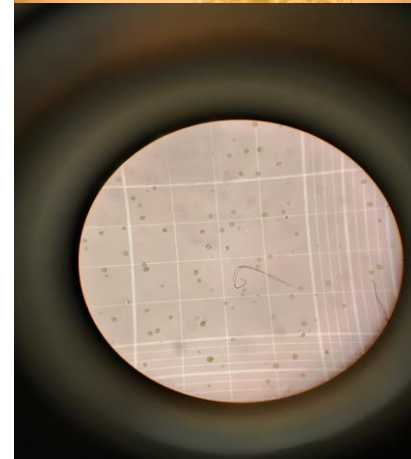
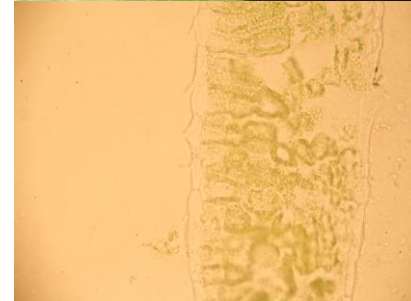


Width

Length

# Er alle afgrøder egnet til bladgødskning?

- **Afgrøder har forskellig "wettability"**
  - salat er "highly wettable"
  - broccoli og porre er "unwetterable"
- **I "unwetterable" afgrøder er effektiviteten meget lav**
- **F.eks kun ca. 5% af udprøjtet Mg and Fe (Barlas et al. 2023, *Plants*)**



**Table 2.** Contact angles of water ( $\theta_w$ ), glycerol ( $\theta_g$ ) and diodomethane ( $\theta_d$ ) with adaxial and abaxial leaf surfaces of lettuce, broccoli and leek plants. Values are means  $\pm$  standard deviations (SD). For the same species, lower-case letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between leaf sides. For the same leaf side, capital letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between species.

Species	Leaf Side	$\theta_w$ (°)	$\theta_g$ (°)	$\theta_d$ (°)
Lettuce	Adaxial	75.6 $\pm$ 7.4 aC	54.1 $\pm$ 6.8 aC	62.4 $\pm$ 5.1 aC
	Abaxial	57.7 $\pm$ 11.6 bB	58.1 $\pm$ 5.8 aB	55.8 $\pm$ 5.7 bB
Broccoli	Adaxial	131.3 $\pm$ 5.5 bB	138.0 $\pm$ 5.0 aA	97.9 $\pm$ 3.6 bB
	Abaxial	137.9 $\pm$ 6.7 aA	136.6 $\pm$ 3.7 aA	105.4 $\pm$ 6.4 aA
Leek	Adaxial	143.5 $\pm$ 5.1 aA	133.7 $\pm$ 5.4 bB	108.4 $\pm$ 4.9 aA
	Abaxial	143.4 $\pm$ 3.2 aA	139.4 $\pm$ 4.0 aA	103.4 $\pm$ 6.8 bA

**Unwetterable:  $\theta > 90$  grader**



# “Liposome-based foliar fertilization to boost climate friendly productivity and quality in high-value crops with resistant hydrophobic cuticles” via IFD; Innovationsfonden

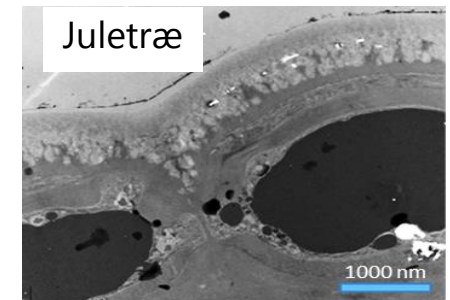
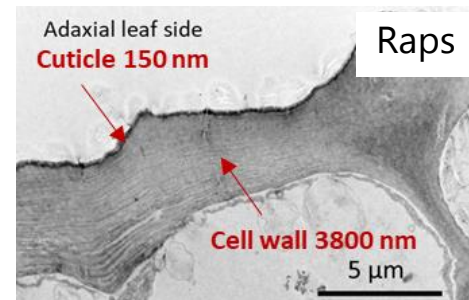
- Juletræproduktionen har problemer med Ca og Mg mangel
- Raps har hyppigt problemer med B
- Begge afgrøder har tykke og meget hydrofobe bladoverflader

**Kan liposomer øge effektiviteten af bladgødskning –især I disse “unwetable” afgrøder?**

- “Wettability” af rapsblade:

**Unwetable:  $\theta > 90$  grader**

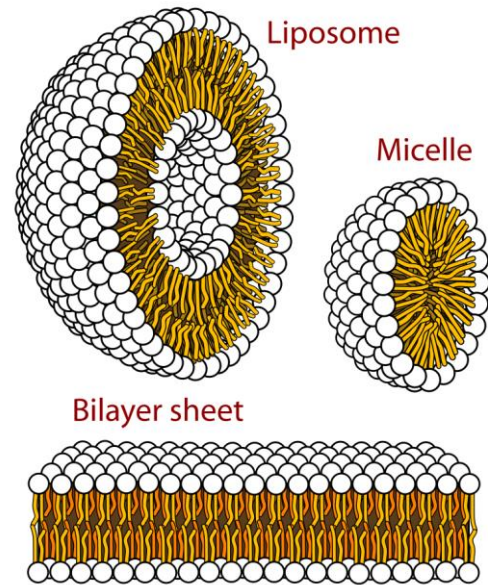
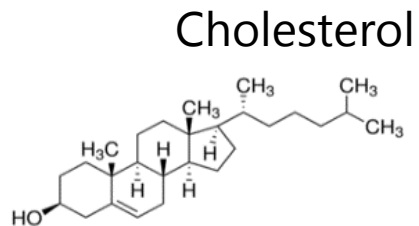
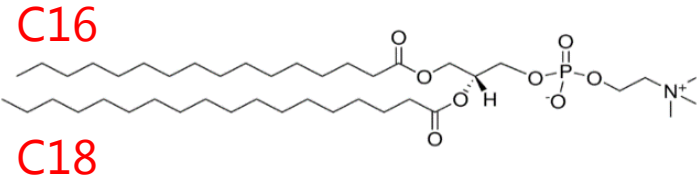
Compound	Water	Glycerol	Diiodomethane
<b>Contact angle adaxial</b> <i>n = 3</i>	140.5 ± 2.9	142.4 ± 8	95.8 ± 1.9
<b>Contact angle abaxial</b> <i>n = 3</i>	142.3 ± 4.1	129.1 ± 5	104.3 ± 4.5



	Cuticle thickness nm	Cell wall thickness nm
Potato	70	900
Rapeseed	150	3800
Nordmann fir	2000	3000

# Liposomer

Phosphatidylcholine; fosforlipider fra sojabønne (HSPC)



- HSPC fra sojabønne er et billigt og bionedbrydeligt materiale
- Cholesterol, fra fåruld, indsættes for at stabilisere liposomerne
- Syntesen af liposomer er velkendt, især indenfor medicinforskning
- En majoritet af Corona-vaccinerne blev leveret med liposomer!

# Liposomerne kan fyldes med næringsstoffer

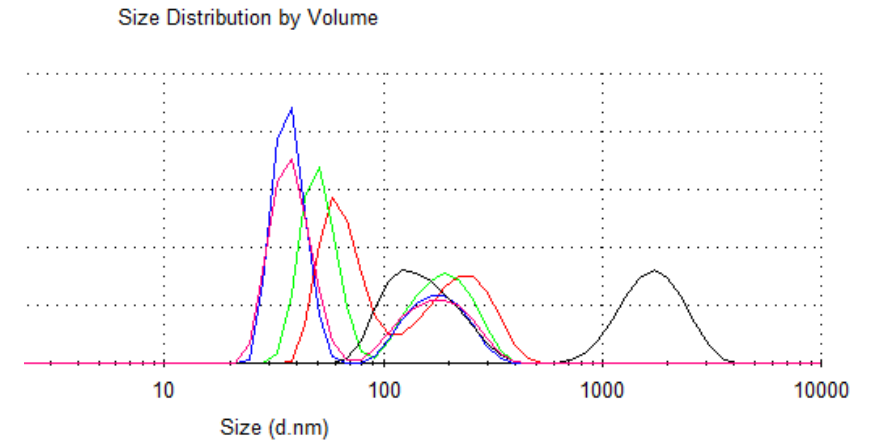
Uden ekstrudering

## Fordele (+):

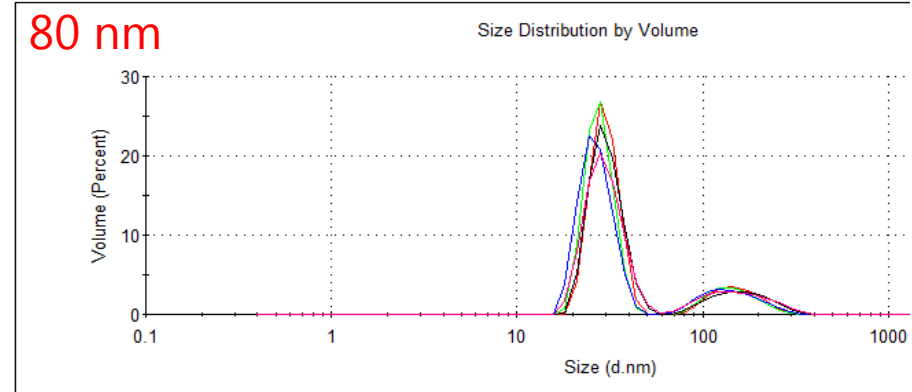
- + Liposomer dannes spontant ved opvarmning, i en opløsning
- + Størrelsen kan "ekstruderes" til ensartet størrelse (<100 nm)
- + Stabile i minimum 6 uger
- + Vil enkapsulere næringsstofferne i opløsningen
- + Kan lades med fluorescerende markører eller ioner til mikroskopi og massespektrometri

## Ulemper (-) og Ukendt (?):

- Kan ikke blandes med sprede/klæbemidler
- ? Skal overleve trykbelastning i sprøjteudstyr
- ? Næringsstofferne kan "leake" ud
- ? Stabiliteten inde i planten er ukendt



Med ekstrudering



## “Ønskeliste” for Liposomerne...

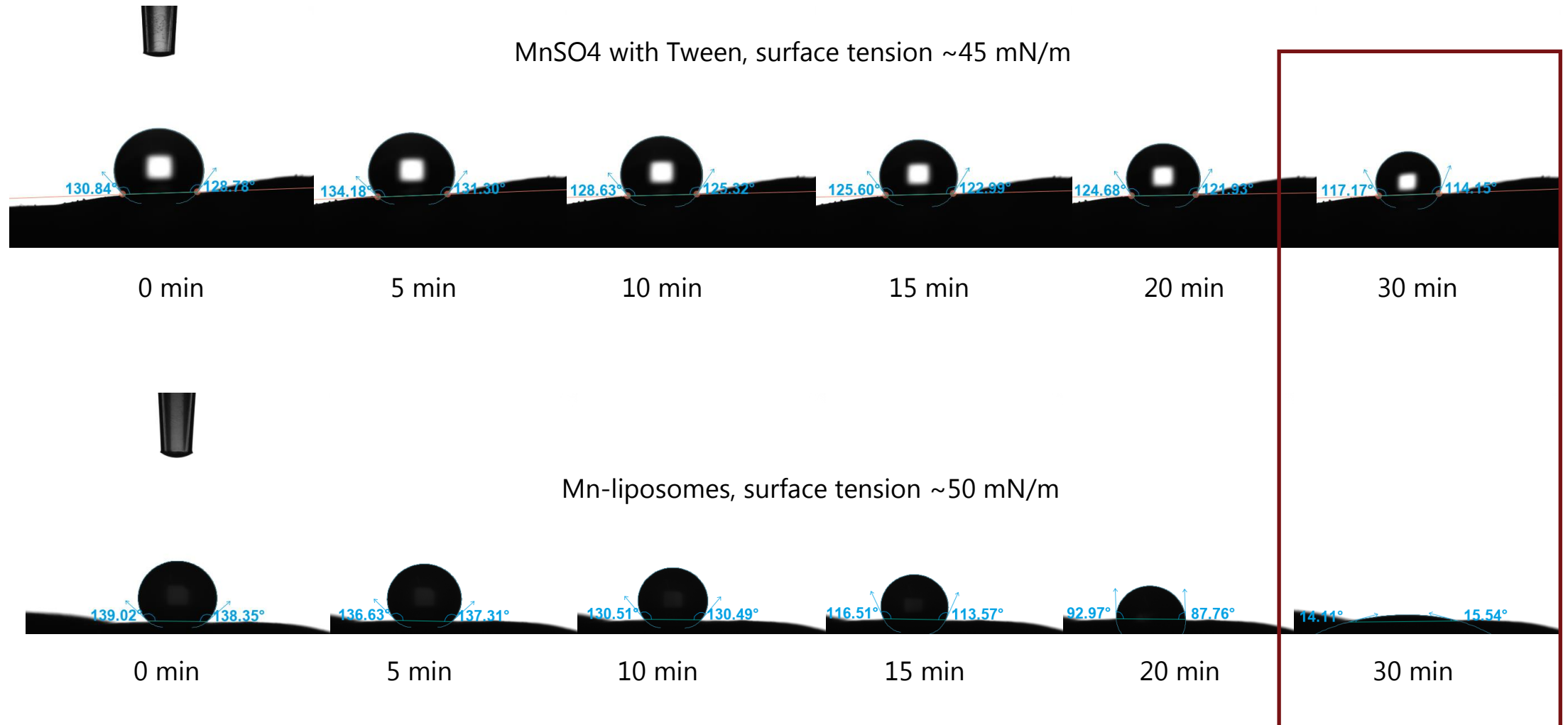
1. Gode klæbe/sprede egenskaber
2. Hurtig penetration hen over en tyk kutikula/igennem stomata
3. Sprede sig inde i plantens blad
4. Optages i cellerne...
5. ...inklusive phloemcellerne, så at næringsstofferne kan remobiliseres

1. Miljøvenlige
2. Stabile og praktiske
3. Fleksible
4. Billige
5. Mere effektive end nuværende produkter

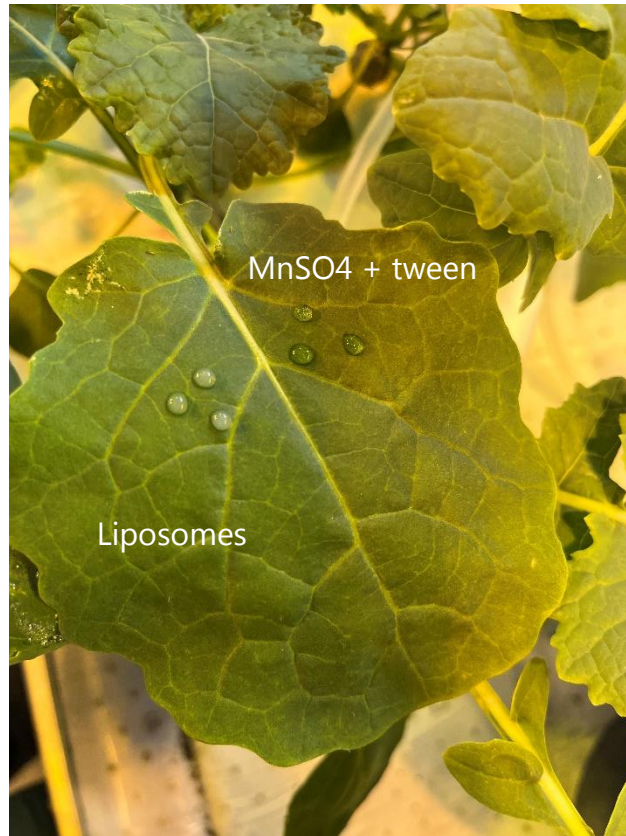
...men de skal samtidig være:



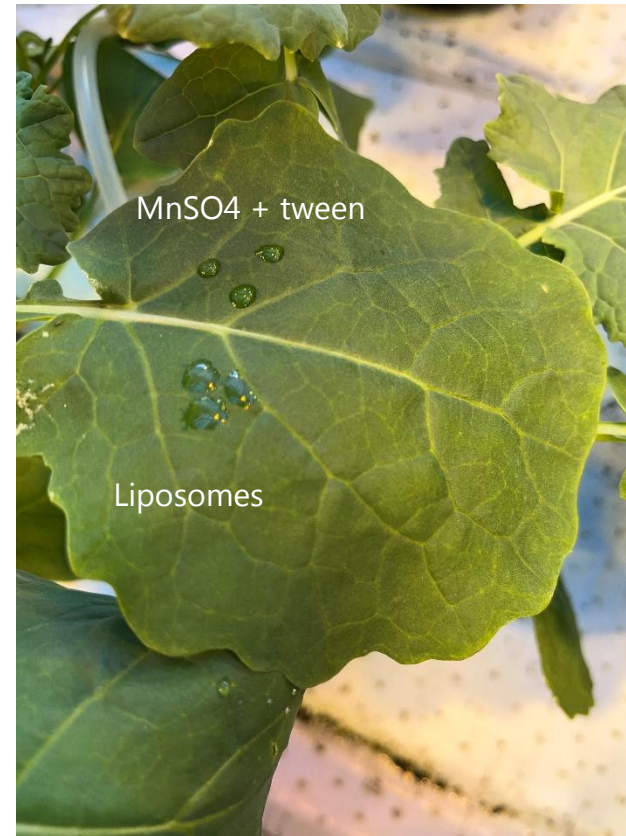
# Sammenligning mellem liposomer og en Mn-opløsning med detergent (Tween-20) -på et rapsblad



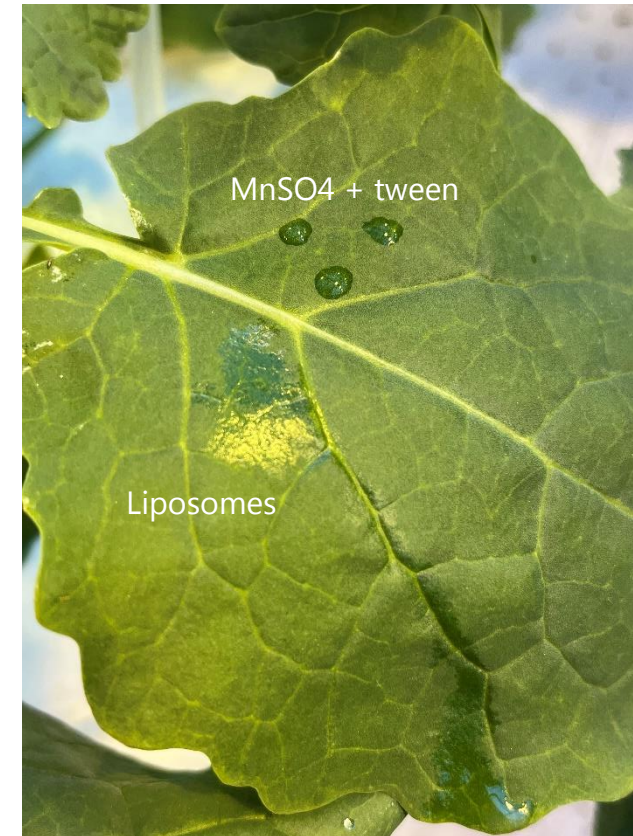
# Spredning på rapsblade er hurtig



Time: 0



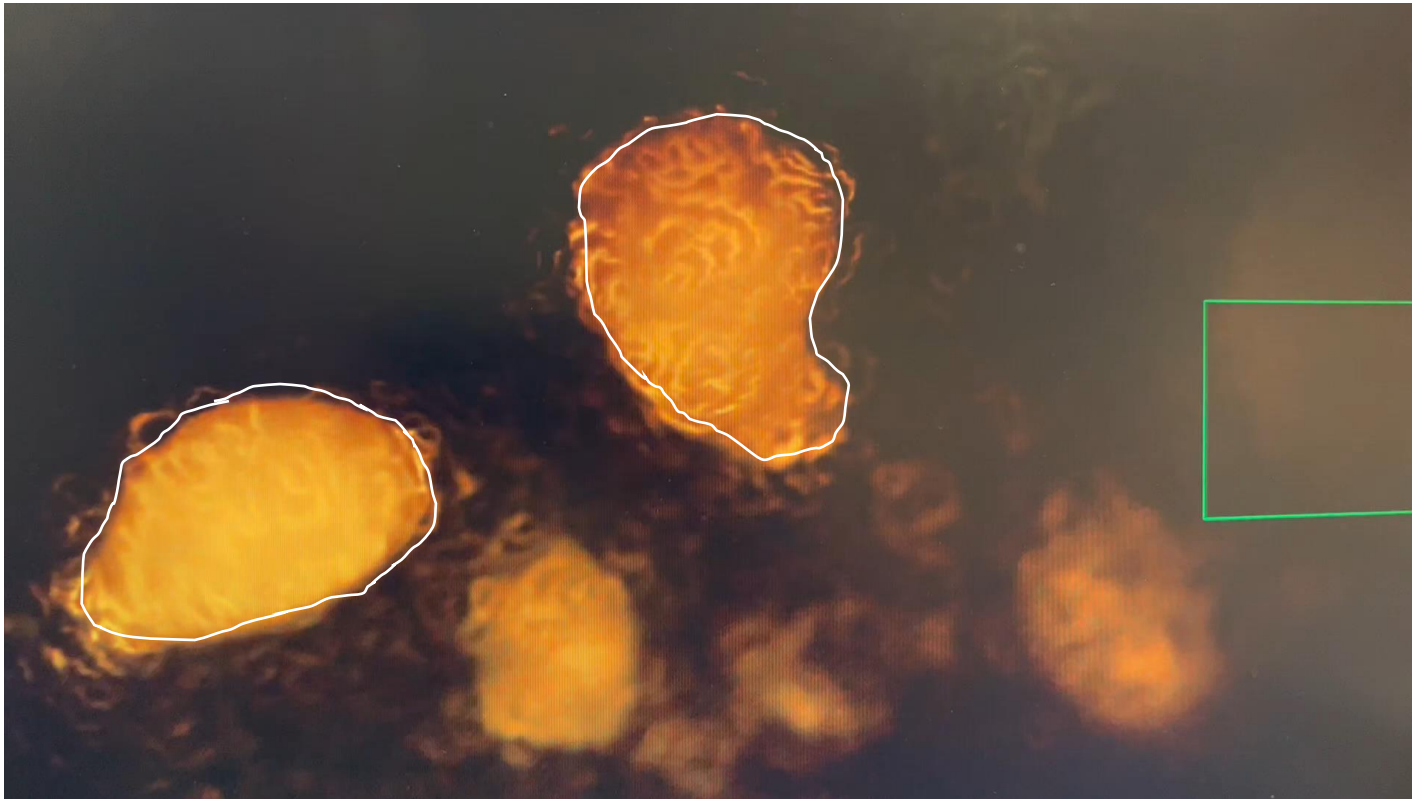
Time: 1 hour



Time: 2 hours

# Spredning på rapsblade – fine dråber

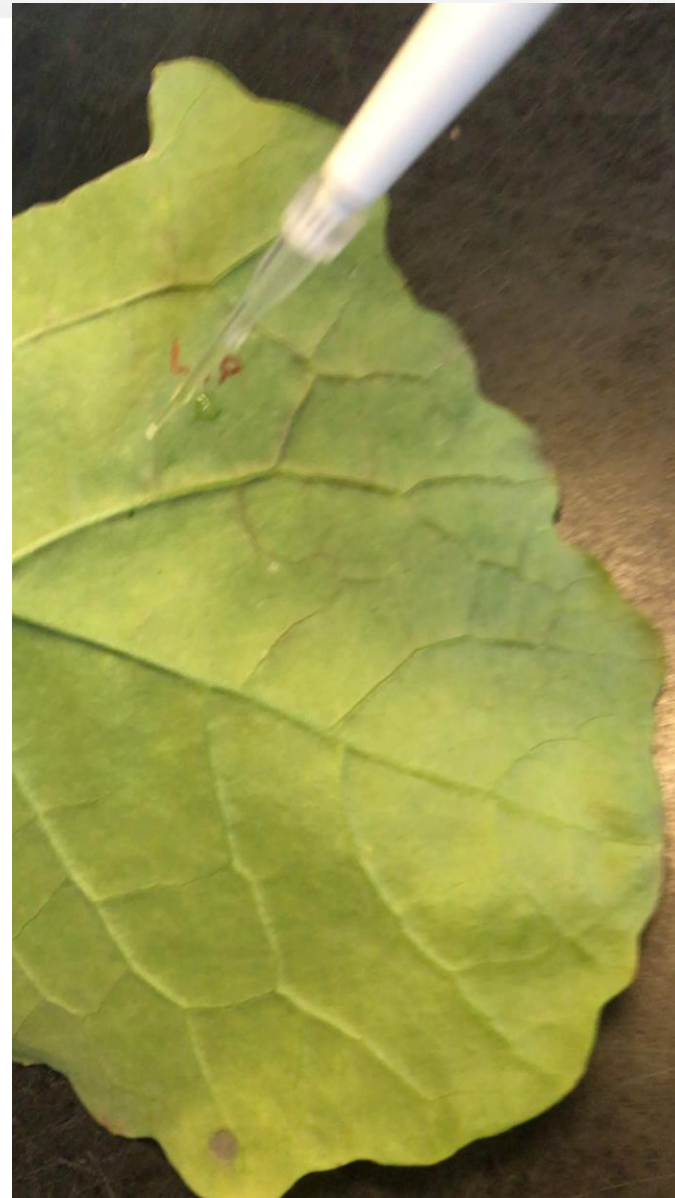
Fluorecerende liposomer på et rapsblad – I real-tid





Liposomerne sidder  
godt fast...

...og kan nemt  
genopfugtes



# Kvantificering af spredningen

- Skaleret
- Hvid balanceret (white-balanced)
- Homogent lys
- Photo-box



## Billede med skaleret, hvid baggrund:

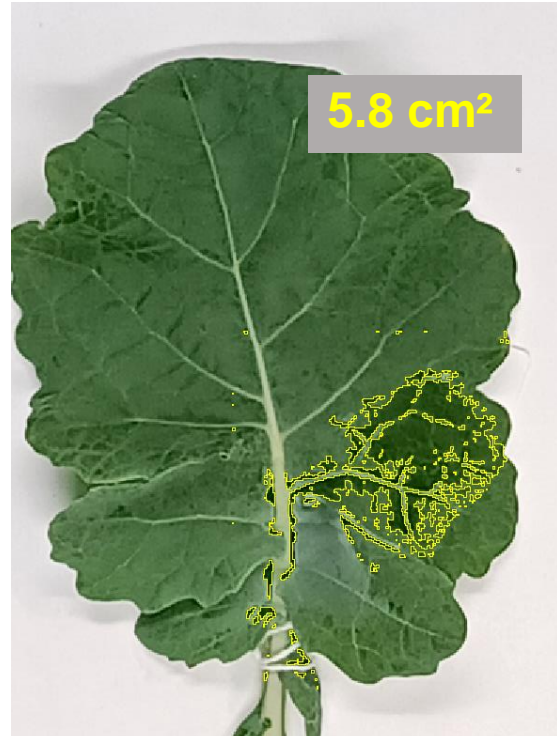


**Scaled picture (cm)**



# Analyse af spredning

Mn-Liposome



Mn-opløsning med detergent (Silwet Gold)



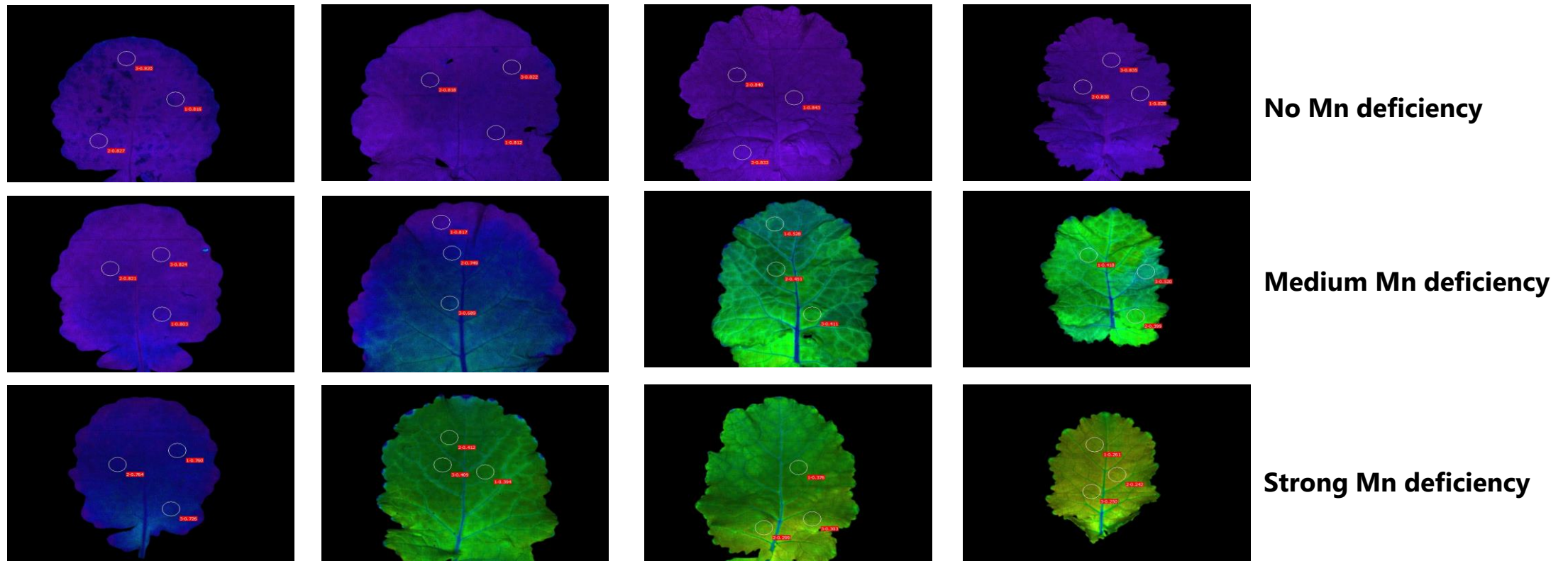
Liposomerne spreder sig ~6 gange mere effektivt på rapsoverflader

# Kan Mn-liposomer så redde Mn-manglende rapsplanter? "Proof-of-concept"



Oldest

Youngest



PAM Imaging: Blå=ikke Mn mangel Grøn=Mn mangel

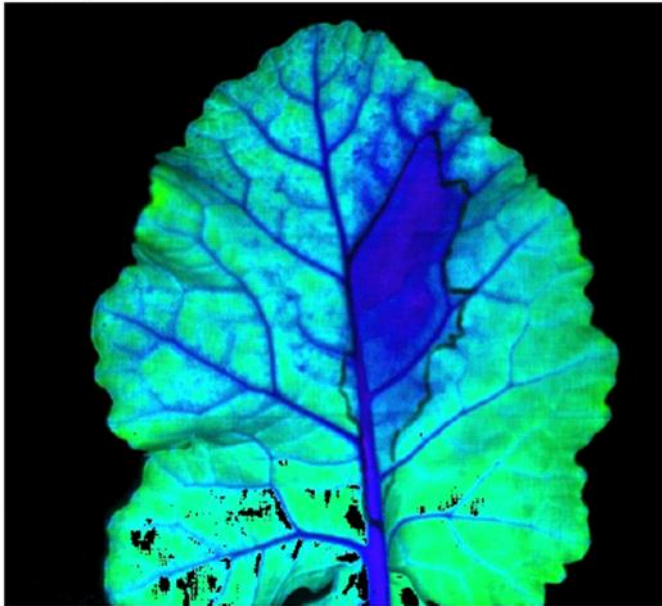


# Mn-liposomer har en tydelig effekt i det behandlede område

## Spredner de sig også inde i bladet?

### PAM / confocal on a treated brassica leaf – “spread gradient” study

Leaf 6, 5 % Mn



#### Treatment

4 x 4 uL drops applied 4 times on the abaxial side



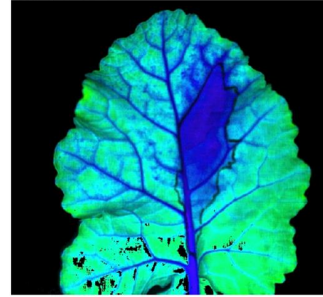
- I det behandlede område er effekten klar – se nummer 1 og 2
- Udenfor det behandlede område er der nogen effekt, men ikke tydelig
- Prøve 1-8 blev analyseret i (confocal) mikroskop

### Prøve 1 og 2:

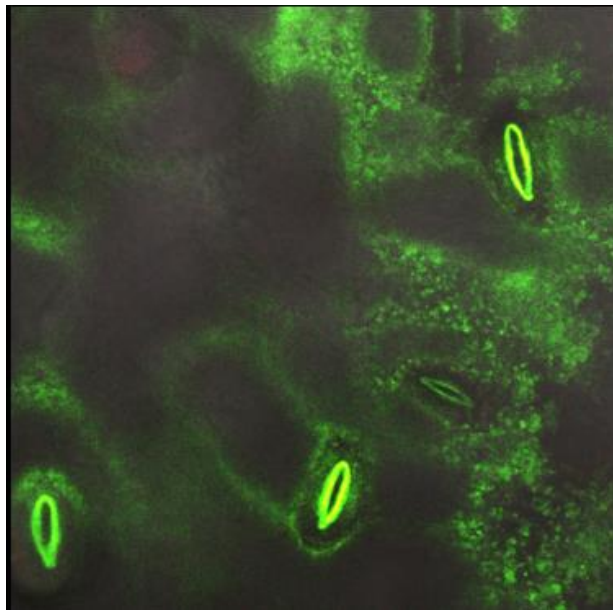
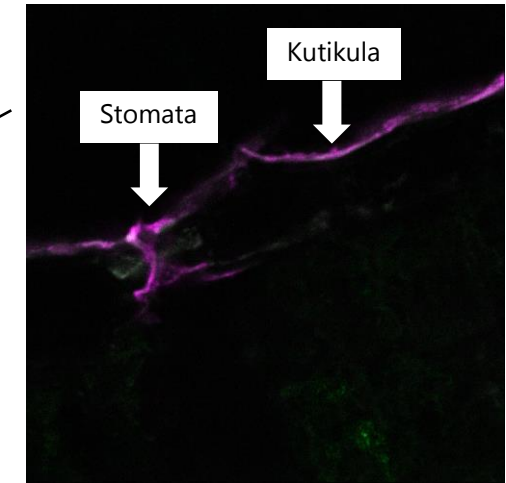
- Liposomerne kan tydeligt ses på overfladen
- De penetrerer gennem stomata
- Kan tydeligt ses 2-3 cellelag I dybden (30-50  $\mu\text{m}$  ned)

### PAM / confocal on a treated brassica leaf – "spread gradient" study

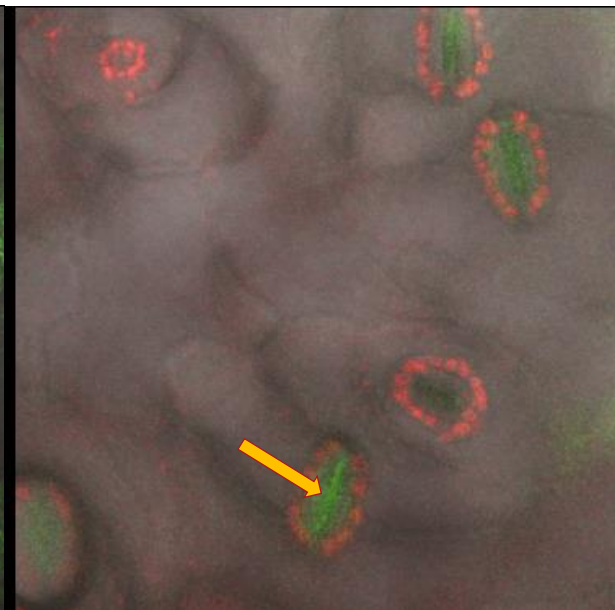
Leaf 6, 5 % Mn



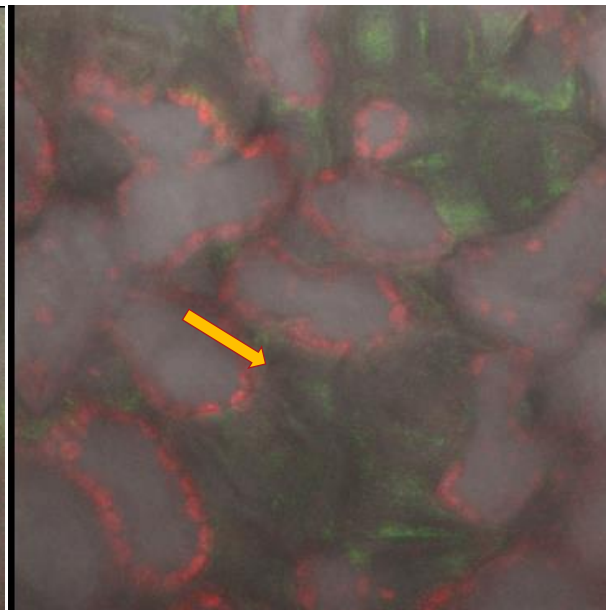
**Treatment**  
4 x 4  $\mu\text{L}$  drops applied 4 times on the abaxial side



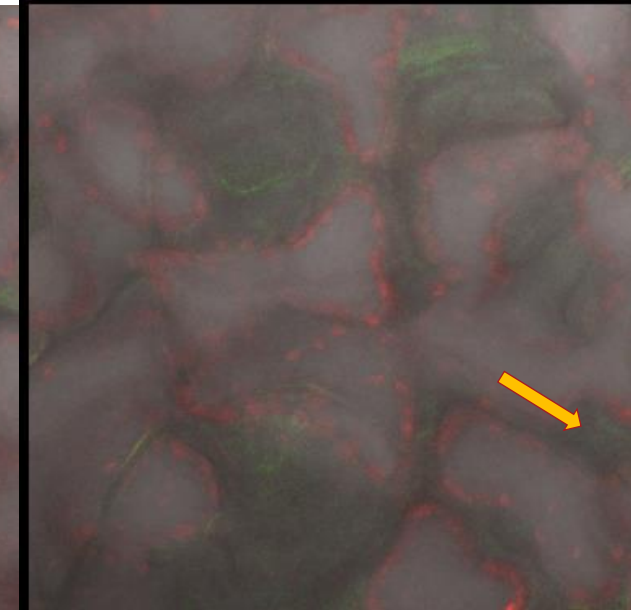
Bladoverfladen (med stomata)



10 $\mu\text{m}$  dybde



30 $\mu\text{m}$  dybde



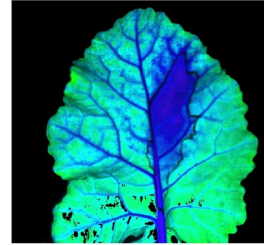
50 $\mu\text{m}$  dybde



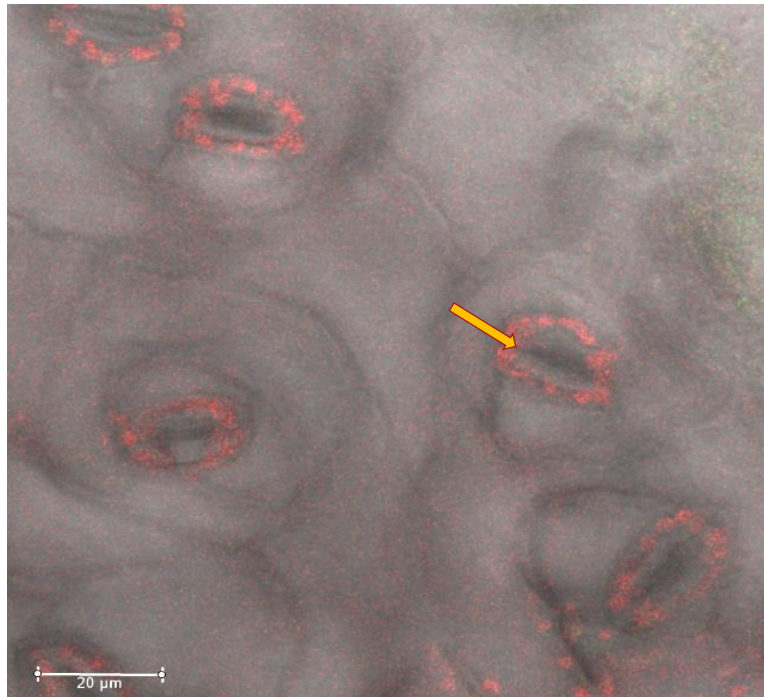
# Prøve nr 4 – Udenfor det behandlede område

PAM / confocal on a treated brassica leaf – “spread gradient” study

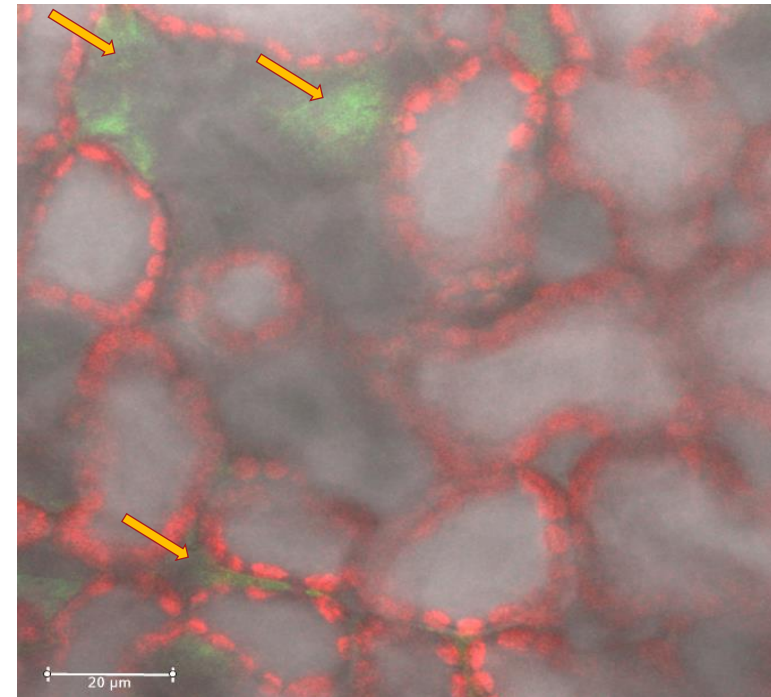
Leaf 6, 5 % Mn



**Treatment**  
4 x 4 uL drops applied 4 times on  
the abaxial side



Ingen liposomer på overfladen



Liposomer I 30 um dybde



## Sammenfatning: Kan liposomer øge effektiviteten af bladgødskning?

- Raps og juletræer er "unwettable", med tykke og hydrofobe overflader
- I disse planter er B, Ca og Mg problematiske
- Liposomer kleber, spreder og penetrerer bladoverfladen på raps...
- ...tilsyneladende mere effektivt end mange detergenter
- Liposomer kan fyldes med Mn og restaurere Mn-mangel i raps

### Uafklaret:

- Er liposomerne intakte igennem hele processen?
- Kan de remobiliseres?

# Tak for ordet!

