



Doctoral Thesis

The influence of organic ligands on zinc availability to wheat

Author(s):

Gramlich, Anja

Publication Date:

2013

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-009932520> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 21145

**THE INFLUENCE OF ORGANIC LIGANDS
ON ZINC AVAILABILITY TO WHEAT**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

ANJA MADLEINA GRAMLICH
Dipl. Umwelt-Natw. ETH

born 22 February 1983
citizen of Regensdorf, Zurich

accepted on the recommendation of

Prof. Rainer Schulin, ETH Zurich
Prof. Emmanuel Frossard, ETH Zurich
Prof. Ellis Hoffland, Wageningen University

2013

Summary

Zinc (Zn) is essential as trace element in human as well as in plant nutrition. It is supplied to humans via the food chain mainly from soils through plants and animals. However, many soils in the world are deficient in plant available Zn, causing not only problems for agricultural crop production but also for human Zn nutrition. Since Zn deficiency in plants is often not caused by a lack of Zn per se in soil, but rather of low availability due to strong Zn binding to the soil matrix, enhancing soil Zn availability for plant uptake is a promising strategy to address the problem. There are various approaches to achieve this through adequate agricultural management practises, e.g. by growing plants that release Zn mobilising root exudates as pre-crops or co-crops, or by incorporation of organic matter into soil with the idea that organic ligands are produced by decomposition that form soluble complexes with Zn. While it is known that such complexation can bring additional Zn into the soil solution, it is much less known to what extent this also translates into increased Zn uptake by crop plants. Therefore, the objective of this PhD thesis was to investigate how complexes with dissolved organic ligands affect the availability of Zn for uptake by wheat roots.

To assess the influence of metal-ligand complexes on the bioavailability of a metal it is necessary to determine its speciation in the soil solution, and in particular the activity of the free metal ion in the case of Zn, as this is the form generally thought to govern the uptake of Zn by plant cells. The permeation liquid membrane

(PLM) technique was considered method of choice, as it is the only currently available method designed to measure free metal concentrations with a short analysis time of 1 h and at low costs. However, it had only been validated for cadmium (Cd), copper (Cu), nickel (Ni) and lead (Pb). Thus, in the first part of this thesis we tested the effect of carrier concentrations and pH on Zn transport across the organic PLM membrane and the ability of the technique to measure free Zn in synthetic plant nutrient solution. We found that Zn trans-membrane transport was dependent on the concentration of the carrier molecule lauric acid (LA), whereas variations in the concentration of the other carrier molecule, the crown ether Kryptofix 22DD, showed no effect, suggesting that Zn is not transported via the «classical» PLM transport mechanism by binding to the crown ether. The flux of Zn across the PLM membrane increased with increasing pH and decreased with increasing ligand concentrations. For a LA concentration of 0.05 M, the theoretical PLM permeability criterion was calculated to be $\ll 1$, indicating that trans-membrane transport was the rate limiting process, which is the underlying assumption in using PLM to measure free metal concentrations. Under these conditions, PLM measurements agreed well with speciation calculations and with Donnan membrane technique (DMT) measurements in the presence of ligands forming negatively charged Zn-complexes (EDTA or citrate). In the presence of histidine higher free Zn concentrations than calculated were measured by PLM and DMT, suggesting that positively charged complexes contributed to cross-membrane transport in both methods.

In the second part of the thesis, ^{65}Zn uptake by wheat seedlings in the presence of the natural ligands citrate or histidine was compared to uptake in the presence of the synthetic ligand EDTA at the same free Zn concentration under hydroponic conditions ($\text{Zn}^{2+} \sim 50 \text{ nM}$). The experiments were carried out using two wheat cultivars differing in Zn efficiency. In the presence of citrate Zn root uptake was enhanced ~ 3.5 times and in the presence of histidine by a factor of ~ 9 , compared to the EDTA treatments. Comparing uptake from nutrient solutions containing ligands only with solutions containing the same ligand concentration and in addition Zn, showed that cit-

rate uptake was slightly reduced in the presence of Zn and accounted only for a fraction of the enhanced Zn uptake. This suggests that the enhancement was primarily due to increased supply of free Zn to the root surface by diffusion and dissociation of Zn-citrate complexes. Histidine uptake was much higher than citrate uptake and not influenced by the presence of Zn. As histidine forms stronger complexes with Zn than citrate, the results suggest that the enhancement of Zn uptake in the presence of histidine was in part due to the uptake of undissociated Zn-histidine complexes. The Zn efficiency of the two cultivars had no effect on Zn uptake in none of the experiments. It indicates that there were no cultivar specific differences in Zn transporter activities. It cannot be excluded that the plants exuded cultivar specific ligands; however, in comparison to the high externally applied ligand concentrations they could have had only negligible effects.

The goal of the third part of the thesis was to gain a better understanding of the potential role of kinetic limitations in Zn-complex dissociation vs. diffusion limitations in root Zn uptake. For this purpose, we performed experiments with the same Zn/ligand treatments as before in which we compared root ^{65}Zn uptake from stirred, non-stirred and agar-containing nutrient solutions. Analogous experiments were also performed using PLM and «diffusive gradients in thin films» (DGT) probes as bio-mimetic devices, in order to identify the potential role of diffusion limitation in root Zn uptake. In treatments with EDTA or ligand-free Zn solution increasing diffusion layer thickness by not stirring and agar addition reduced Zn fluxes into roots to a similar extent as into PLM and DGT probes, indicating that the reduced uptake was due to diffusion limitation. In the presence of citrate the flux of Zn into the roots was of similar to in the presence of EDTA for the same total and free Zn concentrations under stirred conditions, but was not decreased in the non-stirred and agar treatments. This suggests that complex dissociation compensated for reduced diffusion and entire complexes were not taken up. By far the highest Zn influx into roots and also showing no decrease with non-stirring and agar was found in the histidine treatments. Dissociation kinetics inferred from PLM measurements

explained a large part, though not all, of the increased Zn uptake by the plants in the presence of histidine. The difference may have been due to uptake of neutral or positive Zn-histidine complexes.

In conclusion, the results of this thesis suggest that Zn uptake by wheat is possible in form of undissociated neutral and positively charged complexes with histidine. On the other hand, increased supply to root cell surfaces through complex dissociation appeared to be the main cause for enhanced Zn uptake under diffusion-limited conditions in the presence of citrate, which only forms negatively charged complexes with Zn.

Zusammenfassung

Zink (Zn) ist ein essentielles Spurenelement für Menschen und Pflanzen, welches vom Menschen über die Nahrungskette, d.h. aus dem Boden über Pflanzen und Tiere, aufgenommen wird. Allerdings ist Mangel an pflanzenverfügbarem Zn in Böden weltweit ein verbreitetes Problem. Es führt zu Schwierigkeiten in der landwirtschaftlichen Nutzpflanzenproduktion und kann schliesslich auch Zn-Mangel beim Menschen verursachen. Da häufig nicht tiefe Totalgehalte der Böden die Ursachen für Zn-Mangel in Pflanzen sind, sondern die geringe Verfügbarkeit aufgrund starker Sorption an die Bodenmatrix, ist die Verbesserung der Pflanzenverfügbarkeit des schon im Boden vorhandenen Zn eine vielversprechende Lösungsstrategie. Verschiedene Bewirtschaftungsmethoden können angewandt werden, um dieses Ziel zu erreichen. Zum Beispiel können geeignete Fruchtfolgen oder Mischkulturen mit Pflanzen angebaut werden, welche Zn mobilisierende Liganden in die Bodenlösung ausscheiden. Alternativ können Ernteüberreste in den Boden eingearbeitet werden, mit der Idee, dass bei deren Abbau Liganden freigesetzt werden, welche lösliche Komplexe mit Zn bilden. Es ist bekannt, dass durch solche Komplexierungen mehr Zn in die Bodenlösung gebracht werden kann. Man weiss jedoch wenig darüber, ob dies auch zu einer erhöhten Zn-Aufnahme durch Kulturpflanzen führt. Deshalb war das Ziel dieser Doktorarbeit zu untersuchen, ob und wie stark Komplexe mit gelösten organischen Liganden die Zn-Verfügbarkeit für die Aufnahme durch Weizenwurzeln beeinflussen.

Um den Einfluss von Metall-Ligand-Komplexen auf die Bioverfügbarkeit eines Metalls beurteilen zu können, ist es notwendig, deren Spezierung in der Bodenlösung zu kennen. Insbesondere ist die Aktivität der freien Metallionen in der Lösung wichtig, da allgemein angenommen wird, dass die Zn-Aufnahme durch Pflanzenzellen hauptsächlich durch die freie Zn-Konzentration bestimmt wird. Um die freie Zn-Konzentration in Lösungen zu messen, wurde für diese Arbeit die «Permeation Liquid Membrane» (PLM) Technik, aufgrund ihrer kurzen Messzeit von 1 h und der geringen Analysekosten, ausgewählt. Die Methode wurde aber bis jetzt nur für die Messung von Cadmium (Cd), Kupfer (Cu), Nickel (Ni) und Blei (Pb) validiert. Deshalb testeten wir im ersten Teil der Arbeit den Einfluss der Transportermolekül-Konzentrationen und des pH-Wertes auf den Zn-Transport durch die organische PLM Membran und ob die Technik tatsächlich freie Zn-Konzentrationen in synthetischen Pflanzennährlösungen messen kann. Die Resultate zeigten, dass der Zn-Transport durch die Membran von der Konzentration des Transportermoleküls Laurinsäure abhängt, jedoch von Veränderungen der Konzentration des zweiten Transportermoleküls, des Kronenether Kryptofix 22DD, nicht beeinflusst wird. Dies deutet daraufhin, dass Zn nicht über den «klassischen» PLM Mechanismus, d.h. über die Bindung an den Kronenether, durch die Membran transportiert wird. Der Zn-Transport war höher, je höher der pH-Wert der Lösung war und geringer je höher die Liganden-Konzentrationen waren. Für eine Laurinsäuren-Konzentration von 0.05 M ergab die Berechnung des «Permeabilitäts-Indexes» einen Wert $\ll 1$, was bedeutet, dass der Zn-Transport durch die Membran der limitierende Prozess war. Dies ist ein Indiz dafür, dass unter diesen Bedingungen die freie Metallkonzentration in der Lösung gemessen wird. PLM Messungen mit einer Laurinsäure-Konzentration von 0.05 M in Lösungen mit Liganden, die negativ geladene Komplexe mit Zn bilden (EDTA und Citrat), stimmten gut mit den Spezierungsrechnungen und mit Messungen mit der Donnan Membrantechnik (DMT) überein. PLM und DMT Messungen in Lösungen mit Histidin ergaben jedoch höhere freie Zn-Konzentrationen als berechnet wurde. Dies deutet darauf hin, dass positiv geladene Komplexe in beiden Messmethoden zum Zn-Transport beigetragen haben.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Aufnahme von ^{65}Zn durch Weizenkeimlinge aus hydroponischen Lösungen mit den natürlich vorkommenden Liganden Citrat oder Histidine mit der Aufnahme aus Lösungen mit der gleichen freien Zn-Konzentration aber gepuffert mit dem synthetischen Liganden EDTA verglichen ($\text{Zn}^{2+} \sim 50 \text{ nM}$). Die Experimente wurden mit zwei Weizensorten, welche sich in ihrer Zn-Effizienz unterscheiden, durchgeführt. In den Citrat-Behandlungen wurde die Zn-Aufnahme gegenüber den EDTA-Behandlungen ~ 3.5 mal und in den Histidin-Behandlungen um einen Faktor von ~ 9 erhöht. Vergleiche zwischen der Liganden-Aufnahme aus Nährlösungen, welche nur Liganden enthielten und solchen, welche Liganden und zusätzlich Zn enthielten, zeigten, dass die Citrat-Aufnahme durch Zn-Komplexierung leicht reduziert wurde. Dieses Experiment zeigte ebenfalls, dass die gesamte Citrat-Aufnahme nur einen Teil der verglichen zur Kontrolle erhöhten Zn-Aufnahme erklären konnte. Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte Zn-Aufnahme vor allem auf eine erhöhte Zufuhr von freiem Zn zur Wurzeloberfläche durch Diffusionslimitierung und Dissoziation von Zn-Citrat-Komplexen zurückzuführen ist. Die Histidin-Aufnahme war viel höher als die Citrat-Aufnahme und nicht durch die Zugabe von Zn zur Nährlösung beeinflusst. Da Histidin stärkere Komplexe mit Zn bildet als Citrat, legen die Ergebnisse nahe, dass die erhöhte Zn-Aufnahme in den Histidin-Behandlungen mindestens teilweise mit der Aufnahme von undissoziierten Zn-Histidin-Komplexe erklärt werden kann. Die Zn-Effizienz der beiden Weizensorten hatte keinen Einfluss auf die Zn-Aufnahme. Dies bedeutet, dass die Transporter-Aktivitäten der beiden Sorten nicht unterschiedlich waren. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Pflanzen Sorten spezifische Liganden ausschieden, aber im Vergleich zu den hohen extern zugegebenen Ligandkonzentrationen, hatten sie nur vernachlässigbare Auswirkungen.

Das Ziel des dritten Teils dieser Arbeit war, besser zu verstehen, welche Rolle kinetische Limitierungen der Zn-Komplex Dissoziation und Diffusions-Limitierungen in der Zn-Aufnahme durch Weizenwurzeln spielen. Zu diesem Zweck analysierten wir die ^{65}Zn Aufnahme durch Weizen aus gerührten, nicht-gerührten und Agar ent-

haltenden Nährlösungen mit den gleichen Zn/Liganden Behandlungen wie zuvor. Zusätzlich führten wir analoge Versuche mit PLM und «Diffusive Gradients in Thin Films» (DGT) Sonden durch, mit der Idee, dass diese Systeme die Rolle der Diffusionslimitierung auf die Zn-Aufnahme durch die Wurzeln erklären können. In Behandlungen mit EDTA oder in Lösungen ohne Liganden verringerte sich die Zn-Aufnahme in die Wurzeln mit zunehmender Diffusionsschichtdicke in ähnlicher Weise, wie die Zn-Flüsse in PLM und DGT Systeme. Dies bedeutet, dass hier die verringerte Aufnahme auf die eingeschränkte Diffusion zurückgeführt werden kann. In den Citrat-Behandlungen war die Zn-Aufnahme in die Wurzeln in gerührten Systemen ähnlich wie die Zn-Aufnahme in den EDTA-Behandlungen aus Lösungen mit den gleichen totalen und den gleichen freien Zn-Konzentrationen. Im Unterschied zu den EDTA-Behandlungen wurde der Zn-Fluss in den Citrat-Behandlungen jedoch nicht geringer, wenn die Diffusionsschicht entweder durch Nicht-Rühren oder Agarzugabe vergrößert wurde. Dies bedeutet, dass die Komplex-Dissoziation den, durch eingeschränkte Diffusion reduzierten Fluss, kompensieren konnte. Die mit Abstand höchsten Zn-Flüsse in die Wurzeln wurden in den Histidin-Behandlungen gemessen und auch hier hatte die Diffusionsschichtdicke keinen Einfluss auf die Zn-Aufnahme. Dissoziationskinetiken aus den PLM Messungen legen nahe, dass die Dissoziation von Zn-Histidin-Komplexen auch eine wichtige Rolle spielen und sie können die erhöhte Zn-Aufnahme der Wurzeln bis zu einem gewissen Grad, jedoch nicht vollständig, erklären. Der verbleibende Unterschied könnte durch die Aufnahme von neutralen oder positiven Zn-Histidin-Komplexen erklärt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daraufhin, dass Weizenpflanzen undissoziierte Zn-Histidin-Komplexe aufnehmen können, wahrscheinlich aufgrund ihrer neutralen und positiven Ladungen. Die erhöhte Zn-Aufnahme aus Lösungen mit negativ geladenen Zn-Citrat-Komplexen kann wohl dadurch erklärt werden, dass die Zufuhr von freiem Zn zur Wurzeloberfläche unter diffusionslimitierenden Bedingungen durch Komplex-Dissoziation erhöht wurde.