

Aus dem Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Aufnahme, subzelluläre Verteilung und Translokation von  
blattappliziertem Phosphor und dessen Auswirkung auf die Entwicklung  
von Maispflanzen (*Zea mays* L.) unter Phosphormangel

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Agrar- und  
Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-  
Universität zu Kiel

vorgelegt von

M.Sc. Bruno Maximilian Görlach  
aus Gießen

Kiel, 2021



Aus dem Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Aufnahme, subzelluläre Verteilung und Translokation von  
blattappliziertem Phosphor und dessen Auswirkung auf die Entwicklung  
von Maispflanzen (*Zea mays* L.) unter Phosphormangel

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Agrar- und  
Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-  
Universität zu Kiel

vorgelegt von

M.Sc. Bruno Maximilian Görlach  
aus Gießen

Kiel, 2021

---

Dekan: Prof. Dr. Karl H. Mühling

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Karl H. Mühling

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Eichert

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Juli 2021

Gedruckt mit Genehmigung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Meinen Eltern und Großeltern  
in Dankbarkeit gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>Einleitung</b> .....	1
1.1 Phosphor – essentiell aber umstritten .....	2
1.2 Mais und Phosphor.....	8
1.3 Blattapplikation von Nährstoffen und deren Aufnahme über das Blatt.....	9
1.4 Wirkung und Bedeutung einer Phosphor-Blattapplikation für die landwirtschaftliche Nutzung .....	17
1.5 Zielsetzung.....	19
1.6 Referenzen.....	20
<b>Kapitel 1: Phosphate foliar application increases biomass and P concentration in P deficient maize</b> .....	31
<b>Kapitel 2: Uptake, subcellular distribution, and translocation of foliar-applied phosphorus: short-term effects on ion relations in deficient young maize plants</b> ....	43
<b>Kapitel 3: Evaluation of maize growth following early season foliar P supply of various fertilizer formulations and in relation to nutritional status</b> .....	74
<b>Diskussion</b> .....	94
5.1 Hintergrund .....	95
5.2 Hochgradiger Phosphormangel bei Mais hat keinen Einfluss auf die Aufnahme von blattappliziertem Phosphor.....	96
5.3 Die Aufnahme von blattappliziertem Phosphor wird nicht durch den Apoplasten beeinflusst .....	99
5.4 Die Translokation von blattappliziertem Phosphor begünstigt die Wirkung einer Phosphor-Blattdüngung .....	102
5.5 Eine Verdopplung der Phosphor-Applikationskonzentration reduziert die Applikationshäufigkeit bei gleichbleibender Effizienz.....	104

5.6 In Gefäßversuchen mit Bodensubstrat führt eine Phosphor-Blattdüngung zu einer höheren Konstanz der Trockenmasse und des Kornertrags .....	108
5.7 Bedeutung der Phosphor-Blattdüngung in Mais für die Zukunft.....	110
5.8 Referenzen.....	112
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>120</b>
<b>Summary</b> .....	<b>122</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>124</b>
<b>Anhang</b> .....	<b>126</b>

# Einleitung



## 1.1 Phosphor – essentiell aber umstritten

Gegenwärtig ist Phosphor (P), nach Stickstoff, der umstrittenste Nährstoff im landwirtschaftlichen Ökosystem. P gehört zu den essentiellen Nährstoffen für das pflanzliche Wachstum. Aufgrund des hohen pflanzlichen Bedarfs ( $3\text{--}5\text{ mg g}^{-1}\text{ TM}$ , Hawkesford et al. 2012) wird P als Makronährstoff klassifiziert und macht je nach Art der Nutzpflanze  $0,05\text{--}0,5\%$  der Gesamttrockenmasse aus (Vance et al. 2003). Nach Schachtman et al. (1998) und Richardson et al. (2009) wird der Nährstoff vor allem als Orthophosphat im Protonen Co-Transport aus der Bodenlösung aufgenommen. In Abhängigkeit des pH-Werts erfolgt die Aufnahme überwiegend als Dihydrogenphosphat ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), aber auch als Hydrogenphosphat ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) bzw. Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Jedoch ist die Aufnahme von anorganischem Phosphat ( $\text{P}_i$ ) über Pflanzenwurzeln begrenzt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass P überwiegend in gebundenen, stabilen und nahezu unlöslichen Formen vorliegt, eine große Reaktivität gegenüber zahlreichen Bodenbestandteilen aufweist und nur in sehr geringer Konzentration in der Bodenlösung ( $< 10\text{ }\mu\text{M}$ ) vorhanden ist (Bielecki 1973; Schachtman et al. 1998; Hinsinger 2001). Zusätzlich führt die P-Aufnahme zu einer charakteristischen Verarmungszone in der Rhizosphäre. Dies wird ebenfalls durch die geringe Diffusionsgeschwindigkeit ( $10^{-12}$  bis  $10^{-5}\text{ m}^2\text{ s}^{-1}$ ) von P-Ionen im Boden verstärkt (Schachtman et al. 1998). Somit ist die Konzentration des verfügbaren  $\text{P}_i$  in Böden niedriger, als die des pflanzlichen Gewebes, welche nach Raghothama (1999) bei  $5\text{--}20\text{ mM}$  liegt. Daher erfolgt die Aufnahme entgegen eines Konzentrationsgradienten und ist somit energieabhängig (Raghothama 1999). Im Gegensatz zu Stickstoff und Schwefel wird Phosphor in der Pflanze nicht reduziert und zählt nicht zu den assimilierten Nährstoffen. P verbleibt entweder in seiner anorganischen Form oder fungiert, aufgrund der Eigenschaft Esterbindungen einzugehen, als wichtige Komponente verschiedener Schlüsselmoleküle in der Pflanze (Hawkesford et al. 2012). Beispielsweise als Strukturkomponente in Nukleinsäuren und Phospholipiden, weshalb der Nährstoff eine große Bedeutung für den Aufbau der DNA sowie für den Aufbau und die Funktion von Biomembranen hat. Dort fungiert P nach Schachtman et al. (1998) und Hawkesford et al. (2012) als Brückenelement zwischen zwei Nukleotiden bzw. zwischen einem Diglycerid und einem weiteren Molekül (Aminosäure, Alkohol) und formt so die entsprechenden Makromoleküle (Nukleinsäuren bzw. Phospholipide). Nach Maathuis (2009) ist im Falle der Phospholipide die negative Ladung der Phosphatgruppe entscheidend für die räumliche Struktur der Biomembran, da sie der Lipidkomponente den stark hydrophilen Charakter

verleiht. Dies bestimmt die Funktion der Biomembran, welche vor allem zusammen mit Transportproteinen, in der selektiven Nährstoffaufnahme liegt (Hawkesford et al. 2012). Des Weiteren bindet  $P_i$  mittels Pyrophosphatbindungen an weitere Phosphatgruppen. Infolge dieser Bindungen entstehen die Energieträger des pflanzlichen Stoffwechselsystems, wie Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosintriphosphat (ATP). Die Bildung und Hydrolyse der Pyrophosphatbindungen ist einer der zentralen Mechanismen im Energiestoffwechsel. Bedingt durch die Hydrolyse der Pyrophosphatbindung eines ATP's wird Energie freigesetzt, die für weitere Reaktionen, z.B. Stärkebiosynthese oder Ionenaufnahme, genutzt bzw. benötigt wird. Neben ATP gibt es weitere energiereiche Phosphonukleotide wie Uridintriphosphat (UTP) und Guanosintriphosphat (GTP) (Maathuis 2009; Hawkesford et al. 2012). Des Weiteren werden Enzyme in Folge einer Phosphorylierungsreaktion durch ATP, UTP oder ADP aktiviert (Hawkesford et al. 2012). Die Phosphorylierung wird durch Proteinkinasen vermittelt und kann zu einer Aktivierung, Inaktivierung und/oder Veränderung der allosterischen Eigenschaften des Zielproteins führen (Budde und Chollet 1988). Nach Schachtman et al. (1998) ist die Verteilung von anorganischem Phosphat und somit die Aufrechterhaltung einer stabilen  $P_i$ -Konzentration im Cytoplasma essentiell für viele Enzymreaktionen. Im Blatt selbst kann die Konzentration von  $P_i$  um einen Faktor von 20 schwanken, wohingegen die Konzentration im Cytosol infolge der Aufrechterhaltung der Homöostase in einem engen Bereich reguliert wird (Hawkesford et al. 2012). Der Grund hierfür liegt laut Mimura et al. (1990) in der puffernden Funktion der Vakuole, die durch Aufnahme und Abgabe von  $P_i$  in das Cytosol dessen  $P_i$ -Konzentration weitestgehend konstant hält. 85-95% des Gesamt-P einer Zelle werden in Form von  $P_i$  in der Vakuole gespeichert (Lauer et al. 1989b). Gleiches gilt auch für die Zellen in den Wurzeln (Hawkesford et al. 2012). Des Weiteren hat  $P_i$  auch eine wichtige Funktion in der Photosynthese, genauer in der Kohlenstoffverlagerung zwischen den Chloroplasten und dem Cytosol (Hawkesford et al. 2012). Abhängig vom Pflanzengewebe gibt es neben  $P_i$  zwei weitere entscheidende Speicherformen von P – Polyphosphat und Phytat (Yang et al. 2017). Phytat ist die Hauptspeicherform in Pflanzensamen. Bis zu 80% des in die Samen transportierten Phosphors liegt in Form von Phytinsäure vor und dient als Phosphorquelle bei der Keimung (Asada et al. 1970).

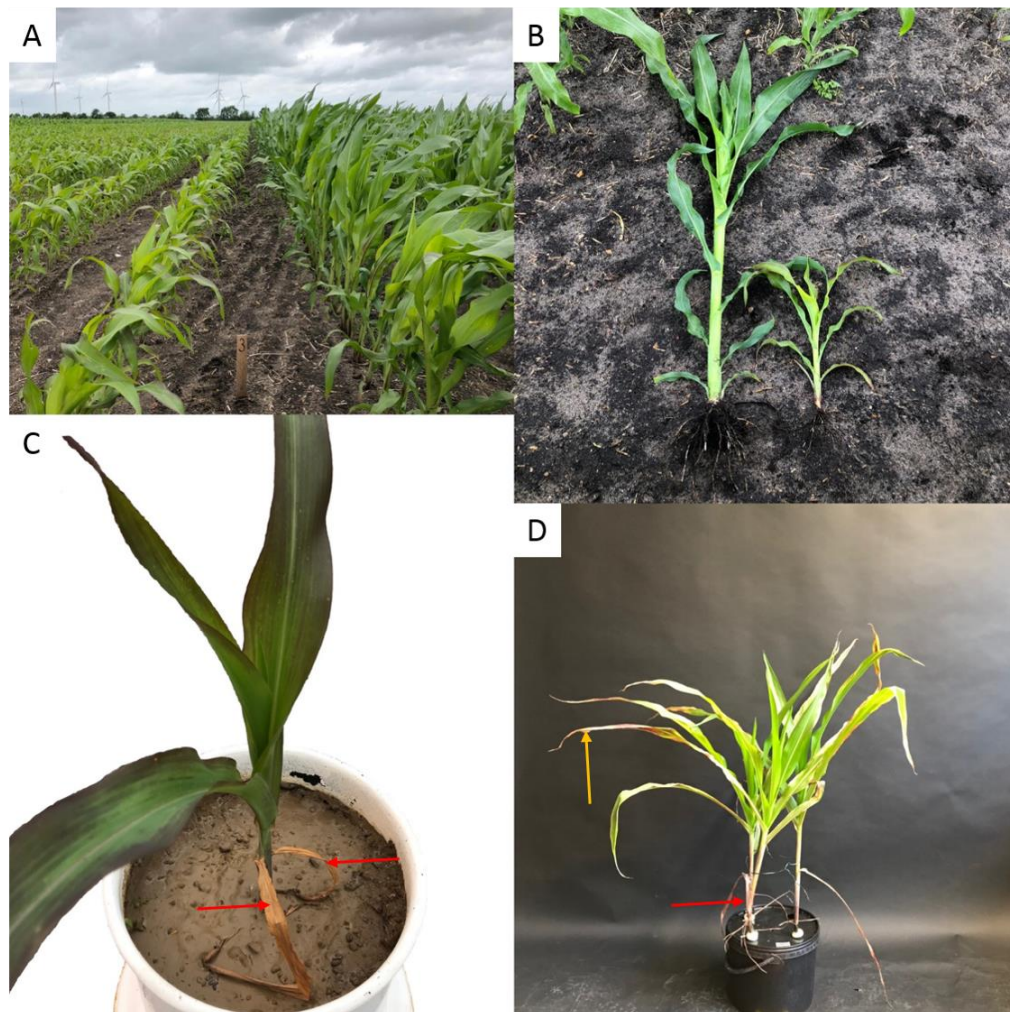
Kommt es zu einer Unterversorgung der Pflanze, so dass eine Aufrechterhaltung der physiologischen und metabolischen Prozesse nicht mehr möglich ist, hat dies einen Einfluss

auf die Entwicklung der Pflanze. Besonders unter starkem P-Mangel sinkt die cytosolische Konzentration von  $P_i$  in den Blättern um einen Faktor bis zu 25. Gleichzeitig sinkt die Konzentration der energiereichen P-Verbindungen um 20-30% (Hawkesford et al. 2012). An der Morphologie der Pflanze wird dies durch verschiedene Symptome deutlich. Besonders das Sprosswachstum wird durch mangelnde P-Verfügbarkeit negativ beeinflusst (Fig. 1.1). Neben einer verminderten Sprossgröße (Fredeen et al. 1989; Rao und Terry 1989) ist auch die Blattbildung verlangsamt (Colomb et al. 2000; Plénet et al. 2000; Assuero et al. 2004) und je nach Kultur auch die Blattanzahl verringert (Lynch et al. 1991). In der Wurzel kommt es zu Veränderungen der Wurzelarchitektur (Williamson et al. 2001). Das Wachstum ist aber weniger betroffen als im Spross, was in einem verringerten Spross-Wurzel-Verhältnis resultiert (Lynch 1995). Jedoch wird die Entwicklung der reproduktiven Organe genauso gehemmt wie das Sprosswachstum – verspätete Blütenanlage (Rossiter 1978), verringerte Blütenanzahl (Bould und Parfitt 1973) sowie verringerte Kornausbildung (Barry und Miller 1989) sind die Folge.

Nach Bergmann (1993) ist eine rotviolette und tiefpurpurne Verfärbung von Blättern vor allem an jungen Pflanzen ein typisches Kennzeichen für Phosphormangel (Fig. 1.1). Dies ist auf eine verstärkte Synthese von Anthocyanen zum Schutz gegen UV-Strahlung und photoinhibitorischen Schäden unter P-Mangel zurückzuführen (Amtmann et al. 2005). Bei anhaltendem P-Mangel kann es, beginnend auf den älteren Blättern, zu einer verstärkten Bildung von braunen bis dunkelbraunen nekrotischen Flecken kommen. Diese verteilen sich über das Blatt und führen zum vollständigen Absterben (Seneszenz) und Abfallen der Blätter (Bergmann 1993). Die Ursache hierfür ist die Remobilisierung von organischem P in älteren Blättern und dessen Translokation in jüngere Blätter. Schlussendlich führt ein P-Mangel bei allen Kulturpflanzen zu einer starken Minderung des Ertragspotentials und ein anhaltender P-Mangel während der Jugendentwicklung der Pflanzen kann durch eine spätere P-Gabe nicht mehr kompensiert werden (Bergmann 1993; Grant et al. 2001).

Folglich ist die moderne Landwirtschaft, trotz zahlreicher Anpassungsmechanismen der Pflanze, zur Erhaltung der hohen Ertragslage auf regelmäßige Inputs durch P-Düngung angewiesen. Zum einen erfolgt dies durch mineralischen Dünger und zum anderen durch organische Wirtschaftsdünger wie Flüssigmist und Festmist, aber auch durch Gärreste aus nachwachsenden Rohstoffen. Neben den positiven Wirkungen von Phosphor auf das

Pflanzenwachstum, den Ertrag und die Bodenfruchtbarkeit birgt eine P-Düngung auch eine Vielzahl negativer Faktoren, die es beim Einsatz des Nährstoffs zu berücksichtigen gilt.



**Figure 1.1:** Phosphor Mangelsymptome an der Kulturpflanze Mais, z.B. (A, B) mit reduziertem Sprosswachstum in Wallsbüll, Schleswig-Holstein; (C) abgestorbene ältere Blätter (Seneszenz, roter Pfeil) und Anthocyanverfärbungen an den jungen, grünen Blättern; (D) verringertes Sprosswachstum, abgestorbene ältere Blätter (roter Pfeil) und beginnendes absterben jüngerer Blätter (orangener Pfeil) in Nährlösung.

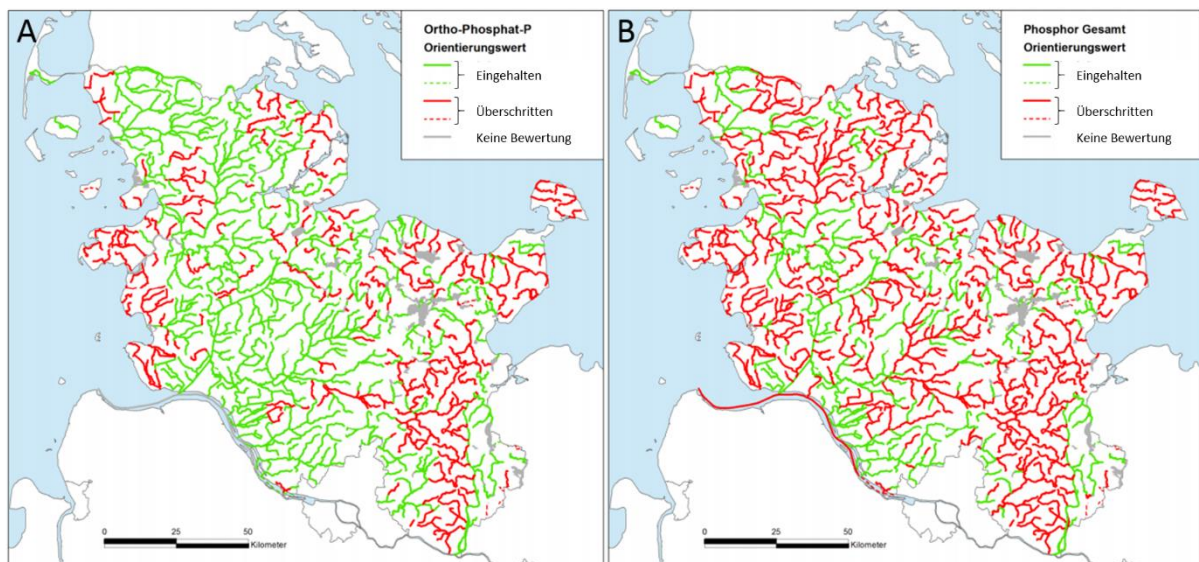
Im Vergleich zu anderen Makronährstoffen weist Phosphor in den meisten Böden eine sehr geringe Mobilität und Pflanzenverfügbarkeit auf (Hinsinger 2001). Der gesamte Bodenvorrat von P steht in einem Fließgleichgewicht zwischen dem mineralisch gebundenen, dem organisch gebundenen sowie dem pflanzenverfügbaren P (Schachtman et al. 1998). Die geringe Mobilität von anorganischem Phosphat im Boden ist zudem auf die hohe Affinität der P-Ionen gegenüber elektrophilen Kationen wie Eisen, Aluminium aber auch Calcium und Magnesium zurückzuführen. Mit diesen können die P-Ionen verschiedenste Formen von Mineralen (z. B. Hydroxylapatit, Variszit, Strengit) bilden (Hinsinger 2001). Nach Holford (1997)

sind ungefähr 80% des gesamten Phosphors im Boden in anorganischer oder organischer Form gebunden. Daher dominierte in der Vergangenheit die Annahme, dass P im Boden als nahezu immobil zu betrachten ist. Solch eine Annahme veranlasste die Landwirte dazu, mehr Dünger auszubringen, als die Pflanzen tatsächlich aufnehmen konnten (Haygarth und Jarvis 1997). Vor diesen Hintergründen entwickelte sich das Agrarökosystem in Bezug auf Phosphor von einer Netto-Senke zu einer Netto-Quelle (Sharpley et al. 2001).

Ähnlich wie bei Stickstoff kann auch P über verschiedene Wege in das Grund- und Oberflächenwasser eingetragen werden. Dabei wird der Nährstoff sowohl in gebundener als auch in gelöster Form über Oberflächenabfluss (Erosion und Abschwemmung), aber auch über den Verlustpfad Sickerwasser bzw. Drainage (Makroporenfluss) in das Grund- und Oberflächenwasser verfrachtet (Hart et al. 2004). Als größter Verlustpfad wird in der Literatur der Oberflächenabfluss, insbesondere die Erosion beschrieben, wobei P überwiegend in gebundener Form an Partikeln transportiert wird (Kronvang 1992; Haygarth und Sharpley 2000). Dahingegen sind die P-Verluste über das Sickerwasser in das Grundwasser als gering eingestuft, da P einerseits im Boden überwiegend an Bodenpartikel (Tonminerale, organische Substanzen, Eisen-/Aluminium-Oxide) absorbiert vorliegt und andererseits mobilisierter, gelöster Phosphor während der Bodenpassage wieder festgelegt werden kann (Holsten et al. 2016; Sharpley et al. 2001). Allerdings ist nach Sharpley et al. (2001) die Umweltwirkung von gelöstem P als überproportional hoch zu betrachten, weshalb trotz geringer Verluste der Grundwasserabfluss als zweitwichtigster Austragspfad gilt (Holsten et al. 2016). Neben der Art des Verfrachtungspfades haben auch die topographischen Gegebenheiten, der P-Gehalt der Böden, der Bodentyp sowie die Art der Bewirtschaftung und insbesondere die Nährstoffapplikation eine entscheidende Rolle auf die P-Verluste (Sharpley und Tunney 2000; Sharpley et al. 2001; Hart et al. 2004).

Laut der Autoren des 2. Nährstoffberichts des Landes Schleswig-Holstein, Henning und Taube (2019), sind die Ursachen für Phosphor-Verluste vielschichtig. Als eine Ursache wird die Entkopplung der Produktionssysteme mit einseitigem Transfer von Phosphor aus Ackerbaubetrieben in Viehbetriebe und der damit einhergehenden Entkopplung des P-Zyklus gesehen. Dies wird auch in weiteren Studien beschrieben (Sharpley und Jarvie 2012; Jarvie et al. 2015; Sharpley et al. 2018). Außerdem wird der Landnutzungswandel von Grünland zu Mais im Zuge der Biogas-Energiewende als weitere entscheidende Triebfeder für die hohen Belastungen des oberflächennahen Grundwassers beschrieben. Vor allem in den maisstarken

Regionen ist mit größeren P-Überschüssen zu rechnen. Neben einer organischen Düngung erfolgt hier häufig ein zusätzlicher Mineraldüngereinsatz, der laut der Autoren im Durchschnitt über  $20 \text{ kg P ha}^{-1}$  beträgt. Dies führt zu P-Salden (Differenz aus dem Acker zugeführten und abgeführten P), die deutlich über den angestrebten Wert von  $10 \text{ kg P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$  liegen. Trotz einer signifikanten Reduktion des mineralischen P-Düngemitelesatzes kommt es zur Belastung der Oberflächengewässer wie Flüssen, Seen und Meeren (Koch et al. 2018). Dies ist auch an den Fließgewässern Schleswig-Holsteins erkennbar (Fig. 1.2; (MELUND 2019)). Eine Folge daraus ist die Eutrophierung von Gewässern bis hin zu massivem Fischsterben und dem Verlust der Biodiversität sowie die Verunreinigung des Trinkwassers (Kotak et al. 1993; Burkholder und Glasgow 1997; Withers et al. 2001).



**Figure 1.2:** Situation zur Einhaltung bzw. Überschreitung der Zielvorgaben des Meeresschutzes für (A) Ortho-Phosphat-Phosphor und (B) Phosphor-Gesamt in Fließgewässern Schleswig-Holsteins (Stand September 2017; Bewertung nach Rakon; Dicke Linien: Beurteilung anhand von Messwerten im Wasserkörper; gestrichelte Linien: Beurteilung übertragen) (MELUND 2019).

Landwirtschaftliche Böden sind jedoch nur eine von mehreren Nährstoffquellen, die sich auf Süßwasser- und Meeresökosysteme auswirken. Trotzdem stellt die Bewirtschaftung der Böden und der Boden-P-Status eine wichtige Strategie zur Eindämmung der Eutrophierung dar (Withers et al. 2019). Eine Reduzierung des P-Inputs zur Generierung niedrigerer P-Gehalte im Boden, die für einen ökologischen Gewinn gerechtfertigt sind, darf die Pflanzenproduktivität nicht negativ beeinflussen (Withers et al. 2019).

Aus den vorgenannten Gründen wird deutlich, dass die Effizienz der P-Nutzung im landwirtschaftlichen Sektor gesteigert werden muss. Im Jahr 2017 wurde daher eine Novellierung der Düngeverordnung durchgeführt. Die Regelungen zur Ausbringung von stickstoff- und phosphorhaltigen Düngemitteln wurden weiter verschärft. Eine wesentliche Veränderung ist die Reduktion des zulässigen P-Überschusses von 20 auf 10 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup>, unabhängig von der Bodenversorgungsstufe. Außerdem darf ab einer Konzentration von 25 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 100mg<sup>-1</sup> Boden nur noch maximal der Entzug gedüngt werden. Aufgrund nicht eingehaltener Ziele im Rahmen der EU-Nitratrichtlinie und EU-Wasserrahmenrichtlinie in Deutschland führte eine Klage der EU zu einer weiteren Verschärfung der Düngeverordnung im Jahr 2020. Dies betrifft insbesondere Gebiete mit einer hohen Stickstoff und/oder Phosphor-Belastung, sogenannte §13-Gebiete. Für Flächen landwirtschaftlicher Betriebe, die in einem §13-Gebiet liegen (P-Kulisse), sollen die Auflagen weiter verschärft werden. Dies beinhaltet vor allem eine Verlängerung der Sperrfristen für die Ausbringung von Düngemitteln (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft).

Vor diesem Hintergrund werden weitere Verschärfungen der Richtlinien die landwirtschaftlichen Betriebe vor große Herausforderungen hinsichtlich der P-Düngung stellen. Die Senkung des zulässigen P-Bilanzüberschusses auf 10 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> führt dazu, dass z. B. eine ertragswirksame Unterfußdüngung bei Mais stark reduziert oder komplett auf diese verzichtet werden muss. Reduzierter Düngereinput und eine geringe Düngernutzungseffizienz durch die Pflanzen im ersten Jahr (< 20%, Plaxton und Tran 2011) sowie klimatische Veränderungen (Kälte, Trockenheit) könnten vor allem bei Pflanzen mit schlechter P-Aneignung in der Jugendentwicklung (z. B. Mais) kurzfristig zu P-Mangel führen.

## 1.2 Mais und Phosphor

Mais (*Zea mays* L.) ist nach Weizen sowohl global (FAOSTAT 2019) als auch in Deutschland (Statistisches Bundesamt 2020) das am zweithäufigsten angebaute Getreide. In Deutschland wurde der Maisanbau in den letzten 20 Jahren, bei gleichzeitigem Rückgang der Fläche von Dauergrünland, stark ausgedehnt, was vor allem auf die Erzeugung von Biogas zurückzuführen ist (Henning und Taube 2019; Deutsches Maiskomitee 2020a). Der Entzug von Phosphor liegt je nach Nutzungsrichtung zwischen 90-120 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup>, wobei in der Jugendphase von der vierten bis zur zehnten Wachstumswoche ein besonders hoher Bedarf gedeckt werden muss (Deutsches Maiskomitee 2020b). Die Remobilisierung der P-Reserven in den Maissamen ist

nach der ersten Wachstumswoche abgeschlossen (Nadeem et al. 2011). Die geringe Mobilität von P im Boden, in Kombination mit schnell wachsenden jungen Maispflanzen mit einem sich langsam entwickelten Wurzelsystem, führt in dieser Wachstumsphase häufig zu einer suboptimalen P-Ernährung von Mais (Mollier und Pellerin 1999; Pedersen et al. 2017). Daher hat Mais zur Jugendentwicklung einen hohen Bedarf an anorganischem Phosphat im wurzelnahen Raum. Gleichzeitig schwächen in Nordeuropa häufig vorkommende Boden- und Lufttemperaturen von unter 15°C im Frühjahr das Wachstum der Wurzeln (Stamp 1986), insbesondere das Längenwachstum (Kaspar und Bland 1992). Daraus resultiert eine verschlechterte Erschließung des Bodens, was zu einer reduzierten Aneignung von Boden-P führt. Außerdem sind die Mineralisation und die Diffusionsgeschwindigkeit von P unter kalten Temperaturen herabgesetzt (Imran et al. 2013), was die P-Aufnahme für junge Maispflanzen erschwert.

Diese Gegebenheiten erklären, warum Mais positiv auf den Anstieg der löslichen P-Konzentrationen in der Nähe der jungen Wurzeln reagiert, der sich aus der Anwendung einer sogenannten Unterfußdüngung von mineralischem P zur Aussaat von Mais ergibt. Barry und Miller (1989) und Gavito und Miller (1998) zeigen in ihren Studien, dass Mais mit einer verstärkten Trockenmassebildung auf eine P-Düngung zur Jugendentwicklung reagiert. In deutschen Landwirtschaftsbetrieben erfolgt größtenteils eine zusätzliche organische Düngung von Gülle oder Gärresten aus der Tierhaltung bzw. Biogaserzeugung.

Die Düngung mit phosphorhaltigen mineralischen und organischen Düngemitteln wurde und wird wahrscheinlich auch in Zukunft weiter eingeschränkt. Eine reduzierte Düngung von P kann vor allem in kalten Frühjahren zu einer negativen Beeinträchtigung der Jugendentwicklung von Mais führen. Unter dem Aspekt einer effizienteren P-Düngung könnte die P-Blattdüngung eine Möglichkeit zur gezielten Behebung von auftretenden P-Mangelsituationen darstellen. In der Theorie stellt die Blattdüngung im Vergleich zur Bodendüngung ein potentiell umweltfreundlicheres und zielgerichteteres Verfahren dar (Eichert und Fernández 2012).

### **1.3 Blattapplikation von Nährstoffen und deren Aufnahme über das Blatt**

Die Blattdüngung ermöglicht die gezielte Applikation von Nährstoffen in gelöster Form auf die Pflanze, insbesondere auf das Blatt. Darüber hinaus ermöglicht dies eine direkte Zufuhr zu Zeitpunkten hohen Bedarfs, woraus eine Steigerung der Nutzungseffizienz von Nährstoffen

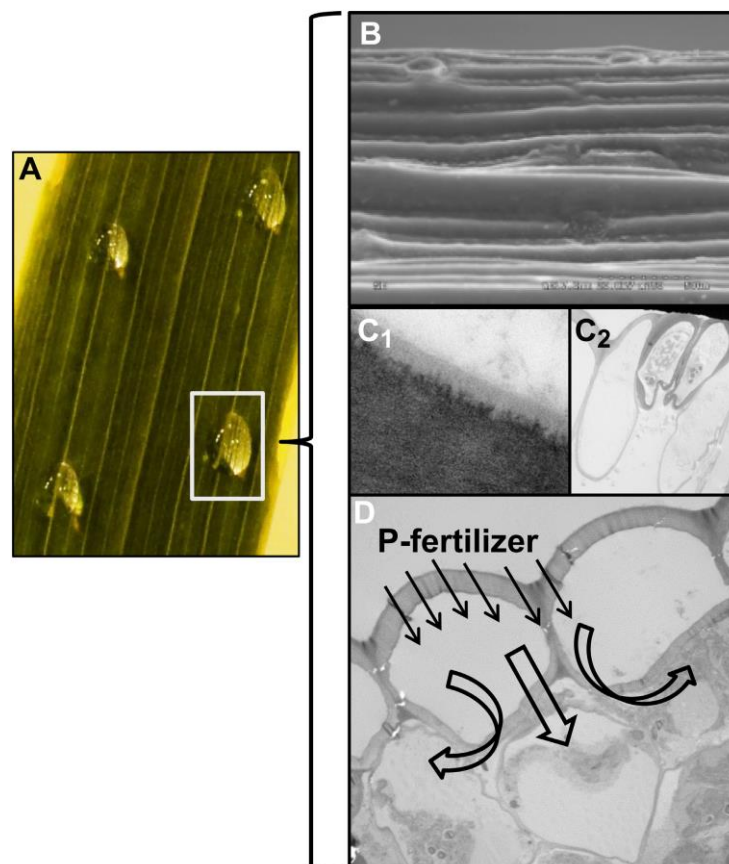


wie P erfolgen kann (Girma et al. 2007). Theoretisch wird durch die gezielte Anwendung einer Blattdüngung der Umwelteinfluss, beispielsweise durch Auswaschung, verringert (Eichert und Fernández 2012). Vor allem findet die Blattdüngung ihre Anwendungsbereiche in Anbaugebieten mit Böden, deren Beschaffenheit die Verfügbarkeit von Nährstoffen einer Bodendüngung limitieren (Festlegung von P) bzw. hohe Nährstoffverluste über den Boden zu erwarten sind (Noack et al. 2010). Des Weiteren ist die Blattdüngung eine wichtige Alternative, wenn das Entwicklungsstadium der Pflanze oder Umweltbedingungen eine ausreichende Nährstoffversorgung wichtiger Pflanzenorgane nicht zulassen (Fernández und Brown 2013). Jedoch ist gegenwärtig das Wissen über die Faktoren, die die Wirksamkeit der Blattdüngung beeinflussen, noch unvollständig (Noack et al. 2010; Fernández et al. 2013). Es gibt eine Vielzahl an Eigenschaften und Faktoren, deren Wechselwirkungen untereinander einen Einfluss auf die Absorption und Translokation einer Blattdüngung haben. Diese können nach Fernández und Brown (2013) einfachheitshalber in drei Kategorien eingeteilt werden. Das sind zum einen die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Spritzbrühe bzw. Nährlösung wie die Molekülgröße, Löslichkeit, elektrische Ladung, pH-Wert, Oberflächenspannung, Tröpfchengröße und Verteilung auf der Pflanzenoberfläche. Zweitens sind es Umweltfaktoren wie die relative Luftfeuchtigkeit, Temperatur und Strahlung. Drittens wird die Wirksamkeit ebenfalls durch die Pflanzenart sowie die Physiologie der Pflanze beeinflusst. Dies sind vor allem die Blattform, das Vorhandensein von Blatthaaren, das Blattnalter, die Architektur der Cuticula, die Wachsschicht und die Blattoberfläche sowie die Mobilität des Nährstoffs in der Pflanze (Fernández und Eichert 2009; Fernández et al. 2013).

Bevor jedoch der Nährstoff einer Blattapplikation von der Pflanze für das Wachstum genutzt werden kann, muss dieser zuerst die Blattoberfläche durchdringen (Fig. 1.3) (Noack et al. 2010). Wie Kirkwood (1999) in seiner Studie beschreibt, gibt es eine Reihe an Prozessen, die zur Durchdringung der Blattoberfläche vollzogen werden müssen. Diese vier Hauptprozesse bestimmen den Anteil einer Blattapplikation, der die Pflanze erreicht (Deposition), der an der Pflanzenoberfläche haften bleibt (Retention), über die Cuticula in die metabolisch aktiven zellulären Kompartimente im Blatt eindringt (Aufnahme) und innerhalb der Pflanze transportiert wird (Translokation) (Fernández et al. 2013; Peirce 2015). Doch im Gegensatz zu Pflanzenwurzeln besitzen Blätter keine Transmembranproteine wie Transporter, Carrier und Kanäle, die auf den Transport von Nährstoffen spezialisiert sind. Die „Aufnahme“ von auf das Blatt applizierten gelösten Nährstoffen ist ein einem Konzentrationsgradienten folgender

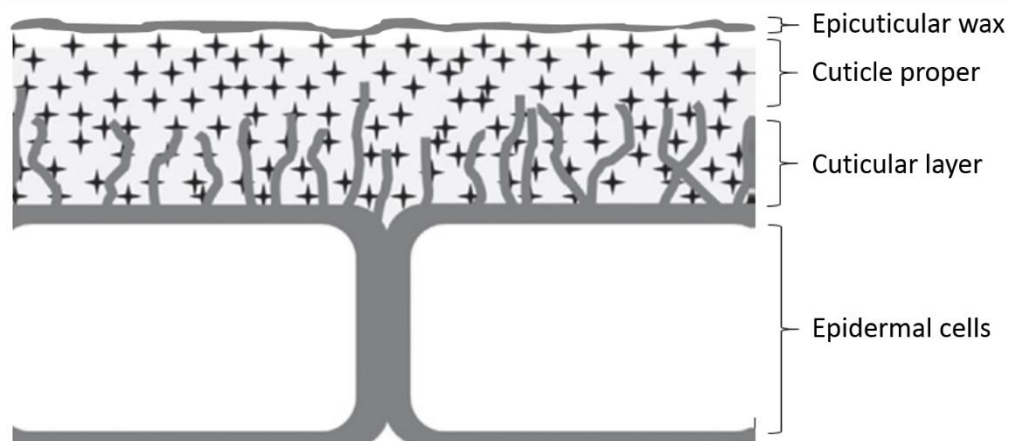
passiver Prozess (Eichert und Goldbach 2008) und erfolgt hauptsächlich über die Cuticula und die Stomata (Noack et al. 2010; Fernández et al. 2013).

Die Cuticula ist eine extrazelluläre Schicht, die die Epidermis der meisten oberirdischen Pflanzenteile überzieht (Fernández und Brown 2013). Als primäre Schnittstelle zwischen der Pflanze und ihrer Umgebung schützt die Cuticula vor diversen biotischen und abiotischen Stressfaktoren (Fernández und Brown 2013) und dient außerdem als Transpirationsschutz (Kerstiens 1996). Andererseits schützt sie im Blattapoplasten vorkommende Nährstoffe und gelöste Stoffe vor der Auswaschung durch Regen (Eichert und Fernández 2012) und ermöglicht den kontrollierten Gasaustausch zwischen Pflanze und Atmosphäre (Yeats und Rose 2013).



**Figure 1.3:** Beispiel zur Aufnahme von auf die abaxiale Blattfläche applizierten Düngertropfen (A). Die Wechselwirkungen zwischen dem Düngertropfen und der Weizenoberfläche (B, Rasterelektronenmikroskop) beeinflussen die Aufnahme des gelösten Nährstoffes über die Cuticula (C1) und Stomata (C2). Die gelösten Phosphat-Ionen werden sehr wahrscheinlich über den Apoplasten in die Epidermiszellen aufgenommen und in andere Pflanzenteile verlagert (D). Abbildungen C und D sind Aufnahmen mit dem Transmissions-Elektronen-Mikroskop der abaxialen Oberfläche eines Weizenblattes (Fernández und Brown 2013).

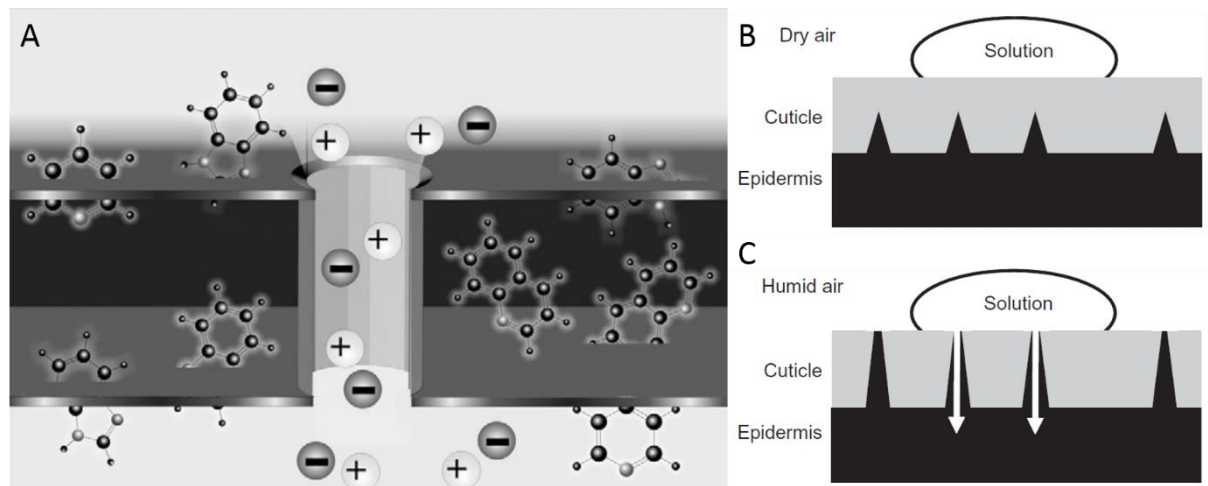
Abhängig von Pflanzenart und -kompartiment variiert die Dicke der Cuticula (Holloway 1993) und besteht nach Pollard et al. (2008) zum größten Teil aus Cutin, einem Polyester aus polymerisierten langkettigen Fettsäuren, in dem zusätzlich intracuticulare Wachse eingebettet sind (Fig. 1.4). Die Cuticula kann durch die Einlagerung von Polysaccharid-Fibrillen aus den Epidermiszellen als zweigeteiltes Element betrachtet werden, der inneren (cuticular layer) und einer äußeren Schicht (cuticle proper) (Pollard et al. 2008; Hawkesford et al. 2012; Eichert und Fernández 2012). Der hydrophobe Charakter der Cuticula nimmt daher von außen nach innen ab, weshalb der von der Epidermis beeinflusste Teil der Cuticula (cuticular layer) durch das Vorhandensein von Polysacchariden eher hydrophile Eigenschaften aufweist (Eichert und Fernández 2012). Die äußere Schicht der Cuticula ist zusätzlich durch eine epicuticulare Wachsschicht überzogen, welche einen stark hydrophoben Charakter aufweist (Heredia 2003).



**Figure 1.4:** Schematische Abbildung des äußeren Aufbaus eines Blattes. Die Epidermiszellen werden durch eine Cuticula, welche aus einer Cutin-Matrix (hellgrau) mit eingebetteten intracuticularen Wachsen besteht, geschützt. Die innere cuticuläre Schicht (cuticular layer) ist mit Polysaccharid Fibrillen durchzogen. Die äußere eigentliche Cuticula ist frei von Zellwandmaterial. In den meisten Fällen ist die Cuticula durch eine stark hydrophobe epicuticulare Wachsschicht überzogen (Eichert und Fernández 2012).

Lipophile, unpolare Verbindungen können über die hydrophobe Cuticula in das Blatt eindringen (Schönherr 2006). Dieser Vorgang soll nach Riederer und Friedmann (2006) in Folge eines 'dissolution-diffusion-model' geschehen. Die Diffusionsrate ist dabei von der Löslichkeit und der Mobilität der lipophilen Verbindungen in der Cuticula abhängig (Schreiber 2006). Der lipophile und hydrophobe Charakter der pflanzlichen Cuticula macht diese jedoch zu einer effektiven Barriere gegenüber der Diffusion von polaren hydrophilen Verbindungen wie mineralischen Salzen, Chelaten oder Komplexen (Fernández und Brown 2013). Die

meisten Blattdünger werden jedoch in Form von hydrophilen, in der Cuticula nahezu unlöslichen Ionen, ausgebracht (Schönherr 2000, 2006). Daher können sie nach Schlegel et al. (2005) die Cuticula nicht über den lipophilen Weg passieren. Jedoch zeigen Studien, dass die Aufnahme von Ionen erheblich größer ist als zu erwarten wäre, weshalb eine Aufnahme über sogenannte 'polare Poren' (Schönherr 1976a), 'wässrige Poren' (Schönherr 2000) bzw. 'wassergefüllte Poren' (Schreiber 2005) angenommen wird (Fig. 1.5).



**Figure 1.5:** (A) Schematische Darstellung einer polaren/wässrigen Pore nach Schönherr (2006), die eine Cuticula durchquert. Die geladenen Teilchen können nur über die Pore in das Innere eindringen, wohingegen die nicht geladenen kleinen Teilchen durch die Membran diffundieren können. (B) und (C) Schematische Darstellung des Einflusses von Luftfeuchtigkeit auf die Bildung von polaren/wässrigen Poren nach Eichert und Fernández (2012). Unter trockenen Bedingungen (B) wird das Wasser aus den Epidermiszellen in der unteren Cuticulaschicht zurückgehalten. Unter feuchten Bedingungen (C) dringt das Wasser in die obere Schicht vor, wodurch 'Poren' entstehen, die das Eindringen polarer, gelöster Stoffe durch die Cuticula ermöglichen.

Es wird vermutet, dass solche Poren aufgrund der Absorption von Wassermolekülen an sich in der Schicht der Cuticula befindenden funktionellen Gruppen (Hydroxy- und Carboxygruppen) entstehen (Schönherr 2000; Schreiber 2005). Dies geschieht sowohl von der atmosphärischen als auch von der epidermalen Seite und wird von der Luftfeuchtigkeit bestimmt (Eichert und Fernández 2012). Die Durchmesser der Poren sind abhängig von der Pflanzenart – z. B. < 1 nm bei der Bitterorange (*Citrus x aurantium* L.) (Schönherr 1976a) oder 2,4 nm bei der Bastard-Schwarz-Pappel (*Populus x canadensis* MOENCH) (Eichert et al. 1998). Nach Noack et al. (2010) sind gelöste Ionen, deren Radius kleiner als der Durchmesser der Poren ist, in der Lage durch diese zu diffundieren. Letztendlich ist dieser Mechanismus nach Aussagen von Fernández und Eichert (2009) noch unzureichend geklärt. Außerdem ist die Existenz der cuticulären Poren bisher nicht mikroskopisch beobachtet worden und die

bestehenden Studien ausschließlich mit isolierter Cuticula durchgeführt wurden. Dies kann nach Fernández et al. (2020) zu irreführenden Interpretationen führen.

Eine weitere Theorie ist die Aufnahme von Nährstoffen über die Stomata (Fernández et al. 2013). Stomata sind Spaltöffnungen, die sich durch die Cuticula und Epidermis erstrecken. Deren Funktion in der Pflanze ist die Regulierung der Wasserabgabe sowie der Austausch von Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) zwischen den pflanzlichen Zellen und der Umwelt (Eichert und Fernández 2012). In früheren Studien wird die Annahme postuliert, dass die Aufnahme der Nährstoffe infolge eines Massenflusses über die Stomata erfolgt (Dybing und Currier 1961; Middleton und Sanderson 1965). Diese Theorie wird von Schönherr und Bukovac (1972) widerlegt, da Schließzellen aufgrund ihrer spezifischen Architektur die Blätter auch vor dem Eindringen von wässrigen Lösungen schützen. Eine Ausnahme bilden hier wässrige Lösungen, deren Oberflächenspannung infolge der Zugabe von Additiven herabgesetzt wurde (Zabkiewicz et al. 1993). Trotz dessen, dass Stomata das Eindringen von Wasser in die Pflanze verhindern, können zahlreiche Studien einen positiven Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Stomata und der Aufnahme von gelösten Nährstoffen darstellen. So besteht eine positive Korrelation zwischen der Anzahl (Schönherr und Bukovac 1978; Eichert und Burkhardt 2001; Eichert und Goldbach 2008) und der Öffnung von Stomata (Eichert et al. 1998; Fernández et al. 2005; Schlegel et al. 2006) mit der Aufnahme von Nährstoffen.

Es wird angenommen, dass die Aufnahme der gelösten Stoffe nicht infolge eines Massenflusses, sondern vielmehr durch Diffusion erfolgt. Nach der Studie von Eichert et al. (2008) sollen hydrophile Ionen bzw. Partikel entlang der Oberfläche der Stomataporen in das Blattinnere eindringen. Die Autoren nehmen an, dass die Diffusion durch eine Schicht aus adsorbierten Wassermolekülen an der Oberfläche der Stomataporen ermöglicht wird. Außerdem lässt sich aus dieser Studie ableiten, dass die Mächtigkeit der Wasserschicht größer 43 nm beträgt und damit in der Größenordnung über den Durchmessern von 'polaren Poren' liegt. Daraus ergibt sich die Annahme, dass über die Stomata, im Vergleich zu Poren in der Cuticula, nicht nur größere Partikel aufgenommen werden können, sondern auch eine höhere Transportrate erreicht wird (Eichert et al. 2008). Wie groß der Einfluss der Stomata auf die Nährstoffaufnahme infolge einer Blattapplikation sein kann, ist letztendlich noch nicht gesichert, könnte aber laut Forschung von hoher Bedeutung sein (Eichert et al. 2008). Des Weiteren könnte eine erhöhte Penetrationsrate in der Gegenwart von Stomata nach

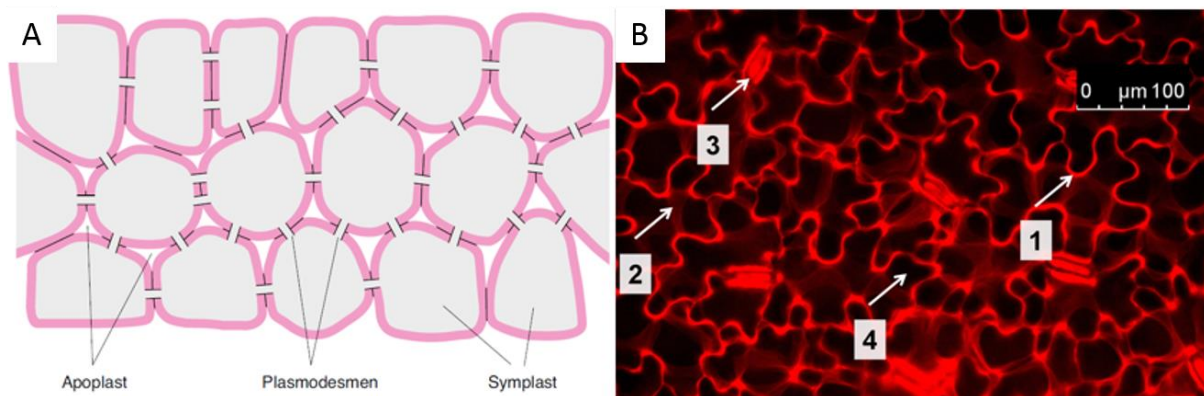
Schönherr und Bukovac (1978) sowie Schlegel und Schönherr (2002) auf die erhöhte Permeabilität der peristomatalen Cuticula und der Schließzellen zurückzuführen sein.

Ob die Aufnahme letztendlich über die Stomata oder über die Cuticula bzw. über beides bedeutender ist, ist in der aktuellen Forschung noch nicht hinreichend geklärt. Die Rolle von epidermalen Strukturen wie Trichomen (Pflanzenhaare) oder Lenticellen (Poren im Korkmantel) hinsichtlich der Aufnahme von Nährstoffen, ist nach Fernández et al. (2013) ebenfalls noch unklar.

Jedoch ist für die Aufnahmewahrscheinlichkeit und -geschwindigkeit über die Cuticula und Stomata die Kontaktfläche zwischen dem Düngertropfen und der Blattfläche ebenso von großer Bedeutung, wie die Blattbeschaffenheit und die Formulierung der Spritzbrühe (Fernández und Brown 2013). Blattdünger können allein oder in Kombination mit einer Vielzahl an Additiven angewendet werden. Additive sind Zusatzstoffe, die die Kontakteigenschaften, die Absorptionsrate und die Oberflächenverteilung der Spritzbrühe verbessern. Tenside (Netzmittel) sind eine unter den Additiven häufig angewendete Gruppe, welche die Oberflächenspannung der Spritzbrühe verringern und folglich die Benetzung auf der Pflanzenoberfläche verbessern. Des Weiteren werden Additive auch zur Verbesserung der Penetrations- oder Hafteigenschaften eingesetzt (Noack et al. 2010; Fernández et al. 2013).

Nachdem der Nährstoff die äußere Blattschicht überwunden hat, gelangt er in den Apoplasten. Der Apoplast spielt eine Hauptrolle bei der Kommunikation der Pflanzen mit der Umwelt (Geilfus und Mühling 2013) und umfasst die extrazellulären Teile innerhalb des pflanzlichen Gewebes (Fig. 1.6). Nach Sattelmacher et al. (1998) besteht der Apoplast aus allen Komponenten, die sich zwischen Plasmalemma und der Cuticula befinden – der Zellwand, der Mittellamelle, dem Xylem und den gas- und wassergefüllten interzellulären Räumen. Zwar macht der Apoplast nur 5 % des Gewebevolumens im Blatt aus (Grignon und Sentenac 1991), erfüllt aber viele verschiedene Funktionen. Insbesondere zur Aufrechterhaltung eines Ionen-Gleichgewichtes (Grignon und Sentenac 1991), dem Schutz des Cytosols vor toxischen Elementen (Sattelmacher et al. 1998), dem Zellwachstum durch Beeinflussung mechanischer und osmotischer Prozesse (Grignon und Sentenac 1991) oder der Regulation vorübergehender pH-Wert Schwankungen (Mühling und Sattelmacher 1995; Geilfus und Mühling 2011). Sein Pendant, der Symplast, ist das intrazelluläre Kontinuum aller verbundenen Cytosole von Mesophyllzellen innerhalb eines Blattes (Mimura 1999). Somit muss der Nährstoff den Apoplasten passieren, damit er in das Zellinnere aufgenommen und in den metabolisch

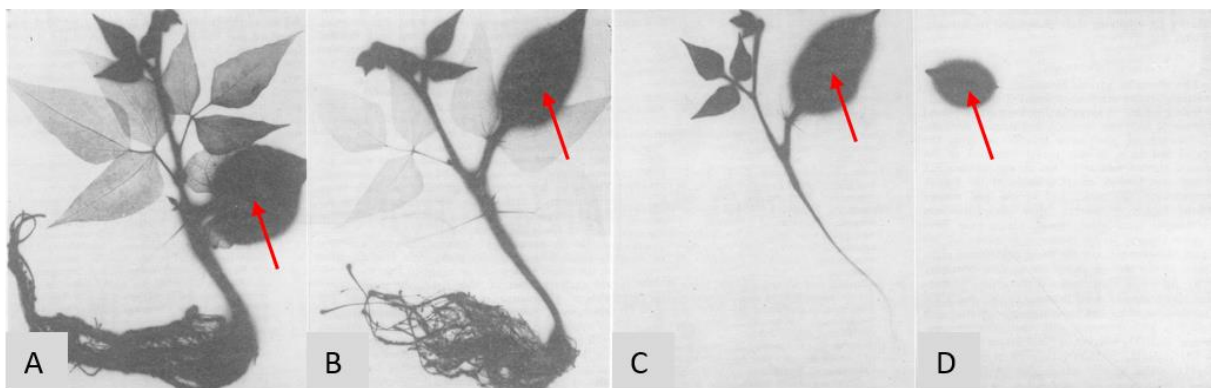
aktiven Kompartimenten genutzt werden kann. In Abhängigkeit des applizierten Nährstoffs kommt es anschließend zu einer lokalen oder systemischen Wirkung in der Pflanze.



**Figure 1.6:** (A) Schematische Darstellung von Apoplast, Symplast und Plasmodesmen nach Heldt und Piechulla (2015). Die extrazellulären Räume zwischen den Zellwänden, sowie Zellwände bilden den Apoplasten. Die über Plasmodesmen verbundenen Zellen ergeben den Symplasten. (B) Fluoreszenzaufnahme der adaxialen Blattseite der Ackerbohne (*Vicia faba* L.). Der Farbstoff ermöglicht die räumliche Unterscheidung in (1) den epidermalen Apoplasten der die Epidermiszellen umgibt, (2) den Palisadenapoplasten, (3) die Stomata und (4) die Zellen des Palisadengewebes, welche schwarz erscheinen, da der Symplast nicht mit dem Farbstoff beladen ist (Geilfus und Mühling 2012).

Die Art der Wirkung ist von der Mobilität im Phloem abhängig. Man unterscheidet zwischen sehr mobilen Nährstoffen wie Phosphat, Stickstoff, Kalium oder Magnesium, die somit in der Pflanze eine systemische Wirkung erzielen können und bedingt mobilen (Eisen, Zink, Bor) bzw. fast immobilen Nährstoffen (Calcium, Mangan), welche primär eine lokale Wirkung erzielen (Hawkesford et al. 2012; Fernández und Brown 2013). Daher muss die Wirksamkeit der Blattapplikation im Verhältnis zu der zu erwartenden Wirkung betrachtet werden. Dies bedeutet, dass auch lokal wirkende Nährstoffe einen signifikanten Nutzen für die Entwicklung von Pflanzen und insbesondere von Früchten haben (Fernández und Brown 2013; Fernández et al. 2013). Jedoch wird die Translokation von Nährstoffen nicht nur durch deren Phloemmobilität bestimmt. Das Entwicklungsstadium des benetzten Pflanzenorgans spielt eine entscheidende Rolle bei der Verlagerung. Koontz und Biddulph (1957) konnten in ihrer Studie an jungen Pflanzen der Kidneybohne (*Phaseolus vulgaris* L.) demonstrieren, dass auf vollständig entwickelte Blätter appliziertes radiomarkiertes P in jüngere, noch wachsende Blätter bzw. die Wurzel verlagert wird. Erfolgt die Applikation jedoch auf wachsendes Blattmaterial, so nimmt der Anteil an verlagertem P sukzessive mit dem Alter des behandelten Blattes ab bzw. erfolgt keine Verlagerung mehr aus den ganz jungen Blättern (Fig. 1.7).

Problematisch bei der Anwendung von Blattdüngungen ist die Höhe der Konzentration des zu verabreichenden Nährstoffs. Die Applikation von zu hohen Konzentrationen resultiert in der Regel in Blattschäden wie z.B. Verätzungen. Lokalisierte Salztoxizität, das Vorhandensein toxischer Verbindungen oder der pH-Wert der Nährlösung sind nach Alexander und Schroeder (1987) weitere mögliche Faktoren, die Blattschäden verursachen. Andererseits besteht die Notwendigkeit der Applikationen von hohen Konzentrationen, damit eine ausreichende Nährstoffaufnahme über das Blatt sichergestellt werden kann. Daher ist die Nährstoffversorgung allein auf Basis von Blattdüngungen bei Makronährstoffen aufgrund des hohen Bedarfs der Pflanze und den möglichen Blattschäden als unwahrscheinlich anzusehen (Johnson et al. 2001).



**Figure 1.7:** Autoradiogramme zeigen die Translokation von radiomarkiertem Phosphor ( $P^{32}$ ) in Kidneybohnenpflanzen (*Phaseolus vulgaris* L.) 24 Stunden nach der Applikation von 0,2 mL einer 10 mM Natriumdihydrogenphosphat ( $NaH_2PO_4$ ) Lösung auf verschiedene Blätteragen (roter Pfeil). Je dunkler das Pflanzengewebe, desto mehr  $P^{32}$  war nachweisbar. (A) und (B) vollentwickelte ältere Blätter im unteren Sprossbereich, (C) jüngeres Blatt im oberen Sprossbereich und (D) junges, nicht vollständig entwickeltes Blatt (Koontz und Biddulph 1957).

## 1.4 Wirkung und Bedeutung einer Phosphor-Blattapplikation für die landwirtschaftliche Nutzung

Die Düngung von Phosphor über das Blatt ist eine weltweit angewandte Technik. Jedoch hat sich die P-Blattdüngung bisher nicht als zuverlässige Methode zur P-Versorgung von Pflanzen durchgesetzt. Es ist offensichtlich, dass der zu blattapplizierenden P-Menge, aufgrund von Löslichkeit, Wirksamkeit und Blattverbrennungen, Grenzen gesetzt sind (Noack et al. 2010). Eine Vielzahl an Studien untersucht die Thematik der P-Blattdüngung an verschiedenen Kulturen wie Sojabohne [*Glycine max* (L.) Merr.] (Garcia L und Hanway 1976; Mallarino et al. 2001), Weizen (*Triticum aestivum*) (Arif et al. 2006; Mosali et al. 2006; Fernández et al. 2014b;



Peirce et al. 2014) und Mais (Barel und Black 1979; Girma et al. 2007). Die Ziele dieser Studien waren vor allem die entsprechende Formulierung, Konzentration und den optimalen Zeitpunkt einer Applikation zu bestimmen, insbesondere unter dem Aspekt der Ertragssteigerung. Wie in dem Review von Noack et al. (2010) zusammengefasst, ist in den meisten Studien die Applikation vor der Anthese (Blüte) der Zeitpunkt mit den vermeintlich höchsten Ertragseffekten. Jedoch gibt es auch Studien, die mit einer Applikation nach der Blüte einen positiven Effekt auf den Ertrag erzielen konnten. Andererseits erzielte eine P-Blattdüngung in frühen Wachstumsstadien eine höhere Anzahl an fruchtbaren Bestockungstrieben in Weizen (Grant et al. 2001). Vermutlich ist aber nach Noack et al. (2010) die Übergangsphase vom vegetativem ins generative Wachstum ein vielversprechender Zeitpunkt, da in dieser Phase ein hoher Bedarf an P vorliegt. Letztendlich lässt sich aus der Vielzahl an Studien jedoch kein optimaler Applikationszeitpunkt bestimmen. Im Allgemeinen zeigen Studien mit P-Blattp Applikationen unterschiedliche Resultate und eine klare Beurteilung ist nicht möglich (Noack et al. 2010).

Außerdem ist der Bedarf an Phosphor von der Kulturart und der P-Verfügbarkeit abhängig. Die besten Ergebnisse hinsichtlich der P-Nutzungseffizienz werden laut Mosali et al. (2006) und Girma et al. (2007) bei einer Aufwandmenge von 1,5-4 kg P ha<sup>-1</sup> erzielt. Andererseits erfolgen die höchsten Ertragseffekte mit höheren Aufwandmengen wie z. B. mit 8 kg P ha<sup>-1</sup> in Form von Kaliumdihydrogenphosphat bei Mais (Girma et al. 2007). Generell ist laut der Studien die P-Nutzungseffizienz einer P-Blattdüngung im Vergleich zu einer Bodendüngung verbessert. Dabei wurden verschiedene P-Verbindungen als Blattdünger angewendet. Nach Noack et al. (2010) und Fernández et al. (2013) sind die am häufigsten verwendeten P-Verbindungen die Phosphorsäure (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), das Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), das Dikaliumhydrogenphosphat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) und das Ammoniumdihydrogenphosphat (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Außerdem zeigt sich in vielen Studien, dass ein niedriger pH-Wert (2-3) der Düngerformulierung zu rascheren und besseren P-Aufnahmeeffekten führt (Noack et al. 2010), aber auch gleichzeitig ein verstärktes Auftreten von Verbrennungsschäden verursacht (Peirce 2015).

In der Literatur wird einer P-Blattdüngung als Ergänzungsdüngung große Bedeutung zugesprochen (Mosali et al. 2006; Noack et al. 2010; Peirce et al. 2014). Sie ist nach Noack et al. (2010) die effektivste bzw. effizienteste Methode um in späten Entwicklungsstadien einer mangelnden P-Versorgung entgegenzuwirken. Allerdings zeigt sich in der Studie von

Fernández et al. (2014b), dass die Absorption von P über das Blatt vom P-Status der Weizenpflanze abhängig ist. Jedoch erfolgte die Studie nur an einer von vielen Kulturpflanzen (Weizen), für die eine P-Blattdüngung von Bedeutung sein könnte. Insgesamt wurde aber bisher nur wenig über den Einfluss eines P-Mangels auf eine mögliche P-Aufnahme über das Blatt geforscht.

## 1.5 Zielsetzung

Phosphor ist ein weltweit bedeutender Makronährstoff für das pflanzliche Wachstum. Jedoch sind die Anforderungen an den landwirtschaftlichen Sektor hinsichtlich der Nutzung von P in den letzten Jahren enorm angestiegen. Dies hat zur Folge, dass sich die Düngestrategie hinsichtlich P weiter verändern wird und muss. Neben diversen Ansätzen zur Erhöhung der P-Nutzungseffizienz von organischen und mineralischen Düngemitteln, stellt die Blattdüngung eine Möglichkeit des gezielten Einsatzes zum Zeitpunkt des Bedarfs dar. Wie in den Abschnitten zuvor erläutert wurde, ist die Applikation von P über das Blatt kein gänzlich neues Konzept. Durch klimatische Veränderungen und die Novellierungen der Düngeverordnung ist das Risiko eines auftretenden P-Mangels im Jugendstadium von Maispflanzen, aufgrund eines hohen Bedarfs an wasserlöslichem P im wurzelnahen Raum, erhöht. Zu niedrige Temperaturen während der Jugendentwicklung beeinträchtigen zum einen die Entwicklung des Wurzelsystems und zum anderen die Verfügbarkeit von Nährstoffen wie P. In erster Linie wurde daher der Effekt von P-Mangel auf die Blattapplikation untersucht. Dabei wurden folgende Fragestellungen verfolgt:

- Können Maispflanzen mit akutem Phosphormangel blattapplizierten Phosphor aufnehmen?
- Kann eine Phosphor-Blattapplikation in der Jugendentwicklung von Mais zu einem signifikanten Biomassezuwachs beitragen?
- Kann durch Erhöhung der Konzentration der Applikationslösung die Häufigkeit der Behandlung reduziert werden?
- Wird blattgedüngter Phosphor in den ersten 48 Stunden direkt in den Symplasten aufgenommen oder kommt es zu einer vorübergehenden Speicherung im Apoplasten?
- Kann eine Phosphor-Blattdüngung zur Jugendentwicklung einen Mehrertrag erzielen?

## 1.6 Referenzen

- Alexander, A.; Schroeder, M. (1987): Fertilizer use efficiency. In: *J. Plant Nutr.* 10 (9-16), S. 1391–1399. DOI: 10.1080/01904168709363671.
- Amtmann, A.; Hammond, J. P.; Armengaud, P.; White, P. J. (2005): Nutrient sensing and signalling in plants: potassium and phosphorus. In: *Adv. Bot. Res.* 43, S. 209–257. DOI: 10.1016/S0065-2296(05)43005-0.
- Arif, M.; Chohan, M. A.; Ali, S.; Gul, R.; Khan, S. (2006): Response of wheat to foliar application of nutrients. In: *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 1 (4), S. 30–34.
- Asada, K.; Tanaka, K.; Kasai, Z. (1970): Formation of phytic acid in cereal grains. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 165 (2), S. 801–814. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1970.tb56445.x.
- Assuero, S. G.; Mollier, A.; Pellerin, S. (2004): The decrease in growth of phosphorus-deficient maize leaves is related to a lower cell production. In: *Plant Cell Environ.* 27 (7), S. 887–895. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2004.01194.x.
- Barel, D.; Black, C. A. (1979): Effect of neutralization and addition of urea, sucrose, and various glycols on phosphorus absorption and leaf damage from foliar-applied phosphate. In: *Plant Soil* 52 (4), S. 515–525. DOI: 10.1007/BF02277947.
- Barry, D. A. J.; Miller, M. H. (1989): Phosphorus nutritional requirement of maize seedlings for maximum yield. In: *Agron. J.* 81 (1), S. 95–99. DOI: 10.2134/agronj1989.00021962008100010017x.
- Bergmann, W. (1993): Ernährungsstörungen bei Kulturpflanzen. 3. Aufl. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Bieleski, R. L. (1973): Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. In: *Annu. Rev. Plant. Biol.* 24 (1), S. 225–252. DOI: 10.1146/annurev.pp.24.060173.001301.
- Bould, C.; Parfitt, R. I. (1973): Leaf analysis as a guide to the nutrition of fruit crops. X. Magnesium and phosphorus sand culture experiments with apple. In: *J. Sci. Food Agric.* 24 (2), S. 175–185. DOI: 10.1002/jsfa.2740240210.
- Budde, R. J. A.; Chollet, R. (1988): Regulation of enzyme activity in plants by reversible phosphorylation. In: *Physiol. Plant.* 72 (2), S. 435–439. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1988.tb05857.x.

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft: Verordnung über die Anwendung von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln nach den Grundsätzen der guten fachlichen Praxis beim Düngen (Düngeverordnung - DüV), S. 1–46. Online verfügbar unter [https://www.gesetze-im-internet.de/d\\_v\\_2017/D%C3%BCV.pdf](https://www.gesetze-im-internet.de/d_v_2017/D%C3%BCV.pdf), zuletzt geprüft am 15.04.2020.

Burkholder, J. M.; Glasgow, H. B. (1997): *Pfiesteria piscicida* and other Pfiesteria-like dinoflagellates: Behavior, impacts, and environmental controls. *Behavior, impacts, and environmental controls*. In: *Limnol. Oceanogr.* 42 (5part2), S. 1052–1075. DOI: 10.4319/lo.1997.42.5\_part\_2.1052.

Colomb, B.; Kiniry, J. R.; Debaeke, P. (2000): Effect of soil phosphorus on leaf development and senescence dynamics of field-grown maize. In: *Agron. J.* 92 (3), S. 428–435. DOI: 10.2134/agronj2000.923428x.

Deutsches Maiskomitee (2020b): Düngung. Online verfügbar unter <https://www.maiskomitee.de/Produktion/D%C3%BCngung>, zuletzt geprüft am 13.03.2021.

Deutsches Maiskomitee (2020a): Maisanbaufläche in Deutschland. Online verfügbar unter <https://www.maiskomitee.de/Fakten/Statistik/Deutschland#:~:text=Auf%20insgesamt%202.720.500%20Hektar,auf%20424.000%20Hektar%20zugelegt%20hat.>, zuletzt geprüft am 11.03.2021.

Dybing, C. D.; Currier, H. B. (1961): Foliar penetration by chemicals. In: *Plant Physiol.* 36 (2), S. 169–174. DOI: 10.1104/pp.36.2.169.

Eichert, T.; Burkhardt, J. (2001): Quantification of stomatal uptake of ionic solutes using a new model system. In: *J. Exp. Bot.* 52 (357), S. 771–781. DOI: 10.1093/jexbot/52.357.771.

Eichert, T.; Fernández, V. (2012): Chapter 4 - Uptake and release of elements by leaves and other aerial plant parts. In: H. Marschner und P. Marschner (Hg.): *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3rd ed. Amsterdam, Boston, MA: Academic Press, S. 71–84.

Eichert, T.; Goldbach, H. E. (2008): Equivalent pore radii of hydrophilic foliar uptake routes in stomatous and astomatous leaf surfaces - further evidence for a stomatal pathway. In: *Physiol. Plant.* 132 (4), S. 491–502. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2007.01023.x.

Eichert, T.; Goldbach, H. E.; Burkhardt, J. (1998): Evidence for the uptake of large anions through stomatal pores. In: *Bot. Acta* 111 (6), S. 461–466. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1998.tb00733.x.

Eichert, T.; Kurtz, A.; Steiner, U.; Goldbach, H. E. (2008): Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. In: *Physiol. Plant.* 134 (1), S. 151–160. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2008.01135.x.

FAOSTAT (2019): Food and agriculture data. Online verfügbar unter <http://www.fao.org/faostat/en/#home>, zuletzt geprüft am 11.03.2021.

Fernández, V.; Brown, P. H. (2013): From plant surface to plant metabolism: the uncertain fate of foliar-applied nutrients. In: *Front. Plant Sci.* 4, S. 289. DOI: 10.3389/fpls.2013.00289.

Fernández, V.; Eichert, T. (2009): Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves. Current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. In: *Crit. Rev. Plant Sci.* 28 (1-2), S. 36–68. DOI: 10.1080/07352680902743069.

Fernández, V.; Gil-Pelegrín, E.; Eichert, T. (2020): Foliar water and solute absorption. An update. In: *Plant J* 105 (4), S. 870–883. DOI: 10.1111/TPJ.15090.

Fernández, V.; Guzmán, P.; Peirce, C. A. E.; McBeath, T. M.; Khayet, M.; McLaughlin, M. J. (2014b): Effect of wheat phosphorus status on leaf surface properties and permeability to foliar-applied phosphorus. In: *Plant Soil* 384 (1-2), S. 7–20. DOI: 10.1007/s11104-014-2052-6.

Fernández, V.; Sotiropoulos, T.; Brown, P. H. (2013): Foliar fertilization. Scientific principles and field practices. Paris: International fertilizer industry association (IFA). Online verfügbar unter <http://catalogue.bnf.fr/ark:/12148/cb435815768>.

Fernández, V.; Ebert, G.; Winkelmann, G. (2005): The use of microbial siderophores for foliar iron application studies. In: *Plant Soil* 272 (1-2), S. 245–252. DOI: 10.1007/s11104-004-5212-2.

Fredeen, A. L.; Rao, I. M.; Terry, N. (1989): Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in *Glycine max.* In: *Plant Physiol.* 89 (1), S. 225–230. DOI: 10.1104/pp.89.1.225.

Garcia L, R.; Hanway, J. J. (1976): Foliar fertilization of soybeans during the seed-filling period. In: *Agron. J.* 68 (4), S. 653–657. DOI: 10.2134/agronj1976.00021962006800040030x.

- Gavito, M. E.; Miller, M. H. (1998): Early phosphorus nutrition, mycorrhizae development, dry matter partitioning and yield of maize. In: *Plant Soil* 199 (2), S. 177–186. DOI: 10.1023/A:1004357322582.
- Geilfus, C.-M.; Mühling, K. H. (2011): Real-Time imaging of leaf apoplastic pH dynamics in response to NaCl stress. In: *Front. Plant Sci.* 2, S. 13. DOI: 10.3389/fpls.2011.00013.
- Geilfus, C.-M.; Mühling, K. H. (2012): Transient alkalinization in the leaf apoplast of *Vicia faba* L. depends on NaCl stress intensity: an in situ ratio imaging study. In: *Plant, cell & environment* 35 (3), S. 578–587. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02437.x.
- Geilfus, C.-M.; Mühling, K.-H. (2013): Ratiometric monitoring of transient apoplastic alkalinizations in the leaf apoplast of living *Vicia faba* plants: Chloride primes and PM-H<sup>+</sup>-ATPase shapes NaCl-induced systemic alkalinizations. In: *New Phytol.* 197 (4), S. 1117–1129. DOI: 10.1111/nph.12046.
- Girma, K.; Martin, K. L.; Freeman, K. W.; Mosali, J.; Teal, R. K.; Raun, W. R. et al. (2007): Determination of optimum rate and growth stage for foliar-applied phosphorus in corn. In: *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 38 (9-10), S. 1137–1154. DOI: 10.1080/00103620701328016.
- Grant, C. A.; Flaten, D. N.; Tomasiewicz, D. J.; Sheppard, S. C. (2001): The importance of early season phosphorus nutrition. In: *Can. J. Plant Sci.* 81 (2), S. 211–224. DOI: 10.4141/P00-093.
- Grignon, C.; Sentenac, H. (1991): pH and ionic conditions in the apoplast. In: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42 (1), S. 103–128. DOI: 10.1146/annurev.pp.42.060191.000535.
- Hart, M. R.; Quin, B. F.; Nguyen, M. L. (2004): Phosphorus runoff from agricultural land and direct fertilizer effects: a review. In: *J. Environ. Qual.* 33 (6), S. 1954–1972. DOI: 10.2134/jeq2004.1954.
- Hawkesford, M.; Horst, W.; Kichey, T.; Lambers, H.; Schjoerring, J.; Møller, I. S.; White, P. (2012): Chapter 6 - Functions of Macronutrients. In: H. Marschner und P. Marschner (Hg.): *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3rd ed. Amsterdam, Boston, MA: Academic Press, S. 135–189.
- Haygarth, P. M.; Jarvis, S. C. (1997): Soil derived phosphorus in surface runoff from grazed grassland lysimeters. In: *Water Res.* 31 (1), S. 140–148. DOI: 10.1016/S0043-1354(99)80002-5.

- Haygarth, P. M.; Sharpley, A. N. (2000): Terminology for phosphorus transfer. In: *J. Environ. Qual.* 29 (1), S. 10–15. DOI: 10.2134/jeq2000.00472425002900010002x.
- Heldt, H.-W.; Piechulla, B. (2015): 1 Eine Blattzelle ist in mehrere metabolische Kompartimente unterteilt. In: H. W. Heldt und B. Piechulla (Hg.): *Pflanzenbiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 3–42.
- Henning, C.; Taube, F. (2019): 2. Nährstoffbericht des Landes Schleswig-Holstein. Unter Mitarbeit von J. Hedtrich, K-U. Strelow und Kluß, C. und Reinsch, T.: Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung des Landes Schleswig-Holstein (MELUND).
- Heredia, A. (2003): Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1620 (1-3), S. 1–7. DOI: 10.1016/S0304-4165(02)00510-X.
- Hinsinger, P. (2001): Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. In: *Plant Soil* 237 (2), S. 173–195. DOI: 10.1023/A:1013351617532.
- Holford, I. C. R. (1997): Soil phosphorus. Its measurement, and its uptake by plants. In: *Soil Res.* 35 (2), S. 227–240. DOI: 10.1071/S96047.
- Holloway, P. J. (1993): Extended summaries SCI pesticides group symposium third international symposium on adjuvants for agrochemicals. Structure and chemistry of plant cuticles. In: *Pestic. Sci.* 37 (2), S. 203–206. DOI: 10.1002/ps.2780370214.
- Holsten, B.; Pfannerstill, M.; Trepel, M. (2016): Phosphor in der Landschaft: Management eines begrenzt verfügbaren Nährstoffes: Institut für Ökosystemforschung, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Imran, M.; Mahmood, A.; Römheld, V.; Neumann, G. (2013): Nutrient seed priming improves seedling development of maize exposed to low root zone temperatures during early growth. In: *Eur. J. Agron.* 49, S. 141–148. DOI: 10.1016/j.eja.2013.04.001.
- Jarvie, H. P.; Sharpley, A. N.; Flaten, D.; Kleinman, P. J. A.; Jenkins, A.; Simmons, T. (2015): The pivotal role of phosphorus in a resilient water-energy-food security nexus. In: *J. Environ. Qual.* 44 (4), S. 1049–1062. DOI: 10.2134/jeq2015.01.0030.

- Johnson, R. S.; Rosecrance, R.; Weinbaum, S.; Andris, H.; Wang, J. (2001): Can we approach complete dependence on foliar-applied urea nitrogen in an early-maturing peach? In: *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 126 (3), S. 364–370. DOI: 10.21273/JASHS.126.3.364.
- Kaspar, T. C.; Bland, W. L. (1992): Soil temperature and root growth. In: *Soil Science* 154 (4), S. 290–299. DOI: 10.1097/00010694-199210000-00005.
- Kerstiens, G. (1996): Cuticular water permeability and its physiological significance. In: *J. Exp. Bot.* 47 (12), S. 1813–1832. DOI: 10.1093/jxb/47.12.1813.
- Kirkwood, R. C. (1999): Recent developments in our understanding of the plant cuticle as a barrier to the foliar uptake of pesticides. In: *J. Pestic. Sci.* 55 (1), S. 69–77. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9063(199901)55:1<69::AID-PS860>3.0.CO;2-H.
- Koch, S.; Kahle, P.; Lennartz, B. (2018): Phosphordynamik und Austragspfade in einem Norddeutschen Tieflandeinzugsgebiet. In: *Wasser und Abfall* (20), S. 18–21. DOI: 10.1007/s35152-018-0067-7.
- Koontz, H.; Biddulph, O. (1957): Factors affecting absorption and translocation of foliar applied phosphorus. In: *Plant Physiol.* 32 (5), S. 463–470. DOI: 10.1104/pp.32.5.463.
- Kotak, B. G.; Kenefick, S. L.; Fritz, D. L.; Rousseaux, C. G.; Prepas, E. E.; Hrudey, S. E. (1993): Occurrence and toxicological evaluation of cyanobacterial toxins in Alberta lakes and farm dugouts. In: *Water Res.* 27 (3), S. 495–506. DOI: 10.1016/0043-1354(93)90050-R.
- Kronvang, B. (1992): The export of particulate matter, particulate phosphorus and dissolved phosphorus from two agricultural river basins. Implications on estimating the non-point phosphorus load. In: *Water Res.* 26 (10), S. 1347–1358. DOI: 10.1016/0043-1354(92)90129-R.
- Lauer, M. J.; Blevins, D. G.; Sierzputowska-Gracz, H. (1989b): P-Nuclear magnetic resonance determination of phosphate compartmentation in leaves of reproductive soybeans (*Glycine max* L.) as affected by phosphate nutrition. In: *Plant Physiol.* 89 (4), S. 1331–1336. DOI: 10.1104/pp.89.4.1331.
- Lynch, J. (1995): Root architecture and plant productivity. In: *Plant Physiol.* 109 (1), S. 7–13. DOI: 10.1104/pp.109.1.7.
- Lynch, J.; Läuchli, A.; Epstein, E. (1991): Vegetative growth of the common bean in response to phosphorus nutrition. In: *Crop Sci.* 31 (2), S. 380–387. DOI: 10.2135/cropsci1991.0011183X003100020031x.



- Maathuis, F. J. M. (2009): Physiological functions of mineral macronutrients. In: *Curr. Opin. Plant Biol.* 12 (3), S. 250–258. DOI: 10.1016/j.pbi.2009.04.003.
- Mallarino, A. P.; Haq, M. U.; Wittry, D.; Bermudez, M. (2001): Variation in soybean response to early season foliar fertilization among and within fields. In: *Agron. J.* 93 (6), S. 1220–1226. DOI: 10.2134/agronj2001.1220.
- MELUND (2019): Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung: Beurteilung der physikalisch-chemischen Bedingungen der Fließgewässer Schleswig-Holsteins und Maßnahmen zur Verringerung der Nährstoffbelastung. Stand: 22.11.2017.
- Middleton, L. J.; Sanderson, J. (1965): The uptake of inorganic ions by plant leaves. In: *J. Exp. Bot.* 16 (2), S. 197–215. DOI: 10.1093/jxb/16.2.197.
- Mimura, T. (1999): Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. In: *International Review of Cytology*, Bd. 191, S. 149–200.
- Mimura, T.; Dietz, K. J.; Kaiser, W.; Schramm, M. J.; Kaiser, G.; Heber, U. (1990): Phosphate transport across biomembranes and cytosolic phosphate homeostasis in barley leaves. In: *Planta* 180 (2), S. 139–146. DOI: 10.1007/BF00193988.
- Mollier, A.; Pellerin, S. (1999): Maize root system growth and development as influenced by phosphorus deficiency. In: *J. Exp. Bot.* 50 (333), S. 487–497. DOI: 10.1093/jxb/50.333.487.
- Mosali, J.; Desta, K.; Teal, R. K.; Freeman, K. W.; Martin, K. L.; Lawles, J. W.; Raun, W. R. (2006): Effect of foliar application of phosphorus on winter wheat grain yield, phosphorus uptake, and use efficiency. In: *J. Plant Nutr.* 29 (12), S. 2147–2163. DOI: 10.1080/01904160600972811.
- Mühling, K. H.; Sattelmacher, B. (1995): Apoplastic ion concentration of intact leaves of field bean (*Vicia faba*) as influenced by ammonium and nitrate nutrition. In: *J. Plant Physiol.* 147 (1), S. 81–86. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)81417-3.
- Nadeem, M.; Mollier, A.; Morel, C.; Vives, A.; Prud'homme, L.; Pellerin, S. (2011): Relative contribution of seed phosphorus reserves and exogenous phosphorus uptake to maize (*Zea mays* L.) nutrition during early growth stages. In: *Plant Soil* 346 (1-2), S. 231–244. DOI: 10.1007/s11104-011-0814-y.

- Noack, S. R.; McBeath, T. M.; McLaughlin, M. J. (2010): Potential for foliar phosphorus fertilisation of dryland cereal crops: a review. In: *Crop Pasture Sci.* 61 (8), S. 659. DOI: 10.1071/CP10080.
- Pedersen, I. F.; Rubæk, G. H.; Sørensen, P. (2017): Cattle slurry acidification and application method can improve initial phosphorus availability for maize. In: *Plant Soil* 414 (1-2), S. 143–158. DOI: 10.1007/s11104-016-3124-6.
- Peirce, C. A. E. (2015): Foliar fertilisation of wheat plants with phosphorus. Dissertation. The University of Adelaide, Adelaide. School of Agriculture, Food and Wine.
- Peirce, C. A. E.; McBeath, T. M.; Fernández, V.; McLaughlin, M. J. (2014): Wheat leaf properties affecting the absorption and subsequent translocation of foliar-applied phosphoric acid fertiliser. In: *Plant Soil* 384 (1-2), S. 37–51. DOI: 10.1007/s11104-014-2245-z.
- Plaxton, W. C.; Tran, H. T. (2011): Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. In: *Plant Physiol.* 156 (3), S. 1006–1015. DOI: 10.1104/pp.111.175281.
- Plénet, D.; Etchebest, S.; Mollier, A.; Pellerin, S. (2000): Growth analysis of maize field crops under phosphorus deficiency. I. Leaf Growth. In: *Plant Soil* 223 (1/2), S. 117–130. DOI: 10.1023/A:1004877111238.
- Pollard, M.; Beisson, F.; Li, Y.; Ohlrogge, J. B. (2008): Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. In: *Trends Plant Sci.* 13 (5), S. 236–246.
- Raghothama, K. G. (1999): Phosphate acquisition. In: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, S. 665–693. DOI: 10.1007/s11104-004-2005-6.
- Rao, I. M.; Terry, N. (1989): Leaf phosphate status, photosynthesis, and carbon partitioning in sugar beet. I. Changes in growth, gas exchange, and calvin cycle enzymes. In: *Plant Physiol.* 90 (3), S. 814–819. DOI: 10.1104/pp.90.3.814.
- Richardson, A. E.; Barea, J.-M.; McNeill, A. M.; Prigent-Combaret, C. (2009): Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. In: *Plant Soil* 321 (1-2), S. 305–339. DOI: 10.1007/s11104-009-9895-2.
- Riederer, M.; Friedmann, A. (2006): Transport of lipophilic non-electrolytes across the cuticle. In: M. Riederer und C. Müller (Hg.): *Biology of the Plant Cuticle*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, S. 250–279.

- Rossiter, R. C. (1978): Phosphorus deficiency and flowering in subterranean clover (*T. subterraneum* L.). In: *Ann. Bot.* 42 (2), S. 325–329. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aob.a085463.
- Sattelmacher, B.; Mühlhng, K.-H.; Pennewiß, K. (1998): The apoplast - its significance for the nutrition of higher plants. In: *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.* 161 (5), S. 485–498. DOI: 10.1002/jpln.1998.3581610502.
- Schachtman, D. P.; Reid, R. J.; Ayling, S. M. (1998): Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. In: *Plant Physiol.* 116 (2), S. 447–453. DOI: 10.1104/pp.116.2.447.
- Schlegel, T. K.; Schönherr, J. (2002): Stage of development affects penetration of calcium chloride into apple fruits. In: *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 165 (6), S. 738–745. DOI: 10.1002/jpln.200290012.
- Schlegel, T. K.; Schönherr, J.; Schreiber, L. (2005): Size selectivity of aqueous pores in stomatous cuticles of *Vicia faba* leaves. In: *Planta* 221 (5), S. 648–655. DOI: 10.1007/s00425-005-1480-1.
- Schlegel, T. K.; Schönherr, J.; Schreiber, L. (2006): Rates of foliar penetration of chelated Fe(III): Role of light, stomata, species, and leaf age. In: *J. Agric. Food Chem.* 54 (18), S. 6809–6813. DOI: 10.1021/jf061149i.
- Schönherr, J. (1976a): Water permeability of isolated cuticular membranes: The effect of cuticular waxes on diffusion of water. In: *Planta* 131 (2), S. 159–164. DOI: 10.1007/BF00389989.
- Schönherr, J. (2000): Calcium chloride penetrates plant cuticles via aqueous pores. In: *Planta* 212 (1), S. 112–118. DOI: 10.1007/s004250000373.
- Schönherr, J. (2006): Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. In: *J. Exp. Bot.* 57 (11), S. 2471–2491. DOI: 10.1093/jxb/erj217.
- Schönherr, J.; Bukovac, M. J. (1972): Penetration of stomata by liquids. Dependence on surface tension, wettability, and stomatal morphology. In: *Plant Physiol.* 49 (5), S. 813–819. DOI: 10.1104/pp.49.5.813.
- Schönherr, J.; Bukovac, M. J. (1978): Foliar penetration of succinic acid-2,2-dimethylhydrazide: Mechanism and rate limiting step. In: *Physiol. Plant.* 42 (2), S. 243–251. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1978.tb02555.x.

- Schreiber, L. (2005): Polar paths of diffusion across plant cuticles: New evidence for an old hypothesis. In: *Ann. Bot.* 95 (7), S. 1069–1073. DOI: 10.1093/aob/mci122.
- Schreiber, L. (2006): Review of sorption and diffusion of lipophilic molecules in cuticular waxes and the effects of accelerators on solute mobilities. In: *J. Exp. Bot.* 57 (11), S. 2515–2523. DOI: 10.1093/jxb/erj173.
- Sharpley, A. N.; Jarvie, H. P. (2012): Agricultural Management, Water Quality and Ecology: Putting Practice into Policy. In: A. Eaglesham, K. Korth und R.W.F. Hardy (Hg.): NABC Report 24: Water Sustainability in Agriculture. Boyce Thompson Institute B15, Ithaca, NY 14853, S. 87–116.
- Sharpley, A. N.; Jarvie, H. P.; Flaten, D.; Kleinman, P. J. A. (2018): Celebrating the 350th anniversary of phosphorus discovery: A conundrum of deficiency and excess. In: *J. Environ. Qual.* 47 (4), S. 774–777. DOI: 10.2134/jeq2018.05.0170.
- Sharpley, A. N.; McDowell, R. W.; Kleinman, P. J. A. (2001): Phosphorus loss from land to water: integrating agricultural and environmental management. In: *Plant Soil* 237 (2), S. 287–307. DOI: 10.1023/A:1013335814593.
- Sharpley, A. N.; Tunney, H. (2000): Phosphorus research strategies to meet agricultural and environmental challenges of the 21st century. In: *J. Environ. Qual.* 29 (1), S. 176–181. DOI: 10.2134/jeq2000.00472425002900010022x.
- Stamp, P. (1986): Chilling stress in maize. In: O. Dolstra und P. Miedema (Hg.): Breeding of silage maize. Wageningen: Pudoc (Proceedings of the Meeting of the Maize and Sorghum Section of EUCARPIA, 13), S. 43–50.
- Statistisches Bundesamt (2020): Anbauflächen, Hektarerträge und Erntemengen ausgewählter Anbaukulturen im Zeitvergleich. Online verfügbar unter <https://www.destatis.de/DE/Themen/Branchen-Unternehmen/Landwirtschaft-Forstwirtschaft-Fischerei/Feldfruechte-Gruenland/Tabellen/liste-feldfruechte-zeitreihe.html;jsessionid=E85220EAEAA06CA3538A26C0E2CD633F.internet711>, zuletzt geprüft am 11.03.2021.
- Vance, C. P.; Uhde-Stone, C.; Allan, D. L. (2003): Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. In: *New Phytol.* 157 (3), S. 423–447. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2003.00695.x.

Williamson, L. C.; Ribrioux, S. P.; Fitter, A. H.; Leyser, H. M. (2001): Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. In: *Plant Physiol.* 126 (2), S. 875–882. DOI: 10.1104/pp.126.2.875.

Withers, P. J. A.; Edwards, A. C.; Foy, R. H. (2001): Phosphorus cycling in UK agriculture and implications for phosphorus loss from soil. In: *Soil Use Manag.* 17 (3), S. 139–149. DOI: 10.1111/j.1475-2743.2001.tb00020.x.

Withers, P. J. A.; Vadas, P. A.; Uusitalo, R.; Forber, K. J.; Hart, M.; Foy, R. H. et al. (2019): A global perspective on integrated strategies to manage soil phosphorus status for eutrophication Control without Limiting Land Productivity. In: *J. Environ. Qual.* 48 (5), S. 1234–1246. DOI: 10.2134/jeq2019.03.0131.

Yang, S.-Y.; Huang, T.-K.; Kuo, H.-F.; Chiou, T.-J. (2017): Role of vacuoles in phosphorus storage and remobilization. In: *J. Exp. Bot.* 165, 3045-3055. DOI: 10.1093/jxb/erw481.

Yeats, T. H.; Rose, J. K. C. (2013): The formation and function of plant cuticles. In: *Plant Physiol.* 163 (1), S. 5–20. DOI: 10.1104/pp.113.222737.

Zabkiewicz, J. A.; Stevens, P. J. G.; Forster, W. A.; Steele, K. D. (1993): Foliar uptake of organosilicone surfactant oligomers into bean leaf in the presence and absence of glyphosate. In: *Pestic. Sci.* 38 (2-3), S. 135–143. DOI: 10.1002/ps.2780380208.

## 1. Kapitel

### Phosphate foliar application increases biomass and P concentration in P deficient maize

Bruno Maximilian Görlach and Karl Hermann Mühling

*Journal of Plant Nutrition and Soil Science* (2021)

DOI: 10.1002/jpln.202000460

# Phosphate foliar application increases biomass and P concentration in P deficient maize

Bruno Maximilian Görlach<sup>1</sup> and Karl Hermann Mühling<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Plant Nutrition and Soil Science, Kiel University, Hermann-Rodewald-Straße 2, 24118 Kiel, Germany

## Abstract

**Background:** Foliar application is mainly used in agriculture as a targeted top-up application to prevent deficiencies or during anthesis to improve quality. Hence, foliar fertilization usually occurs in plants that are in good condition and capable of uptake through the leaf. However, the extent to which plants utilize a nutrient under conditions of deficiency is also of importance.

**Aims:** Our aim was to determine the response of P deficient maize plants to P foliar application at various concentrations and to investigate possible differences between the adaxial and abaxial sides of leaves with regard to uptake.

**Methods:** Maize plants were grown under P deficiency in nutrient solution for two weeks followed by 2–3 foliar P treatments over a period of three weeks. Three different foliar P concentrations were compared. Older and younger shoots and roots were analyzed. In a second experiment, the influence of the leaf side on P uptake was determined by an infiltration/centrifugation method on the 5<sup>th</sup> leaf and total P in the 4<sup>th</sup> leaf, older and younger shoot, and root.

**Results:** Foliar application significantly increased the biomass and P concentration in deficient maize, including the roots. Omission of a third application and a concomitant increase in the application concentration achieved comparable results. Uptake occurred on both sides of the leaf with no significant differences.

**Conclusions:** Maize plants are able to absorb and utilize foliar-applied P, even under deficient conditions and independently of leaf side. P foliar application can therefore be used as a top-up application in deficiency situations. Moreover, the number of applications can be reduced at higher P application concentrations.

**Key words:** abaxial / adaxial / foliar absorption / foliar fertilization / subcellular

Accepted February 09, 2021

## 1 Introduction

The history of research into foliar application stretches back to the 19<sup>th</sup> century, as reported by *Fernández and Eichert* (2009), who also point out that this method is now becoming increasingly important in agricultural practice. In theory, it has the potential of being a more targeted and environmentally friendly fertilization method, as the nutrients are applied directly to the plant. Thus, foliar application can help to reduce the environmental impact associated with soil fertilization.

The success of foliar application lies in the interaction of many individual factors. According to *Fernández and Brown* (2013), these factors can be divided into three groups for simplicity, namely the physico-chemical properties of the formulation, the environmental factors, and various plant physiological aspects. Examples of the physical-chemical properties are the molecular size of the nutrient and the pH-value, surface tension, and deliquescence point of the spray solution, whereas those of the environmental factors are the air temperature, relative humidity, and light. The structure and position of the leaf, the architecture of the cuticle, the wax layer, and the mobility of the nutrient in the plant are included under

plant physiological aspects (*Fernández and Eichert*, 2009; *Fernández and Brown*, 2013; *Fernández et al.*, 2013). Before the foliar-applied nutrient can be utilized by the plant, it must first penetrate the leaf surface into the leaf interior (*Noack et al.*, 2010). This so-called “uptake” is a passive process that is driven by concentration gradients (*Eichert and Goldbach*, 2008), which, according to the current state of research, mainly takes place *via* the cuticle and stomata (*Noack et al.*, 2010; *Fernández et al.*, 2013). The cuticle is an extracellular layer that covers the epidermis of most above-ground plant parts, such as the leaf. According to *Heredia* (2003), the cuticle is also covered by an epicuticular wax layer, which gives the plant surface a hydrophobic character. Therefore, the plant cuticle is an effective barrier against the diffusion of hydrophilic polar compounds, *i.e.*, water-soluble compounds such as mineral salts, chelates, and complexes (*Fernández et al.*, 2013). However, most foliar fertilizers are applied in the form of ions, which have a very low solubility in the cuticle. *Schlegel et al.* (2005) and *Schönherr* (2006) have shown that hydrophilic compounds penetrate the cuticle *via* so-called polar or aqueous pores. In particular, the part of the cuticle

\* Correspondence: Prof. Dr. K. H. Mühling;  
e-mail: khmuehling@plantnutrition.uni-kiel.de



surrounding the stomata and trichomes serves as the preferred entry point for ions into the leaf. However, the structure of the cuticle varies greatly between plant species, organ types, stages of development, and nutrient status. This is a major challenge, because it creates differences between plants with regard to the properties of permeability of the cuticle (Kannan, 2010). Another possibility is the absorption of nutrients through the stomata. The uptake of dissolved substances is assumed to occur by diffusion (Eichert et al., 2008). Hydrophilic substances are likely to diffuse into water molecules adsorbed on the stomatal walls. The extent of the influence of stomata on nutrient uptake as a result of foliar application remains uncertain but might be of great importance based on current research (Eichert et al., 2008; Fernández et al., 2014; Peirce et al., 2014). Furthermore, even within a single leaf, differences occur between the abaxial and adaxial sides of the leaf in terms of stomata and trichoma density and of cuticular composition. Thus, the leaf side itself can have an influence on the uptake of foliar-applied nutrients.

Numerous studies have shown that the macronutrient phosphate (P) is absorbed through the leaf. Under conditions of poor P availability in the root zone, this is essential because P is indispensable for plant growth. Therefore, a limited P supply has a strong impact on crop development, for example, by reducing shoot growth (Fredeen et al., 1989) or tillering (Rodríguez et al., 1999). Consequently, plant production is dependent on a constant input of P fertilization to secure the yield. For optimal crop development, early P application is crucial for the growth of roots and shoots (Noack et al., 2010). One important crop with a requirement for P fertilization is maize (*Zea mays* L.). In order to generate optimal plant development, sufficient water-soluble P needs to be provided (banded) to the root area of the plant at the time of sowing. Banding the fertilizer near to the roots is a worldwide commonly used and efficient method for P fertilization (Grant et al., 2001).

Nevertheless, P fertilization carries the risk of diffuse P losses and, consequently, of increased environmental pollution (Withers et al., 2001). Hence, farmers will be obliged by law to reduce P fertilization or to use it more efficiently. If P deficiency occurs as a result of reduced fertilization in combination with other factors (e.g., weather conditions), P foliar application might be a means of counteracting this deficiency.

The review by Noack et al. (2010) on the state of research on P foliar fertilization suggests that an effect of foliar-applied P cannot be generalized. Numerous studies have shown positive, negative, or no effects of various concentrations on the uptake of P, the development of the plant, and the yield of cereal plants. The main objectives of these studies have been to determine the appropriate formulation, concentration, and optimal timing of application, with a focus on yield increase. Furthermore, as described by Noack et al. (2010), the physiology of the uptake of foliar-applied radiolabeled P has been investigated in a number of studies, often involving the use of specifically applied droplets (Koontz and Biddulph, 1957; Peirce et al., 2014). This has provided valuable information on the uptake mechanism, the amount of uptake, and the displacement of P-ions. Although the application of P via the leaf

is not a new concept, little research has however been carried out on the possible effects on biomass growth in cases of P deficiency in maize.

Because P foliar application is mainly used as a supplement for late season top-up application, which is considered to improve the quality of the crop, the aim of this study has been to investigate whether (1) a P foliar application enhances plant development and the P content of maize plants with acute P deficiency, (2) a doubling of the applied total amount of P by doubling the P concentration of the foliar fertilizer results in a significant additional yield, (3) a doubling of the foliar fertilizer concentration with the same applied P total amount but at reduced application frequency achieves the same results, (4) a difference occurs between the abaxial and adaxial side of the leaf in terms of uptake, and (5) foliar application is more or less effective compared with re-supply via the root in hydroponics.

## 2 Material and methods

### 2.1 Plant material and growth conditions









The maize (*Zea mays* L.) variety “Keops” (KWS SAAT SE & Co. KGaA, Einbeck, Germany) was grown in 9L nutrient solution in the greenhouse of the Institute of Plant Nutrition and Soil Science, Kiel University (54°20'50" N, 10°6'55" E) from April–June. The temperature was set at 23±2°C during the day and 15°C during the night, and the relative humidity at around 50±10%, under a 14-h photoperiod (8 am to 10 pm) with light intensities ranging from 200 to 550 μmol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Temperature and humidity were regulated by automatic air exchange. Seeds were soaked in 10 mM aerated CaSO<sub>4</sub> solution for 24 h and allowed to germinate for 5 days. Uniform maize seedlings were transferred into 10-L plastic vessels. Initially, the concentration of the nutrient solution was 25%, but this was gradually increased to 100% within a week. The full nutrient solution (pH 5.9) had the following composition: 1.3 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.7 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1.0 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 200 μM Fe-EDTA, 5 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2 μM MnSO<sub>4</sub>, 0.5 μM ZnSO<sub>4</sub>, 0.3 μM CuSO<sub>4</sub>, and 0.01 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>. The solution was changed weekly to avoid nutrient depletion, and at the same time, the vessels were newly randomized. The KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> concentration was adjusted in dependence on the treatment (Tab. 1).

### 2.2 Experiment 1

In the first experiment, the influence of P foliar application on the nutrient status and plant development was analyzed after 2 weeks of deficiency in comparison with re-supply via the roots. Six treatments with a different P supply were cultivated in four biological replicates (Tab. 1). The first 7 d after seedling transference (three plants per vessel), the maize plants were cultivated under normal P conditions (0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) to ensure proper seedling development. Afterwards, in order to induce P deficiency symptoms, the P concentration in the nutrient solution was lowered to 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in all treatments, except for the positive control (Tab. 1). After two



**Table 1:** Schematic view of various phosphate supplies for the six distinct treatments over a period of seven weeks. For each treatment, four biological replicates were installed with three maize plants. Foliar application was carried out only once a week. From week four onwards, P was omitted in the nutrient solution of the foliar applications. For further details, see descriptions in the text (see Material and methods).<sup>a</sup>

Time after germination	pos. C	neg. C	Root	FA <sub>200</sub>	FA <sub>100</sub>	FA <sub>50</sub>
week 1	+	+	+	+	+	+
week 2+3	+	–	–	–	–	–
week 4	+	–	+			
week 5	+	–	+	x		
week 6	+	–	+			
week 7	+	–	+	x	x	x
Harvest: day 46						

<sup>a</sup>pos. C (positive control); neg. C (negative control); Root (re-supply *via* root); FA<sub>xx</sub> (foliar application with foliar application concentration in mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); + (0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> *via* roots); – (0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> *via* roots); x (0.00 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

weeks under deficiency conditions, re-supply occurred *via* (1) the roots, by increasing the KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> concentration back to 0.2 mM until harvest; (2) two foliar applications with a total applied amount of 372 mg P pot<sup>-1</sup> (200 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 4.5) on the first day of the 4<sup>th</sup> week at BBCH 15 (20 mL pot<sup>-1</sup>) and 11 d later at BBCH 17/18 (40 mL pot<sup>-1</sup>); (3) three foliar applications with two levels of P concentration (50 mM and 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 4.5) and a total applied amount of 186 or 372 mg P pot<sup>-1</sup> on the first day of the 4<sup>th</sup> week at BBCH 15 (20 mL pot<sup>-1</sup>), 7 d later at BBCH 16/17 (50 mL pot<sup>-1</sup>), and once again 9 d later at BBCH 17/18 (50 mL pot<sup>-1</sup>) (Tab. 1). Applications were conducted using a calibrated hand-held spray bottle. The plants were wetted from underneath and above. Furthermore, the solution contained 0.1% Silwet<sup>®</sup> Gold as a wetting agent to increase the spreading and penetrating properties and application took place in the morning between 5.30 am and 7 am to avoid leaf burn by high irradiation and to take advantage of the higher air humidity. To prevent contamination of the nutrient solution, the plant stems were wrapped with paper, and the vessel lids were covered with foil. From the time of the 1<sup>st</sup> foliar application, plants in the foliar application groups received no further P supply *via* their roots. Prior to the first foliar application, an intermediate harvest was performed on the same day for the later calculation of the uptake efficiency. Plants were harvested 10 d after the last foliar application on day 46 after seedling transference. Total P concentration was determined in the older shoot (fully developed leaves and stem), the younger shoot (no fully developed leaves), and the root. Additionally, a possible effect on the uptake of other nutrients was investigated, especially for K, since P was applied as a K salt.

### 2.3 Experiment 2

In experiment 1, the maize plants were wetted from underneath and above. Therefore, in experiment 2, possible differ-

ences between applications to the adaxial and the abaxial sides of the leaf were investigated in order to differentiate the influence of the leaf sides on overall uptake. Germination, nutrient solution composition, and cultivation in the first three weeks were the same as those described above. In addition, foliar application was carried out at the same time as the 1<sup>st</sup> foliar application in experiment 1, but the foliar application solution (200 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> plus 0.1% Silwet<sup>®</sup> Gold) was brushed onto the respective side of the leaf to avoid cross-contamination. Per plant, 2 mL (6 mL pot<sup>-1</sup>) were applied, and to prevent contamination of the nutrient solution, the plant stems were wrapped with paper, and the vessel lids were covered with foil. Harvest took place the following day. In order to determine the uptake of the foliar-applied P more precisely, subcellular parameters were determined in addition to the total P concentration in dry matter. Total P concentration was determined separately in the 4<sup>th</sup> leaf, the older shoot (all leaves below the 4<sup>th</sup> leaf plus stem), the younger shoot (all leaves above the 5<sup>th</sup> leaf), and the root. The 5<sup>th</sup> leaf was used to obtain the apoplastic washing fluid (AWF) and the cell sap.

### 2.4 Sampling and analysis of plant tissue

To determine their fresh weight, maize plants from each vessel were cut above the ground. Afterwards, the plants were divided into those parts to be examined and washed three times in deionized water to avoid fertilizer residues remaining on the leaf. Oven-dried plants (65°C) were weighed and then ground to a fine powder (Cyclotec 1093, Foss Tecator, Höganäs, Sweden). For mineral nutrient analyses, 200 mg of each replicate were digested with 10 mL of 69% HNO<sub>3</sub> (ROTIPUR-AN Supra for ICP, 69%) for 45 min in a 1800 W microwave oven (MARS 6, Xpress, CEM, Matthews, MC, USA), according to the method described by Jezek et al. (2014).

## 2.5 Sampling and analysis of subcellular fluids

The methods for the extraction of AWF (Lohaus et al., 2001; O'Leary et al., 2014) were used in a modified form. Briefly, 5<sup>th</sup> leaves were cut with a razor blade and carefully washed three times in deionized water. For infiltration, leaves were cut into segments of 15 cm<sup>2</sup> without midribs and placed in separated cups fully covered with deionized water in a desiccator. A vacuum was then generated for 5 min. Leaf segments were removed and placed on dry tissue, and water was dabbed off carefully. For recovery of AWF, the leaf segments were transferred into 20 mL syringes with open tips and placed into Sarstedt™ tubes (Sarstedt™ Tube, 50 mL). Subsequently, the tubes were centrifuged at 1500 rpm for 10 min at 4°C (Heraeus Multifuge X3R Zentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The supernatant was transferred into new tubes, weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at –80°C until further used. For cell sap collection, leaf segments were removed from the syringes and frozen in liquid nitrogen. They were thawed at room temperature and transferred afterwards into syringes placed in tubes for centrifugation (see above). The supernatant was transferred into new tubes, weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored by –80°C until purification. AWF samples were diluted at a ratio of 1:10, chloroform was added, and the solution was vortexed and centrifuged (12000 rpm, 4°C, 5 min). Cell sap samples were mixed at a ratio of 1:1 with an ice-cold methanol/chloroform mixture (1:1, v/v), vortexed, and shaken at 4°C for 60 min. Afterwards, 2 mL deionized water was added, and the sample was again vortexed and shaken (4°C, 60 min). Finally, the mixture was centrifuged at 4500 rpm and 4°C for 10 min. The removed aqueous phase from AWF and cell sap was then passed over C18-columns (JTB-7020-01) for further purification. The ion concentration in the AWF was multiplied by three, and the dilution factor  $[(V_{\text{water}}+V_{\text{gas}})/V_{\text{water}}]$  of the maize plants determined by Lohaus et al. (2001).

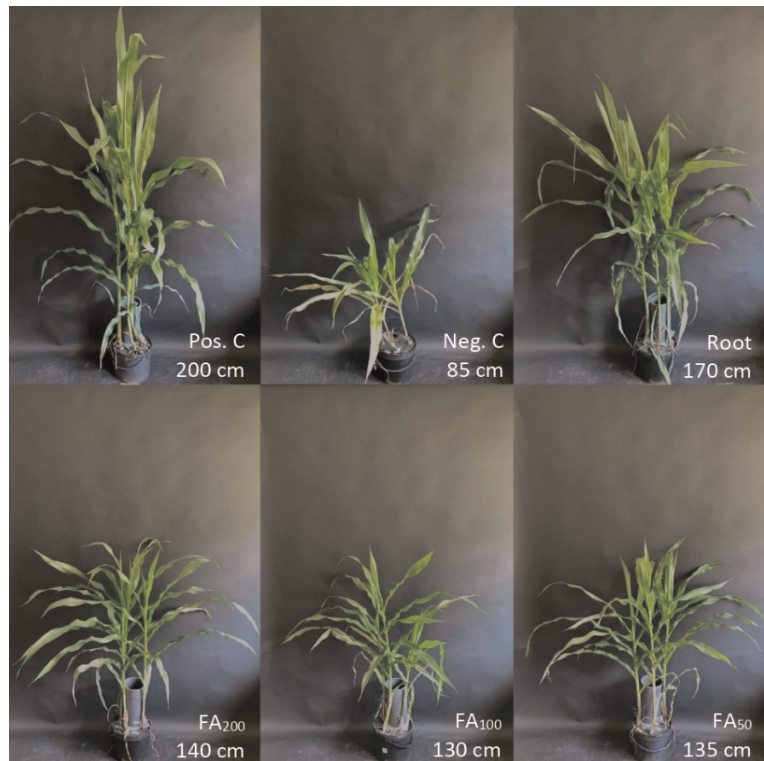
## 2.6 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS software (version 17.0). Values of treatments were subjected to one-way ANOVA followed by Duncan's Multiple Range test at  $\alpha = 5\%$ .

## 3 Results

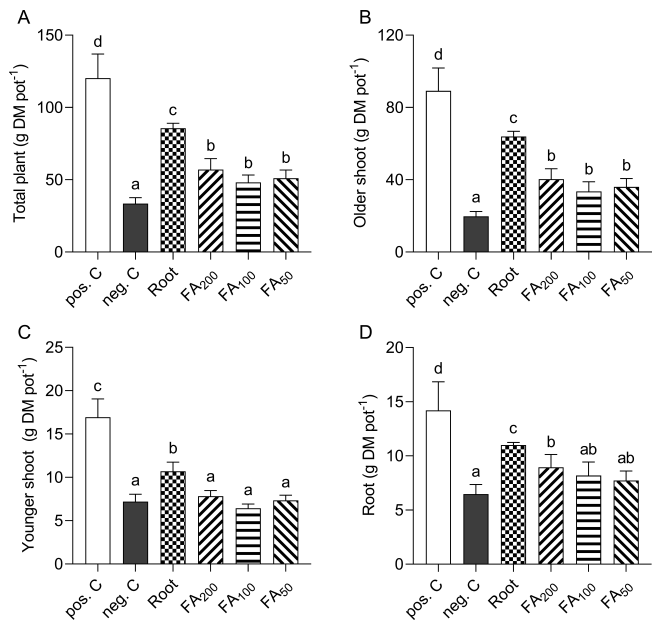
### 3.1 Plant Development

Total shoot dry matter (DM) values of the negative control (neg.C) and positive control (pos.C) were significantly reduced or increased, respectively, in comparison with the treatments involving the re-supply of P (leaves or roots; Figs. 1



**Figure 1:** Visual symptoms of phosphorus deficiency and impact of phosphorus re-supply. Representative plants at harvest time (46 days after germination). Pos. C (positive control), 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (potassium dihydrogen phosphate) in nutrient solution (NS); neg. C (negative control), 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS in week 1 and 0.01 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 6 weeks; Root (re-supply *via* roots), 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS in week 1, 0.01 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 2 weeks and 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS for the last 4 weeks; FA<sub>200</sub> (foliar application), 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS in week 1, 0.01 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 2 weeks, and 0.0 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  over the last 4 weeks + 200 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  two times in week 4 and 6; FA<sub>100</sub>, 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS in week 1, 0.01 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 2 weeks, and 0.0 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  over 4 weeks + 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  three times in week 4–6; FA<sub>50</sub>, 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS in week 1, 0.01 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 2 weeks, and 0.0 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  over 4 weeks + 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  three times in week 4–6.

and 2A). Mean DM values were 33.5 g pot<sup>-1</sup> for neg. C and 120.3 g pot<sup>-1</sup> for pos. C. Foliar application after two weeks of deficiency increased DM up to about 70%, which was significantly different compared with the neg. C (Fig. 2A). No significant differences in the total plant DM could be found between the various foliar applications (57.11 g, 48.2 g, and 51.1 g pot<sup>-1</sup>). However, re-supply *via* the root (Root) gave significantly higher DM compared with foliar application and amounted to 85.6 g pot<sup>-1</sup>, representing an additional yield of 65% compared with that obtained after foliar application. The division into groups of older or younger shoots resulted in similar proportions of DM being obtained in the older shoot as in the total plant (Fig. 2B), whereas in the younger shoot, no significant difference was seen between the neg. C and the foliar applications as determined after 7 weeks (Fig. 2C). In contrast, the group Root showed a significantly higher DM. However, the significantly highest DM was measured in the pos. C. Re-supply of P *via* the leaves also significantly increased the root DM in the foliar applications at 200 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (FA<sub>200</sub>) in comparison with the neg. C (Fig. 2C). On the other hand, the DM of roots from plants receiving the foliar

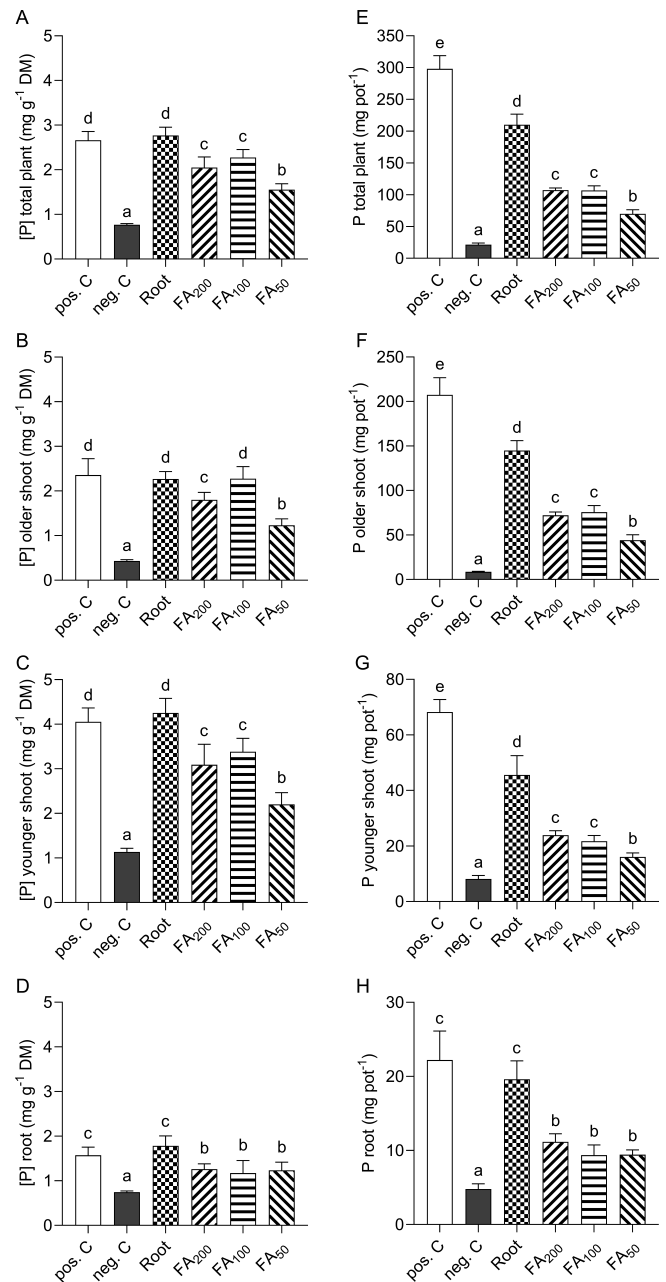


**Figure 2:** Dry matter in  $\text{g pot}^{-1}$  of (A) total shoot, (B) older shoot, (C) younger shoot, and (D) root at harvest 46 days after germination. Pos. C (positive control),  $0.2\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  (potassium dihydrogen phosphate) in nutrient solution (NS); neg. C (negative control),  $0.2\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in the NS in week 1 and  $0.01\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 6 weeks; Root (re-supply *via* roots),  $0.2\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS in week 1,  $0.01\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 2 weeks, and  $0.2\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS for the last 4 weeks; FA<sub>200</sub> (foliar application),  $0.2\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS in week 1,  $0.01\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 2 weeks, and  $0.0\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  over the last 4 weeks +  $200\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  two times in week 4 and 6; FA<sub>100</sub>,  $0.2\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS in week 1,  $0.01\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 2 weeks, and  $0.0\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  over 4 weeks +  $100\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  three times in week 4–6; FA<sub>50</sub>,  $0.2\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS in week 1,  $0.01\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 2 weeks, and  $0.0\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  over 4 weeks +  $50\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  three times in week 4–6. Bars represent means + SD ( $n = 4$ ). Small letters indicate significant differences between treatments (ANOVA with Duncan test,  $p \leq 0.05$ ).

application at  $100\text{ mM}$  (FA<sub>100</sub>) or at  $50\text{ mM}$  (FA<sub>50</sub>) showed no significant differences from either the neg. C or the treatment at FA<sub>200</sub>. Moreover, the pos. C group significantly showed the highest and the Root group the second highest values in the root.

### 3.2 P concentration and content in different parts of plants

The studied parts of neg. C plants cultivated under deficiency conditions exhibited the significantly lowest P concentrations in all plant groups (Fig. 3A–3D). The P concentrations were between  $0.43\text{ mg P g DM}^{-1}$  in the older shoot,  $1.1\text{ mg P g DM}^{-1}$  in the younger shoot, and  $0.74\text{ mg P g DM}^{-1}$  in the root tissue; total shoot contained  $0.77\text{ mg P g DM}^{-1}$ . Optimal nutrition led to a P concentration between  $1.6\text{ mg P g DM}^{-1}$  in the root and  $4.1\text{ mg P g DM}^{-1}$  in the younger shoot. Addition of  $0.2\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  after two weeks of deficiency significantly raised the P concentration in all plant parts to the same level as those of the pos. C group. Re-supply of P *via* foliar application resulted in an average percentage increase of P concentration up to 430% in the old-



**Figure 3:** Phosphorus concentration [P] in  $\text{mg g}^{-1}$  dry matter and content in  $\text{mg pot}^{-1}$  of (A, E) total shoot, (B, F) older shoot, (C, G) younger shoot, and (D, H) root were analyzed after harvest 46 days after germination. Pos. C (positive control),  $0.2\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  (potassium dihydrogen phosphate) in nutrient solution (NS); neg. C (negative control),  $0.2\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in the NS in week 1 and  $0.01\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 6 weeks; Root (re-supply *via* roots),  $0.2\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS in week 1,  $0.01\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 2 weeks, and  $0.2\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS for the last 4 weeks; FA<sub>200</sub> (foliar application),  $0.2\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS in week 1,  $0.01\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 2 weeks, and  $0.0\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  over the last 4 weeks +  $200\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  two times in week 4 and 6; FA<sub>100</sub>,  $0.2\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS in week 1,  $0.01\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 2 weeks, and  $0.0\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  over 4 weeks +  $100\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  three times in week 4–6; FA<sub>50</sub>,  $0.2\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS in week 1,  $0.01\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 2 weeks, and  $0.0\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  over 4 weeks +  $50\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$  three times in week 4–6. Bars represent means + SD ( $n = 4$ ). Small letters indicate significant differences between treatments (ANOVA with Duncan test,  $p \leq 0.05$ ).

er shoot, around 200% in the younger shoot, and 85% in the roots compared with those of the neg. C group. Significant effects on the P concentration in the shoot were detected between the three foliar applications. FA<sub>100</sub> in three applications led to the highest P concentration in the whole plant at 2.3 mg P g DM<sup>-1</sup> and in the older shoot at 2.3 mg P g DM<sup>-1</sup> (Fig. 3A, 3B). In contrast, plants receiving FA<sub>50</sub>, also given in three applications, revealed the lowest P concentration in their shoot segments (Fig. 3A–3C). When applied twice at an increased foliar fertilizer concentration, as in FA<sub>200</sub>, the P concentration did not increase as much as in the older shoots of plants treated with FA<sub>100</sub> (1.8 mg P g DM<sup>-1</sup>), but no differences were determined in the total plant (2.1 mg P g DM<sup>-1</sup>) and in the younger shoot.

With regard to the P content of the whole plant or the individual regions, the results showed that FA<sub>200</sub> and FA<sub>100</sub> treatment resulted in a significantly higher P content than of plants treated with FA<sub>50</sub>, *i.e.*, approx. 50% more, apart from the root (Fig. 3). In the older shoot, the differences in the contents between foliar application and neg. C were significantly the highest (up to 770%), whereas in the root, they significantly increased by a factor of two. Furthermore, in all compartments, the contents for the Root group were significantly increased at twice the value of the foliar applications. The contents of the pos. C group were significantly the highest in the older shoot and in the younger shoot with more than 200 and 68 mg P pot<sup>-1</sup>, respectively. Only values in the Root group were equivalent.

The proportion of P absorbed following foliar application was, at 90% of the total P for FA<sub>200</sub> and FA<sub>100</sub>, significantly higher in comparison with that for FA<sub>50</sub>. Treatment with FA<sub>50</sub> achieved a total P value of 85% for the whole plant (Tab. 2). With a proportion of 94% for FA<sub>200</sub> and FA<sub>100</sub> and 91% for FA<sub>50</sub>, the values for the total shoot P were above 90%. In the root, almost 50% of the P in all three treatments came from foliar-applied P.

The uptake efficiency of foliar-applied P reached 26% for FA<sub>200</sub> and FA<sub>100</sub>, whereas it was significantly higher for FA<sub>50</sub> at 32%.

### 3.3 Potassium and magnesium concentration after P re-supply

Macronutrient measurements revealed an influence of P nutrition amount and method on the potassium (K<sup>+</sup>) concentration and content in the plant tissues (Fig. 4A, 4B). In comparison to the P concentration in the older shoot, younger shoot, and root (Fig. 2B–2D), the K<sup>+</sup> concentration demonstrated an inverse ratio of the treatments. Overall, the plants receiving the neg. C and foliar applications had the highest K<sup>+</sup> concentrations. However, re-supply of P *via* the roots reduced the K<sup>+</sup> concentration in comparison to that in the plants in the neg. C group and after foliar applications, and no difference from the pos. C was observed in the younger shoot. In contrast, the contents in the older shoot showed the same ratios as those measured for P. However, this relationship could not be measured in the younger shoot and root. The neg. C was at the level of the groups with P re-supply. The K<sup>+</sup> concentrations in the older shoot and the root of the pos. C group were the significantly lowest and the contents the significant highest, apart from the root.

The neg. C group consistently showed the lowest magnesium (Mg<sup>2+</sup>) concentrations and contents (Fig. 4C, 4D). In comparison with the pos. C and Root groups, the values were even significantly lower. An increase in Mg<sup>2+</sup> concentration and content were also measured following the foliar applications. Thereby, the highest Mg<sup>2+</sup> concentration was determined following FA<sub>100</sub> treatment and was significantly higher than that in the neg. C group. This was also measured for the FA<sub>200</sub> treatment in the younger shoot. The slightest differences were seen in the younger shoot. However, an increase of the KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> concentration in the nutrient solution led to a significant increase of Mg<sup>2+</sup> concentration in the root. At

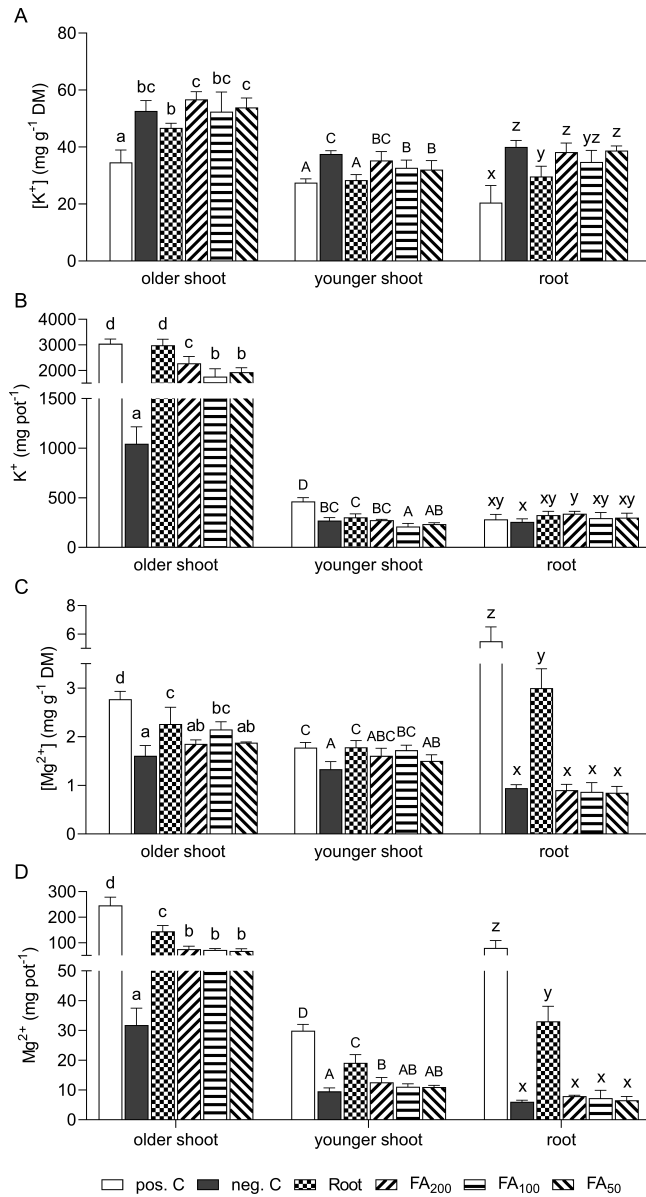
**Table 2:** Foliar phosphorus absorption and percentage of total plant phosphorus adjusted by the values of the intermediate harvest and calculation of the uptake efficiency of treated maize plants depending on the amount of P applied *via* the leaf.<sup>a</sup>

Treatment	Plant part	Foliar P absorption (mg pot <sup>-1</sup> )		Foliar P (% foliar P of total P)		Foliar P applied in total (mg pot <sup>-1</sup> )	Foliar P absorption (% of foliar P recovered)
FA <sub>200</sub>	Total	96.77 ± 4	b	90 ± 1	b	372	26 ± 1 a
	Shoot	90.94 ± 4	B	94 ± 1	B		
	Root	6.27 ± 1	ns	56 ± 7	ns		
FA <sub>100</sub>	Total	96.33 ± 8	b	90 ± 1	b	372	26 ± 2 a
	Shoot	91.85 ± 8	B	94 ± 1	B		
	Root	4.48 ± 1	ns	47 ± 11	ns		
FA <sub>50</sub>	Total	59.38 ± 9	a	85 ± 1	a	186	32 ± 3 b
	Shoot	54.82 ± 7	A	91 ± 1	A		
	Root	4.56 ± 1	ns	48 ± 10	ns		

<sup>a</sup>FA<sub>xx</sub> (foliar application with foliar application concentration in mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); data are means ± SD (*n* = 4). Letters indicate significant differences within the examined plant part between treatments (ANOVA with Duncan test, *p* ≤ 0.05); not significant (ns).

5.5 mg Mg<sup>2+</sup> g DM<sup>-1</sup>, the pos. C group contained 6 times more Mg<sup>2+</sup> than the neg. C group, especially after the foliar applica-

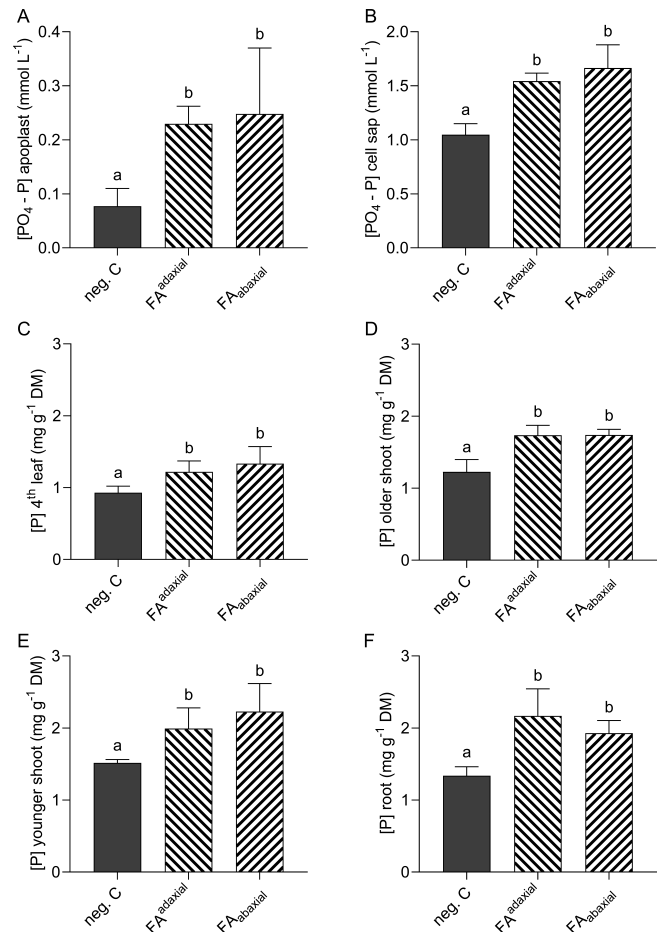
tions (≈ 0.9 mg Mg<sup>2+</sup> g DM<sup>-1</sup>), whereas the respective value for the Root group was 3.4 times higher (3.0 mg Mg<sup>2+</sup> g DM<sup>-1</sup>).



**Figure 4:** (A, B) Potassium and (C, D) magnesium concentration [K<sup>+</sup>; Mg<sup>2+</sup>] in mg g<sup>-1</sup> dry matter and content in mg pot<sup>-1</sup> of older shoot, younger shoot, and root were analyzed after 46 days of growth Pos. C (positive control), 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (potassium dihydrogen phosphate) in nutrient solution (NS); neg. C (negative control), 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in the NS in week 1 and 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 6 weeks; Root (re-supply *via* roots), 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS in week 1, 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 2 weeks, and 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for the last 4 weeks; FA<sub>200</sub> (foliar application), 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS in week 1, 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 2 weeks, and 0.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> over the last 4 weeks + 200 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> two times in week 4 and 6; FA<sub>100</sub>: 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS in week 1, 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 2 weeks, and 0.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> over 4 weeks + 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> three times in week 4–6; FA<sub>50</sub>: 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS in week 1, 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 2 weeks, and 0.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> over 4 weeks + 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> three times in week 4–6. Bars represent means + SD (n = 4). Letters indicate significant differences between treatments (ANOVA with Duncan test, p ≤ 0.05).

### 3.4 Total P and subcellular phosphate-P concentration in dependence on the treated leaf side

In all investigated plant regions, treatments with foliar-applied P showed significantly higher P concentrations independently of the treated leaf side (Fig. 5). The subcellular measurements showed no significant difference between the treated leaf sides. In the cell sap, the phosphate-P concentration for FA<sub>abaxial</sub> at 1.66 mmol L<sup>-1</sup> was slightly higher than the concentration for FA<sub>adaxial</sub> at 1.54 mmol L<sup>-1</sup>. The increase in P concentration in the treated groups was about 30 to 50% compared with the neg. C group. In particular, in the untreated root,



**Figure 5:** Concentration of phosphate-phosphorus [PO<sub>4</sub>-P] in mmol L<sup>-1</sup> of (A) apoplast, and (B) cell sap and of phosphorus concentration [P] in mg g<sup>-1</sup> dry matter of (C) 4<sup>th</sup> leaf, (D) older shoot, (E) younger shoot, and (F) root. Neg. C (negative control), 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in nutrient solution (NS) for 1 week and 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 2.5 weeks; FA<sub>adaxial</sub> (foliar application), 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 1 week, 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 2 weeks, and 0.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 200 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> on the adaxial leaf side in week 4; FA<sub>abaxial</sub>: 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 1 week, 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 2 weeks, and 0.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 200 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> on the abaxial leaf side in week 4. Bars represent means + SD (n = 4). Small letters indicate significant differences between treatments (ANOVA with Duncan test, p ≤ 0.05).

the P concentration increased from 1.3 mg P g DM<sup>-1</sup> to 1.9 (FA<sub>abaxial</sub>) and to 2.2 mg P g DM<sup>-1</sup> (FA<sub>adaxial</sub>). The highest concentrations of P were measured in younger shoots. However, no significant differences in P uptake were measured between the adaxial and abaxial side of the leaf.

## 4 Discussion

The efficiency of P fertilizer use is crucial for the economic and environmental sustainability of agriculture. Little work has been carried out on the influence of P status on foliar P uptake. Therefore, we questioned whether the foliar application of the macronutrient P in maize plants with a P deficiency is sufficient to enhance plant development and growth. Hence, the biomass and P plant status in the various parts of the maize plant were investigated using hydroponic cultivation.

### 4.1 Foliar application of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> increases biomass and P concentration

The huge differences in dry matter between the positive and the negative control (Figs. 1 and 2) demonstrate the importance of P as an essential macronutrient and underline the need for the development of appropriate P fertilization strategies to ensure high plant productivity, with respect to changes in Fertilizer Ordinances (Jezek et al., 2014). In addition to reduced dry matter, negative control plants grown in 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> also showed premature leaf senescence and reduced leaf area. This is in agreement with results of several other studies (Colomb et al., 2000; Assuero et al., 2004; Hawkesford et al., 2012). However, studies on foliar application have not focused on biomass effects in deficient plants. The re-supply of P *via* foliar applications after 2 weeks of P deficiency resulted in a significant effect on biomass, P concentration, and P content (Figs. 2 and 3). This finding broadly supports the statement by Noack et al. (2010) that early P foliar application could lead to an early dry matter response. On the contrary, no positive effects of P foliar application on the biomass are reported in the study of Thorne (1957). Furthermore, plants receiving foliar P application showed a visible delay of leaf senescence compared to plants of the negative control group (Fig. 1). Thus, foliar application seems to delay leaf senescence, a feature that Benbella and Paulsen (1998) have also shown in their field experiment with wheat (*Triticum aestivum*). This finding can be attributed to the significantly increased P concentration and P content in the whole plant following foliar application (Fig. 3). Our results thus confirm both the uptake of P by P deficient maize and its utilization for growth under hydroponic conditions. This is contrary to the findings of Fernández et al. (2014) who have reported that no radiolabeled P is taken up by deficient wheat leaves. According to those authors, this might be attributable to the decrease in stoma and trichome density and a failure to open stoma following a normal diurnal rhythm. In contrast, Clarkson and Scattergood (1982) have found that leaves of barley (*Hordeum vulgare*) grown *via* hydroponics with a one-week P deficiency have a higher absorption of radiolabeled KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> than control plants. However, nutrient deficiency leads to a possible change in the structure of leaves, which can impair or prevent absorption.

Unsurprisingly, we determined that the P concentration in the younger shoots of the plants receiving foliar applications was highest compared with the other plant parts. According to Fernández and Brown (2013), P exhibits high phloem mobility and can be translocated within the plant. Koontz and Biddulph (1957) have demonstrated on bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) that the immature leaves do not displace foliar applied <sup>32</sup>P, whereas <sup>32</sup>P absorbed *via* fully developed leaves is displaced into growing tissue. Hence, a redistribution and translocation of P occur to the point of demand. This is also evident in the studies of Grant et al. (2001) and McBeath et al. (2011) and in the younger shoots and the roots of our study (Fig. 3). However, not all leaves had appeared at the time of our last P foliar application and, thus, a translocation of P must have occurred to ensure such high P concentrations in the younger shoot. Overall, up to 90% of the total P content resulted from our foliar applications (Tab. 2). Our calculations suggested that the proportion in the shoot was even higher at up to 94% foliar-applied P, and that about 50% of the P in the roots was attributable to foliar application. No differences were found in the dry matter of the younger shoot between the negative control and the foliar applications or between the foliar applications (Fig. 2C). In addition to P re-translocation (Mimura et al., 1996) in the negative control, a possible explanation is that differences would only become apparent when the leaves are fully developed, because under P deficiency, leaf expansion is inhibited (Fredeen et al., 1989; Assuero et al., 2004). Therefore, based on the P concentration and P content, we might expect that the leaves of the plants receiving the foliar applications would have a larger leaf area with further growth. Probably the largest amount of P was taken up with the last application, because at this time, the largest leaf area was present. As harvest took place 10 days later and based on the P content, the lack of difference in dry matter between the plants receiving foliar treatments can be explained by the above-mentioned arguments.

### 4.2 Foliar P is absorbed over both sides of the leaf

The results of our second experiment demonstrated that P deficient maize absorbed P in equal proportions over the adaxial and abaxial leaf sides (Fig. 5). Under normal conditions, maize plants show differences in the structure of their leaves. While a higher stomata density is found on the abaxial side, the adaxial side has three different types of trichomes (Driscoll et al., 2006; Martin and Glover, 2007; Revilla et al., 2016). Further, various studies have shown that stomata have a direct impact on the absorption rate of foliar-applied nutrients (e.g. Eichert and Burkhardt, 2001; Eichert and Goldbach, 2008); thus, increased absorption *via* the abaxial leaf side is suspected. However, the presence of trichomes is highly likely to promote nutrient uptake, which might be beneficial for foliar fertilization *via* the adaxial side in maize. For example, Schlegel and Schönherr (2002) have shown that the presence of trichomes on young apple fruits increases the uptake of CaCl<sub>2</sub>. According to Fernández et al. (2014), this might be because of the reduced thickness of the cuticle and the occurrence of cracks and discontinuities in the trichome base. Furthermore, the study of Revilla et al. (2016) has revealed that maize leaves are less wettable on the abaxial side of the leaf, but this also depends on the population. A

similar effect has been observed during application in our study. However, quantification of the importance of the individual uptake pathways is problematic because differences in uptake being difficult to attribute to just one component (Peirce et al., 2014).

#### 4.3 The increase of foliar fertilizer concentration enables the reduction of applications

Higher concentrations of foliar P solutions led to a higher absorption rate but lower uptake efficiency (Schönherr, 2001; Girma et al., 2007; Peirce et al., 2014). This has been confirmed by our results (Fig. 3, Tab. 2). Moreover, the results of a further doubling of the foliar fertilizer concentration to 200 mM but with the same applied total P amount as for foliar application with 100 mM suggested that a third application is unnecessary. No differences have been measured in dry matter and P content (Figs. 2 and 3) and, hence, from a practical point of view, the saving of an additional application will be of importance from a time and economic perspective. According to Fernández and Eichert (2009), the higher absorption rates can probably be attributed to the finding that the uptake rate is determined by the difference in concentration of the solutes within the spray solution and the interior of the leaf. Nevertheless, in our study, foliar application with 200 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and foliar application with 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  achieved, at 26%, a significantly lower relative absorption rate than foliar application with 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  at 32% (Tab. 2). In our experiments, application by spraying led to unavoidable losses, thereby reducing the efficiency (Tab. 2). In addition to the drift caused by the wetting of the plants from all sides, the run-off/dripping of the spray solution along the leaves and over the stem must also be taken into account. This was revealed by the darkening of the paper that we had wrapped around the base of the stems to prevent the spray solution from affecting the nutrient solution. A further indication that the leaf fertilizer was not completely absorbed was the presence of individual crystalline residues of the spray solution on individual maize leaves. These were mainly formed where larger quantities of solution had accumulated and dried out leaving deposits. Reed and Tukey (1978) and McBeath et al. (2020) have found low uptake efficiency in the use of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as a foliar fertilizer, attributable to its crystallization on the surface of leaves.

#### 4.4 Foliar application is at a disadvantage compared with re-supply via the root

Despite the positive effects compared to the negative control, foliar application was at a disadvantage compared with the re-supply of P via the root in hydroponics. With respect to the dry matter and P concentration, the re-supply of P via the root showed significantly increased values (Figs. 2 and 3A–3D). Foliar application with 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  led to no differences in P concentrations in the older shoot compared with the positive control and re-supply via the root. However, if the P content of the plants was taken into account (Figs. 3E–3H), the total amount of P in the shoot and root was significantly reduced by half when P was applied via the leaf. On the one hand, P foliar application is limited by the fact that concentra-

tions that are too high lead to damage of the leaf through high nutrient loading (Noack et al., 2010). On the other hand, P supply in the leaf by foliar-applied P is for a short period of time as shown by Arsic et al. (2020), whereas re-supply via the root in hydroponics ensured continuous supply. However, we must point out that the above experiments have been conducted by hydroculture. A possible interaction of P-ions with soil components has not been considered in this study. Although the addition of P via the root affects the P concentration of the positive control, it cannot solve a two-week deficiency, if the P content is also taken into account (Fig. 3).

#### 4.5 P re-supply reveals different effects on potassium and magnesium

Decreased  $\text{K}^+$  concentrations for the positive control and for re-supply via the root are attributable to a dilution effect (Figs. 4A, 4B) as was also shown by Reinbott and Blevins (1991, 1994). On the other hand, in the foliar applications, the  $\text{K}^+$  content in the older shoot increased more than the dry matter, regardless of the applied concentration, and therefore the concentrations did not decrease. The finding that the contents increased more than the dry matter can be attributed to the additional amount of  $\text{K}^+$  applied to the leaves. Surprisingly, no increase in the  $\text{K}^+$  content was observed in the younger shoots, despite foliar application. Because the  $\text{K}^+$  level was not deficient and because P has no influence on  $\text{K}^+$  uptake, a possible  $\text{K}^+$  effect as a result of foliar application cannot be assessed.

In comparison with  $\text{K}^+$ , the  $\text{Mg}^{2+}$  concentration in the maize shoot or root is dependent on the P nutritional status of the maize plants, since the  $\text{Mg}^{2+}$  concentration was the same in the nutrient solution of all treatments (Fig. 4C). This is consistent with other studies. Reinbott and Blevins (1991, 1994) measured an increase in the  $\text{Mg}^{2+}$  concentration and  $\text{Mg}^{2+}$  content under increased P levels. The P foliar application had an effect on the uptake of  $\text{Mg}^{2+}$ , as can be seen in the concentrations/contents of  $\text{Mg}^{2+}$  but especially in the  $\text{Mg}^{2+}$  content in the older shoot (Figs. 4C, 4D). However, re-supply via the root has a stronger effect. This is probably attributable to the continuous P supply in the nutrient solution. An interesting finding was the  $\text{Mg}^{2+}$  concentration and content in the root of the positive control and the re-supply via root. This suggests that the P-supply/level in the root space is decisive for  $\text{Mg}^{2+}$  uptake, as is consistent with the study of Reinbott and Blevins (1991). These results confirm the assumption of Reinbott and Blevins (1999) that the uptake and translocation of  $\text{Mg}^{2+}$  are directly influenced by P levels, e.g., via the regulation of channels divalent cations.

## 5 Conclusion

Our results show the potential benefits of such foliar application in maize with P deficiency. Under controlled conditions, we have shown that foliar application can be used to intervene in cases of acute P deficiency, as maize plants are able to absorb P through the leaf, despite P deficiency. A P foliar application on maize might also be a suitable for avoiding sudden P starvation. Furthermore, an additional application

can be omitted by doubling the spray concentration without increasing the P amount. Nevertheless, the concentration of P should not be increased at will, because concentrations that are too high lead to damage of the leaf structure or of functional processes within the leaf. No difference was detected with regard to whether the nutrient P is applied *via* the adaxial or abaxial side of the leaf. This finding is beneficial for nutrient absorption as the plant can be wetted from both sides to increase the potential uptake area and to avoid losses during the spraying process, both further increasing the efficiency of P uptake. Our data show that further research on application techniques will be beneficial in order to make foliar application more efficient, especially given that farmers will increasingly be forced by law to reduce P soil fertilization.

## Acknowledgments

Bruno Maximilian Görlach gratefully acknowledges the financial support provided by the *Federal State Scholarship* from *Kiel University*. Open access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

## Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## References

- Arsic, M., Le Tougaard, S., Persson, D. P., Martens, H. J., Doolette, C. L., Lombi, E., Schjoerring, J. K., Husted, S. (2020): Bioimaging techniques reveal foliar phosphate uptake pathways and leaf phosphorus status. *Plant Physiol.* 183, 1472–1483.
- Assuero, S. G., Mollier, A., Pellerin, S. (2004): The decrease in growth of phosphorus-deficient maize leaves is related to a lower cell production. *Plant Cell Environ.* 27, 887–895.
- Benbella, M., Paulsen, G. M. (1998): Efficacy of treatments for delaying senescence of wheat leaves: II. Senescence and grain yield under field conditions. *Agron. J.* 90, 332–338.
- Clarkson, D. T., Scattergood, C. B. (1982): Growth and phosphate transport in barley and tomato plants during the development of, and recovery from, phosphate-stress. *J. Exp. Bot.* 33, 865–875.
- Colomb, B., Kiniry, J. R., Debaeke, P. (2000): Effect of soil phosphorus on leaf development and senescence dynamics of field-grown maize. *Agron. J.* 92, 428–435.
- Driscoll, S. P., Prins, A., Olmos, E., Kunert, K. J., Foyer, C. H. (2006): Specification of adaxial and abaxial stomata, epidermal structure and photosynthesis to CO<sub>2</sub> enrichment in maize leaves. *J. Exp. Bot.* 57, 381–390.
- Eichert, T., Burkhardt, J. (2001): Quantification of stomatal uptake of ionic solutes using a new model system. *J. Exp. Bot.* 52, 771–781.
- Eichert, T., Goldbach, H. E. (2008): Equivalent pore radii of hydrophilic foliar uptake routes in stomatous and astomatous leaf surfaces—further evidence for a stomatal pathway. *Physiol. Plant.* 132, 491–502.
- Eichert, T., Kurtz, A., Steiner, U., Goldbach, H. E. (2008): Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiol. Plant.* 134, 151–160.
- Fernández, V., Brown, P. H. (2013): From plant surface to plant metabolism: the uncertain fate of foliar-applied nutrients. *Front. Plant Sci.* 4. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00289>.
- Fernández, V., Eichert, T. (2009): Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: Current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. *Crit. Rev. Plant Sci.* 28, 36–68.
- Fernández, V., Guzmán, P., Peirce, C. A. E., McBeath, T. M., Khayet, M., McLaughlin, M. J. (2014): Effect of wheat phosphorus status on leaf surface properties and permeability to foliar-applied phosphorus. *Plant Soil* 384, 7–20.
- Fernández, V., Sotiropoulos, T., Brown, P. H. (2013): Foliar Fertilization: Scientific Principles and Field Practices. International fertilizer industry association (IFA), Paris, France.
- Fredeen, A. L., Rao, I. M., Terry, N. (1989): Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in *Glycine max*. *Plant Physiol.* 89, 225–230.
- Girma, K., Martin, K. L., Freeman, K. W., Mosali, J., Teal, R. K., Raun, W. R., Moges, S. M., Arnall, D. B. (2007): Determination of optimum rate and growth stage for foliar-applied phosphorus in corn. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 38, 1137–1154.
- Grant, C. A., Flaten, D. N., Tomasiewicz, D. J., Sheppard, S. C. (2001): The importance of early season phosphorus nutrition. *Can. J. Plant Sci.* 81, 211–224.
- Hawkesford, M., Horst, W., Kichey, T., Lambers, H., Schjoerring, J., Møller, I. S., White, P. (2012): Functions of Macronutrients, in Marschner, P. (ed.): *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, 3<sup>rd</sup> Ed. Academic Press, Boston, MA, USA, pp. 135–189.
- Heredia, A. (2003): Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochim. Biophys. Acta* 1620, 1–7.
- Jezek, M., Geilfus, C.-M., Bayer, A., Mühling, K. H. (2014): Photosynthetic capacity, nutrient status, and growth of maize (*Zea mays* L.) upon MgSO<sub>4</sub> leaf-application. *Front. Plant Sci.* 5. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00781>.
- Kannan, S. (2010): Foliar Fertilization for Sustainable Crop Production, in Lichtfouse, E. (ed.): *Genetic Engineering, Biofertilisation, Soil Quality and Organic Farming. Sustainable Agriculture Reviews 4*. ger, Dordrecht, The Netherlands, pp. 371–402.
- Koontz, H., Biddulph, O. (1957): Factors affecting absorption and translocation of foliar applied phosphorus. *Plant Physiol.* 32, 463–470.
- Lohaus, G., Pennewiss, K., Sattelmacher, B., Hussmann, M., Muehling, K. H. (2001): Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiol. Plant.* 111, 457–465.
- Martin, C., Glover, B. J. (2007): Functional aspects of cell patterning in aerial epidermis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 70–82.
- McBeath, T. M., Facelli, E., Peirce, C. A. E., Arachchige, V. K., McLaughlin, M. J. (2020): Assessment of foliar-applied phosphorus fertiliser formulations to enhance phosphorus nutrition and grain production in wheat. *Crop Pasture Sci.* 71, 795–806.
- McBeath, T. M., McLaughlin, M. J., Noack, S. R. (2011): Wheat grain yield response to and translocation of foliar-applied phosphorus. *Crop Pasture Sci.* 62, 58–65.
- Mimura, T., Sakano, K., Shimmen, T. (1996): Studies on the distribution, re-translocation and homeostasis of inorganic phosphate in barley leaves. *Plant Cell Environ.* 19, 311–320.
- Noack, S. R., McBeath, T. M., McLaughlin, M. J. (2010): Potential for foliar phosphorus fertilisation of dryland cereal crops: a review. *Crop Pasture Sci.* 61, 659–669.
- O'Leary, B. M., Rico, A., McCraw, S., Fones, H. N., Preston, G. M. (2014): The infiltration-centrifugation technique for extraction of



- apoplastic fluid from plant leaves using *Phaseolus vulgaris* as an example. *J. Vis. Exp.* 2014. DOI: <https://doi.org/10.3791/52113>.
- Peirce, C. A. E., McBeath, T. M., Fernández, V., McLaughlin, M. J. (2014): Wheat leaf properties affecting the absorption and subsequent translocation of foliar-applied phosphoric acid fertiliser. *Plant Soil* 384, 37–51.
- Reed, D. W., Tukey, H. B. (1978): Effect of pH on foliar absorption of phosphorus compounds by chrysanthemum. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 337–340.
- Reinbott, T. M., Blevins, D. G. (1991): Phosphate interaction with uptake and leaf concentration of magnesium, calcium, and potassium in winter wheat seedlings. *Agron. J.* 83, 1043–1046.
- Reinbott, T. M., Blevins, D. G. (1994): Phosphorus and temperature effects on magnesium, calcium, and potassium in wheat and tall fescue leaves. *Agron. J.* 86, 523–529.
- Reinbott, T. M., Blevins, D. G. (1999): Phosphorus nutritional effects on root hydraulic conductance, xylem water flow and flux of magnesium and calcium in squash plants. *Plant Soil* 209, 263–273.
- Revilla, P., Fernández, V., Álvarez-Iglesias, L., Medina, E. T., Caverro, J. (2016): Leaf physico-chemical and physiological properties of maize (*Zea mays* L.) populations from different origins. *Plant Physiol. Biochem.* 107, 319–325.
- Rodríguez, D., Andrade, F. H., Goudriaan, J. (1999): Effects of phosphorus nutrition on tiller emergence in wheat. *Plant Soil* 209, 283–295.
- Schlegel, T. K., Schönherr, J. (2002): Stage of development affects penetration of calcium chloride into apple fruits. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 165, 738–745.
- Schlegel, T. K., Schönherr, J., Schreiber, L. (2005): Size selectivity of aqueous pores in stomatous cuticles of *Vicia faba* leaves. *Planta* 221, 648–655.
- Schönherr, J. (2001): Cuticular penetration of calcium salts: effects of humidity, anions, and adjuvants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164, 225–231.
- Schönherr, J. (2006): Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *J. Exp. Bot.* 57, 2471–2491.
- Thorne, G. N. (1957): The effect of applying a nutrient in leaf sprays on the absorption of the same nutrient by the roots. *J. Exp. Bot.* 8, 401–412.
- Withers, P. J. A., Edwards, A. C., Foy, R. H. (2001): Phosphorus cycling in UK agriculture and implications for phosphorus loss from soil. *Soil Use Manage.* 17, 139–149.

## 2. Kapitel

# Uptake, subcellular distribution, and translocation of foliar-applied phosphorus: short-term effects on ion relations in deficient young maize plants

Bruno Maximilian Görlach, Amit Sagervanshi, Jon Niklas Henningsen and Karl Hermann Mühling

submitted in *Plant Physiology and Biochemistry*\*

\*published in *Plant Physiology and Biochemistry* 166, (2021), 677-688

DOI: 10.1016/j.plaphy.2021.06.028

## Abstract

One crucial aspect for successful foliar application is the uptake of the nutrient into the cytoplasm for metabolization by the plant. Our aim was to determine the subcellular distribution of foliar-applied P in leaves, the translocation of this P within the whole plant, and its impact on the ion status of P-deficient maize plants within the first 48 h of treatment. Maize plants with P deficiency were sprayed with 200 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . After 6, 24, and 48 h, the 5<sup>th</sup> leaf of each plant was harvested for the isolation of apoplastic washing fluid, cell sap, and vascular bundle sap and for the examination of transporter gene expression. The remainder of the plant was divided into 4<sup>th</sup> leaf, older and younger shoots, and root for total P determination. No accumulation of foliar-applied P was measured in the apoplast. P was mostly taken up into the cytosol within the first 6 h and was associated with increased mRNA levels of *PHT1* transporters. A strong tendency towards rapid translocation into the younger shoot and an increase in  $\text{NO}_3^-$  uptake or a decrease in organic acid translocation were observed. The apoplast seems to exert no effect on the uptake of foliar-applied P into the epidermal and mesophyll cells of intact leaves. Instead, the plant responds with the rapid translocation of P and changes in ion status to generate further growth. The effect of the absorbed foliar-applied P is assumed to be a rapid process with no transient storage in the leaf apoplast.

## 1 Introduction

Phosphorus (P) accounts for 0.05-0.5% of total dry plant matter, depending on crop species (Vance et al. 2003). It is one of the most important of plant nutrients, and because of its high plant requirement, is classified as an essential macronutrient. Globally, P is one of the most frequently limiting nutrients for plant growth. P has a low availability, especially on acid soils, which account for 30% of the total land area worldwide (Uexküll und Mutert 1995). P deficiency has a negative effect on crop yield (Hawkesford et al. 2012) and can also affect the uptake of other nutrients, for example  $\text{NO}_3^-$  (Jeschke et al. 1997) or Mg (Reinbott und Blevins 1991). Therefore, plants have developed various adaptive systems as a result of P-starvation, e.g., high-affinity P uptake, storage of inorganic P in the vacuole, re-translocation of inorganic P between tissues, and exudation of phosphatases or organic acids into the rhizosphere (Mimura 1999). One important crop with a requirement for P fertilization is maize (*Zea mays* L.). Therefore, maize plants require the application of starter P to provide essential P for early growth (Grant et al. 2001). Moreover, in addition to starter P during sowing, foliar application late in-season has become established as an effective alternative for P fertilization of crops on soils with a high P fixation (Noack et al. 2010). Foliar-applied P might thus also play a significant role under conditions of phosphorus deficiency. The nutrient can be applied directly to the plant and enables a higher efficiency of fertilizer use (Girma et al. 2007). The nutrient must however be absorbed by the plant, especially the leaves, to have an effect on metabolism and crop yield. Therefore, the nutrient has to penetrate the leaf surface and apoplast to reach the cytosol of the mesophyll cells in order to be utilized by the plant (Noack et al. 2010). According to the current state of research, "nutrient uptake" is a passive process that is driven by concentration gradients and takes place mainly via the cuticle and stomata (Eichert und Goldbach 2008; Fernández et al. 2013). The probability and rate of uptake via the cuticle and stomata presumably depends on the contact area between the fertilizer droplet and the leaf surface. This area is thus just as crucial for uptake as the formulation of the spray liquid, the leaf composition, and the leaf mass (Fernández und Brown 2013). However, in order to reach the cytosol or to be translocated via the phloem within the plant, the nutrient must first enter the apoplast.

The apoplast comprises those parts within the plant that are extracellular. Its counterpart, the symplast, is the intracellular continuum of all connected cytosols of mesophyll cells within a

leaf of a plant (Mimura 1999). According to Sattelmacher et al. (1998), the apoplast is formed by all components between the plasmalemma and the cuticle, i.e., the cell wall, middle lamella, xylem, and gas- and water-filled intercellular spaces. The apoplast has functions in the ion balance (Grignon und Sentenac 1991), element detoxification (Sattelmacher et al. 1998), and regulation of transient pH fluctuations (Geilfus und Mühling 2011; Mühling et al. 1995) in plants. Furthermore, the leaf apoplast is known to play a role as a diffusion barrier and in ion exchange (Fernández und Brown 2013). Ions present in the apoplast also influence the movement of ions between the apoplast and the symplast (Lee et al. 2012). However, little is known about the movement of ions within the apoplast. The uptake of nutrients into/from the apoplast and their interaction within the apoplast have not been examined in detail. The physico-chemical properties of the apoplast presumably influence the movement and uptake of foliar-applied nutrients into the symplast (Fernández und Brown 2013).

Foliar application can only be effective when the nutrient is absorbed, via the apoplast, into the symplast from where it can be utilized or translocated via the phloem into the growing parts of the plant, such as young leaves, fruits, or grain (Bukovac und Wittwer 1957). A distinction is made between highly mobile nutrients (e.g., N, P, K, or Mg) that can achieve a systematic effect in plants, conditionally mobile nutrients (e.g., Fe, Zn, B), and almost immobile nutrients (e.g., Ca, Mn;) that primarily achieve a local effect (Hawkesford et al. 2012; Fernández und Brown 2013). This means that the effectiveness of the treatment must be considered in relation to the effect to be expected. Therefore, even locally acting nutrients can have a great benefit for the development of plants and, especially, of fruits (Fernández und Brown 2013; Fernández et al. 2013). In addition, the developmental stage of the wetted plant organs plays a major role in nutrient translocation within a plant. For P, Koontz und Biddulph (1957) have shown, by means of radiolabeled P, that when applied to mature leaves of *Phaseolus vulgaris*, P is mostly translocated to the younger leaves and root, whereas immature leaves exhibit little to no translocation of foliar-applied P. This suggests that, depending on the stage of development, translocation of mobile P in the phloem occurs to the site of demand. The internal utilization of inorganic P within the plant requires its transport through membranes wherever symplastic connections are lost. Thus, membrane transport systems are also required for the distribution and remobilization of inorganic P in shoot tissues. A number of members of the *PHT1* family of plant phosphate transporters perform this role (Mudge et al. 2002; Smith et al. 2003).

Several studies have analyzed the effects of P foliar application, as reviewed by Noack et al. (2010). Aspects of optimal concentration, optimal timing, and yield increase have been investigated in various crops, especially soybean (*Glycine max.* L.) and wheat (*Triticum aestivum*). For example, Fernández et al. (2014b) and Peirce et al. (2014) have investigated the influence of the leaf surface and the P nutritional status on the uptake and translocation of P in wheat. However, in all previous studies, little work has been carried out on deficient plants, and no subdivisions have been made between the movements of foliar-applied P into the apoplast and symplast. Thus, the aim of this study has been to determine the apoplastic uptake and movement of foliar-applied P into the apoplast and symplast over a fixed period of time in P deficient maize plants and to compare these data with the re-supply of P via the roots. We have also investigated the effect of the re-application of P via the leaf on other nutrients and chemical compounds. Such an approach should provide further information about the uptake, distribution, translocation, and effect of P within leaf tissue and about the impact of the apoplast on the uptake of foliar-applied P into the mesophyll cells of intact leaves.

## 2 Material and methods

### 2.1 Experimental set-up

Experiments were carried out in the greenhouse at the experimental station of the Institute of Plant Nutrition and Soil Science, Kiel University (54°20' 50''N, 10°6' 55''E). Maize (cv. Keops, KWS SAAT SE & Co. KGaA, Einbeck, Germany) was grown under a 14 h photoperiod (light intensities: 200-550  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in nutrient solution, and the temperature was set at  $23 \pm 2/15^\circ\text{C}$  (day/night). The temperature and humidity were regulated by automatic air exchange. Seeds were germinated in vermiculite/perlite (2:1) for 6 days. Uniform maize seedlings were transferred into 10 L plastic vessels. Initially, the concentration of the nutrient solution was 25%, but this was gradually increased to 100% within a week. The 100% nutrient solution (pH 5.9) had the following composition: 1.3 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.7 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1.0 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 2.0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 200  $\mu\text{M}$  Fe-EDTA, 5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$ , 0.5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0.3  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , and 0.01  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7$ . The solution was changed weekly to avoid nutrient depletion, and at the same time, the vessels were newly randomized. The  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  concentration was adjusted depending on the treatment.

P uptake via foliar application compared with re-supply via the roots was to be determined in P-deficient plants over time. Four treatments with 12 biological replicates were cultivated under normal P conditions (0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) to ensure proper seedling development within the first 7 days after seedling transference (Tab. 1). Afterwards, in order to induce P deficiency symptoms, the P concentration in the nutrient solution was lowered to 0.01 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in all treatments, except for the positive control. After two weeks under nutrient deficiency, re-supply occurred via the roots by increasing the  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  concentration back to 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  or via foliar application as described in section 2.2. To assess P uptake over time, four biological replicates of each treatment were harvested at three time points, namely at 6, 24, and 48 h, after P re-supply. To gain further insight into P uptake, subcellular parameters were determined in addition to the total P concentration in dry matter. The total P concentration was determined separately in the 4<sup>th</sup> leaf, the older shoot (all leaves below the 4<sup>th</sup> leaf plus stem), the younger shoot (all leaves above the 5<sup>th</sup> leaf), and the root. The 5<sup>th</sup> leaf was used to obtain the apoplastic washing fluid (AWF) and the cell sap (Tab. 1). In addition, the plants were cut off below the 4<sup>th</sup> leaf for collection of the vascular bundle sap. The first exudate was discarded to avoid contamination from cut cells. Vascular bundle sap was kept on ice during collection and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until purification. The response of the plants to a P foliar application was examined in a broader perspective by measuring other nutrients or organic acids. To obtain an overview of the activity of various transporters with respect to P uptake via the leaf, the abundance of certain transcripts was analyzed in fresh plant material after 6 h. A second batch of plants was grown under identical conditions. The youngest fully expanded leaf (YFEL), one growing leaf, and the roots were harvested. Fresh plant materials were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . For RNA analysis, leaves and roots were ground in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

## 2.2 Foliar application

The unique foliar application occurred in the early morning hours between 5.30 am and 6.30 am to avoid leaf burn by high irradiation and to take advantage of the higher air humidity. The foliar application solution (pH 4.5) contained 200 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 0.1% (v/w) Silwet® Gold as a wetting agent to increase its spreading and penetrating properties. Applications were conducted using a calibrated hand-held spray bottle. The plants were wetted from underneath and from above with 15 mL ( $93 \text{ mg P pot}^{-1}$ ) foliar application solution. To prevent contamination of the nutrient solution, the plant stems were wrapped with paper, and the

vessel lids were covered with foil. The negative control was grown under deficient conditions, whereas the foliar application group received no further P supply via the roots.

**Table 1:** Schematic view of experimental setup with four distinct P treatments and 12 biological replicates. Four biological replicates for each harvest date at 6, 24, and 48 hours after foliar application. Three maize plants were harvested and divided into 5<sup>th</sup> leaf (infiltration/centrifugation method) and 4<sup>th</sup> leaf, older and younger shoot, and root (total P).

	Treatment (12 biological replicates)							
	Pos. C		Neg. C		Root		FA <sub>200</sub>	
Week 1	+		+		+		+	
Week 2/3	+		-		-		-	
Week 4	+		-		+		FA	
	↙ ↘		↙ ↘		↙ ↘		↙ ↘	
	Total [P]	Sub-cellular	Total [P]	Sub-cellular	Total [P]	Sub-cellular	Total [P]	Sub-cellular
<b>Harvest: 6, 24 and 48h after P re-supply</b>	4 <sup>th</sup> leaf; older -; younger shoot; root	5 <sup>th</sup> leaf	4 <sup>th</sup> leaf; older -; younger shoot; root	5 <sup>th</sup> leaf	4 <sup>th</sup> leaf; older -; younger shoot; root	5 <sup>th</sup> leaf	4 <sup>th</sup> leaf; older -; younger shoot; root	5 <sup>th</sup> leaf

<sup>a</sup>pos. C (positive control); neg. C (negative control); Root (re-supply via root); FA<sub>200</sub> (foliar application with 200 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); + (0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> via roots); - (0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> via roots); FA (200 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> via leaf)

### 2.3 Sampling and analysis of subcellular fluids

The method for extraction of AWF was used as described by Görlach und Mühling (2021). Briefly, 5<sup>th</sup> leaves were cut and carefully washed three times in deionized water. Leaf segments of 15 cm<sup>2</sup> were placed in a desiccator, and a vacuum was then generated for 5 min. For the recovery of AWF, the leaf segments were transferred into 20 mL syringes with open tips and placed into Sarstedt™ tubes (Sarstedt™ Tube, 50 mL). Subsequently, the tubes were centrifuged at 1500 rpm for 10 min at 4°C (Heraeus Multifuge X3R Zentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The supernatant was transferred and stored at -80°C until further used. For cell sap collection, leaf segments were removed from the syringes and frozen in liquid nitrogen. They were thawed, centrifuged, and stored at -80°C until purification (see above). AWF samples were diluted at a ratio of 1:10, chloroform was added, and the solution was vortexed and centrifuged (12000 rpm, 5 min, 4°C). Cell sap samples were mixed at a ratio of 1:1 with an ice-cold methanol/chloroform mixture (1:1, v/v), vortexed, and shaken for



60 min at 4°C. Afterwards, 2 mL deionized water was added, and the sample was again vortexed and shaken (60 min, 4°C). Finally, the mixture was centrifuged for 10 min at 4500 rpm and 4°C. The removed aqueous phases were then passed over strata C18-columns (JTB-7020-01) for further purification. The ion concentration in the AWF was determined by isocratic ion chromatography (Dionex™ IC-5000 Capillary Reagent-Free IC System, Thermo Scientific) and was multiplied by 3, and the dilution factor ( $= (V_{\text{water}} + V_{\text{gas}}) / V_{\text{water}}$ ) of the maize plants was determined as given by Lohaus et al. (2001).

#### 2.4 Sampling and analysis of plant tissue

For total P concentration, the fresh weight of the various plant parts (depending on the experiment) was first determined. To avoid the presence of foliar fertilizer residues, all plant parts were washed three times in deionized water. Oven-dried plants (65°C) were weighed and then milled to a fine powder (Cyclotec 1093, Foss Tecator, Höganäs, Sweden). For the determination of minerals with inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS; Agilent Technologies 7700 Series, Böblingen, Germany), 200 mg of each replicate was digested with 10 mL of 69% HNO<sub>3</sub> (ROTIPURAN Supra for ICP, 69%) for 45 min in a 1800 W microwave oven (MARS 6, Xpress, CEM, Matthews, MC, USA) according to the method described by Jezek et al. (2015).

Free inorganic anions and organic acids were extracted in hot water. Oven-dried milled fine powder (20 mg) was dissolved and boiled for 5 min in 1 mL deionized water, mixed thoroughly by vortexing, and immediately placed on ice for 30 min. An aliquot of 0.150 mL supernatant was collected and diluted with 1.350 mL deionized water, followed by the addition of 0.200 µL chloroform. Subsequently, the samples were vortexed and centrifuged once again. The supernatant was collected and cleaned by being passed through strata C18-columns. Afterwards, both the anions and organic acids were determined by isocratic ion chromatography (Dionex™ IC-5000 Capillary Reagent-Free IC System, Thermo Scientific).

#### 2.5 RNA isolation and RT-qPCR analysis

For analysis of the mRNA transcript level of certain phosphate transporters (*Zm PHT1;1*, *Zm PHT1;2*, *Zm PHT12*), the total coding RNA of leaves and root were extracted by using TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The concentration and purity of RNA were determined by a NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life Science), and the integrity was checked by gel electrophoresis. Total isolated coding RNA (1 µg) was

reverse-transcribed following the manufacturer's instructions (Verso cDNA synthesis kit, Thermo Fisher Scientific, USA), including DNase I treatment. The quality of the synthesized cDNA (1:10 dilution) was examined by standard PCR with the most stable reference gene ubiquitin-conjugating enzyme (Zm UBC) (Geilfus et al. 2011; da Silva et al. 2019). Quantitative RT-PCR was performed by the PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems) with the primers shown in Table S1 on a CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany). Each reaction (20 µl) contained 200 nM of each primer, 2 µl diluted cDNA templates, and other reaction components. After an initial denaturation step (95°C for 5 min), RT-qPCR was carried out over 40 cycles (95°C for 15 s, 60°C for 30 s, 72°C for 30 s), followed by a melting curve stage (95°C for 15 s, 60°C for 1 min, 95°C for 15 s, 24°C for 15 s). Three biological replicates and three technical replicates were used for each treatment. The transcript levels of the genes were normalized with the endogenous control (Zm UBC), and the expression changes of target mRNAs were determined by using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method (Livak und Schmittgen 2001).

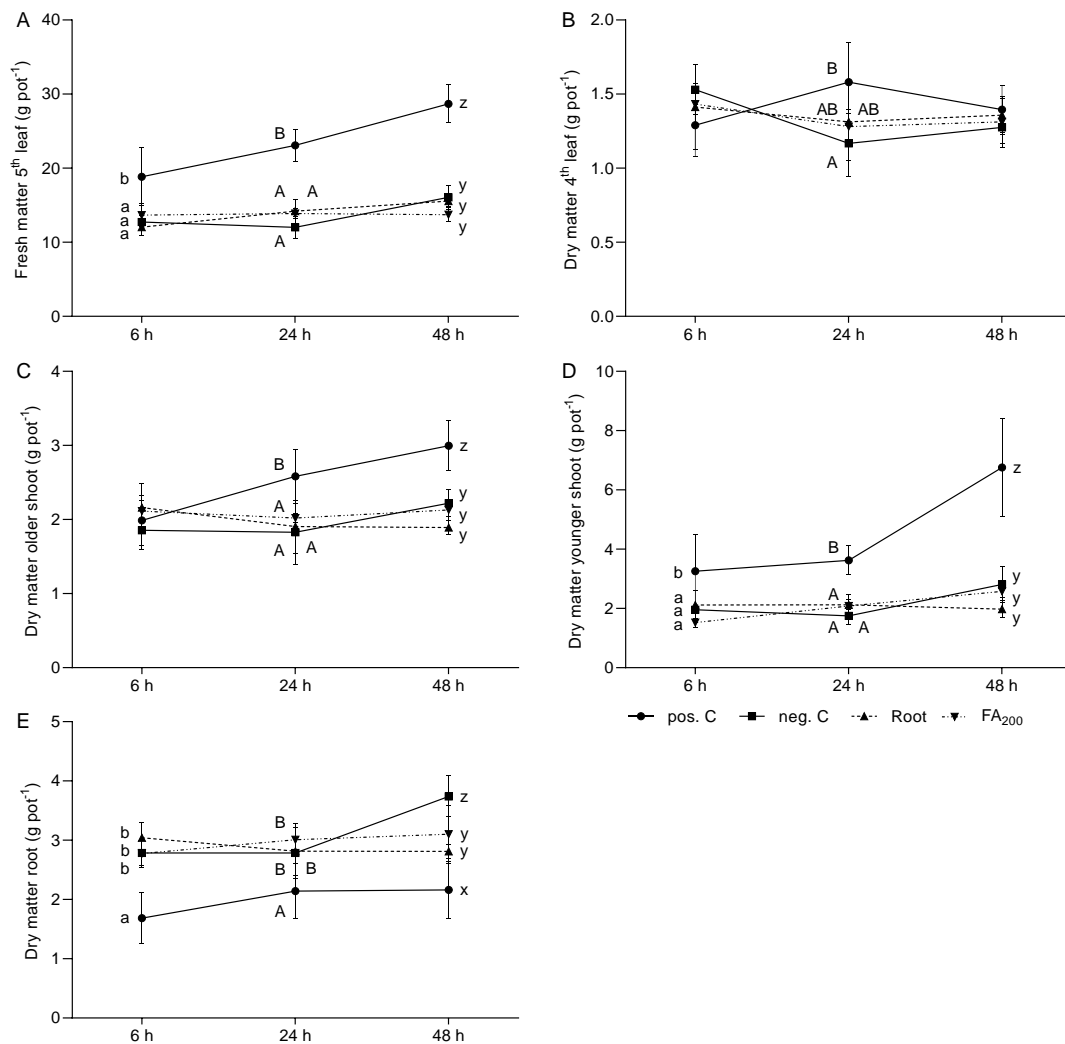
## 2.6 Statistical analysis

Data were statistically analyzed using SPSS software (version 17.0) and GraphPad Prism 8. The analysis was based on four biological replicates per treatment. The effects of treatments were tested using one-way ANOVA according to Duncan's (homogeneity of variance) or Games-Howell (heterogeneity of variance) multiple range tests at  $p \leq 5\%$ . Significance of the correlations was tested using a two-tailed Pearson's correlation on GraphPad Prism 8 at  $p \leq 5\%$ . Significant differences are indicated by different letters.

## 3 Results

### 3.1 Plant growth

Examination of growth parameters showed a significant increase in dry matter of the positive control compared with the deficient groups over the course of the harvest period (48 h) (Fig. 1). Furthermore, no significant difference was seen in dry matter between the negative control and the groups with P re-supply in all investigated plant regions, except after 48 h in the roots (Fig. 1E). This was also observed in the fresh weight of the 5<sup>th</sup> leaf (Fig. 1E), whereas the fully developed 4<sup>th</sup> leaf showed no major differences between the variants (Fig. 1A). In contrast, the deficiency groups exhibited enhanced root growth that was significantly different from the positive control (Fig. 1E).

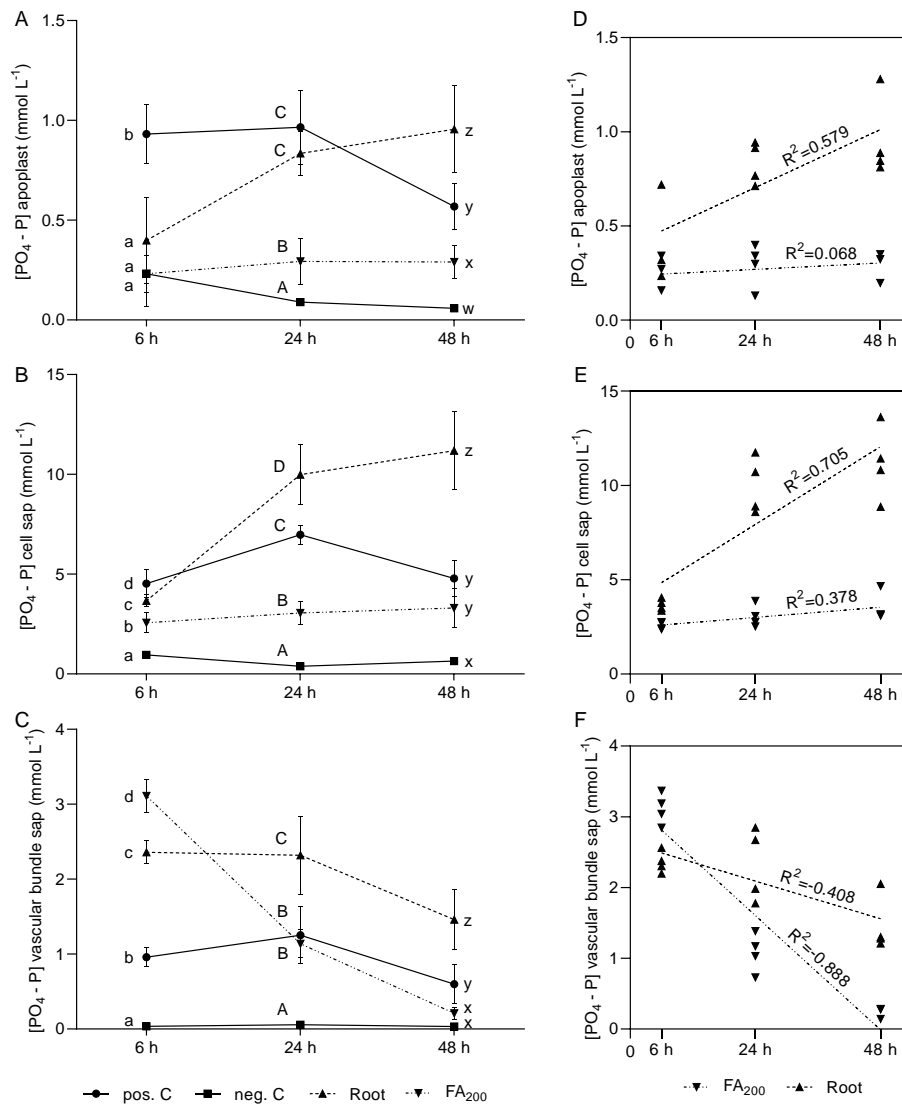


**Figure 1:** Fresh matter in gram pot<sup>-1</sup> of (A) 5<sup>th</sup> leaf, and dry matter in gram pot<sup>-1</sup> of (B) 4<sup>th</sup> leaf, (C) older shoot, (D) younger shoot, and (E) root at harvest 6, 24, and 48 hours after foliar application. Pos. C (positive Control), 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (potassium dihydrogen phosphate) in nutrient solution (NS); neg. C (negative control), 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 1 week and 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for the following weeks; root (resupply via roots), 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 1 week, 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 2 weeks, and 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as re-supply in week 4; FA<sub>200</sub> (foliar application), 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 1 week, 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 2 weeks, and 0.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 200 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as re-supply in week 4. Bars represent means + standard deviation ( $n = 4$ ). Letters indicate significant differences between treatments (ANOVA with Duncan test,  $p \leq 0.05$ ).

### 3.2 Subcellular phosphate-P concentration

The analysis of the subcellular phosphate-P concentrations [ $\text{PO}_4\text{-P}$ ] showed the lowest values in the AWF and the highest values in the cell sap (Fig. 2A, B). In the apoplast, the main differences between all treatments became apparent after 24 h and remained until the third harvest. The positive control group and those plants receiving re-supply via their roots revealed the significantly highest  $\text{PO}_4\text{-P}$  concentration in the apoplast. Significant differences between the negative control and the foliar application group were measured after 24 h and 48 h. Correlation analysis between harvest dates and the  $\text{PO}_4\text{-P}$  concentration in the AWF revealed a determination coefficient of 58% for re-supply via the root, whereas no correlation could be determined in the foliar application group (Fig. 2D). Almost the same correlations could be observed for the cell sap (Fig. 2E). Compared with the concentration in the AWF, all treatments differed significantly in the cell sap after 6 h (Fig. 2B). Foliar application and re-supply via the root showed the third and second highest concentration at 2.6 and 3.7 mmol  $\text{PO}_4\text{-P L}^{-1}$ , respectively. At 0.95 mmol  $\text{PO}_4\text{-P L}^{-1}$ , the concentration in the negative control was 1.8 times lower than the concentration in the group with re-supply via leaf. This ratio could also be determined after 24 h and 48 h, as the values for both treatments remained relatively stable. After 48 h, no significant difference between the positive control and foliar application group could be measured, whereas a re-supply via the root revealed the significantly highest concentrations as early as 24 h. An almost reverse picture for the groups with re-supply was obtained from the vascular bundle sap analysis (Fig. 2C). Re-supply via the leaf achieved the significantly highest concentration after the first 6 h (3.1 mmol  $\text{PO}_4\text{-P L}^{-1}$ ), but this level markedly decreased during the following 42 h (0.2 mmol  $\text{PO}_4\text{-P L}^{-1}$ ) to almost that of the negative control (0.03 mmol  $\text{PO}_4\text{-P L}^{-1}$ ).

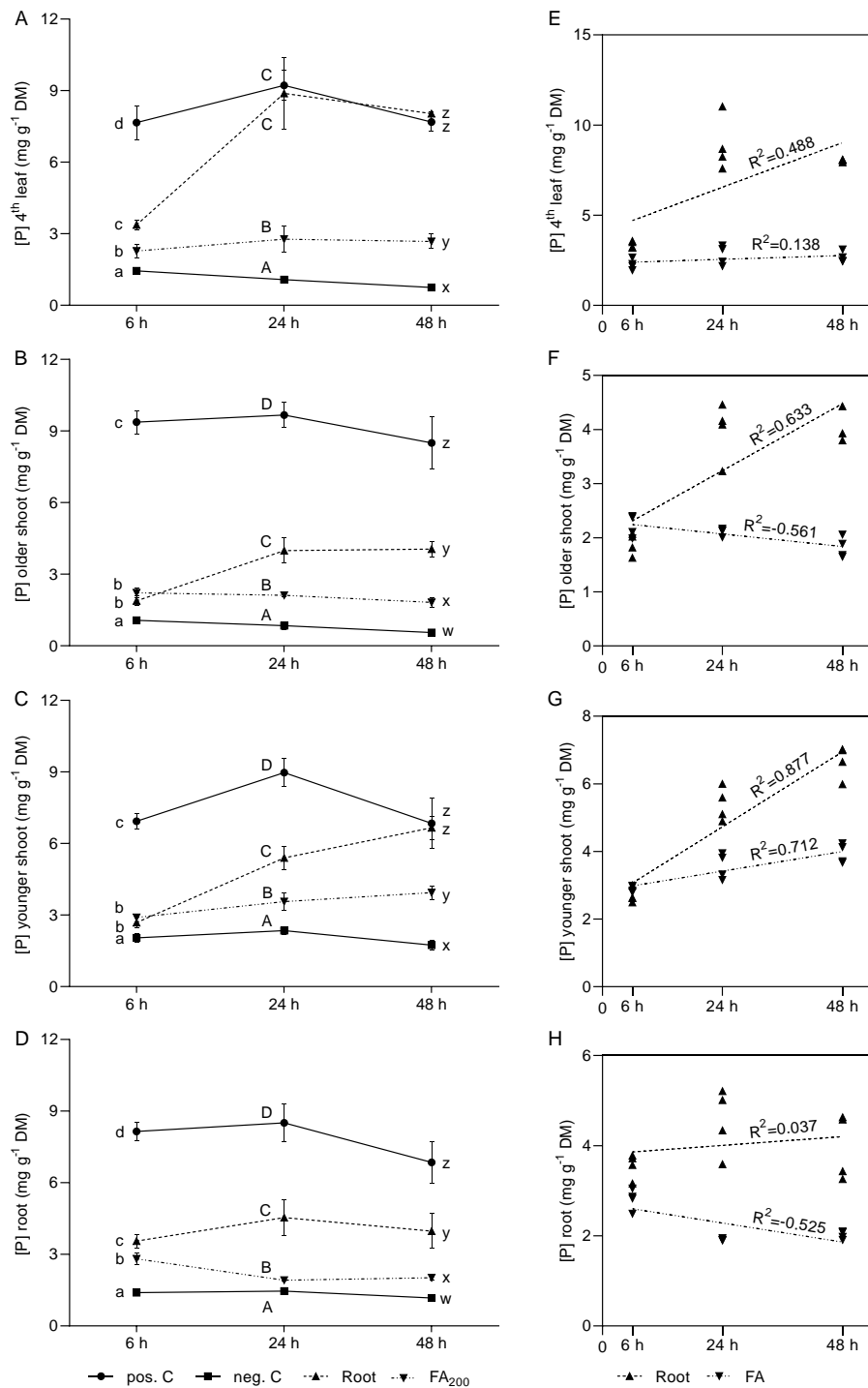
A highly significant negative correlation was detected by correlating vascular bundle sap concentration with the time after re-supply ( $R^2 = -0,888$ , Fig. 2F). This correlation gave a determination coefficient of nearly 38% for the group with root re-supply. The concentrations here did not rise to the level of foliar application after 6 h but remained stable over 24 h ( $\sim 2.3$  mmol  $\text{PO}_4\text{-P L}^{-1}$ ) and slowly declined after 24 h, while nevertheless exhibiting the significantly highest values from the timepoint after 6 h. The values for both control treatments remained relatively stable, although the concentrations for the negative control at  $\sim 0.04$  mmol  $\text{PO}_4\text{-P L}^{-1}$  were below the concentrations of the other treatments (Fig. 2C).



**Figure 2:** Concentration of phosphate-phosphorus  $[PO_4-P]$  in  $mmol L^{-1}$  of (A) apoplast, (B) cell sap, and (C) vascular bundle sap at 6, 24, and 48 hours after foliar application. Pos. C (positive Control), 0.2 mM  $KH_2PO_4$  (potassium dihydrogen phosphate) in nutrient solution (NS); neg. C (negative control), 0.2 mM  $KH_2PO_4$  in NS for 1 week and 0.01 mM  $KH_2PO_4$  in NS for the following weeks; root (resupply via roots), 0.2 mM  $KH_2PO_4$  in NS for 1 week, 0.01 mM  $KH_2PO_4$  in NS for 2 weeks, and 0.2 mM  $KH_2PO_4$  as re-supply in week 4; FA<sub>200</sub> (foliar application), 0.2 mM  $KH_2PO_4$  in NS for 1 week, 0.01 mM  $KH_2PO_4$  in NS for 2 weeks, and 0.0 mM  $KH_2PO_4$  + 200 mM  $KH_2PO_4$  as re-supply in week 4. (D) Apoplast, (E) symplast, and (F) vascular bundle sap showing correlations for the treatments Root and FA<sub>200</sub> between  $[PO_4-P]$  and time. Bars represent means +standard deviation ( $n = 4$ ). Letters indicate significant differences between treatments (ANOVA with Duncan or Games Howell test,  $p \leq 0.05$ ).

### 3.3 Phosphorus concentration after P re-supply

P foliar application significantly increased the P concentration [P] in all parts of the plant compared with the negative control over time by a factor of up to 2 (Fig. 3). In the younger shoot, the group receiving foliar application exhibited an increasing trend, as was indicated by the correlation of P concentration with time after re-supply, with a determination coefficient of nearly 71% (Fig. 3C). However, in the 4<sup>th</sup> leaf, the P concentration remained stable ( $R^2 = 0.14$ ; Fig. 3E), and negative correlations were determined for the older shoot and the root ( $R^2 = -0.56$ ;  $-0.53$ ; Fig. 3F, H). At 3.9 mg P g<sup>-1</sup> DM, the highest P concentration in the group re-supplied via the leaf was measured after 48 h in the younger shoot. Compared with the negative control, this represented an increase of 130% (1.7 mg P g<sup>-1</sup> DM). The concentration in the group re-supplied via the root was 6.7 mg P g<sup>-1</sup> DM and, for the positive control, 7.0 mg P g<sup>-1</sup> DM. In the roots, the P concentration increased by 100% (6 h) and 43% (48 h) after foliar application compared with the negative control. The group re-supplied via the root revealed no significant differences from that re-supplied via leaf in most cases after 6 h. However, after 24 h, the difference between foliar application and re-supply via the roots became significantly evident. The P concentration in the group with root re-supply approached the level of the positive control in the 4<sup>th</sup> leaf and the younger shoot (Fig. 3A, C). Compared with foliar re-supply, the P concentration in the groups with P re-supply via root remained stable in the roots ( $R^2 = 0.04$ ; Fig. 3D, H), but a major increase was observed in the younger shoot over time ( $R^2 = 0.88$ ; Fig. 3G). Overall, the positive control showed the highest P concentration and the negative control the lowest. In addition, the concentrations in the control groups exhibited a decreasing trend over time.

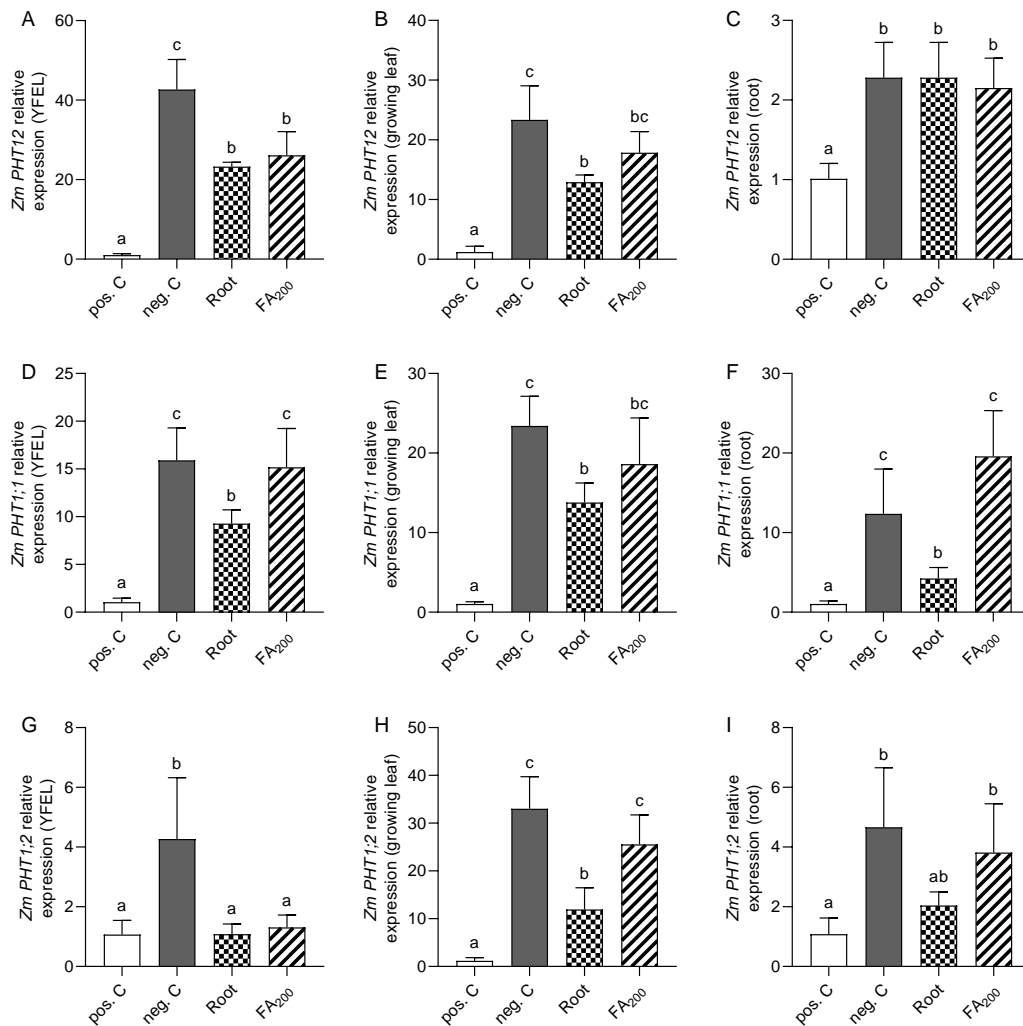


**Figure 3:** Total phosphorus concentration [P] in mg g<sup>-1</sup> DM and correlations between total phosphorus concentration [P] and time of harvest for Root and FA<sub>200</sub> treatments at 6, 24, and 48 hours after foliar application. (A, E) 4<sup>th</sup> Leaf, (B, F) older shoot (stem and leaves below 4<sup>th</sup> leaf), (C, G) younger shoot (leaves above 5<sup>th</sup> leaf), and (D, H) root. Pos. C (positive Control), 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (potassium dihydrogen phosphate) in nutrient solution (NS); neg. C (negative control), 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 1 week and 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for the following weeks; root (resupply via roots), 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 1 week, 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 2 weeks, and 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as re-supply in week 4; FA<sub>200</sub> (foliar application), 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 1 week, 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 2 weeks, and 0.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 200 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as re-supply in week 4. Bars represent means +standard deviation (*n* = 4). Letters indicate significant differences between treatments (ANOVA with Duncan or Games Howell test, *p* ≤ 0.05).

### 3.4 Relative transcript abundance of *PHT1* transporter genes

Under P deficiency, the expression of the three studied transporters in the *Zm PHT1* family were significantly increased compared with the positive control with sufficient P supply (Fig. 4). The mRNA expression of plasma membrane transporter *Zm PHT12* was significantly increased for the negative control and in the groups with re-supply via root and leaf. In the youngest fully developed leaf (YFEL), the groups with P re-supply showed a significant decrease in mRNA expression compared with the negative control. Similar results were measured in the growing leaf, but no significant difference was seen between the negative control and the group with P re-supply via the leaf. In the roots, no difference in mRNA expression was detected between the three P-deficient groups (Fig. 4A-C). In the growing leaf, mRNA expression of *Zm PHT1;1* showed the same pattern as that for *Zm PHT12* (Fig. 4E). In the YFEL and the roots, mRNA expression of *Zm PHT1;1* in the group with P re-supply via the leaf was at the same level as that of the negative control, whereas in the treatment with re-supply via the root, the expression was significantly reduced (Fig. 4D, F). Compared with the other two transporters, the differences were less pronounced for *Zm PHT1;2*. Although the highest mRNA expression was measured in the growing leaf for the negative control and the plants re-supplied via the leaf, this level was similar to those of the other transporters (Fig. 4H). However, in the YFEL, no difference was detected between the groups with P re-supply and the positive control (Fig. 4G). Moreover, mRNA expression of the *Zm PHT1;2* transporter was not significantly increased in the roots re-supplied with P compared with roots in the positive control (Fig. 4I). In contrast, no significant difference could be measured between the root re-supply treatment and the other two treatments, both of were significantly different from the positive control.



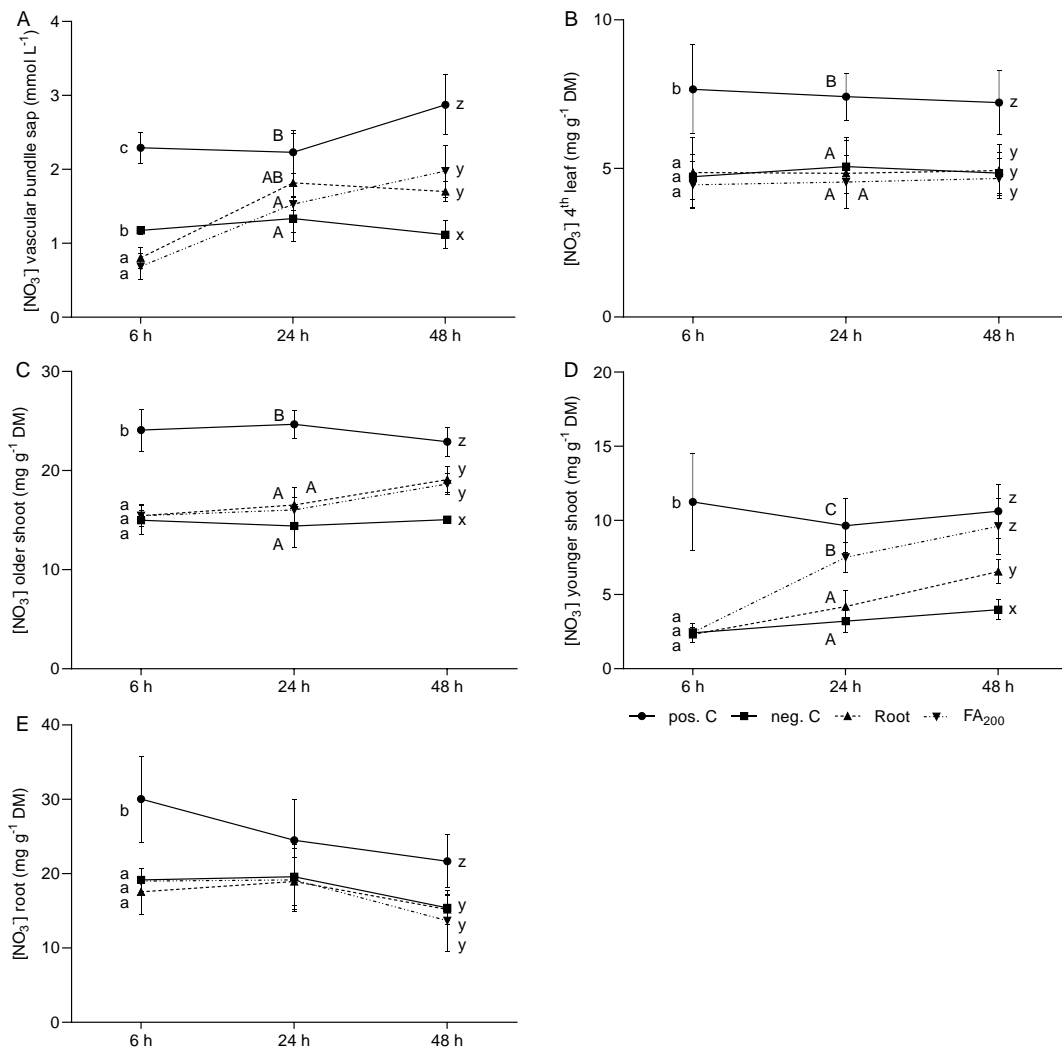


**Figure 4:** Relative expression of (A-C) *Zm PHT12*, (D-F) *Zm PHT1;1*, and (G-I) *Zm PHT1;2* genes in the youngest fully expanded leaf, a growing leaf, and the roots. Pos. C (positive Control), 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (potassium dihydrogen phosphate) in nutrient solution (NS); neg. C (negative control), 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 1 week and 0.01 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS for the following weeks; root (resupply via roots), 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 1 week, 0.01 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 2 weeks, and 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as re-supply in week 4; FA<sub>200</sub> (foliar application), 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 1 week, 0.01 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 2 weeks, and 0.0 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 200 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as re-supply in week 4. Bars represent means + standard deviation ( $n = 3$ ). Small letters indicate significant differences between treatments (ANOVA with Duncan or Games Howell test,  $p \leq 0.05$ ).

### 3.5 Nitrate and organic acids concentration after P-resupply

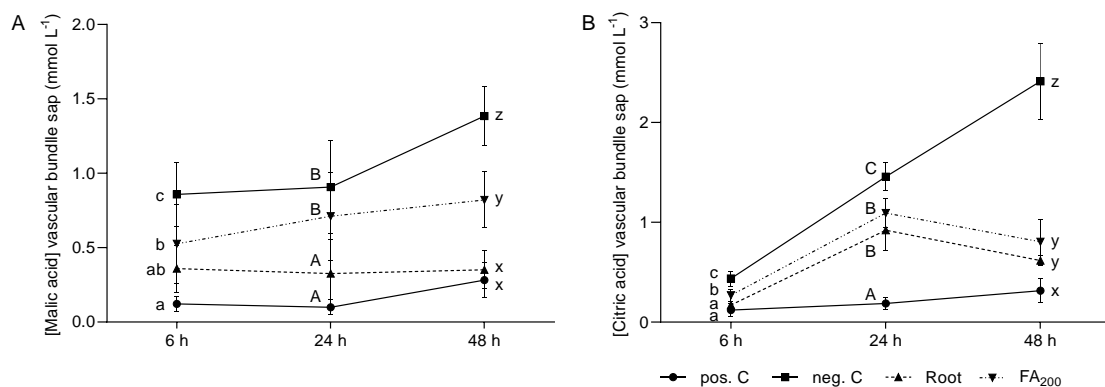
Regardless of the type of P re-supply, the nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) concentration increased significantly in contrast to that of the negative control after 48 h in the older shoot (~13%) and the vascular bundle sap (~65%) (Fig. 5A, C). This was also evident in the younger shoot. However, the group re-supplied via the root showed a significantly stronger increase than the group with foliar application and was at a similar level to that of the positive control after 48 h (Fig. 5D). In the 4<sup>th</sup> leaf and the roots, no effect on  $\text{NO}_3^-$  concentration could be measured as a result of P re-

supply. The concentrations in the groups with P deficiency were significantly lower than those in the positive control (Fig. 5B, E).



**Figure 5:** Nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) concentration in mmol L<sup>-1</sup> of (A) the vascular bundle sap and in mg g<sup>-1</sup> DM of (B) 4<sup>th</sup> leaf, (C) older shoot (stem and leaves below 4<sup>th</sup> leaf), (D) younger shoot (leaves above 5<sup>th</sup> leaf), and (E) root at 6, 24, and 48 hours after foliar application. Pos. C (positive Control), 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (potassium dihydrogen phosphate) in nutrient solution (NS); neg. C (negative control), 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 1 week and 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for the following weeks; root (resupply via roots), 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 1 week, 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 2 weeks, and 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as re-supply in week 4; FA<sub>200</sub> (foliar application), 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 1 week, 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in NS for 2 weeks, and 0.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 200 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as re-supply in week 4. Bars represent means + standard deviation (*n* = 4). Letters indicate significant differences between treatments (ANOVA with Duncan or Games Howell test, *p* ≤ 0.05).

The concentration of malic acid in the vascular bundle sap was significantly highest in the negative control (Fig. 6A). The largest differences were measured after 48 h. For the group with P foliar fertilization, the concentration was 40% lower and, for the group re-supplied via the roots, was even 74% lower. The lowest concentration was measured in the positive control. Similar results were found for the concentrations of citric acid in the vascular bundle sap (Fig. 6B). The concentrations were significantly reduced in the groups with P re-supply. The significantly lowest concentrations were measured in the positive control.



**Figure 6:** Concentration of (A) malic acid and (B) citric acid in  $\text{mmol L}^{-1}$  of vascular bundle sap at 6, 24, and 48 hours after foliar application. Pos. C (positive Control), 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (potassium dihydrogen phosphate) in nutrient solution (NS); neg. C (negative control), 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 1 week and 0.01 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS for the following weeks; root (resupply via roots), 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 1 week, 0.01 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 2 weeks, and 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as re-supply in week 4; FA<sub>200</sub> (foliar application), 0.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 1 week, 0.01 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in NS for 2 weeks, and 0.0 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 200 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as re-supply in week 4. Bars represent means + standard deviation ( $n = 4$ ). Letters indicate significant differences between treatments (ANOVA with Duncan or Games Howell test,  $p \leq 0.05$ ).

## 4 Discussion

In this study, the uptake of foliar-applied P in maize under P deficiency was determined subcellularly in order to gain new insights into nutrient movement within leaf tissue. The dry matter results showed that a deficiency of P led to a significant reduction of plant growth (Fig. 1), thus demonstrating the importance of an adequate supply of this essential macronutrient to the plant. No difference was measurable in the dry matter of the 5<sup>th</sup> leaf, probably because of the sufficient P supply of all treatments in the first week. However, the other plant compartments exhibited P deficiency conditions from the second week onwards; this considerably restricted growth, in particular the growth and expansion of the leaves (Fig. 1D), as shown in previous studies (Plénet et al. 2000; Assuero et al. 2004). At the same

time, the plants of the deficiency groups showed increased root growth under P deficiency (Fig. 1E), leading to a typical decrease in the shoot/root ratio (Hawkesford et al. 2012). First adaptations to the addition of P were visible in the dry mass of the roots, which did not increase compared with that in the negative control. Here, foliar fertilization was no less effective than root fertilization (Fig. 1E).

#### 4.1 Effect of foliar-applied P on the $\text{PO}_4\text{-P}$ concentration of various subcellular compartments

In most studies regarding P foliar application, the P concentration of the whole tissue is measured, and no difference is made between the intracellular and the apoplastic space. In the present study, we have measured the apoplastic and the intracellular  $\text{PO}_4\text{-P}$  concentrations separately in relation to P foliar application. Our results demonstrate that foliar application leads to significantly increased  $\text{PO}_4\text{-P}$  concentrations in all three compartments, i.e., the apoplast, cell sap, and vascular bundle sap (Fig. 2). By comparing the concentrations of  $\text{PO}_4\text{-P}$  in the apoplast and cell sap, even an increase in uptake into the epidermal and mesophyll cells becomes apparent. In comparison with the control treatments (~6:1), the  $\text{PO}_4\text{-P}$  concentration ratio is approximately 11:1, which can be attributed to the maintenance of a stable inorganic P concentration in the cytoplasm for enzyme reactions (Schachtman et al. 1998). In addition, Mimura et al. (1990) have shown higher uptake rates of P in isolated protoplasts of P-deficient leaves. This is attributable to the upregulation of transporters. Independently of this, the P concentrations in the apoplast and cell sap change in parallel (Fig. 2), as also shown by Mimura et al. (1996), presumably because of the P homeostasis achieved via membrane transport between the various inter- and intracellular pools, i.e., between the cytoplasm, vacuole, apoplast, and nucleus (Schachtman et al. 1998). Moreover, these results are in agreement with those obtained by Mimura et al. (1990; 1992; 1996), who have worked on phosphate transport across membranes, phosphate retranslocation, and inorganic phosphate homeostasis in the leaves of barley with a P root supply. The increasing concentrations are confirmed by the determination of the increased P concentration in the 4<sup>th</sup> leaf as a result of foliar application (Fig. 3A).

Furthermore, the results show no temporarily high accumulation of foliar-applied P in the apoplast. Thus, we can conclude that foliar-applied P, which has penetrated the leaf, is almost completely absorbed into the epidermal and mesophyll cells (Fig. 2) and that the response of the plant is rapid. The absence of accumulation in the apoplast might be attributable not only

to homeostasis, but also to the structure of the apoplast and the upregulation of P transporters. The apoplast is composed of the water-free space, which is freely accessible to ions and charged and uncharged molecules, and the Donnan free space, in which cation exchange and anion repulsion take place. Because of the high proportion of carboxyl groups ( $R-COO^-$ ) in the cell walls, the apoplast acts as a cation exchanger, whereas anions are repelled (White 2012). In addition, Schachtman et al. (1998) report that P starvation leads to an increased expression of transporters of the plasma membrane gene family. In our study, the gene expression of three *Zm PHT1* family  $P_i/H^+$  co-transporters have been found to be highly affected under P deficiency in the youngest fully expanded leaf, a growing leaf, and the roots in comparison with those of the positive control (Fig. 5). For *Zm PHT12* and *ZmPHT1;2*, this result is in agreement with those of Nagy et al. (2006) and Liu et al. (2016), whereas for *ZmPHT1;1*, Nagy et al. (2006) have also detected increased relative expression, whereas Liu et al. (2016) report no higher relative expression in the roots. The rate of phosphate transport across plasma membranes is determined in part by the number of transporters in the membranes. This number is related to the rates of transcription of the genes encoding the transporters, the rates of mRNA decay, and the rates of protein turnover (Smith et al. 2003). Physiological measurements have shown that plants rapidly increase their capacity for phosphate uptake under phosphate deprivation (Clarkson and Scattergood 1982). Thus, the higher abundance of these plasma membrane transporters confirms the rapid uptake of both foliar-applied and root-applied P after two weeks of P deficiency. As described by Plaxton and Tran (2011), members of the *Zm PHT1* family exhibits a certain degree of tissue-specific expression, which may explain the differences in the relative expression of mRNA in the various plant regions (Fig. 5). In addition, regardless of the transporters, a decrease in relative expression has been detected mainly in those plants re-supplied via the roots. In plants re-supplied via the leaf, we have found a lower relative expression mainly in the youngest fully expanded leaf, even less expression in the growing leaves, and none at all in the roots (Fig. 5). This implies the increased P concentrations exert some form of feedback regulation in the plant.

Our results suggest that a short-term high P foliate supply leads to uptake into the cytoplasm or to temporary storage in the vacuole, which occupies more than 80% of the cell volume and acts as a kind of main buffer (Mimura et al. 1990; Schachtman et al. 1998). Moreover, Morcuende et al. (2007) have demonstrated, in *Arabidopsis* seedlings, that, as a result of P re-

supply, rapid (<3 h) upregulation of the cellular molecular machinery occurs to promote growth and to optimize metabolic pathways for energy production, followed rapidly by cell division and lipid and protein biosynthesis. This finding is contrary to that of Fernández et al. (2014b) who have found that P deficient wheat plants fail to absorb foliar-applied P, and that, with increasing plant P status, the absorption increases. The authors suspect that this effect is attributable to the additionally discovered change in the surface structure of the leaf and the decrease in the number of stomata and trichomes. Our results have established that foliar-applied P can indeed penetrate P-deficient maize leaves and is taken up by the plant into the cells.

#### 4.2 Rapid translocation of foliar-applied P within the plant to sites of demand

We have obtained another important finding by measuring the  $\text{PO}_4\text{-P}$  concentration in the vascular bundle sap (Fig. 2C). In general, the groups resupplied with P exhibit the highest  $\text{PO}_4\text{-P}$  concentrations, but the significantly highest  $\text{PO}_4\text{-P}$  concentration over the entire measuring period after 6 h is conspicuous in the foliar application group. This confirms the rapid uptake of P into the cell and the translocation of foliar-applied P to the point of demand. Our results from the subcellular measurements are also confirmed by the determination of the P concentration in the individual plant compartments (Fig. 3). Translocation of the foliar-applied P occurs mainly within the first 24 h and is very low after 48 h, as illustrated by the negative correlation between  $\text{PO}_4\text{-P}$  concentration and time (Fig. 2C, F). Here, translocation of P occurs within the first 6 h into both the younger shoots and the roots (Fig. 3C, D). Whereas translocation in the younger shoots increases steadily over time (Fig. 3C, 4C), it decreases again in the roots over the following 18 h but remains increased compared with the negative control (Fig. 3D, 4D). Furthermore, the differences in the P concentrations of the older and younger shoot indicate that the plant directs P to sinks, i.e., the growing parts (Fig. 3B, C); hence, the P concentrations in the younger shoots are higher than those in the older shoots under P deficiency, as described by Mimura (1995). This is also measurable in plants with re-supply via the roots (Fig. 3C). According to Luan et al. (2017), the decrease in P concentration in roots might be attributed to miRNAs serving as long-distance signals and traveling from shoots to roots to maintain inorganic P homeostasis at the whole-plant level, under low inorganic P conditions, through enhanced P uptake and translocation. According to Jeschke et al. (1997), a large proportion of re-translocated P via phloem to the roots is reloaded into the xylem and transported into the growing plant tissue in deficient plants. Our results reveal that

the onset of translocation within the plant is rapid, and that the foliar-applied P is not only effective at the site of application. Using high-resolution laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry elemental mapping, Arsic et al. (2020) have shown the rapid movement of applied ions from the leaf surface to the phloem within 24 h and a re-translocation of foliar-applied P into the growing leaves within 7 days. The authors conclude that foliar P only provides a temporary nutritional relief for the deficient leaves, since they decline back to a P-deficient status by days 6 and 7. This is, in particular, evident from the negative correlation of P concentration and time in the older shoot, the root, and the vascular bundle sap during the first 48 h (Fig. 2F, 4B, D). Furthermore, the increase in the younger shoot as a result of re-supply via the roots is significantly stronger than after foliar fertilization (Fig. 4C). The differences between re-supply via the leaf and root indicate that foliar application provides a positive effect but cannot keep pace with the consistency of root application under hydroponic conditions. However, three P foliar applications within 14 days result in a 70% biomass increase compared with a P deficient control (Görlach und Mühling 2021). Whereas Arsic et al. (2020) performed their first measurement after 24 h, we have shown that the uptake of foliar-applied P occurs mainly within the first 6 h, in agreement with Wittwer und Lundahl (1951). According to Neumann et al. (1981), the penetration of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  can persist for up to 72 h, despite the apparent drying of the applied droplets. However, foliar-applied P is presumably not completely translocated. This is evident from previous studies (Barrier und Loomis 1957; McBeath et al. 2020). In particular, the translocation of foliar-applied P from treated leaves to other parts of the plant is reduced in wheat when applied at early tillering compared with application at flag leaf emergence (Peirce et al. 2019).

#### 4.3 Foliar-applied P increases uptake of nitrate and decreases translocation of organic acids

An influence of P re-supply (mainly in the form of foliar application) on the uptake and translocation of other nutrients or chemical compounds within the first 48 h was only measurable for  $\text{NO}_3^-$  and organic acids (Fig. 5, 6). An increase in Mg concentration within the first 48 h could not be measured and seemed to become apparent only as a consequence of a longer growth phase (Görlach and Mühling 2021).

A reduced uptake and lower translocation of nitrate from the roots to the shoot under P deficiency was also detected by Jeschke et al. (1997), Neumann et al. (1999), and Gniazdowska und Rychter (2000) who postulated reduced  $\text{NO}_3^-$  reductase activity in the roots and a lower

sink requirement attributable to slower growing deficient plants or to increased proton extrusion. Our results show a rapid plant response within the first 48 h after P re-supply via the leaf or root, especially in the growing younger shoot (Fig. 5). Thus, the increase in the nitrate concentration occurs in parallel with the increase in the vascular bundle sap (Fig. 5A, C, D), possibly related to an increase in the ATP level, which also drops as a result of P deficiency (Gniazdowska und Rychter 2000). On the other hand, the re-supply of P probably induces greater growth in the plant. The higher concentration of  $\text{NO}_3^-$  in the younger shoot in the group with root re-supply can be explained by the sustained P uptake by the roots (Fig. 2, 3), whereas during foliar application, the increase in P concentration is limited.

The decrease of the concentrations of malic acid and citric acid in the vascular bundle sap as a result of P re-supply can therefore be seen as a reaction of the plant to the increasing P concentration within the plant tissue (Fig. 6). As a result of P resupply via the root, the effect is not only greater on the P concentration, but also on the two organic acids (Fig. 5, 6), which supports the assumption that the formation of organic acids is reduced after P re-supply. An important component of the response of the plant to inorganic P starvation is the excretion of organic acids from the roots into the rhizosphere, resulting in rhizosphere acidification (Raghothama 1999; Plaxton und Tran 2011). According to Jones (1998), malate and citrate are mainly released into the rhizosphere under P deficiency. The increased P concentration by resupplying probably reduces the activity of enzymes such as malate hydrogenase and citrate synthase, which are increased under P deficiency (Fang et al. 2009). The finding of no increased concentrations of malic acid and citric acid in the shoot and root (data not shown) is probably attributable to the direct excretion of organic acids via the roots.

## 5 Conclusions

Our results show the potential benefits of P foliar application in maize with P deficiency. Under controlled conditions, we have shown that the P concentration in the plant tissue increases in all compartments, especially during the first 6 h. This also results in the increased uptake of nitrate or decreased translocation of organic acids. No accumulation of foliar-applied P in the apoplast has been detected, but rather a rapid increase of the P concentration in the symplast of epidermal and mesophyll cells. We conclude that increased expression of *PHT1* transporters favors the uptake of P into the cytosol, and that there is no interference from the apoplast on foliar-applied P. The plant shows rapid translocation of the absorbed nutrient within the plant,



especially into the sinks. Thus, foliar-applied P can be assumed to be an efficient fertilizer technique, as the P is absorbed into the leaf mesophyll. Our results demonstrate the rapid effect of foliar-applied P, which is an advantage, especially for the speedy remedy of deficiency conditions.

## Acknowledgements

B. M. G. gratefully acknowledges the financial support provided by the *Federal State Scholarship* from *Kiel University*. Also language editing by Dr. R. Theresa Jones (freelance language-editor) is gratefully acknowledged.

## References

- Arsic, M.; Le Tougaard, S.; Persson, D. P.; Martens, H. J.; Doolette, C. L.; Lombi, E. et al. (2020): Bioimaging techniques reveal foliar phosphate uptake pathways and leaf phosphorus status. In: *Plant Physiol.* 183 (4), S. 1472–1483. DOI: 10.1104/pp.20.00484.
- Assuero, S. G.; Mollier, A.; Pellerin, S. (2004): The decrease in growth of phosphorus-deficient maize leaves is related to a lower cell production. In: *Plant Cell Environ.* 27 (7), S. 887–895. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2004.01194.x.
- Barrier, G. E.; Loomis, W. E. (1957): Absorption and translocation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and P by leaves. In: *Plant Physiol.* 32 (3), S. 225–231. DOI: 10.1104/pp.32.3.225.
- Bukovac, M. J.; Wittwer, S. H. (1957): Absorption and mobility of foliar applied nutrients. In: *Plant Physiol.* 32 (5), S. 428–435. DOI: 10.1104/pp.32.5.428.
- Clarkson, D T.; Scattergood, C B. (1982): Growth and phosphate transport in barley and tomato plants during the development of, and recovery from, phosphate-stress. In: *J. Exp. Bot.* 33 (5), S. 865–875. DOI: 10.1093/jxb/33.5.865.
- da Silva, M. F.; Gonçalves, M. C.; Dos Santos Brito, M.; Nóbile, P. M.; Andrade, L. M. de; Medeiros, C. N. et al. (2019): Reference genes for gene expression studies targeting sugarcane infected with Sugarcane mosaic virus (SCMV). In: *BMC Res Notes* 12 (1), S. 149. DOI: 10.1186/s13104-019-4168-5.
- Eichert, T.; Goldbach, H. E. (2008): Equivalent pore radii of hydrophilic foliar uptake routes in stomatous and astomatous leaf surfaces - further evidence for a stomatal pathway. In: *Physiol. Plant.* 132 (4), S. 491–502. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2007.01023.x.
- Fang, Z.; Shao, C.; Meng, Y.; Wu, P.; Chen, M. (2009): Phosphate signaling in Arabidopsis and *Oryza sativa*. In: *Plant Science* 176 (2), S. 170–180. DOI: 10.1016/j.plantsci.2008.09.007.
- Fernández, V.; Brown, P. H. (2013): From plant surface to plant metabolism: the uncertain fate of foliar-applied nutrients. In: *Front. Plant Sci.* 4, S. 289. DOI: 10.3389/fpls.2013.00289.
- Fernández, V.; Guzmán, P.; Peirce, C. A. E.; McBeath, T. M.; Khayet, M.; McLaughlin, M. J. (2014b): Effect of wheat phosphorus status on leaf surface properties and permeability to foliar-applied phosphorus. In: *Plant Soil* 384 (1-2), S. 7–20. DOI: 10.1007/s11104-014-2052-6.

- Fernández, V.; Sotiropoulos, T.; Brown, P. H. (2013): Foliar fertilization. Scientific principles and field practices. Paris: International fertilizer industry association (IFA). Online verfügbar unter <http://catalogue.bnf.fr/ark:/12148/cb435815768>.
- Geilfus, C.-M.; Mühlhling, K. H. (2011): Real-Time imaging of leaf apoplastic pH dynamics in response to NaCl stress. In: *Front. Plant Sci.* 2, S. 13. DOI: 10.3389/fpls.2011.00013.
- Geilfus, C.-M.; Zörb, C.; Neuhaus, C.; Hansen, T.; Lüthen, H.; Mühlhling, K. H. (2011): Differential transcript expression of wall-loosening candidates in leaves of maize cultivars differing in salt resistance. In: *J Plant Growth Regul* 30 (4), S. 387–395. DOI: 10.1007/s00344-011-9201-4.
- Girma, K.; Martin, K. L.; Freeman, K. W.; Mosali, J.; Teal, R. K.; Raun, W. R. et al. (2007): Determination of optimum rate and growth stage for foliar-applied phosphorus in corn. In: *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 38 (9-10), S. 1137–1154. DOI: 10.1080/00103620701328016.
- Gniazdowska, A.; Rychter, A. M. (2000): Nitrate uptake by bean (*Phaseolus vulgaris* L.) roots under phosphate deficiency. In: *Plant Soil* 226 (1), S. 79–85. DOI: 10.1023/A:1026463307043.
- Görlach, B. M.; Mühlhling, K. H. (2021): Phosphate foliar application increases biomass and P concentration in P deficient maize. In: *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 183, S. 1472. DOI: 10.1002/jpln.202000460.
- Grant, C. A.; Flaten, D. N.; Tomasiewicz, D. J.; Sheppard, S. C. (2001): The importance of early season phosphorus nutrition. In: *Can. J. Plant Sci.* 81 (2), S. 211–224. DOI: 10.4141/P00-093.
- Grignon, C.; Sentenac, H. (1991): pH and ionic conditions in the apoplast. In: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42 (1), S. 103–128. DOI: 10.1146/annurev.pp.42.060191.000535.
- Hawkesford, M.; Horst, W.; Kichey, T.; Lambers, H.; Schjoerring, J.; Møller, I. S.; White, P. (2012): Chapter 6 - Functions of Macronutrients. In: H. Marschner und P. Marschner (Hg.): *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3rd ed. Amsterdam, Boston, MA: Academic Press, S. 135–189.
- Jeschke, W. D.; Kirkby, E. A.; Peuke, A. D.; Pate, J. S.; Hartung, W. (1997): Effects of P deficiency on assimilation and transport of nitrate and phosphate in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.). In: *J. Exp. Bot.* 48 (1), S. 75–91. DOI: 10.1093/jxb/48.1.75.
- Jezek, M.; Geilfus, C.-M.; Bayer, A.; Mühlhling, K. H. (2015): Photosynthetic capacity, nutrient status, and growth of maize (*Zea mays* L.) upon MgSO<sub>4</sub> leaf-application. In: *Front. Plant Sci.* 5, S. 781. DOI: 10.3389/fpls.2014.00781.

- Jones, D. L. (1998): Organic acids in the rhizosphere – a critical review. In: *Plant Soil* 205 (1), S. 25–44. DOI: 10.1023/A:1004356007312.
- Koontz, H.; Biddulph, O. (1957): Factors affecting absorption and translocation of foliar applied phosphorus. In: *Plant Physiol.* 32 (5), S. 463–470. DOI: 10.1104/pp.32.5.463.
- Lee, J.; Holbrook, N. M.; Zwieniecki, M. A. (2012): Ion induced changes in the structure of bordered pit membranes. In: *Front. Plant Sci.* 3, S. 55. DOI: 10.3389/fpls.2012.00055.
- Liu, Fang; Xu, Yunjian; Jiang, Huanhuan; Jiang, Chaosheng; Du, Yibin; Gong, Cheng et al. (2016): Systematic identification, evolution and expression analysis of the Zea mays PHT1 Gene family reveals several new members involved in root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. In: *Int. J. Mol. Sci.* 17 (6). DOI: 10.3390/ijms17060930.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lohaus, G.; Pennewiss, K.; Sattelmacher, B.; Hussmann, M.; Muehling, K. H. (2001): Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. In: *Physiol. Plant.* 111 (4), S. 457–465. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110405.x.
- Luan, M.; Tang, R.-J.; Tang, Y.; Tian, W.; Hou, C.; Zhao, F. et al. (2017): Transport and homeostasis of potassium and phosphate: limiting factors for sustainable crop production. In: *J. Exp. Bot.* 68 (12), S. 3091–3105. DOI: 10.1093/jxb/erw444.
- McBeath, T. M.; Facelli, E.; Peirce, C. A. E.; Arachchige, V. K.; McLaughlin, M. J. (2020): Assessment of foliar-applied phosphorus fertiliser formulations to enhance phosphorus nutrition and grain production in wheat. In: *Crop Pasture Sci.* 71 (9), S. 795. DOI: 10.1071/CP20241.
- Mimura, T. (1995): Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants. In: *Plant Cell Physiol.* 36 (1), S. 1–7. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078724.
- Mimura, T. (1999): Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. In: *International Review of Cytology*, Bd. 191, S. 149–200.

- Mimura, T.; Dietz, K. J.; Kaiser, W.; Schramm, M. J.; Kaiser, G.; Heber, U. (1990): Phosphate transport across biomembranes and cytosolic phosphate homeostasis in barley leaves. In: *Planta* 180 (2), S. 139–146. DOI: 10.1007/BF00193988.
- Mimura, T.; Sakano, K.; Shimmen, T. (1996): Studies on the distribution, re-translocation and homeostasis of inorganic phosphate in barley leaves. In: *Plant Cell Environ.* 19 (3), S. 311–320. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1996.tb00253.x.
- Mimura, T.; Yin, Z.-H.; Wirth, E.; Dietz, K. J. (1992): Phosphate transport and apoplastic phosphate homeostasis in barley leaves. In: *Plant Cell Physiol.*, S. 563–568. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078290.
- Morcuende, R.; Bari, R.; Gibon, Y.; Zheng, W.; Pant, B. D.; Bläsing, O. et al. (2007): Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of Arabidopsis in response to phosphorus. In: *Plant Cell Environ.* 30 (1), S. 85–112. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2006.01608.x.
- Mudge, S. R.; Rae, A. L.; Diatloff, E.; Smith, F. W. (2002): Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in Arabidopsis. In: *Plant J* 31 (3), S. 341–353. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2002.01356.x.
- Mühling, K. H.; Plieth, C.; Hansen, U-P.; Sattelmacher, B. (1995): Apoplastic pH of intact leaves of *Vicia faba* as influenced by light. In: *J. Exp. Bot.* 46 (4), S. 377–382. DOI: 10.1093/jxb/46.4.377.
- Nagy, R.; Vasconcelos, M. J. V.; Zhao, S.; McElver, J.; Bruce, W.; Amrhein, N. et al. (2006): Differential regulation of five Pht1 phosphate transporters from maize (*Zea mays* L.). In: *Plant biology (Stuttgart, Germany)* 8 (2), S. 186–197. DOI: 10.1055/s-2005-873052.
- Neumann, G.; Massonneau, A.; Martinoia, E.; Römheld, V. (1999): Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. In: *Planta* 208 (3), S. 373–382. DOI: 10.1007/s004250050572.
- Noack, S. R.; McBeath, T. M.; McLaughlin, M. J. (2010): Potential for foliar phosphorus fertilisation of dryland cereal crops: a review. In: *Crop Pasture Sci.* 61 (8), S. 659. DOI: 10.1071/CP10080.
- Peirce, C. A. E.; McBeath, T. M.; Fernández, V.; McLaughlin, M. J. (2014): Wheat leaf properties affecting the absorption and subsequent translocation of foliar-applied phosphoric acid fertiliser. In: *Plant Soil* 384 (1-2), S. 37–51. DOI: 10.1007/s11104-014-2245-z.

- Peirce, C. A. E.; McBeath, T. M.; Priest, C.; McLaughlin, M. J. (2019): The timing of application and inclusion of a surfactant are important for absorption and translocation of foliar phosphoric acid by wheat leaves. In: *Front. Plant Sci.* 10, S. 1532. DOI: 10.3389/fpls.2019.01532.
- Plaxton, W. C.; Tran, H. T. (2011): Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. In: *Plant Physiol.* 156 (3), S. 1006–1015. DOI: 10.1104/pp.111.175281.
- Plénet, D.; Etchebest, S.; Mollier, A.; Pellerin, S. (2000): Growth analysis of maize field crops under phosphorus deficiency. I. Leaf Growth. In: *Plant Soil* 223 (1/2), S. 117–130. DOI: 10.1023/A:1004877111238.
- Raghothama, K. G. (1999): Phosphate acquisition. In: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, S. 665–693. DOI: 10.1007/s11104-004-2005-6.
- Reinbott, T. M.; Blevins, D. G. (1991): Phosphate interaction with uptake and leaf concentration of magnesium, calcium, and potassium in winter wheat seedlings. In: *Agron. J.* 83 (6), S. 1043–1046. DOI: 10.2134/agronj1991.00021962008300060021x.
- Sattelmacher, B.; Mühling, K.-H.; Pennewiß, K. (1998): The apoplast - its significance for the nutrition of higher plants. In: *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.* 161 (5), S. 485–498. DOI: 10.1002/jpln.1998.3581610502.
- Schachtman, D. P.; Reid, R. J.; Ayling, S. M. (1998): Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. In: *Plant Physiol.* 116 (2), S. 447–453. DOI: 10.1104/pp.116.2.447.
- Smith, F. W.; Mudge, S. R.; Rae, A. L.; Glassop, D. (2003): Phosphate transport in plants. In: *Plant Soil* 248 (1/2), S. 71–83. DOI: 10.1023/A:1022376332180.
- Uexküll, H. R. von; Mutert, E. (1995): Global extent, development and economic impact of acid soils. In: *Plant Soil* 171 (1), S. 1–15. DOI: 10.1007/BF00009558.
- Vance, C. P.; Uhde-Stone, C.; Allan, D. L. (2003): Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. In: *New Phytol.* 157 (3), S. 423–447. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2003.00695.x.
- White, P. J. (2012): Chapter 3 - Long-distance Transport in the Xylem and Phloem. In: H. Marschner und P. Marschner (Hg.): *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3rd ed. Amsterdam, Boston, MA: Academic Press, S. 49–70.

Wittwer, S. H.; Lundahl, W. S. (1951): Autoradiography as an aid in determining the gross absorption and utilization of foliar applied nutrients. In: *Plant Physiol.* 26 (4), S. 792–797. DOI: 10.1104/pp.26.4.792.

**Table S1.** List of primer pairs used for RT qPCR analysis.

Gene bank accession number	Primer Name		Sequence of forward (f) and reverse (r) primers (5'–3')	Length (bp)	%GC content	Annealing temp (°C)	Product size (bp)
NM_001112348.1	<i>Zm PHT12</i>	F	GTCACTACCTTGCTGCACAC	20	55	59	157
		R	CATAAGTGGCTGCGAGGATG	20	55	59	
JQ178245.1	<i>Zm PHT1;2</i>	F	AGTACGCCAACAAGAGGAGG	20	55	59	131
		R	GTTGGATGGAGCACTGTTCG	20	55	59	
NM_001111799	<i>Zm PHT1;1</i>	F	TGGTCATGGTCATCTGCTCC	20	55	59	148
		R	TACTCGGACATGATGGTGGC	20	55	59	



### 3. Kapitel

## Evaluation of maize growth following early season foliar P supply of various fertilizer formulations and in relation to nutritional status

Bruno Maximilian Görlach, Jon Niklas Henningsen, Jens Torsten Mackens and Karl Hermann Mühling

*Agronomy* (2021), 11(4), 727

DOI: 10.3390/agronomy11040727

## Article

# Evaluation of Maize Growth Following Early Season Foliar P Supply of Various Fertilizer Formulations and in Relation to Nutritional Status

Bruno Maximilian Görlach <sup>\*</sup>, Jon Niklas Henningsen, Jens Torsten Mackens  and Karl Hermann Mühling 

Institute of Plant Nutrition and Soil Science, Kiel University; Hermann-Rodewald-Straße 2, 24118 Kiel, Germany; jnhenningsen@plantnutrition.uni-kiel.de (J.N.H.); jtmackens@plantnutrition.uni-kiel.de (J.T.M.); khmuehling@plantnutrition.uni-kiel.de (K.H.M.)

\* Correspondence: bgoerlach@plantnutrition.uni-kiel.de; Tel.: +49-431-880-3189

**Abstract:** The efficiency of phosphorus (P) use in agriculture needs to be improved, with farmers being increasingly forced by law to reduce P soil fertilization. Thus, P foliar application might become more important in agriculture. The effect of foliar P fertilization has not been widely studied in maize, despite it being a crop with high P demand during juvenile development. Our aim was to investigate the effect of P foliar application during juvenile development on maize crop growth and yield. We conducted outdoor pot experiments to investigate the effect on P uptake, translocation, and dry matter following three applications of foliar fertilizer of various P formulations and with additional P soil fertilization between the 4th and 6th leaf stage during two growing seasons. To determine direct and possible long-term effects, plants were harvested at various developmental stages. P foliar application resulted in a significant increase in P concentration in all plant parts ten days after the last application, regardless of P form, nutritional status, or year. P concentration remained high only in those parts of the plant that were present during foliar application. Biomass effects were sporadically visible until flowering, but not at maturity. We conclude that foliar P fertilization during juvenile development does not increase yield but might nevertheless be a useful remedy for short-term P deficits.

**Keywords:** foliar application; foliar nutrition; foliar uptake; nutrient management; phosphate; phosphorus



**Citation:** Görlach, B.M.; Henningsen, J.N.; Mackens, J.T.; Mühling, K.H. Evaluation of Maize Growth Following Early Season Foliar P Supply of Various Fertilizer Formulations and in Relation to Nutritional Status. *Agronomy* **2021**, *11*, 727. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040727>

Academic Editor: Frank Liebisch

Received: 4 March 2021

Accepted: 7 April 2021

Published: 9 April 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Phosphorus (P) is an essential and indispensable macronutrient for plant growth and is the second most frequent limiting macronutrient after nitrogen [1]. The nutrient is of prime importance as a structural component in nucleic acids, phospholipids, coenzymes, and phosphoproteins [2] and as an energy carrier in the form of adenosine diphosphate (ADP) or triphosphate (ATP) [3] and also plays a role in photosynthesis and respiration [4]. Thus, in the absence of an adequate P supply, plants show a range of P deficiency symptoms such as decreased plant height [2], reductions in tillering [5], restricted seed formation [6], reduced leaf area [7,8], and premature senescence of leaves [9]. However, plant uptake precedes biomass development, and so early season P-nutrition is crucial for the life cycle and growth of shoot and root [10]. Indeed, a persistent P deficiency during juvenile development cannot be subsequently recovered in the form of a late-season supply [2].

One of the arable crops with a close relationship to P is maize (*Zea mays* L.). Maize is the second-largest arable crop both worldwide [11] and in Germany [12]. In Central and Northern Europe, maize is sown in the springtime (April/May). Low temperatures are a major yield-limiting factor. In April, in particular, the air and soil temperatures are at a minimum for optimal growth conditions. Maize growth is slow at temperatures lower than 15 °C because the seedlings lose the ability to establish dry matter during the development

of the root, which is weak under these conditions [13]. Moreover; nutrient acquisition is particularly limited by low temperatures since, under low soil temperatures, the solubility of nutrients and the speed of diffusion decrease [14]. Consequently, the availability of P, which is delivered by diffusion [1], is significantly reduced. Low soil temperatures cause two problems: (I) poor development of the root area [13,15] and (II) reduced availability of soil P to the plant [2,16]. In addition, the low availability of P ions in bulk soils (large reactivity relative to numerous soil constituents [17]) and a concentration below 10  $\mu\text{M}$  in the soil solution limits plant uptake of P [1,18]. Since the diffusion rate of P is low, root uptake generates a rhizosphere that is depleted of P [1]. In consequence, P is one of the least available and most inaccessible macronutrients in soil [19]. Therefore, maize plants require the application of starter P at sowing to provide essential P for early growth [2]. The practical method of supplying P to provide sufficient water-soluble P in the root area and to increase P fertilizer efficiency is usually by banding the fertilizer near to or with the seed during sowing [2,20]. This method ensures P nutrition during juvenile development.

According to Hart et al. [21], the use of (mineral) fertilizer has massively increased over the last century. Furthermore, agricultural systems have changed from being a net sink of P to a net source of P, which increases the problem of diffuse P losses [22]. In order to protect the environment and maintain its ecological and chemical status, the European Union has adopted various directives (EU Nitrates Directive, EU Water Framework Directive) that have led to Fertilizer Ordinances being drawn up at the level of the individual states in the EU. The Fertilizer Ordinance regulates good professional practice with regard to the application of fertilizers on agricultural land and is intended to increase the efficiency of fertilizer use [23]. Thus, in the future, farmers will be increasingly forced by law to reduce P fertilization of the soil. Foliar application has become an increasingly important tool for sustainable and productive crop management [24] and is used worldwide. In addition, this method can be employed at times of high nutrient demand. The application of nutrients such as P by this technique might therefore lead to an increase in the efficiency of fertilizer use [10,25].

In the literature, many factors are mentioned that have an influence on the absorption and translocation of leaf fertilizers: (1) the physical and chemical properties of the sprayed nutrient solution (e.g., molecule size, solubility, surface tension); (2) environmental factors (e.g., relative humidity, temperature, radiation); (3) plant species and physiology of the plant (e.g., architecture of the cuticle, wax layer, mobility of the nutrient in the plant) [24,26,27]. However, the effectiveness depends not only on the uptake of nutrients into the leaf, but also on the subsequent transfer of nutrients to other parts of the plant, such as young leaves, grains, or fruits. Hence, nutrients with high phloem mobility are theoretically more likely to generate systemic effects in contrast to immobile elements [24]. The uptake of various forms of foliar P have previously been shown for some crops, especially for winter wheat [28–31]. Nevertheless, most of the research on foliar P fertilization has been conducted on winter wheat in the U.S. and Australia. According to Noack et al. [10], foliar fertilization is the most effective and efficient method for late-season P supply. We, therefore, wished to study the effect of P foliar application during juvenile development in maize and to determine whether this would lead to a more efficient design of P fertilization in maize. The effects of three P foliar applications were studied with regard to (1) the concentration and translocation of P within the plant, (2) biomass development, and (3) yield during a specific time course. These aspects were investigated as a function of two P foliar fertilizer forms and the nutritional status of the maize plants.

## 2. Materials and Methods

The experimental designs were completely randomized and were carried out in the outdoor area of the Experimental Station of the Institute of Plant Nutrition and Soil Science, Kiel University, Kiel, Germany (54°20'50'' N, 10°6'55'' E). Basic fertilization was mixed into the soil by using a (concrete) mixer. One gram N (as  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), 1.2 g K (as  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ), 1.2 g K (as KCl), 0.5 g Ca (as  $\text{CaSO}_4$ ), and 0.33 g Mg (as  $\text{MgSO}_4$ ) were applied to each

pot (Mitscherlichpot, 6.2 L). To eliminate nutrient deficiencies other than P, additional nutrient solutions were surface-applied at 30 days after sowing (DAS) at levels (in g pot<sup>-1</sup>) of: 0.015 Fe (as Fe-EDTA), 0.010 Cu (as CuSO<sub>4</sub>), 0.015 Zn (as ZnSO<sub>4</sub>), 0.030 Mn (as MnSO<sub>4</sub>), 0.010 B (as H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), and 0.002 Mo (as (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>); at 43 DAS: 1 K (as KSO<sub>4</sub>) and 0.5 N (as NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>); at 57 DAS: 1 K (as KSO<sub>4</sub>) and 0.5 N (as NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>); at 71 DAS: 1 K (as KSO<sub>4</sub>), 0.5 N (as NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), 0.1 Ca (as CaSO<sub>4</sub>), and 0.1 Mg (as MgSO<sub>4</sub>). Two maize seeds (*Zea mays* L. var. Keops, KWS SAAT SE & Co. KGaA, Einbeck, Germany) were sown per pot at a depth of 3.5 cm. Five days after germination, the plants in the pots were separated into one plant per pot. Under natural weather conditions, plants were watered only if necessary. Excess rainwater was collected and returned. In anticipation of heavy rainfall, plants were moved to a rainout shelter. At times of high water demand, containers were placed in large buckets with a continuous water supply.

P foliar fertilizer was applied early in the morning (5.30–6 a.m.) to avoid leaf burn by high irradiation and to take advantage of the higher air humidity. Maize plants were sprayed from above by using an in-house spraying technology with three double flat fan nozzles (Air Injektor Kompakt-Doppelflachstrahldüsen IDKT 120, Lechler, Metzingen, Germany). The overlapping of leaves was avoided by the pots being aligned with appropriate spacing. To improve the wetting of the plants, 0.1% of the wetting agent Silwet® Gold (Spiess-Urania, Ochsenfurt, Germany) was added to the sprayed fluid. Contamination of the soil was prevented by covering the pots with aluminum foil and wrapping the stems with paper. The applied concentration was equivalent to 1.24 kg phosphorus ha<sup>-1</sup> in a total volume of 200 L ha<sup>-1</sup>.

### 2.1. Experiment 1

Experiment 1 was conducted from May to October 2019 to investigate the uptake and influence of two different P foliar fertilizer formulations on growth, P concentration, and grain formation. Mitscherlich pots were filled with 6 kg air-dried and sieved soil (<4 mm). The soil substrate was an arable (with organic fertilization) loamy sand from the district of Plön (Schleswig-Holstein) with 79.3% sand, 13.3% silt, and 7.4% clay. Further details are summarized in Table 1. Three treatments were cultivated in five biological replicates: a control treatment (control) without foliar P application and two treatments with different foliar P fertilizers (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Foliar fertilizers were applied on 40, 46, and 53 DAS. The concentration of the fertilizer solution was 200 mM, and the pH was 4.5. For H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, the pH had to be raised to 4.5 using NaOH, as otherwise, severe leaf burn would have occurred. To illustrate possible effects of P foliar application over time, maize plants were harvested at three dates, namely ten days after the last P application (BBCH 16), at flowering (BBCH 65), and at maturity (BBCH 89). This includes three crucial developmental stages of maize. The developmental stages of maize consisted of germination (BBCH 00–09), leaf development (BBCH 10–19); stem elongation (BBCH 30–39); inflorescence emergence, heading (BBCH 51–59); flowering, anthesis (BBCH 61–69); development of fruit (BBCH 71–79); ripening (BBCH 83–89); and senescence (BBCH 97–99) [32]. The total P concentration was studied in various parts of the plants for better evaluation.

**Table 1.** Physico-chemical characteristics of the soils.

	Soil Experiment 1	Soil Experiment 2
pH (CaCl <sub>2</sub> )	5.9	6.1
Phosphorus (mg 100 g <sup>-1</sup> soil)	7.5	5.0
Phosphorus release rate (µg kg <sup>-1</sup> *10 min)	825	519
Potassium (mg 100 g <sup>-1</sup> soil)	8.6	7.9
Magnesium (mg 100 g <sup>-1</sup> soil)	8.7	5.1
Copper (mg 100 g <sup>-1</sup> soil)	1.3	0.9
Manganese (mg 100 g <sup>-1</sup> soil)	23.6	145.5
Zinc (mg 100 g <sup>-1</sup> soil)	1.4	1.3
Boron (mg 100 g <sup>-1</sup> soil)	0.33	0.38
Sulfur (mg 100 g <sup>-1</sup> soil)	5.7	5.9

## 2.2. Experiment 2

The second experiment was set up in the subsequent growing season from May to October 2020 in order to investigate whether soil fertilization with P had an influence on the effect of foliar-applied P. Mitscherlich pots were filled with 6 kg air-dried and sieved soil (<4 mm). The soil substrate was an arable loamy sand from the district of Ost-Holstein (Schleswig-Holstein) with 71.8% sand, 19.9% silt, and 8.3% clay. Further details are summarized in Table 1. The experiment comprised four treatments with five biological replicates: two control treatments with 200 and 300 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  soil fertilization, respectively, and two treatments with additional foliar application.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  was used as foliar fertilizer and was applied on 35, 42, and 49 DAS. The P concentration was 200 mM, and the pH was 4.5. Aboveground plant material was harvested ten days after the last P application (BBCH 16) and at maturity (BBCH 89) and was then separated into groups containing the various parts of the plants for better evaluation.

## 2.3. Plant Sampling and Analysis

Plants were cut aboveground. Afterward, the plant material was divided into those parts to be examined. All plant parts were washed three times in deionized water to avoid fertilizer residues remaining on the leaves. Oven-dried plants (65 °C) were weighed and then milled to a fine powder for further analysis (Cyclotec 1093, Foss Tecator, Höganäs, Sweden). For mineral nutrient analyses, 200 mg of finely ground plant material was digested with 10 mL of 69%  $\text{HNO}_3$  (ROTIPURAN Supra for ICP, 69%) for 45 min in an 1800 W microwave oven (MARS 6, Xpress, CEM, Matthews, MC, USA) and subsequently measured using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS; Agilent Technologies 7700 Series, Böblingen, Germany) according to the method described by Jezek et al. [33]. For starch analysis, the milled grain material was additionally ground with a ball mill (Schwingmühle MM 400, Retsch GmbH, Haan, Germany). Starch concentration and content were determined by enzymatic hydrolysis of starch to glucose as described by Brandt et al. [34].

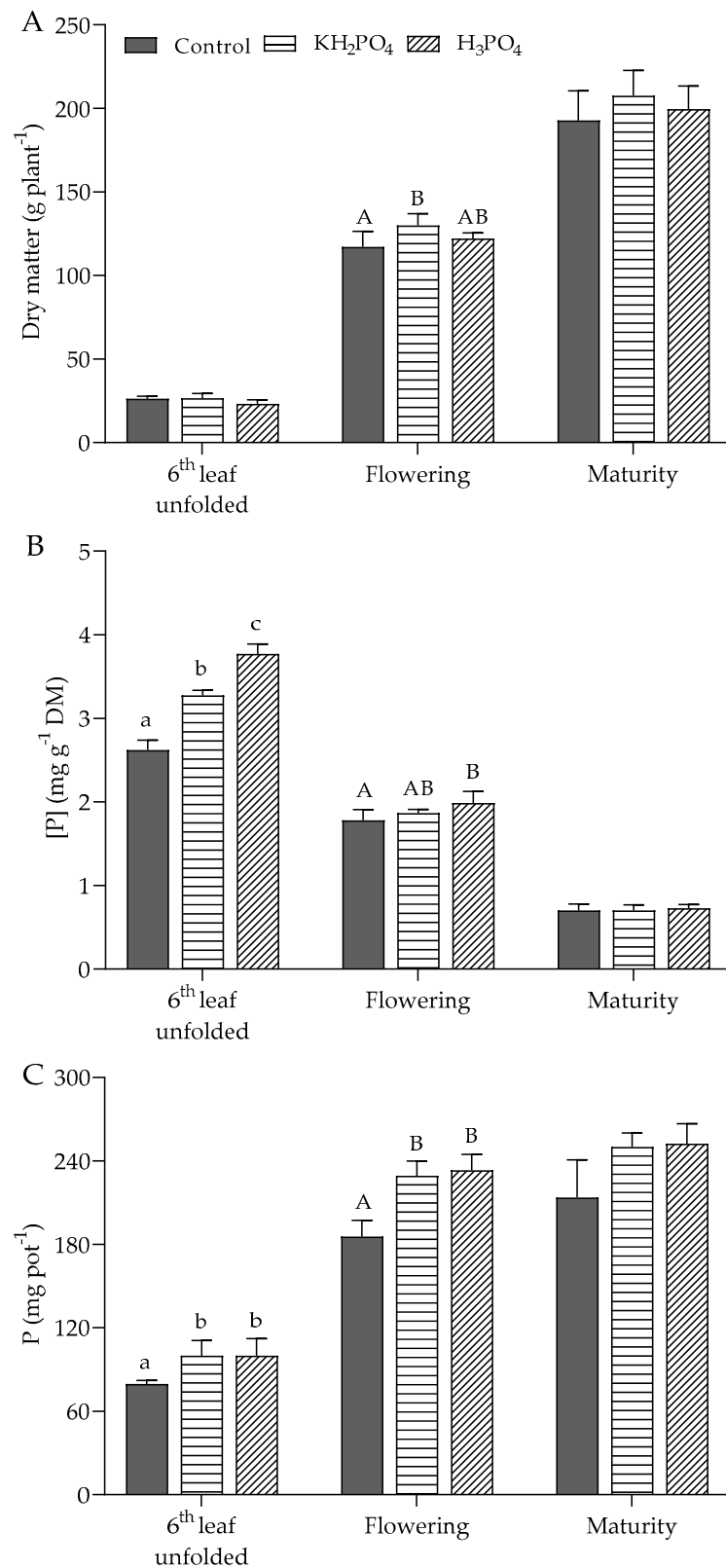
## 2.4. Statistical Analysis

Data were statistically analyzed using SPSS software (version 17.0). Analysis was based on five biological replicates per treatment. Effects of treatments were tested using Student's t-test in cases of two experimental groups or one-way ANOVA and following Duncan's Multiple Range test at  $\alpha \leq 5\%$ .

## 3. Results

### 3.1. Development of Biomass, P Concentration, and P Content Over Time

During the entire growth period, predominantly no significant difference was seen in the dry matter (DM) of the total plant. However, at flowering, plants with additional  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foliar P application showed significantly higher dry matter than those receiving the control treatment, whereas those treated by foliar fertilization with  $\text{H}_3\text{PO}_4$  were not significantly different from either treatment (Figure 1A). Mean dry matter values were 117.2 g  $\text{pot}^{-1}$  for the control, 130.0 g  $\text{pot}^{-1}$  for foliar application with  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and 122.2 g  $\text{pot}^{-1}$  for foliar application with  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . By the time that the plants had fully ripened, no significant difference could be determined in the dry matter of the plants (Figure 1A).



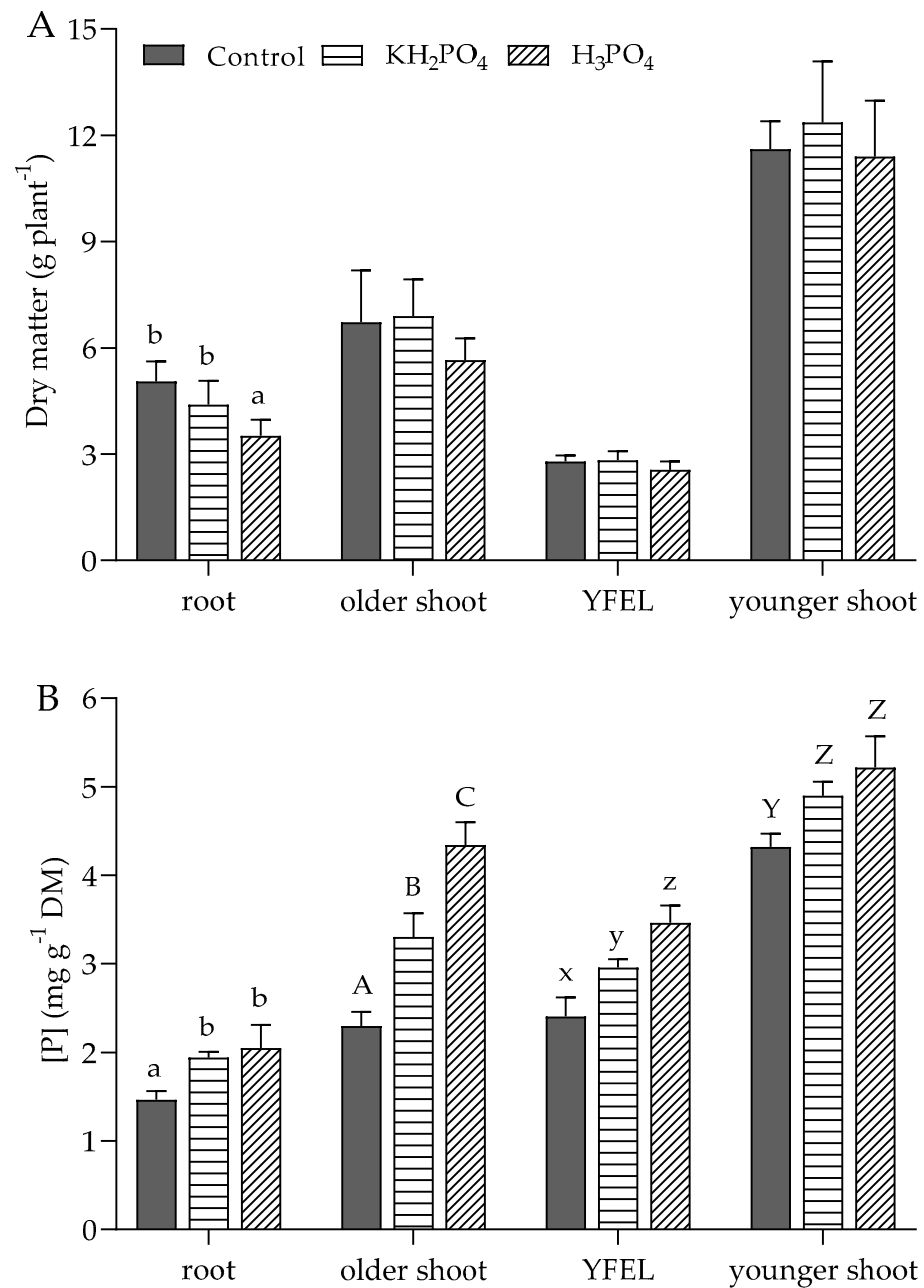
**Figure 1.** (A) Dry matter in g plant<sup>-1</sup>. (B) Phosphorus concentration (P) in mg g<sup>-1</sup> dry matter. (C) Phosphorus content (P) in mg plant<sup>-1</sup> of the total maize plant. Control without P fertilization (control), three foliar applications of 200 mM potassium dihydrogen phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) or phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) at 40, 46, and 53 days after sowing. Maize plants were harvested during the 6<sup>th</sup> leaf stage (BBCH 16), flowering (BBCH 65), or maturity (BBCH 89) over time. Bars represent means + SD (*n* = 5). Upper and lower case letters indicate significant differences between treatments within the development stages (ANOVA with Duncan test, *p* ≤ 0.05).

In contrast, significant differences in P concentrations were evident ten days after foliar application, but these diminished during the further progress of the growing season (Figure 1B). At 3.8 mg P g<sup>-1</sup> DM, plants that had received an H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> foliar application exhibited a significant increase of 44% compared with the control treatment. The P concentration of the plants that were foliar-fertilized with KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3.3 mg P g<sup>-1</sup> DM) was at a lower level than those with foliar-applied H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> but was significantly higher than those under the control treatment (2.6 mg P g<sup>-1</sup> DM). At flowering, the P concentration was in a range of 1.8 mg P g<sup>-1</sup> DM, and only the treatment with foliar-applied H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> resulted in a significant increase in comparison with the control treatment. The lowest P concentrations (all showing no significant differences) were measured in plants at the third harvest. However, for P content, the values for the treatments with additional foliar applications were 25% higher than those from the control treatment with significant difference until flowering (Figure 1C).

### 3.2. P Concentration in Various Parts of Plants at 6 Leaf Stage, Flowering, and Maturity

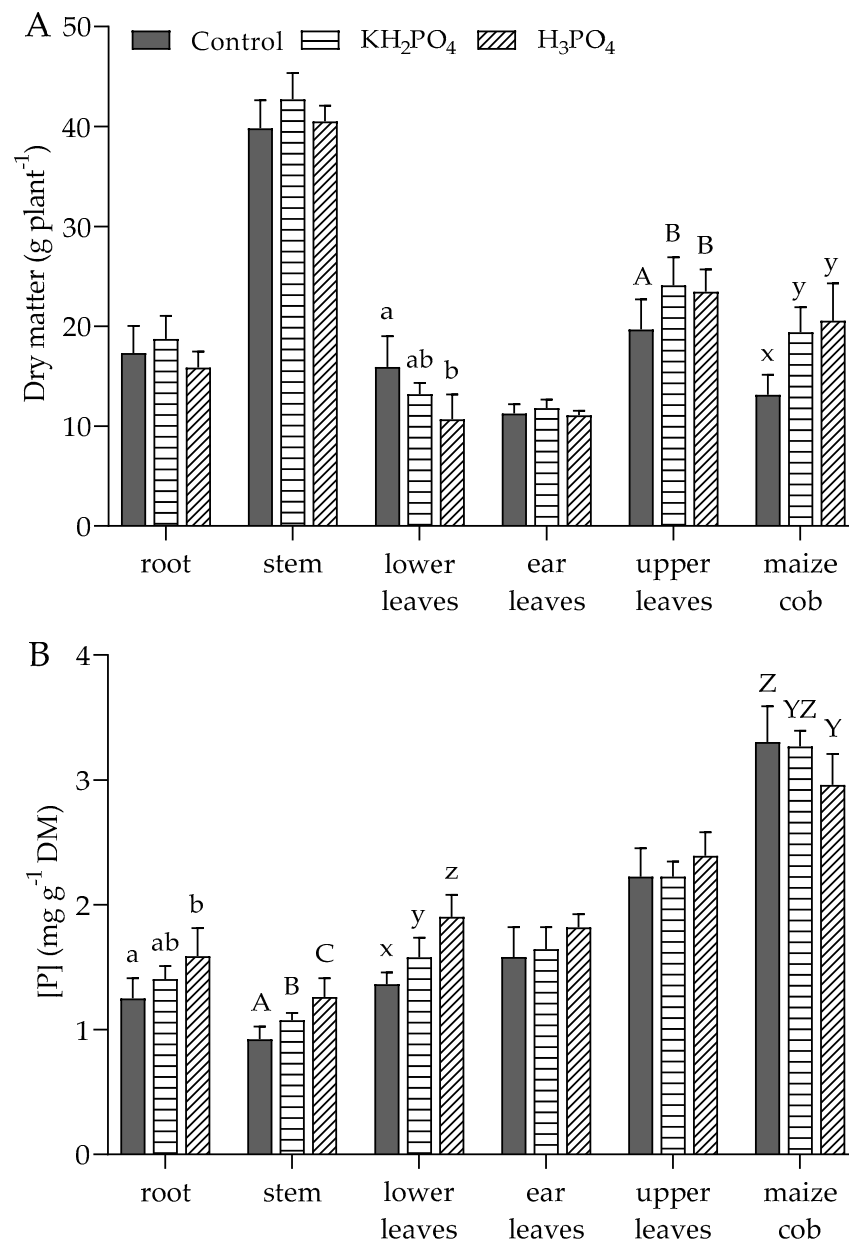
The determination of the dry matter of the various plant parts showed differences only in the roots. The root dry matter of the group with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> foliar fertilization was significantly reduced (Figure 2A). The studied parts of the control plants cultivated under no P supply exhibited the significantly lowest P concentrations in all parts of these plants (Figure 2B). The P concentrations were between 2.3 mg P g<sup>-1</sup> DM in the older shoot, 2.4 mg P g<sup>-1</sup> DM in the youngest fully expanded leaf (YFEL), and 4.3 mg P g<sup>-1</sup> DM in the younger shoot; root tissue contained 1.5 mg P g<sup>-1</sup> DM. Supply of P via the foliar application with KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> resulted in an average percentage increase up to 17% in the younger shoot and 37% in the root (Figure 2B). In the older shoot and the YFEL, foliar application with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> showed a significant increase in concentration compared with foliar application with KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Figure 2B). In the older shoot, in particular, this resulted in an increase of P concentration by 88% above the mean value of the control plants compared with an increase of 44% when KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> was applied.

During flowering, the groups with supplemental foliar fertilization showed significantly lower dry matter in the leaves below the ear leaves (lower leaves) but significantly higher values in the leaves above the ear leaves (upper leaves) and the growing maize cobs (Figure 3A). No differences in P concentration could be measured in the ear leaves and the leaves above them (Figure 3B). However, significant differences in P concentration were evident in the leaves below the maize cobs. At 1.9 mg P g<sup>-1</sup> DM, the P concentration in maize plants following H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> foliar application was 24% higher compared with maize plants having KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> foliar application and 40% higher compared with maize plants without foliar application (Figure 3B). Foliar application of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> also showed the significantly highest concentrations in the roots and the stem. However, the application of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> had the significantly second-highest concentration in the stem but showed no significant differences in the root from either the control or the treatment with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Figure 3B). The opposite was seen in the young maize cobs and the associated husk leaves. Significant effects were detected between the control and the H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> group. At 3.3 mg P g<sup>-1</sup> DM, the control group showed the highest P concentration (Figure 3B).



**Figure 2.** (A) Dry matter in  $\text{g plant}^{-1}$  and (B) phosphorus concentration (P) in  $\text{mg g}^{-1}$  dry matter at BBCH 16 (6th leaf unfolded) following the three treatments: control without P fertilization (control) or three foliar applications of 200 mM potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) or phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) at 40, 46, and 53 days after sowing. Maize plant material was separated into root, older shoot, youngest fully developed leaf (YFEL), and younger shoot. Bars represent means + SD ( $n = 5$ ). Upper and lower case letters indicate significant differences between treatments within the examined parameters (ANOVA with Duncan test,  $p \leq 0.05$ ).

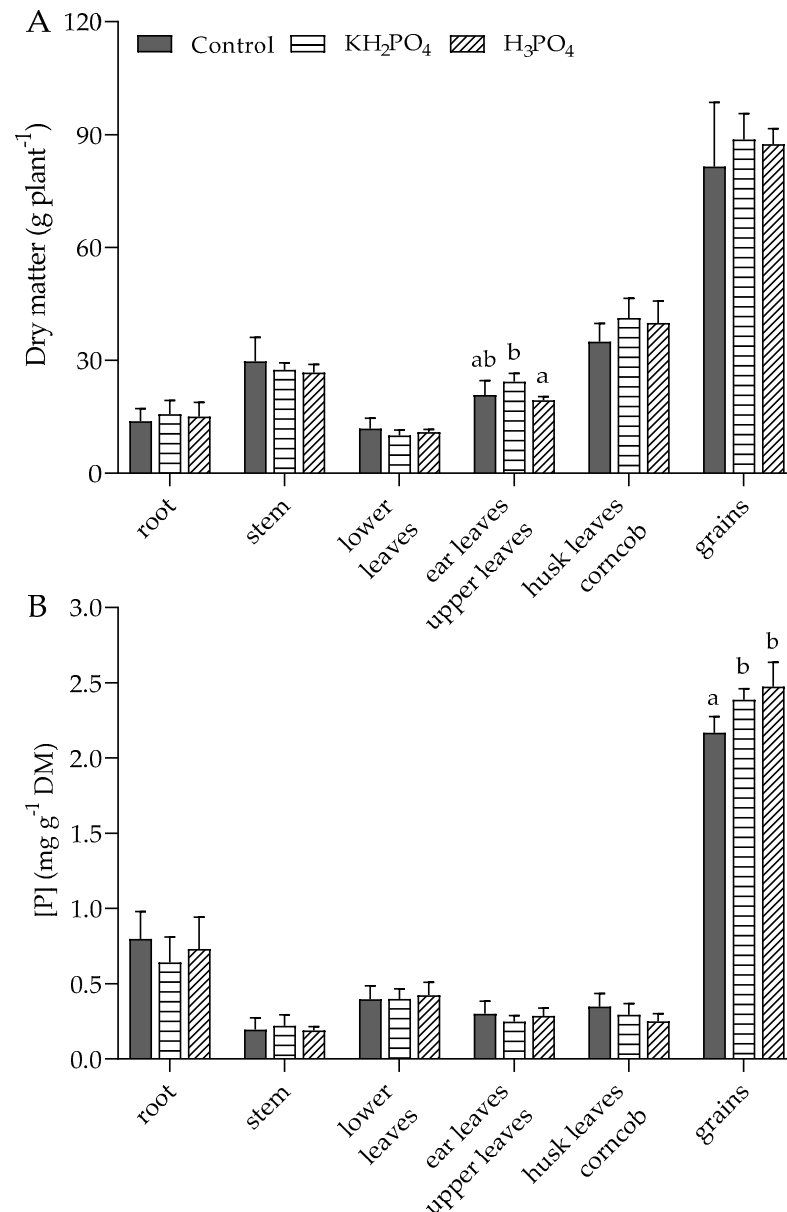




**Figure 3.** (A) Dry matter in  $\text{g plant}^{-1}$  and (B) phosphorus concentration (P) in  $\text{mg g}^{-1}$  dry matter of the investigated parts of the plant were analyzed after harvest at flowering (BBCH 65). Plant material was separated into root, stem, lower leaves (leaves below the ear leaves), ear leaves, upper leaves (leaves above the ear leaves), and maize cobs (+husk leaves). Control without P fertilization (control) or three foliar applications of 200 mM potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) or phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) at 40, 46, and 53 days after sowing. Bars represent means + SD ( $n = 5$ ). Upper and lower case letters indicate significant differences between treatments within the examined parameters (ANOVA with Duncan test,  $p \leq 0.05$ ).

Once the plants had fully ripened, no significant differences were seen in their dry matter, except for the cob leaves and the leaves above them (Figure 4A). At maturity, the P concentrations in the roots were below a value of  $1.0 \text{ mg P g}^{-1} \text{ DM}$ , which was however higher than the P concentrations of the individual shoot sections, which were below a value of  $0.5 \text{ mg P g}^{-1} \text{ DM}$ , except for the P concentration in maize grains. In the individually studied plant regions, no significant differences were detected among the three treatments, even in the lower parts of the plant (root, stem, lower leaves), with the exception of the maize grains (Figure 4B). However, the measurement of the P concentration in the

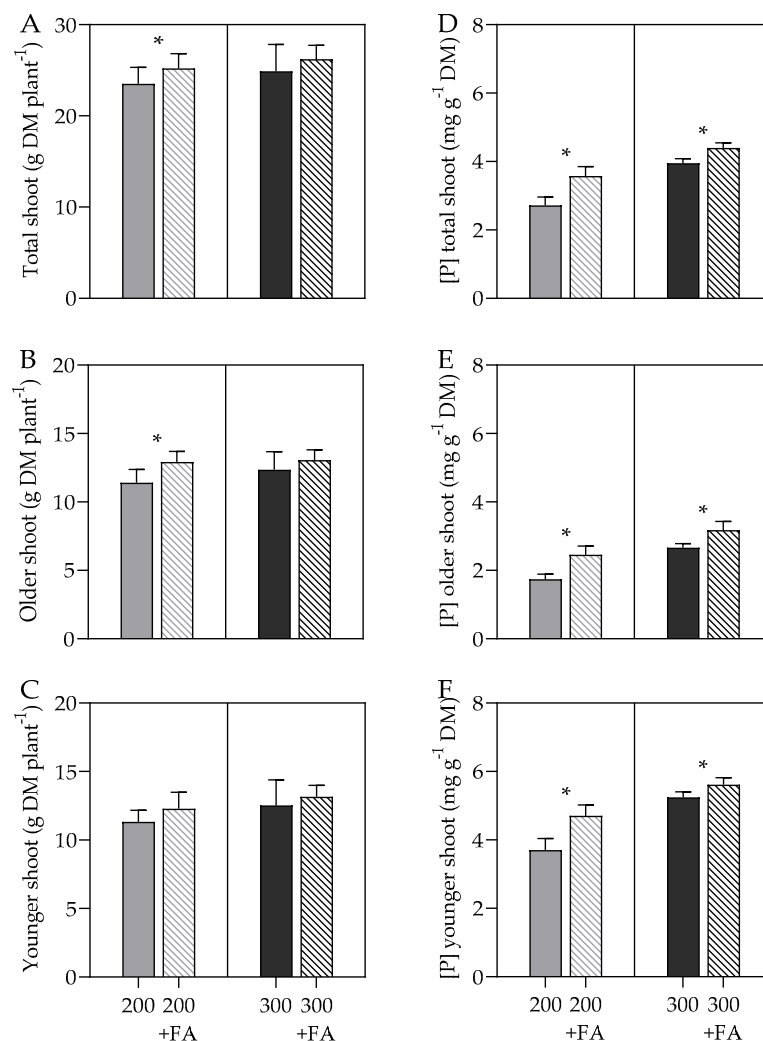
maize grains showed a significant increase in the groups with additional foliar fertilization compared with the control. At  $2.39 \text{ mg P g}^{-1} \text{ DM}$  for the treatment with  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and  $2.47 \text{ mg P g}^{-1} \text{ DM}$  for the treatment with  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , the concentrations were at similar levels, regardless of the foliar-applied P form. The P concentration in the control group was 13% lower at  $2.17 \text{ mg P g}^{-1} \text{ DM}$ .



**Figure 4.** (A) Dry matter in  $\text{g plant}^{-1}$  and (B) phosphorus concentration (P) in  $\text{mg g}^{-1}$  dry matter of the investigated parts of the plant were analyzed after harvest at maturity (BBCH 89). Plant material was separated into root, stem, lower leaves (leaves below the ear leaves), ear leaves and upper leaves, husk leaves and corn cob, and grains. Control without P fertilization (control) and three foliar applications of 200 mM potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) or phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) at 40, 46, and 53 days after sowing. Bars represent means + SD ( $n = 5$ ). Upper and lower case letters indicate significant differences between treatments within the examined parameters (ANOVA with Duncan test,  $p \leq 0.05$ ).

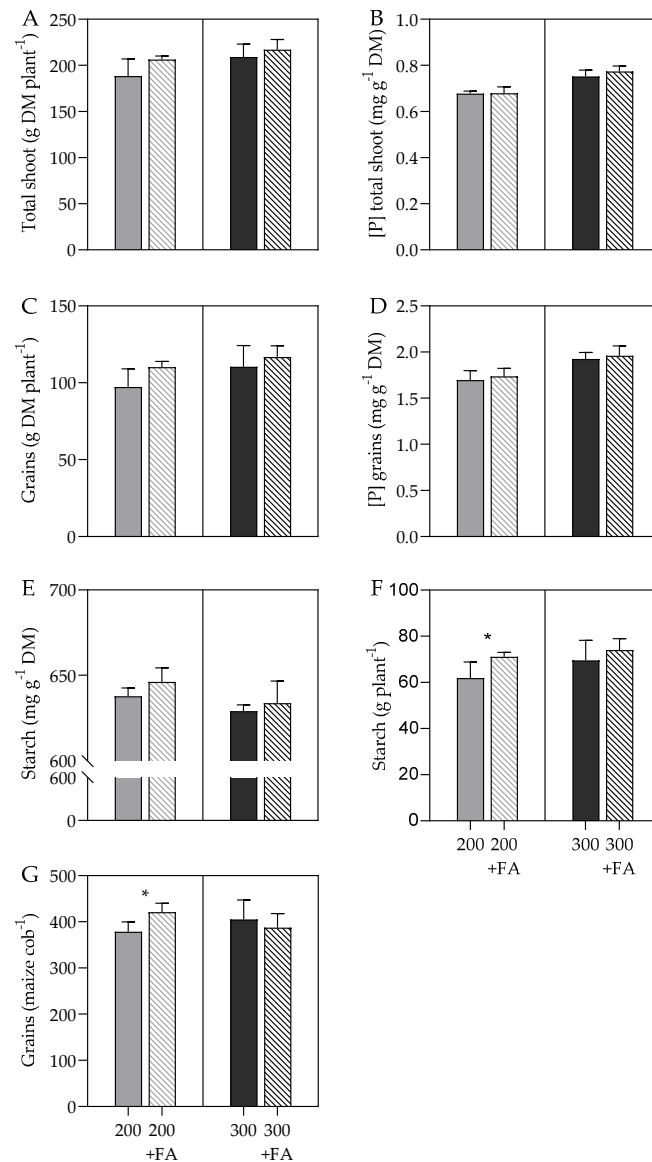
### 3.3. Dry Matter and P Concentration according to P Soil and Foliar Fertilization

Determination of total dry matter of shoots of maize plants at BBCH 16 showed a significant increase as a result of the foliar application in the group receiving soil fertilizer of 200 mg P (Figure 5A). A significant difference was shown in the older shoot, whereas no significant increase in dry matter was observed in the younger shoot (Figure 5B,C). In the group with soil fertilization of 300 mg P, the foliar application showed no effect on dry matter (Figure 5A–C). Regardless of the amount of P fertilized via soil, the P concentration in all examined parts of the plant and thus also in the total shoot was significantly increased by three foliar applications of P (Figure 5D–F). In the older shoot, the P concentration was increased by 40% (200 + foliar application, FA) or 20% (300 + FA) by foliar P fertilization compared with the control treatment. Moreover, the effect was stronger in the older shoot than in the younger shoot, in which an increase in concentration of only 27% and 7%, respectively, occurred, respectively.



**Figure 5.** Dry matter in  $\text{g plant}^{-1}$  and phosphorus concentration (P) in  $\text{mg g}^{-1}$  dry matter of (A,D) total shoot, (B,E) older shoot, and (C,F) younger shoot at BBCH 16 (6th leaf unfolded). Plants were cultivated with 200 mg P soil fertilization (200) with additional foliar application (FA) (200 + FA) or with 300 mg P soil fertilization (300) with additional foliar application (300 + FA).  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  was used as foliar fertilizer and was applied at 35, 42, and 49 days after sowing. Bars represent means + SD ( $n = 5$ ). Asterisks indicate significant differences between treatments of one fertilization level (student's t-test,  $p \leq 0.05$ ).

In fully ripened plants, a significant effect was no longer seen in shoot dry matter following three P foliar applications during juvenile development, regardless of P soil fertilization (Figure 6A). Moreover, no significant difference was measured in the P concentration of the total shoot (Figure 6B). In particular, in the examined maize grains, no significant increase in dry matter could be determined by a P foliar application (Figure 6C). In addition, P and starch concentrations were not increased in the grains (Figure 6D,E). Only the starch content in the group receiving soil fertilization of 200 mg P was significantly increased as a result of P foliar fertilization. However, this was not evident in the group with 300 mg of soil-applied P (Figure 6F).



**Figure 6.** Total shoot (A) dry matter in g plant<sup>-1</sup>, (B) phosphorus concentration (P) in mg g<sup>-1</sup> dry matter, (C) grain dry matter in g plant<sup>-1</sup>, (D) grain phosphorus concentration (P) in mg g<sup>-1</sup> dry matter, (E) starch concentration in mg g<sup>-1</sup> dry matter, (F) starch content in g plant<sup>-1</sup>, and (G) number of grains per maize cob at maturity (BBCH 89). Plants were cultivated with 200 mg P soil fertilization (200) with additional foliar application (FA) (200 + FA) or with 300 mg P soil fertilization (300) with additional foliar application (300 + FA). KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> was used as foliar fertilizer and was applied at 35, 42, and 49 days after sowing. Bars represent means + SD ( $n = 5$ ). Asterisks indicate significant differences between treatments of one fertilization level (Student's *t*-test,  $p \leq 0.05$ ).

#### 4. Discussion

We have shown that early season P foliar fertilization has a significant effect on P concentration and P content but a marginal effect on biomass development in maize (Figure 1, Figure 5, and Figure 6). The effect of P foliar fertilization on P concentration is mainly measurable at the time of the first harvest at the 6<sup>th</sup> leaf stage. At this point, a significant increase is evident regardless of the foliar P fertilizer form or the P nutritional status of the plant (Figures 2B and 5D–F). Previous studies have found that the application of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> results in a high uptake efficiency. According to Peirce et al. [35], the higher penetration rate of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> is associated with a higher percentage of scorch, which can cause significant leaf damage. Leaf damage is suggested to have a negative effect on the translocation of foliar-applied H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> [35,36]. In addition, photosynthesis might also be negatively affected by leaf damage, resulting in reduced plant growth [37]. Therefore, the occurrence of scorch is suspected to be the cause of the lack of yield effect [35,38]. To prevent this, we raised the pH of the H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> spray solution in the present study to 4.5. Thereafter, the application of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> still showed a significantly higher absorption than KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, confirming the higher uptake efficiency of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. This was mainly measurable in the plant regions directly affected by foliar fertilization (Figure 2B). The lower uptake efficiency of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> might be attributable to the phenomenon of crystalline formation on the leaves. At low humidity, an increased accumulation of crystalline residues occurs that prevents the penetration of P into the leaf. This observation and the lower uptake rates of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> compared with other P-containing products have also been reported by McBeath et al. [36] and Reed and Tukey [39]. The formation of crystalline residues in KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> was visible in our study but was probably not as strong as that in the study of McBeath et al. [36], and the differences in uptake were less pronounced. This is attributable to possible differences in relative humidity. A similar effect of crystalline formation was not observed with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, despite an increase in pH. Nevertheless, a high amount of sodium hydroxide is necessary to adjust the pH of the H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> spray solution in order to avoid high leaf damage. Compared with KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> also provides no significant additional yield; hence, our decision to use KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in our second experiment.

We observed no difference in P concentrations in the younger shoots and roots (which were not directly affected or only partially affected by foliar P) between the two P foliar fertilizers. This showed that the percent translocation of foliar fertilized H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> was lower than that for KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, which was also confirmed by the data from the roots and growing corn cob during flowering (Figure 3B). Despite differences in pH during the application of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, this finding was also evident in the studies by Peirce et al. [35] and McBeath et al. [36]. Nevertheless, the assumption of translocation of foliar-applied P to the root by Peirce et al. [31] can be confirmed by the significantly increased P concentrations in the roots in the present investigation (Figures 2B and 3B). The translocation of (foliar-applied) P to the roots is supported by the studies of Koontz and Biddulph [40] and Jeschke et al. [41]. Over time until grain maturity, the significant increase could not be maintained in the two experiments. At flowering, P concentration was still significantly increased only in the leaves below the ear leaf or in the roots and the stem. Thus, P concentration was further enhanced in plant parts that were also present during foliar fertilization (Figure 3B). This indicates that the foliar-applied P is not completely translocated. Moreover, in Peirce et al. [35], translocation of foliar-applied P from treated leaves to other plant parts was reduced in wheat when applied at early tillering compared with the application at flag leaf emergence. According to the authors, this might be attributable to high scorching and the reduced ability of the leaf cells of younger plants to translocate P to other parts of the plant. Possibly, the latter is more likely, since less (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) or even no scorching (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) occurred in our experiment. However, the stress conditions that were experienced by the plant and that were possibly caused by the low incidence of scorch in the treatment with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> could have been the trigger for the lower translocation of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. In addition, compared with Peirce et al. [35], our results showed that scorching is enhanced by very low pH values. On the other hand, P uptake via the roots might also reduce re-translocation at

younger growth stages, and complete re-mobilization might only occur with grain filling and end with leaf senescence. Translocation is probably more effective under severe P deficiency conditions because P uptake through the root is reduced. However, in the study by Fernández et al. [30], no difference in percent translocation was found at different P soil fertilization levels. On the other hand, a significant effect of P foliar application on biomass growth in maize under severe P deficiency has been shown in plants grown under hydroponics by Görlach and Mühling [42]. The findings of no  $(\text{KH}_2\text{PO}_4)$  or significantly lower  $(\text{H}_3\text{PO}_4)$  P concentrations in the growing maize cobs and husk leaves at flowering compared with the control indicate a dilution effect, as the dry matter of growing cobs was significantly increased in the groups with foliar fertilization (Figure 3B). With regard to the P content of the maize cobs and husk leaves, the results showed a significant increase of 43% in P contents for the treatments receiving foliar application (Figure S1). At maturity, no longer were any differences seen in the P concentrations of the individual shoot segments, apart from the grains (Figure 4B), a finding that supports the assumption of only complete translocation of foliar-applied P to grain filling. As described by Grant et al. [2], P re-mobilization within the plant is crucial for the P concentration in the grain and is the reason that P is effectively translocated from senescent plant parts to the grain until the plants have fully ripened [43]. This is in agreement with our results (Figure 4B) and also with other studies of P foliar fertilization in wheat [35,44,45]. The significantly elevated P concentrations in the maize grains can be attributed to P foliar fertilization. As seen at flowering (Figure 3B), the concentrations of P and the contents (Figure S1) in the plant parts affected by foliar fertilization are significantly increased and are only completely translocated into the grain at maturity. This suggests that no substitution of P occurs in the plant as a result of P foliar fertilization. Thus, root P uptake is unlikely to be strongly affected by P foliar fertilization, as also shown by McBeath et al. [36] for wheat. However, no significant effect on P concentration in the grains was determined in experiment 2 (Figure 6D), and we detected no differences in the P concentrations in all other examined plant parts (Figure S2). Furthermore, no significant difference could be measured in the P content at maturity in the plants of experiment 1 (Figure 1C). Consequently, a possible influence on P root uptake cannot be excluded and might occur because of an increased translocation of P from the older leaves into the grain.

Moreover, experiment 2 showed that the nutritional status of the plant has an influence on foliar-applied P absorption. The results suggest that foliar-applied P uptake is increased when the P nutritional status of the plant is lower. This might be mainly because the uptake rate is determined by the difference in concentration of the solutes within the spray solution and the interior of the leaf [26]. A better effect of P foliar fertilization at a lower nutritional status of the plant is consistent with the study of Mosali et al. [29] on wheat. However, Fernández et al. [30] have found that foliar-applied P absorption is higher in wheat plants with a higher soil P supply. The authors suggest that this is related to changes in leaf morphology. Furthermore, we have not detected an effect of P foliar fertilization on starch concentration in either experiment (Figure 6E,F, and Figure S3), only in the group with 200 mg P soil fertilization in experiment 2. The higher content was attributable to an increased grain dry matter and a slightly increased starch concentration, as a result of P foliar fertilization (Figure 6C,E). Similar results were obtained in the study of Leach and Hameleers [46]. Likewise, P foliar fertilization showed a significant effect in the group with 200 mg P soil fertilization with regard to the number of grains per cob, but not in the other groups (Figure 6G and Figure S4). This demonstrates the complexity of the efficacy of foliar-applied P and its dependence on numerous factors.

P foliar fertilization showed a significant dry matter effect at the first harvest date only in experiment 2 in the group with a soil fertilization of 200 mg P. The dry matter effect in experiment 1 at flowering can be attributed mainly to the more advanced development of the maize cob, possibly as a result of P foliar fertilization (Figure 3A). Despite three applications of foliar P fertilizer, concentration effects were not reflected in yield, but foliar fertilization prevented much variability in plant and grain dry weight between replicates

compared with the controls (Figure 1A, Figure 4A, and Figure 6A,B). The absence of a yield effect, despite the increase in P concentration and content, might be attributable to the insufficient translocation of foliar-applied P. As described by McBeath et al. [36], the effect of P foliar fertilization depends on the effectiveness of translocation within the plant. As our results showed, complete translocation also did not occur until grain filling, as discussed above (Figures 3 and 4). On the other hand, the yield effect of foliar P fertilization at the 6th leaf stage in experiment 1 was possibly reduced by the strong P replenishment capacity of the soil (Table 1), which was probably accelerated by warm temperatures and the small soil volume. However, the soil type was deliberately selected to test the effect of foliar P fertilization under regional conditions. Although our experiments were in the range of practical application rates of  $1.24 \text{ kg phosphorus ha}^{-1}$ , the latter could be increased, because of the lack of leaf damage, in order to achieve a possible yield effect. The differences in the dry matter of the leaves above and below the ear leaves might be the result of a lower cob set since the overall number of leaves was the same in all treatments (Figure 3A, data not shown). In general, studies with P foliar applications show inconclusive results, as summarized in the review by Noack et al. [10]. The lack of a positive yield effect has been demonstrated in previous studies of wheat [29,47] and maize [25], whereas other investigations have detected a yield effect as a result of P foliar fertilization [48,49]. Nevertheless, the potential of P foliar application is apparent as revealed by the significant increases in P concentration and content. We assume that foliar P application can be used to bridge short-term P deficiencies in the root zone because P is applied directly to the plant and will not be influenced by any soil parameters. Foliar application from both the abaxial and adaxial leaf surface might improve the success of P foliar fertilization in practical field trials because more P would be available to the plant for the same amount of effort, as can be seen in the study of Görlach and Mühling [42].

## 5. Conclusions

The foliar application of P resulted in a significant increase in P concentration not only in the shoot, but also in the root, irrespective of the year, P form, or nutritional status of the treated maize plants. The increase in P concentration was significantly stronger in plants with no or less P soil fertilization. In plants with P foliar applications, P concentrations remained increased mainly in the plant segments that were also present at the time of applications (root, stem, lower leaves). Complete translocation of the grain occurred during maturity. Therefore, P foliar application is an effective fertilizer technique for the efficient P acquisition by maize plants. In general, foliar P fertilization resulted in a higher consistency in dry matter and grain yield. A possible negative effect of P foliar application on P uptake via the root cannot be excluded. The reason that the significant effect on plant P status resulting from P foliar application does not translate into increased biomass or grain yield remains unclear. However, other mechanisms need to be investigated to explain the lack of maize responses to foliar application of P. Thus, plants respond to P foliar application, but this method might be improved by foliar application on both sides of the leaf.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/agronomy11040727/s1>, Figure S1: Phosphorus content (P) in  $\text{mg plant}^{-1}$  of the investigated parts of the plant were analyzed after harvest at flowering (BBCH 65). Plant material was separated into root, stem, lower leaves (leaves below the ear leaves), ear leaves, upper leaves (leaves above the ear leaves), and maize cobs (+husk leaves). Control without P fertilization (control) or three foliar applications of 200 mM potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) or phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) at 40, 46, and 53 days after sowing. Bars represent means + SD ( $n = 5$ ). Letters indicate significant differences between treatments (ANOVA with Duncan test,  $p \leq 0.05$ ). Figure S2: Phosphorus concentration (P) in  $\text{mg g}^{-1}$  dry matter of (A) stem, (B) lower leaves, and (C) ear + upper leaves. Plants were cultivated with 200 mg P soil fertilization (200) with additional foliar application (FA) (200 + FA) or with 300 mg P soil fertilization (300) with additional foliar application (300 + FA).  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  was used as foliar fertilizer and was applied at 35, 42, and 49 days after sowing. Bars represent means + SD ( $n = 5$ ). Asterisks indicate significant differences between treatments of one fertilization

level (student's t-test,  $p \leq 0.05$ ). Figure S3: (A) Starch concentration in  $\text{mg g}^{-1}$  dry matter, and (B) starch content in  $\text{g plant}^{-1}$ . Control without P fertilization (control) or three foliar applications of 200 mM potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) or phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) at 40, 46, and 53 days after sowing. Bars represent means + SD ( $n = 5$ ). Letters indicate significant differences between treatments (ANOVA with Duncan test,  $p \leq 0.05$ ). Figure S4: Number of grains per maize cob at maturity (BBCH 89). Control without P fertilization (control) or three foliar applications of 200 mM potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) or phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) at 40, 46, and 53 days after sowing. Bars represent means + SD ( $n = 5$ ). Letters indicate significant differences between treatments (ANOVA with Duncan test,  $p \leq 0.05$ ).

**Author Contributions:** Conceptualization, visualization, investigation, laboratory work, collected data, data analysis, and writing the original draft, B.M.G.; investigation, review and editing, J.N.H.; investigation, J.T.M.; project administration, supervision, and review, K.H.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This project was funded by a Federal State Scholarship from Kiel University.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

**Acknowledgments:** Language editing by R. Theresa Jones (freelance language-editor) is gratefully acknowledged. We acknowledge financial support by Land Schleswig-Holstein within the funding programme Open Access Publikationsfonds.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

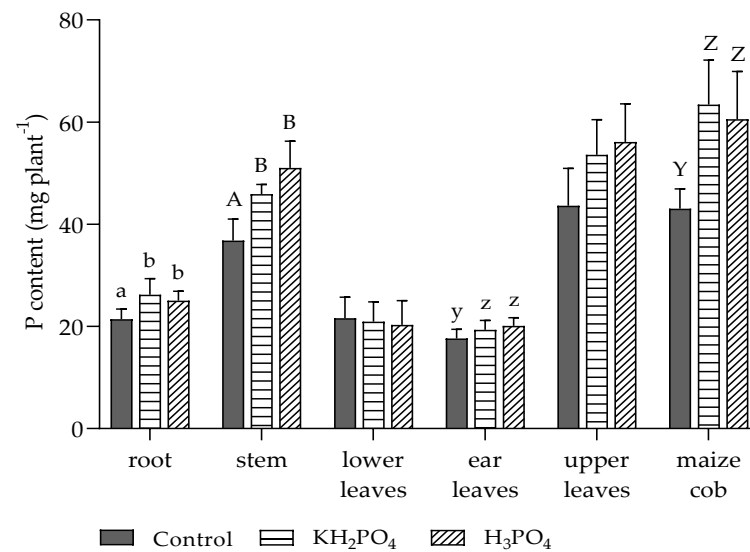
## References

- Schachtman, D.P.; Reid, R.J.; Ayling, S. Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiol.* **1998**, *116*, 447–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Grant, C.A.; Flaten, D.N.; Tomasiewicz, D.J.; Sheppard, S.C. The importance of early season phosphorus nutrition. *Can. J. Plant Sci.* **2001**, *81*, 211–224. [[CrossRef](#)]
- Maathuis, F.J. Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2009**, *12*, 250–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Raghothama, K.G.; Karthikeyan, A.S. Phosphate Acquisition. *Plant Soil* **2005**, *274*, 37–49. [[CrossRef](#)]
- Rodriguez, D.; Andrade, F.; Goudriaan, J. Effects of phosphorus nutrition on tiller emergence in wheat. *Plant Soil* **1999**, *209*, 283–295. [[CrossRef](#)]
- Barry, D.A.J.; Miller, M.H. Phosphorus Nutritional Requirement of Maize Seedlings for Maximum Yield. *Agron. J.* **1989**, *81*, 95–99. [[CrossRef](#)]
- Plénet, D.; Etchebest, S.; Mollier, A.; Pellerin, S. Growth analysis of maize field crops under phosphorus deficiency. I. Leaf Growth. *Plant Soil* **2000**, *223*, 119–132. [[CrossRef](#)]
- Assuero, S.G.; Mollier, A.; Pellerin, S. The decrease in growth of phosphorus-deficient maize leaves is related to a lower cell production. *Plant Cell Environ.* **2004**, *27*, 887–895. [[CrossRef](#)]
- Hawkesford, M.; Horst, W.; Kichey, T.; Lambers, H.; Schjoerring, J.; Møller, I.S.; White, P. Chapter 6—Functions of Macronutrients. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*, 3rd ed.; Marschner, H., Marschner, P., Eds.; Academic Press: Boston, MA, USA, 2012; pp. 135–189. ISBN 9780123849052.
- Noack, S.R.; McBeath, T.M.; McLaughlin, M.J. Potential for foliar phosphorus fertilisation of dryland cereal crops: A review. *Crop Pasture Sci.* **2010**, *61*, 659–669. [[CrossRef](#)]
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. *Statistisches Jahrbuch über Ernährung, Landwirtschaft und Forsten der Bundesrepublik Deutschland 2018*; Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft: Berlin, Germany, 2018; ISBN 978-3-8308-1365-1.
- Statistisches Bundesamt. Anbauflächen, Hektarerträge und Erntemengen Ausgewählter Anbaukulturen im Zeitvergleich. Available online: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Branchen-Unternehmen/Landwirtschaft-Forstwirtschaft-Fischerei/Feldfruech-te-Gruenland/Tabellen/liste-feldfruechte-zeitreihe.html;jsessionid=E85220EAEAA06CA3538A26C0E2CD633F.internet711> (accessed on 11 March 2021).
- Stamp, P. Chilling stress in maize. In *Breeding of Silage Maize*; Dolstra, O., Miedema, P., Eds.; Pudoc: Wageningen, Germany, 1986; pp. 43–50. ISBN 90-220-0895-9.
- Imran, M.; Mahmood, A.; Römheld, V.; Neumann, G. Nutrient seed priming improves seedling development of maize exposed to low root zone temperatures during early growth. *Eur. J. Agron.* **2013**, *49*, 141–148. [[CrossRef](#)]

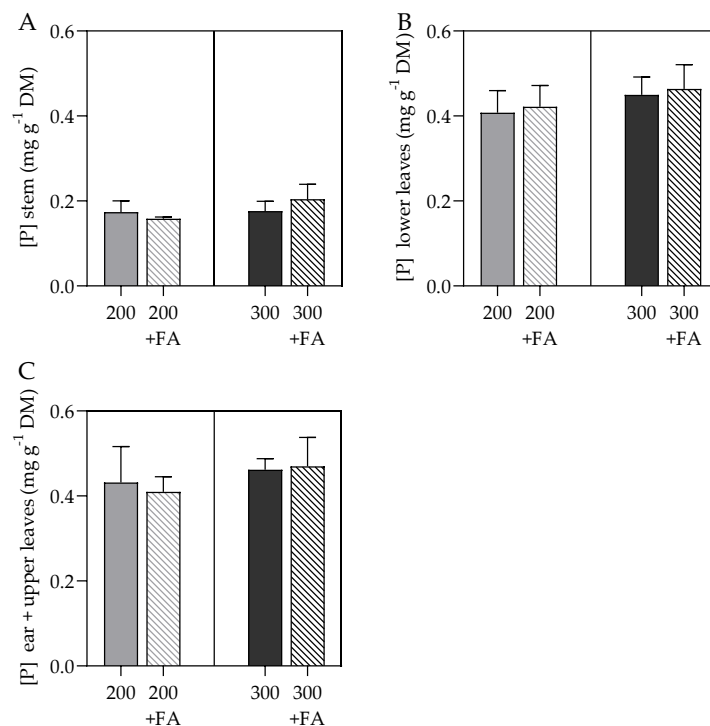


15. Pregitzer, K.; King, J. Effects of Soil Temperature on Nutrient Uptake. In *Nutrient Acquisition by Plants: An Ecological Perspective*; Bassiri Rad, H., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2005; pp. 277–310.
16. Sutton, C.D. Effect of low soil temperature on phosphate nutrition of plants—A review. *J. Sci. Food Agric.* **1969**, *20*, 1–3. [[CrossRef](#)]
17. Hinsinger, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: A review. *Plant Soil* **2001**, *237*, 173–195. [[CrossRef](#)]
18. Bielecki, R.L. Phosphate Pools, Phosphate Transport, and Phosphate Availability. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1973**, *24*, 225–252. [[CrossRef](#)]
19. Vance, C.P.; Uhde-Stone, C.; Allan, D.L. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* **2003**, *157*, 423–447. [[CrossRef](#)]
20. Pedersen, I.F.; Rubæk, G.H.; Sørensen, P. Cattle slurry acidification and application method can improve initial phosphorus availability for maize. *Plant Soil* **2017**, *414*, 143–158. [[CrossRef](#)]
21. Hart, M.R.; Quin, B.F.; Nguyen, M.L. Phosphorus Runoff from Agricultural Land and Direct Fertilizer Effects: A Review. *J. Environ. Qual.* **2004**, *33*, 1954–1972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Sharpley, A.N.; McDowell, R.W.; Kleinman, P.J.A. Phosphorus loss from land to water: Integrating agricultural and environmental management. *Plant Soil* **2001**, *237*, 287–307. [[CrossRef](#)]
23. Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung. *Die Neue Düngeverordnung*, 2nd ed.; Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung: Berlin, Germany, 2018; ISBN 978-3-8308-1323-1.
24. Fernández, V.; Brown, P.H. From plant surface to plant metabolism: The uncertain fate of foliar-applied nutrients. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Girma, K.; Martin, K.L.; Freeman, K.W.; Mosali, J.; Teal, R.K.; Raun, W.R.; Moges, S.M.; Arnall, D.B. Determination of Optimum Rate and Growth Stage for Foliar-Applied Phosphorus in Corn. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **2007**, *38*, 1137–1154. [[CrossRef](#)]
26. Fernández, V.; Eichert, T. Uptake of Hydrophilic Solutes Through Plant Leaves: Current State of Knowledge and Perspectives of Foliar Fertilization. *Crit. Rev. Plant Sci.* **2009**, *28*, 36–68. [[CrossRef](#)]
27. Fernández, V.; Sotiropoulos, T.; Brown, P.H. *Foliar Fertilization: Scientific Principles and Field Practices*; International Fertilizer Industry Association (IFA): Paris, France, 2013; ISBN 979-10-92366-00-6.
28. Arif, M.; Chohan, M.A.; Ali, S.; Gul, R.; Khan, S. Response of wheat to foliar application of nutrients. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* **2006**, *1*, 30–34.
29. Mosali, J.; Desta, K.; Teal, R.K.; Freeman, K.W.; Martin, K.L.; Lawles, J.W.; Raun, W.R. Effect of Foliar Application of Phosphorus on Winter Wheat Grain Yield, Phosphorus Uptake, and Use Efficiency. *J. Plant Nutr.* **2006**, *29*, 2147–2163. [[CrossRef](#)]
30. Fernández, V.; Guzmán, P.; Peirce, C.A.E.; McBeath, T.M.; Khayet, M.; McLaughlin, M.J. Effect of wheat phosphorus status on leaf surface properties and permeability to foliar-applied phosphorus. *Plant Soil* **2014**, *384*, 7–20. [[CrossRef](#)]
31. Peirce, C.A.E.; McBeath, T.M.; Fernández, V.; McLaughlin, M.J. Wheat leaf properties affecting the absorption and subsequent translocation of foliar-applied phosphoric acid fertiliser. *Plant Soil* **2014**, *384*, 37–51. [[CrossRef](#)]
32. Lancashire, P.D.; Bleiholder, H.; Van Den Boom, T.; Langelüddecke, P.; Stauss, R.; Weber, E.; Witzemberger, A. A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Ann. Appl. Biol.* **1991**, *119*, 561–601. [[CrossRef](#)]
33. Jezek, M.; Geilfus, C.-M.; Bayer, A.; Mühling, K.H. Photosynthetic capacity, nutrient status, and growth of maize (*Zea mays* L.) upon MgSO<sub>4</sub> leaf-application. *Front. Plant Sci.* **2015**, *5*, 781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Brandt, M.; Schuldt, A.; Mannerkorpi, P.; Vearasilp, T. Zur enzymatischen Stärkebestimmung im Darminhalt und Kot von Kühen mit hitzestabiler Amylase. *Arch. Anim. Nutr.* **1987**, *37*, 455.
35. Peirce, C.A.E.; McBeath, T.M.; Priest, C.; McLaughlin, M.J. The Timing of Application and Inclusion of a Surfactant Are Important for Absorption and Translocation of Foliar Phosphoric Acid by Wheat Leaves. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 1532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. McBeath, T.M.; Facelli, E.; Peirce, C.A.E.; Arachchige, V.K.; McLaughlin, M.J. Assessment of foliar-applied phosphorus fertilizer formulations to enhance phosphorus nutrition and grain production in wheat. *Crop Pasture Sci.* **2020**, *71*, 795. [[CrossRef](#)]
37. Fageria, N.K.; Filho, M.B.; Moreira, A.; Guimarães, C.M. Foliar Fertilization of Crop Plants. *J. Plant Nutr.* **2009**, *32*, 1044–1064. [[CrossRef](#)]
38. Barel, D.; Black, C.A. Effect of neutralization and addition of urea, sucrose, and various glycols on phosphorus absorption and leaf damage from foliar-applied phosphate. *Plant Soil* **1979**, *52*, 515–525. [[CrossRef](#)]
39. Reed, D.W.; Tukey, H.B. Effect of pH on foliar absorption of phosphorus compounds by chrysanthemum. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1978**, *103*, 337–340.
40. Koontz, H.; Biddulph, O. Factors Affecting Absorption and Translocation of Foliar Applied Phosphorus. *Plant Physiol.* **1957**, *32*, 463–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Jeschke, W.D.; Kirkby, E.A.; Peuke, A.D.; Pate, J.S.; Hartung, W. Effects of P deficiency on assimilation and transport of nitrate and phosphate in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.). *J. Exp. Bot.* **1997**, *48*, 75–91. [[CrossRef](#)]
42. Görlach, B.M.; Mühling, K.H. Phosphate foliar application increases biomass and P concentration in P deficient maize. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **2021**, *183*, 1472. [[CrossRef](#)]
43. Batten, G.; Wardlaw, I.; Aston, M. Growth and the distribution of phosphorus in wheat developed under various phosphorus and temperature regimes. *Aust. J. Agric. Res.* **1986**, *37*, 459–469. [[CrossRef](#)]

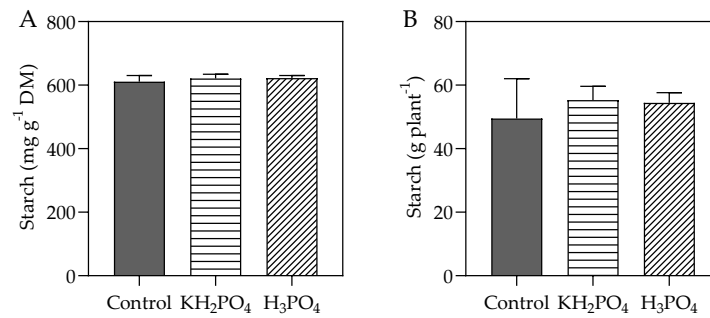
44. Marshall, C.; Wardlaw, I. A Comparative Study of the Distribution and Speed of Movement of  $^{14}\text{C}$  Assimilates and Foliar-Applied  $^{32}\text{P}$ -Labelled Phosphate in Wheat. *Aust. J. Biol. Sci.* **1973**, *26*, 1–14. [[CrossRef](#)]
45. McBeath, T.M.; McLaughlin, M.J.; Noack, S.R. And Wheat grain yield response to and translocation of foliar-applied phosphorus. *Crop. Pasture Sci.* **2011**, *62*, 58–65. [[CrossRef](#)]
46. Leach, K.A.; Hameleers, A. The effects of a foliar spray containing phosphorus and zinc on the development, composition and yield of forage maize. *Grass Forage Sci.* **2001**, *56*, 311–315. [[CrossRef](#)]
47. Froese, S.; Wiens, J.; Warkentin, T.; Schoenau, J. Response of canola, wheat, and pea to foliar phosphorus fertilization at a phosphorus-deficient site in eastern Saskatchewan. *Can. J. Plant Sci.* **2020**, *100*, 642–652. [[CrossRef](#)]
48. Benbella, M.; Paulsen, G.M. Efficacy of Treatments for Delaying Senescence of Wheat Leaves: II. Senescence and Grain Yield under Field Conditions. *Agron. J.* **1998**, *90*, 332–338. [[CrossRef](#)]
49. Sherchand, K.; Paulsen, G.M. Response of wheat to foliar phosphorus treatments under field and high temperature regimes. *J. Plant Nutr.* **1985**, *8*, 1171–1181. [[CrossRef](#)]



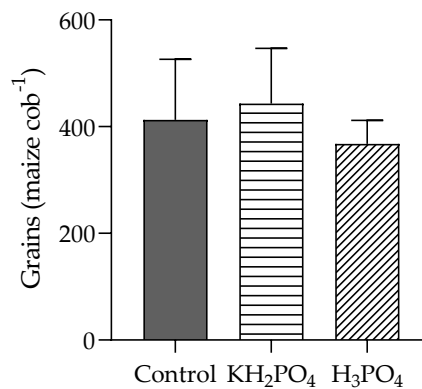
**Figure S1:** Phosphorus content (P) in mg plant<sup>-1</sup> of the investigated parts of the plant were analyzed after harvest at flowering (BBCH 65). Plant material was separated into root, stem, lower leaves (leaves below the ear leaves), ear leaves, upper leaves (leaves above the ear leaves), and maize cobs (+ husk leaves). Control without P fertilization (control) or three foliar applications of 200mM potassium dihydrogen phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) or phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) at 40, 46, and 53 days after sowing. Bars represent means + SD ( $n = 5$ ). Letters indicate significant differences between treatments (ANOVA with Duncan test,  $p \leq 0.05$ ).



**Figure S2:** Phosphorus concentration [P] in mg g<sup>-1</sup> dry matter of (A) stem, (B) lower leaves, and (C) ear + upper leaves. Plants were cultivated with 200 mg P soil fertilization (200) with additional foliar application (FA) (200+FA) or with 300 mg P soil fertilization (300) with additional foliar application (300+FA). KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> was used as foliar fertilizer and was applied at 35, 42, and 49 days after sowing. Bars represent means + SD ( $n = 5$ ). Asterisks indicate significant differences between treatments of one fertilization level (student's *t*-test,  $p \leq 0.05$ ).



**Figure S3:** (A) Starch concentration in mg g<sup>-1</sup> dry matter, and (B) starch content in g plant<sup>-1</sup>. Control without P fertilization (control) or three foliar applications of 200 mM potassium dihydrogen phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) or phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) at 40, 46, and 53 days after sowing. Bars represent means + SD ( $n = 5$ ). Letters indicate significant differences between treatments (ANOVA with Duncan test,  $p \leq 0.05$ ).



**Figure S4:** Number of grains per maize cob at maturity (BBCH 89). Control without P fertilization (control) or three foliar applications of 200 mM potassium dihydrogen phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) or phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) at 40, 46, and 53 days after sowing. Bars represent means + SD ( $n = 5$ ). Letters indicate significant differences between treatments (ANOVA with Duncan test,  $p \leq 0.05$ ).

## Diskussion

## 5.1 Hintergrund

Fehlendes Wissen über die Aufnahme von blattapplizierten Nährstoffen führte zu dem beliebten Spruch 'spray and pray' (Fernández und Eichert 2009). Trotzdem hat sich die Blattdüngung in der Landwirtschaft immer mehr etabliert, da sie im Vergleich zur Bodendüngung potentiell umweltfreundlicher und zielgerichteter ist (Eichert und Fernández 2012). Dies gilt insbesondere im Bereich der Mikronährstoffe, welche von Pflanzen im Vergleich zu Makronährstoffen in geringeren Mengen benötigt werden. Untersuchungen zur Wirkung von Mikronährstoffbehandlungen haben gezeigt, dass die Applikationskonzentrationen bei Wurzelbehandlungen im mikromolaren Bereich liegen, während bei Blattanwendungen Konzentrationen im millimolaren Bereich angewendet werden (Fernández und Eichert 2009). Makronährstoffe wie P wurden bei dieser Art der Düngung jahrzehntelang nicht beachtet, weil die von der Pflanze benötigten P-Düngermengen zu groß sind, um allein durch eine Blattdüngung gedeckt werden zu können (Mosali et al. 2006). In den letzten zwanzig Jahren hat sich die Forschung vor allem auf die zusätzliche P-Blattdüngung, als sogenannte „top-up“ Applikation, zur Qualitätssteigerung von Getreide (v. a. Weizen) in Ländern wie den USA oder Australien fokussiert, wie in dem Review von Noack et al. (2010) zusammenfassend erläutert wird. Jedoch ist wenig über den Einfluss von P-Mangel auf die Aufnahme und Wirksamkeit von Phosphor über das Blatt bekannt (Peirce 2015).

Eine der Hypothesen in der vorliegenden Arbeit lautet, dass eine P-Blattdüngung ein unterstützender Faktor für eine Überbrückung kritischer Phasen oder zur Behebung von witterungsbedingtem P-Mangel sein könnte. Insbesondere bei Kulturpflanzen mit einem hohen P-Bedarf während der Jugendentwicklung (z. B. Mais), bei denen sich ein früher P-Mangel negativ auf den späteren Ertrag auswirkt, könnte sich eine P-Blattdüngung positiv auf den Biomassezuwachs auswirken.

Letztendlich kann festgehalten werden, dass die P-Blattdüngung in unserer heimischen Landwirtschaft noch keine große Rolle spielt. Dies liegt u.a. darin begründet, dass weitestgehend Böden mit guter P-Versorgung sowie ein wachstumsfreundliches Klima vorliegen. Diese Gründe ermöglichen eine gute Pflanzenentwicklung ohne die Notwendigkeit einer zusätzlichen Blattdüngung. Klimatische Veränderungen (Trockenheit und Kälte im Frühjahr) und die Novellierungen der Düngeverordnung führen aber auch in Deutschland langsam zu einem Umdenken in der Düngemittelapplikation.

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit dem Thema der P-Blattdüngung, um ihre Wirksamkeit in Maispflanzen mit akutem P-Mangel zu bestimmen. Die wissenschaftlichen Schwerpunkte liegen dabei in der Verteilung des blattapplizierten Phosphors auf die subzellulären Kompartimente Apoplast und Symplast, auf der Translokation innerhalb der Pflanze, auf der Entwicklung der Biomasse sowie auf dem Einfluss der Konzentration der Spritzbrühe auf die Aufnahme und die notwendige Applikationshäufigkeit.

## 5.2 Hochgradiger Phosphormangel bei Mais hat keinen Einfluss auf die Aufnahme von blattappliziertem Phosphat

Die großen Unterschiede in der Trockenmasse zwischen den Pflanzen der Gruppe mit optimaler Phosphorversorgung und denen mit unzureichender P-Versorgung (Kapitel 1, Fig. 1, 2; Kapitel 2, Fig. 1) zeigen sehr deutlich die zentrale Bedeutung von P als essentiellen Makronährstoff auf. Die eigenen Ergebnisse in der hier vorgelegten Arbeit unterstreichen die Notwendigkeit neue geeignete P-Düngestrategien zu entwickeln, um trotz der Veränderungen in der Düngeverordnung eine hohe Pflanzenproduktivität zu gewährleisten. Zum Beispiel zeigt sich nach zwei Wochen unter P-Mangelbedingungen, dass die P-Reserven der Pflanzen aufgebraucht sind und das Wachstum der Pflanzen um ca. 20% verringert ist (Kapitel 2, Fig. 1). Im Verlauf der folgenden Woche steigen die Unterschiede in der Trockenmasse auf 50% (im Vergleich zur Kontrollgruppe mit ausreichender P-Versorgung) an. Neben den typischen rotvioletten bis purpurnen Verfärbungen durch verstärkte Anthocyanbildung (Vance et al. 2003) ist dies insbesondere an einer verringerten Sprossgröße erkennbar (Kapitel 1, Fig. 1, 2; Kapitel 2, Fig. 1). Ebenfalls ist die Entwicklung neuer Blätter verzögert und eine verkleinerte Blattfläche kann in den Versuchen unter P-Mangel in Kapitel 1 und 2 festgestellt werden. Die Ergebnisse bestätigen die Befunde aus den Studien von Plénet et al. (2000) sowie Assuero et al. (2004). Wie in den Ergebnissen der eigenen Untersuchung aus Kapitel 1 belegt wird, kann eine dreimalige Blattapplikation von P einem P-Mangel entgegenwirken. Dies ist insbesondere an der Sprossgröße, Trockenmasse und der Anzahl gesunder Blätter verifizierbar und kann vor allem auf die positive Entwicklung der Pflanzen im Bereich des alten Sprosses (Stängel und vollentwickelte Blätter) zurückgeführt werden (Kapitel 1, Fig. 1, 2).

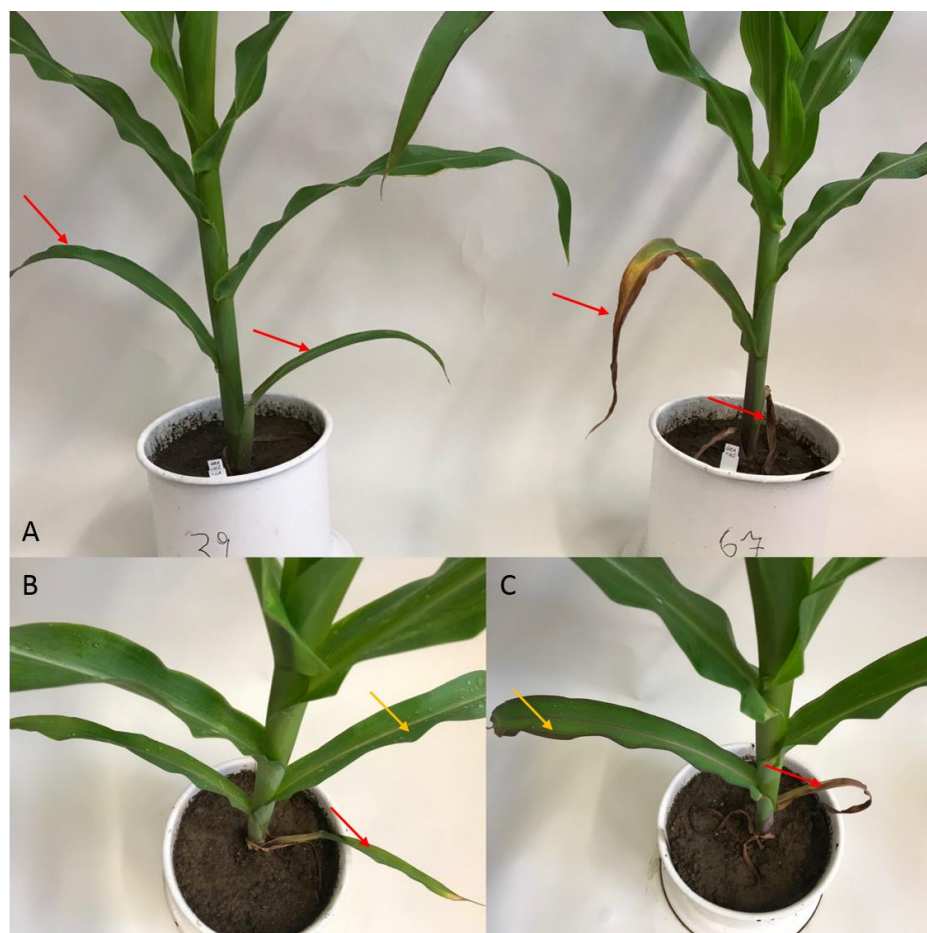
Infolge der Blattapplikationen ist das Schossen der Pflanzen mit 50 bis 60 cm Unterschied in der Pflanzenhöhe im Vergleich zur P-Mangelkontrolle stärker ausgeprägt gewesen. Im jungen Spross dagegen ist kein positiver Effekt durch die Blattdüngung auf die Trockenmasse zu

dokumentieren (Kapitel 1, Fig. 2C). Im Vergleich zur höheren Trockenmasse der Pflanzen mit einer Wiedergabe von P über die Wurzeln zeigt sich, dass die P-Versorgung durch blattappliziertes P für kürzere Dauer einen positiven Effekt auf das pflanzliche Wachstum hat (Kapitel 1, Fig. 2). Dies wird durch die Abnahme der P-Translokation in der Gruppe mit P-Blattdüngung im Vergleich zur Gruppe mit wiedereinsetzender Wurzeldüngung sichtbar (Kapitel 2, Fig. 2C, F). Auch in der Studie von Arsic et al. (2020) zeigt sich eine Abnahme in der Translokation von blattappliziertem P in Gerstenpflanzen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den ausbleibenden Effekt in der Trockenmasse im jüngeren Spross wäre, dass die Blätter noch nicht vollständig entwickelt sind und erst mit vollständiger Blattentwicklung der Kontrollgruppe mit P-Mangel überlegen gewesen wären. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass unter P-Mangel die Blattausdehnung gehemmt ist (Fredeen et al. 1989; Plénet et al. 2000). Hervorgerufen wird dies durch eine verminderte Zellproduktions- und Zellteilungsrate, aber auch die durchschnittliche Länge der Zellteilungszone ist unter P-Mangel verringert (Assuero et al. 2004). Unter Berücksichtigung der P-Konzentrationen bzw. -Gehalte im jungen Spross aus Kapitel 1 und 2 kann man davon ausgehen, dass die Blätter der Blattdüngungsvarianten mit weiterem Wachstum eine größere Blattausdehnung aufweisen werden als die Blätter von Pflanzen der P-Mangelgruppe. Zusätzlich ist der Zuwachs der Trockenmasse des Sprosses in den Gruppen mit P-Blattdüngung im Vergleich zur Kontrolle mit P-Mangel größer als der Zuwachs in der Wurzel Trockenmasse und führt zu einer Verschiebung des Spross-Wurzel-Verhältnisses zugunsten des Sprosses (Kapitel 1, Fig. 2). Dieses Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass unter P-Mangel das Wurzelwachstum zur besseren Nährstofferschließung gestärkt wird. Neben anorganischem P (Kapitel 1, Fig. 3D; Kapitel 2, Fig. 3D) werden vor allem Photosyntheseprodukte zur Aufrechterhaltung des Wurzelwachstums aus dem Spross in die Wurzeln verlagert (Fredeen et al. 1989; Cakmak et al. 1994). Nach 48h kann noch kein signifikanter Effekt durch die P-Zugabe über das Blatt oder die Wurzel in Kapitel 2 bestimmt werden. Jedoch ist die Wurzel Trockenmassebildung in der P-Mangelkontrolle um 26% erhöht (Kapitel 2, Fig. 1E).

Zusätzlich ist an den Pflanzen der Blattdüngungsvarianten eine höhere Anzahl an vitalen Blättern im alten Spross (Daten nicht gezeigt) bzw. eine zeitliche Verzögerung des Absterbens von Blättern nachweisbar (Fig. 5.1). Aus diesen Befunden lässt sich ableiten, dass die Seneszenz der älteren Blätter in der Negativkontrolle infolge einer P-Blattdüngung verzögert wird, was durch die signifikant höheren P-Konzentrationen und P-Gehalte in Spross und



Wurzel bestätigt wird (Kapitel 1; 2). Gleiches wird von Benbella und Paulsen (1998) an Weizenpflanzen im Feld nachgewiesen. Für die Seneszenz ist die P-Homöostase der Gesamtpflanze ausschlaggebend, welche die P-Konzentration in den jungen Blättern auch unter P-Mangel aufrechtzuerhalten versucht, um deren Wachstum zu gewährleisten (Mimura 1995). Entscheidend dafür ist die hohe Phloemmobilität von P (Fernández und Brown 2013), die eine generelle Remobilisierung von P aus alten vollentwickelten Blättern in junge wachsende Blätter innerhalb der Pflanze ermöglicht (Biddulph et al. 1958; Greenway und Gunn 1966). Diesen gesamtheitlichen Prozess können ebenfalls Mimura et al. (1996) an jungen Gerstenpflanzen mit P-Mangel nachweisen. Durch diesen Mechanismus kommt es bei P-Mangelpflanzen zu einem Absterben der älteren Blätter (Fig. 5.1).



**Figure 5.1:** Verzögerung der Blattseneszenz (roter Pfeil) und Anthocyanverfärbung (orangener Pfeil) aufgrund von Phosphat-Blattdüngung bei Maispflanzen unter Phosphormangelbedingungen. (A) Vergleich zwischen P-Blattdüngung (links) und ausbleibender Blattdüngung (rechts), (B) Maispflanze mit P-Blattdüngung und (C) Maispflanze ohne Blattdüngung.

Neben Phosphor (Fernández et al. 2014b) kann auch z. B. für Bor (Will et al. 2011) oder Zink (Li et al. 2018b) keine oder nur eine geringe Absorption des blattapplizierten Nährstoffs

nachgewiesen werden. Dies ist unabhängig von der Kulturpflanze. Trotz des Nährstoffmangels, welcher zu einer Veränderung der Blattmorphologie und Absorption führen kann, können mit den in dieser Arbeit ermittelten Daten die Annahmen bestätigt werden, dass eine P-Blattapplikation in frühen Entwicklungsstadien (Noack et al. 2010) bzw. unter P-Mangelzuständen (McBeath et al. 2020) bei Mais in Hydrokultur einen positiven Effekt auf die Biomasseentwicklung hat. Die Ergebnisse aus Kapitel 1 zeigen, dass 90% des Gesamt-P in den Maispflanzen auf die Blattdüngung zurückzuführen ist und es infolgedessen zu einem positiven Effekt auf die Entwicklung von Maispflanzen mit akutem P-Mangel kommt. Somit kann postuliert werden, dass die Zunahme an Biomasse bei hochgradigem P-Mangel größer ist. Dies zeigt, dass der Einsatz der P-Blattdüngung in Mais sinnvoll wäre und das Einsatzspektrum der P-Düngung in Mais vergrößert.

### 5.3 Die Aufnahme von blattappliziertem Phosphor wird nicht durch den Apoplasten beeinflusst

In dem Review von Fernández und Brown (2013) wird postuliert, dass auf das Blatt applizierte Nährstoffe durch die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Apoplasten in ihrer Bewegung bzw. Aufnahme in den Symplasten beeinflusst werden können. Dies wird darauf zurückgeführt, dass der Apoplast ein heterogener Bereich ist, der eine Diffusionsbarriere darstellt und eine entscheidende Rolle im Ionenaustausch einnimmt (Fernández und Brown 2013). Daraus wird abgeleitet, dass die Eigenschaften des Apoplasten eine Auswirkung auf die Aufnahme von blattgedüngten Nährstoffen haben können. Insbesondere das Vorhandensein verschiedenster Ionen im Apoplasten könnte einen Einfluss auf die Bewegung von aufgenommenen Nährstoffen haben (Lee et al. 2012). Letztendlich ist über die Bewegung von Nährstoffen über den Apoplasten hin zum Symplasten wenig bekannt und die Aufnahme von Nährstoffen sowohl in den als auch aus dem Apoplasten noch nicht hinreichend untersucht (Sattelmacher 2001).

Es wird angenommen, dass eine P-Blattapplikation jedoch nur dann zu einer Erhöhung der Trockenmasse (also des Ertrags) führen kann, wenn P über den Apoplasten in den Symplasten der Mesophyllzellen des Blattes aufgenommen wird. Dort kann P in den metabolisch aktiven Kompartimenten verwertet werden oder über das Phloem in wachsende Pflanzenteile wie junge Blätter, Früchte oder Körner verlagert werden (Bukovac und Wittwer 1957). Wie von Sattelmacher et al. (1998) zusammengefasst, hat sich in älteren Studien gezeigt, dass wenn

die Aufnahme von Nährstoffen in den Blattapoplasten die Aufnahme in den Symplasten übersteigt, es zu einer Akkumulation von Nährstoffen im Blattapoplasten kommen kann. Aufgrund dieser Erkenntnisse werden der apoplastische und der symplastische Raum in der vorliegenden Studie separat voneinander untersucht.

Während im Symplasten die Konzentration um mehr als  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  ansteigt, erhöht diese sich im Apoplasten erst nach 24 h um ca.  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  (Kapitel 2, Fig. 2). Dabei erfolgt eine rasche Aufnahme von blattappliziertem P in die Mesophyllzellen, unabhängig von der behandelten Blattseite (Kapitel 1, Fig. 5). So kann P unmittelbar von den Pflanzen für ihren Stoffwechsel genutzt werden. Daraus lässt sich rückschließen, dass das kurzfristig hohe Angebot an blattappliziertem P nicht durch Bindungen innerhalb des Apoplasten beeinflusst wird und nahezu vollständig in die Epidermis- und Mesophyllzellen aufgenommen wird. Wie bei einer P-Wiederzugabe über die Wurzeln (Kapitel 2, Fig. 2; Mimura et al. 1990; 1992) übernimmt der Apoplast auch bei einer Blattdüngung eine transiente Speicherfunktion mit ansteigender P-Konzentration im Zellinneren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Wirkung des aufgenommenen P als sehr effizient angesehen werden kann, wodurch die positive Wirkung einer Blattdüngung auf den Zuwachs in der Biomasse in Kapitel 1 erklärt werden kann.

Morcuende et al. (2007) zeigen in ihrer Studie eine rasche Reversibilität auf allen Ebenen infolge einer P-Wiederzugabe über die Wurzeln bei P-Mangelpflanzen. Insbesondere die Konzentrationen von ATP und Hexosephosphaten erholen sich innerhalb von Minuten. Außerdem kommt es zu einem raschen Absinken des unter P-Mangel ansteigenden Tricarbonsäurespiegels, was auf eine schnelle Induktion der Glykolyse hinweist. Dies führt zum Abbau von Kohlenhydraten mit anschließender Energiegewinnung im Citratzyklus für das pflanzliche Wachstum (Heldt und Piechulla 2015). Auch die Repression von Genen (DNA-/RNA-Synthese) wird aufgehoben bzw. die verstärkte Induktion von Genen, die für die Galakto/Sulfolipid-Synthese und den Abbau von Phospholipiden benötigt wird. Des Weiteren zeigt diese Arbeit, dass infolge einer P-Blattdüngung nicht nur die Expression von *Zm PHT1*  $\text{P}_i/\text{H}^+$  Co-Transportern verringert wird, sondern auch die Aufnahme von weiteren Nährstoffen wie Nitrat und Magnesium induziert wird (Kapitel 1, Fig. 4B; Kapitel 2, Fig. 4, 5). Ebenso kommt es infolge einer ansteigenden P-Konzentration zur Verringerung der Translokation von organischen Säuren innerhalb der Pflanze (Kapitel 2, Fig. 6). Die Veränderungen dieser Prozesse veranschaulichen, dass infolge einer P-Blattdüngung der Stoffwechsel der Pflanzen wieder angeregt wird.

Die rasche Aufnahme von blattappliziertem P kann auf die P-Homöostase innerhalb der Pflanze zurückgeführt werden. Nach den Autoren Lauer et al. (1989a) ist unter P-Mangel der größte Anteil an anorganischem P in den metabolisch aktiven Kompartimenten der Zelle, dem Cytosol und den Chloroplasten, zu finden. Daher ist anzunehmen, dass vorerst die cytoplasmatische P-Konzentration infolge einer P-Blattdüngung erhöht wird. Außerdem wird die rasche Aufnahme wahrscheinlich auch durch diverse Eigenschaften (Dominanz freier Carboxylgruppen, White 2012) des Apoplasten begünstigt. Die in unserer Untersuchung gefundene erhöhte Expression der Plasmamembran *Zm PHT1* P<sub>i</sub>/H<sup>+</sup> Co-Transporter (Kapitel 2, Fig. 4) unterstützt ebenfalls die Annahme einer raschen Aufnahme von blattapplizierten P-Ionen in die Mesophyllzellen zur Erhöhung der P-Konzentration im Cytosol. Pflanzen reagieren unter anderem auf P-Mangel mit der Regulation verschiedener PSR-Gene (phosphate-starvation-response) (Luan et al. 2017). Dazu gehört nicht nur die Remobilisierung von P aus älteren Blättern, sondern auch die verstärkte Expression von P-Transportern (Raghothama 1999). Eine raschere Aufnahme aus dem Blattapoplasten über die Plasmamembran in den Symplasten zeigen Mimura et al. (1990; 1992) nach der Zugabe von P über die Wurzeln an P-Mangelpflanzen im Vergleich zu Kontrollvarianten. Dies zeigt sich auch in den Ergebnissen aus Kapitel 2 infolge einer P-Blattdüngung (Fig. 2).

Außerdem konnten Arsic et al. (2020) an Blättern von jungen Gerstenpflanzen mit P-Mangel eine Aufnahme sowohl über die Cuticula als auch über die Stomata nachweisen. Die größte Akkumulation findet jedoch in den sogenannten Faserzellen statt. Deshalb schließen die Autoren darauf, dass über ebendiese Faserzellen die Hauptpenetration und über die Bündelscheide der weitere Transport in Richtung Leitbündel erfolgt. Diese Faserzellen befinden sich entlang der Mittelrippe und der Blattadern und sind mit den erweiterten Bündelscheiden verbunden. Zudem können mehrere Studien den Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Stomata (Knoche und Bukovac 1992; Eichert und Burkhardt 2001; Eichert und Goldbach 2008) oder Trichomen bzw. Narben von Trichomen (Fernández et al. 2014a; Schreel et al. 2020) und der Aufnahme von auf der Blattoberfläche abgelagertem Wasser/Nährstoffen aufzeigen. Aus diesen Erkenntnissen und den Ergebnissen der Studie aus Kapitel 1 (Fig. 5) kann aus der Sicht des Autors abgeleitet werden, dass die Aufnahme von blattappliziertem P unter P-Mangelsituationen wahrscheinlich über verschiedene Aufnahmepfade erfolgen kann. Diese Annahme wird durch die blattmorphologischen

Unterschiede zwischen der abaxialen (mehr Stomata) und adaxialen (mehr Trichome) Blattseite bekräftigt (Driscoll et al. 2006; Martin und Glover 2007; Revilla et al. 2016).

## 5.4 Die Translokation von blattappliziertem Phosphor begünstigt die Wirkung einer Phosphor-Blattdüngung

Wird Phosphor über die Wurzeln aufgenommen, so wird es vor allem über das Xylem zu den jüngeren Blättern transportiert und in deren Mesophyllzellen aufgenommen. Dort wird P zum Teil metabolisiert und der größte Teil in den Vakuolen zwischengespeichert (Bieleski und Laties 1963; Mimura 1999). Bei einer Blattapplikation muss der Nährstoff aber nicht von der Wurzel, sondern von dem Blatt in die restliche Pflanze verlagert werden. Neben der raschen Aufnahme von blattappliziertem P in den ersten 6 h in den Symplasten der Mesophyllzellen, zeigt sich auch eine rasche Translokation aus den Blättern in die restliche Pflanze (Kapitel 2, Fig. 2C). Nach 6 h ist die Konzentration an  $\text{PO}_4\text{-P}$  in den Leitbündeln (Phloem-/Xylemsaft) infolge einer Blattdüngung im Vergleich zu den Kontrollgruppen oder einer Wiedertzugabe über die Wurzel am höchsten (Kapitel 2, Fig. 2C, F). Das über das Blatt aufgenommene P wird vor allem in die Wurzeln und den wachsenden Spross verlagert, den sogenannten Sinks (Kapitel 2, Fig. 3). Dies bestätigt die signifikant erhöhten P-Konzentrationen (70 %), -Gehalte (50%) bzw. Trockenmassen (27%) der Wurzeln in Hydrokultur in Kapitel 1 im Vergleich zur P-Mangelkontrolle (Fig. 2, 3). Nach den Ergebnissen aus Kapitel 2 kann vor allem der wachsende Spross als Hauptsink betrachtet werden. Während im 4. Blatt, dem alten Spross und der Wurzel keine oder eine eher negative Korrelation zwischen P-Konzentration und Zeit bestimmt werden konnte, zeigte sich im wachsenden Spross eine positive Korrelation (Kapitel 2, Fig. 3). Je älter die Blätter, desto höher die Verlagerung von blattappliziertem P (Koontz und Biddulph 1957).

Zwar erfolgt die Translokation von P vor allem innerhalb der ersten 24 h, aber im Zeitverlauf von 48 h kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die P-Konzentrationen im jungen Spross weiter ansteigen und gleichzeitig im alten Spross langsam abnehmen (Kapitel 2, Fig. 3B, C). Die Translokation ist nach 48 h immer noch um den Faktor sieben im Vergleich zur P-Mangelkontrolle erhöht (Kapitel 2, Fig. 2C). Dies lässt auf eine stetige Translokation von P aus vollentwickelten Blattetagen in die wachsenden Blattetagen rückschließen. In der Studie von Arsic et al. (2020) wird nach vier Tagen der kritische Wert für physiologischen P-Mangel von  $2 \text{ mg g}^{-1} \text{ TM}$  (Carstensen et al. 2019) in der Gerste wieder unterschritten und nach sieben

Tagen ist die P-Konzentration des letzten vollentwickelten Blattes wieder auf dem Niveau der P-Mangelkontrolle. Im Gegenzug bleibt sie im wachsenden Blatt weiterhin über dem kritischen Wert. Auch in Kapitel 1 werden die höchsten Konzentrationen an P im jüngsten Blatt gemessen.

Dies zeigt, dass es auch in den Pflanzen aus Kapitel 1 eine Translokation in den jungen Spross gegeben haben muss. Signifikant erhöhte P-Konzentrationen in einem nicht durch die Blattdüngung betroffenen jüngsten Blatt belegen diese Annahme (Anhang, Fig. 1). Dies bestätigt eine schnelle systemische Wirkung einer P-Blattdüngung.

Insbesondere unter Nährstoffmangel ist eine Zirkulation von Nährstoffen im Phloem und Xylem innerhalb der Pflanze wesentlich für das pflanzliche Wachstum (Marschner et al. 1997). Die Ergebnisse in Kapitel 2 zeigen, dass die Translokation von blattappliziertem P innerhalb der Pflanze zum größten Teil unmittelbar in den ersten 24 h nach einer Blattdüngung erfolgt und die Translokation negativ mit der Zeit korreliert ist (Fig. 2C, F). Arsic et al. (2020) beweisen im Bereich der Leitbündel eine starke Akkumulation von blattappliziertem P nach 24 h, was auf eine rasche Bewegung des blattapplizierten P in Richtung des Phloems hindeutet und die Ergebnisse der erhöhten  $PO_4$ -P-Konzentrationen in den Leitbündeln erklärt (Kapitel 2, Fig. 2C). In der eigenen Arbeit stammt ca. 50% des P-Gehaltes in der Wurzel aus der P-Blattdüngung (Kapitel 1, Tab. 2). Generell wird nicht mehr P in die Wurzel verlagert und es gibt keinen Unterschied zwischen den drei verwendeten Blattdüngungsvarianten (Kapitel 1, Fig. 3D, H). Diese Befunde lassen vermuten, dass infolge der P-Blattdüngung das P-Konzentrationsniveau in der Pflanze wahrscheinlich einen kritischen Wert überschritten hat, so dass ein Teil des in die Wurzeln verlagerten Phosphors im Zuge der P-Homöostase auf der Ebene der Gesamtpflanze für ein weiteres Wachstum zurück in den Spross verlagert wird.

Nach Luan et al. (2017) kommt es unter P-Mangel zur Expression von Fernsignalen, die in die Wurzel verlagert werden und dort dafür sorgen, dass die E2-Konjugase kodiert wird, welche eine Komponente der Mangelsignaltransduktionskette von anorganischem Phosphat ist und die P-Allokation zwischen Spross und Wurzeln reguliert (Aung et al. 2006; Bari et al. 2006). Dies hat zur Folge, dass es zu einer verstärkten Expression von Transportern kommt, die für die Aufnahme in die Wurzel und die Beladung des Xylems (Nährstofftransport in den Spross) verantwortlich sind (Kapitel 2, Fig. 4). Die in Kapitel 2 (Fig. 3) dieser Arbeit dokumentierte Abnahme und die daraufhin nach 6h relativ konstant bleibende P-Konzentration in den Wurzeln bestätigen die Ergebnisse aus Kapitel 1. Dies bekräftigt die Hypothese, dass es zu

einem Rücktransport von in die Wurzel verlagertem P in den Spross kommt, wenn ein kritischer Wert überschritten wird (Kapitel 2, Fig. 3D). Auch Peng und Li (2005) zeigen an Weizenpflanzen mit beginnendem P-Mangel, den Prozess einer verstärkten Remobilisierung von P aus den älteren vegetativen Organen über das Phloem in die Wurzeln, mit anschließender Wiederbeladung des Xylems und Rücktransport zum Sink.

Ebenfalls belegen die erhobenen Daten dieser Arbeit, dass die Konzentrationen in den Blattdüngungsvarianten nicht auf das Niveau der Mangelpflanzen zurücksinken, wodurch die Pflanzen länger von den P-Reserven einer Blattdüngung zehren können (Kapitel 1, 3).

Im Vergleich zu den nur einmal behandelten 21 Tage alten Gerstenpflanzen in der Studie von Arsic et al. (2020) kann in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass wahrscheinlich deutlich mehr P aufgenommen wird. Dies könnte unter anderem auf die wiederkehrende Blattdüngung, aber auch auf den zunehmenden Blattflächenindex zurückgeführt werden.

## 5.5 Eine Verdopplung der Phosphor-Applikationskonzentration reduziert die Applikationshäufigkeit bei gleichbleibender Effizienz

Entscheidend für die Blattdüngung ist die effiziente Nutzung dieser Düngungstechnik, also mit dem geringsten Aufwand den größten Nutzen zu erzielen. Dies bedeutet, dass die Anzahl an Applikationsterminen auf das Nötigste beschränkt werden sollte. Jeder einzelne Applikationstermin ist aus ökonomischer Sicht kostbar, da er Personal (-Zeit) und Material in Anspruch nimmt. So kann in dieser Arbeit nicht nur die Aufnahme von blattappliziertem P und dessen effektive Translokation unter P-Mangel, sondern auch das Potential der Einsparung einer Applikation durch Konzentrationserhöhung gezeigt werden (Kapitel 1, Fig. 3). Höhere Absorptionsraten lassen sich durch den Konzentrationsgradienten zwischen Applikationslösung und der Konzentration innerhalb des Blattes erklären. Nach dem Fick'schen Gesetz ist der Konzentrationsgradient die treibende Kraft für die Diffusion (Fernández und Eichert 2009). Unter Berücksichtigung der Konzentrationen für  $\text{PO}_4\text{-P}$  im Apoplasten mit weniger als  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  (Kapitel 1, Fig. 5A; Kapitel 2, Fig. 2A) und den Konzentrationen der Applikationslösungen (50, 100 bzw.  $200 \text{ mmol L}^{-1}$ ) ist ein großer Konzentrationsgradient gewährleistet, welcher zu einer Aufnahme von P in das Blatt führt. Daraus lässt sich laut der Autoren Fernández und Eichert (2009) schließen, dass die Aufnahmerate hauptsächlich durch die Konzentration in der Applikationslösung auf der Blattoberfläche bestimmt wird. Je höher die Lösungskonzentration, desto mehr P kann in

kürzerer Zeit aufgenommen werden. Um einen hohen Konzentrationsgradienten aufrechtzuerhalten, muss der gelöste Nährstoff zum einen eine hohe Mobilität im Blattapoplasten und zum anderen eine rasche Aufnahme in die Epidermis- und Mesophyllzellen aufweisen (Fernández und Eichert 2009). Dies wird in den Untersuchungen der vorgelegten Studie aus Kapitel 2 bewiesen. Andererseits ist der Konzentrationsgradient dynamisch, da unmittelbar nach der Applikation der Nährstofflösung Wasser verdunstet und die Konzentration dadurch weiter ansteigt.

Für jeden gelösten Stoff gibt es einen definierten Schwellenwert für die relative Luftfeuchtigkeit, oberhalb dessen die Lösung flüssig bleibt und unterhalb dessen sie austrocknet. Dieser Schwellenwert wird als Deliqueszenzpunkt bezeichnet (Burkhardt und Eiden 1994; Fernández et al. 2017). Der Deliqueszenzpunkt ist von den hygrokopischen Eigenschaften des gelösten Stoffes abhängig. Befinden sich der Deliqueszenzpunkt und die relative Luftfeuchtigkeit in einem Gleichgewicht, so ist die Konzentration des gelösten Stoffes am größten. Übersteigt die relative Luftfeuchtigkeit den Deliqueszenzpunkt, so nimmt die Konzentration ab. Fällt sie jedoch unter den Deliqueszenzpunkt, so trocknet der gelöste Stoff vollständig ein und eine Aufnahme bleibt aus (Fernández et al. 2017). Daher begünstigen ein hoher Deliqueszenzpunkt und eine niedrige Luftfeuchtigkeit das rasche Austrocknen der Applikationslösung, wodurch die Diffusion in das Blatt gestoppt wird. Außerdem ist nach Schönherr (2000) auch bei niedriger Luftfeuchtigkeit die Durchlässigkeit der Cuticula, aufgrund geringerer Radien der 'wässrigen Poren', herabgesetzt. Die Abhängigkeit von der umgebenden Luftfeuchte für die Aufnahme von Nährstoffen, die auf das Blatt appliziert werden, wird in vorherigen Studien beobachtet (Allen 1960; Eichert et al. 1998; Schönherr 2000). Die kaum steigende Gesamtkonzentration in den Maispflanzen mit P-Blattapplikation nach den ersten 6 h (Kapitel 2, Fig. 2, 3) und das schnelle Eintrocknen der Applikationslösung innerhalb der ersten 20 Minuten sowie einem Deliqueszenzpunkt von 95 % für  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Mauer und Taylor 2010) zeigen, dass vor allem die relative Luftfeuchte und der Deliqueszenzpunkt die Aufnahmerate begrenzen. In Kombination mit einer Luftfeuchte von maximal 60 % in den Morgenstunden war die Penetrationszeit des gelösten P stark begrenzt. Letztendlich ist die Beziehung zwischen der Konzentration der Applikationslösung und der Aufnahmerate nicht gänzlich geklärt (Fernández und Eichert 2009). Die Autoren erörtern in ihrem Review, dass es sowohl Studien gibt, die eine positive (Schönherr 2001) Korrelation zwischen steigender Konzentration der Applikationslösung und Aufnahmeraten dokumentieren, als auch Studien



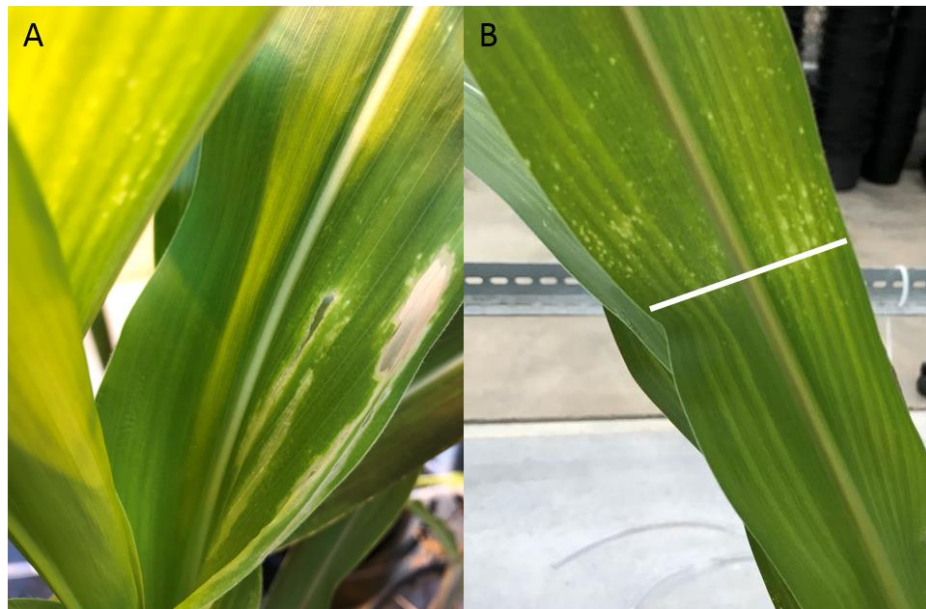
die eine negative (Schlegel et al. 2006) Korrelation zwischen steigender Konzentration der Applikationslösung und Aufnahmeraten nachweisen.

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse zeigen mit steigendem Konzentrationsgradienten eine höhere Penetrationsrate (Kapitel 1). Es zeigt sich, dass mit steigender Konzentration der Applikationslösung auch die absolute, nicht aber die relative Aufnahmerate steigt (Kapitel 1, Tab. 2). Ein Rückgang der relativen Penetrationsraten mit höheren P-Konzentrationen könnte zusätzlich auch auf eine fortschreitende Sättigung der Aufnahmeorte zurückzuführen sein (Chamel 1988). Auch in anderen Studien zeigt sich, dass höhere P-Konzentrationen bei gleichzeitig höherer Applikationsmenge zu einer höheren P-Aufnahmerate in Mais (Girma et al. 2007) und Weizen führen (Peirce et al. 2014), bei gleichzeitig verringerter Effizienz. Somit muss bei steigender Konzentration mit Einbußen in der Effizienz des Düngers gerechnet werden. Erhöht sich jedoch nur die P-Konzentration in der Applikationslösung und die applizierte Gesamtmenge bleibt gleich, kann kein Absinken der Effizienz bzw. der P-Konzentration und der Trockenmasse bestimmt werden (Kapitel 1, Fig. 2, 3; Tab. 2). Außerdem verringert sich nach Peirce (2015) die relative Translokation mit Erhöhung der P-Konzentration der Applikationslösung, die absolute Translokation bleibt aber immer noch höher.

Da P als Makronährstoff in größeren Mengen von Pflanzen benötigt wird, sollte für eine effektive Blattdüngung eine höhere Konzentration mit einer etwas geringeren Effizienz eingesetzt werden, da die Menge an blattappliziertem P auf den Hektar gesehen, relativ gering ist ( $2-3 \text{ kg ha}^{-1}$ ).

Übersteigt die relative Luftfeuchtigkeit, z. B. in der Nacht oder in den Morgenstunden, wieder den Deliqueszenzpunkt, so kann es zu einer erneuten Verflüssigung des applizierten Stoffes kommen. Dies ermöglicht eine erneute Penetration der Blattoberfläche (Fernández et al. 2017). Betrachtet man die P-Gesamtkonzentration und den P-Gesamtgehalt der Daten aus Kapitel 2 (Anhang, Fig. 2), so zeigt sich einerseits, dass innerhalb der ersten 6 h der größte Anteil des blattapplizierten P aufgenommen wird. Andererseits ist außerdem ein leichter Anstieg des P-Gehaltes über die ersten 48 h zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass es zu einer erneuten Verflüssigung der eingetrockneten Applikationslösung und einer wiederkehrenden Penetration des Blattes gekommen sein muss. Aufgrund von erhöhter Luftfeuchtigkeit in den Morgenstunden befeuchtete Blätter und die Bildung von Guttationstropfen an den Blatträndern, können eine Wiederbefeuchtung begünstigen.

Verbrennungen können in dieser Arbeit nur an einzelnen Pflanzen beobachtet werden, insbesondere dort, wo es aufgrund der Wachstumsmorphologie zu einer Ansammlung der Applikationslösung gekommen ist (Fig. 5.2). Auch in der Dissertation von Peirce (2015) treten kaum Verbrennungsschäden an dem Punkt auf, wo der Tropfen mit  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  appliziert wird. Verbrennungen auf dem Blatt zeigen sich laut der Autoren Neumann et al. (1981) für  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  erst ab einer Konzentration  $\geq 0,5\text{M}$ . Zu Verbrennungen kommt es durch die Aufnahme zu hoher Salzkonzentrationen, welche phytotoxisch wirken und zum Absterben von Zellen führen. Begünstigt wird dies durch die Konzentration, die Umweltbedingungen (Luftfeuchte, Temperatur), den pH-Wert bzw. die Verwendung von Additiven (Eichert und Fernández 2012; Fernández et al. 2013). Vor allem P-Formen mit niedrigen pH-Werten zeigen eine verstärkte Aufnahme, aber gleichzeitig auch ein größeres Potential für Verbrennungen (Peirce et al. 2014; Peirce et al. 2016; McBeath et al. 2020). Ein niedriger Deliqueszenzpunkt begünstigt eine länger anhaltende Aufnahme, so dass höhere Salzkonzentrationen eindringen und Blattschäden verursacht werden können (Noack et al. 2010). Daher wird eine länger anhaltende Penetration durch die Ansammlung von Applikationslösung an bestimmten Lokalisationen des Blattes in dieser Studie als Ursache für Verbrennungen angesehen.



**Figure 5.2:** Verbrennungsschäden an Blättern durch das Ansammeln der Applikationslösung in den Blattachsen noch nicht vollständig entwickelter Blätter. (A) Sehr starke Verbrennungen durch Ansammlung der Applikationslösung, die zum Verlust von Blattgewebe geführt haben. (B) Zeitpunkt der letzten Applikation durch leichte Verbrennungsschäden sehr gut sichtbar. Das Blatt war zum Zeitpunkt der Applikation nur bis zur weißen Linie sichtbar.

Es wird davon ausgegangen, dass Verbrennungen die photosynthetisch aktive Blattfläche verringern (Neumann 1979) und dies die ertragsfördernde Wirkung einer Blattdüngung schmälert (Fernández et al. 2013). Daher können bei Makronährstoffen wie P, die in hohen Mengen appliziert werden müssen, Salze mit einem hohen Deliqueszenzpunkt von Vorteil sein. Langsamere Aufnahmezeiten könnten Blattschäden größtenteils vermeiden wie in diesem Falle  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Eichert 2019).

## 5.6 In Gefäßversuchen mit Bodensubstrat führt eine Phosphor-Blattdüngung zu einer höheren Konstanz der Trockenmasse und des Kornertrags

Die gewonnenen Erkenntnisse aus den Hydrokulturversuchen sollten auch an Maispflanzen überprüft werden, die in Bodensubstrat wachsen (Kapitel 3). Vergleicht man die Daten der vorliegenden Arbeit aus den Kapiteln 1 und 2 mit den Daten aus Kapitel 3, so ist die fehlende Konstanz im Biomassezuwachs bei in Bodensubstrat wachsenden Maispflanzen mit P-Blattdüngung deutlich erkennbar (Kapitel 3, Fig. 1, 5). Dies kann einerseits durch die P-Versorgung an den Wurzeln erklärt werden. Während in Hydrokultur über zwei Wochen starker P-Mangel herrscht und ab dem Zeitpunkt der P-Blattapplikationen kein P mehr über die Wurzeln angeboten wird, werden Bodensubstrate mit optimaler Versorgungsstufe (Gehaltsklasse C) verwendet. Die Bodengehalte und Nachlieferungspotentiale (mittel-hoch) der beiden Bodensubstrate lassen vermuten, dass diese die Wirkung einer P-Blattdüngung herabsetzen. Diese Konstellationen wurden bewusst so ausgewählt, da sie Böden der Schleswig-Holsteinischen Ackerbauregionen widerspiegeln sollen (Kapitel 3, Tab. 1). Andererseits erfolgte in Hydrokultur eine vollständige Benetzung (abaxial und adaxial) mittels kalibrierter Handsprühflasche, während in den Versuchen mit Bodensubstrat die Applikation nur von oberhalb (überwiegend adaxial) durch eigene Sprühtechnik mit drei Doppelflachstrahldüsen (Air Injektor Kompakt-Doppelflachstrahldüsen IDKT 120, Lechler, Metzingen, Deutschland) erfolgte. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zur Bestimmung der Aufnahme in Abhängigkeit der Blattseite (Kapitel 1, Fig. 5) und die Daten der subzellulären Verteilung von P (Kapitel 2, Fig. 2) zeigen, dass bei beidseitiger Behandlung mindestens eine Verdopplung der P-Konzentration erreicht wird. Wohingegen bei einseitiger Behandlung die Konzentration nur um ein Viertel bis ein Drittel erhöht wird. Außerdem zeigen die Daten aus Kapitel 1 (Fig. 5), dass sich die adaxiale und abaxiale Blattseite in der P-Aufnahme nicht

unterscheiden. Daraus kann abgeleitet werden, dass eine P-Blattdüngung mit beidseitiger Benetzung den Effekt einer Blattdüngung vergrößern sollte.

Wie in den Kapiteln 1 und 2 zeigt sich auch für in Bodensubstrat wachsende Maispflanzen eine signifikante Erhöhung der P-Konzentration in den einzelnen Sprossabschnitten und der Wurzel. Dies bestätigt die Aufnahme des blattapplizierten Phosphors in Hydrokultur aus den Kapiteln 1 und 2. Ebenfalls wird die Translokation von blattappliziertem P innerhalb der Pflanze bestätigt (Kapitel 2), da auch hier eine Erhöhung der P-Konzentrationen bzw. Gehalte in den Wurzeln festgestellt werden kann (Kapitel 3, Fig. 1C, 2B).

In der Studie aus Kapitel 3 zeigt sich jedoch, dass die Verlagerung von blattappliziertem P nur zu einem gewissen Teil erfolgt und vor allem in den durch die Applikation betroffenen Pflanzenabschnitten verbleibt (Kapitel 3, Fig. 3, 4). Ebenfalls bleiben in Kapitel 1 die Konzentrationen in den vollentwickelten Blättern (alter Spross), auch zehn Tage nach der letzten Applikation, signifikant erhöht (Kapitel 1, Fig. 3B). Wie in Kapitel 3 bereits diskutiert, erfolgt eine vollständige Translokation erst während der Kornfüllung. Dies könnte, neben der fehlenden Wachstumszeit, ein weiterer Hinweis darauf sein, warum in Kapitel 1 zum Zeitpunkt der Ernte noch keine signifikanten Unterschiede zwischen der niedrigeren und den höheren Aufwandmengen eingetreten sind (Kapitel 1, Fig. 2). Außerdem zeigt sich auch in Versuchen mit Bodensubstrat eine Verzögerung der Blattseneszenz infolge einer Blattdüngung mit P (Fig. 5.1).

Dennoch war die Wirkung einer Blattdüngung, im Vergleich zu absoluten P-Mangelsituationen in Hydrokultur, weniger stark ausgeprägt. Hieraus ist zu schließen, dass die Wirkung einer P-Blattapplikation vor allem unter absoluten Mangelbedingungen zur Geltung kommt. Des Weiteren zeigt die vorliegende Arbeit, dass P unabhängig vom Ernährungsstatus der Pflanze aufgenommen wird (Kapitel 3, Fig. 5), weshalb der Einsatz flexibel gestaltet werden kann. Wie aus dem Reviewartikel von Noack et al. (2010) hervorgeht, zeigen die bisherigen Studien mit P-Blattapplikationen im Allgemeinen nicht durchgehend schlüssige Ergebnisse. So zeigen auch die Ergebnisse aus Kapitel 3, die Komplexität der Wirksamkeit von blattappliziertem P und die Abhängigkeit der Wirkung von zahlreichen Faktoren, wie Pflanzenart oder Sorte, Blattphänologie, Anzahl der Stomata oder den vorherrschenden Umweltbedingungen (Fernández und Brown 2013).

## 5.7 Bedeutung der Phosphor-Blattdüngung in Mais für die Zukunft

Die Blattapplikation von Phosphor ist laut der Autoren Noack et al. (2010) eine potenzielle Managementstrategie, die eine strategische Anwendung von Dünger in günstigen Jahreszeiten ermöglicht. Allerdings haben sowohl im Feld als auch im Gewächshaus angebaute Pflanzen unterschiedliche Reaktionen auf die P-Blattapplikation gezeigt. Die Ergebnisse der vorgelegten Dissertation zeigen anschaulich, dass die P-Blattdüngung nicht nur als eine strategische Anwendung in günstigen Jahreszeiten zur Ausschöpfung des Ertragspotentials genutzt werden kann, sondern auch unter starken Mangelbedingungen das Potential zur Verbesserung des Nährstoffhaushalts haben könnte (Kapitel 1; 3). Vor allem die rasche Translokation an blattappliziertem P zeigt, dass mit einer schnellen Reaktion der Pflanze zu rechnen ist (Kapitel 2). Es kann postuliert werden, dass kurzfristiger P-Mangel behoben werden kann. Somit könnten insbesondere niedrige Temperaturen während der Jugendentwicklung von Mais und einer daraus resultierenden schlechteren Aneignung von P aufgefangen werden. Jedoch muss die Aufnahme und Wirkung von blattappliziertem P auch unter entsprechenden Bedingungen überprüft werden.

Außerdem ist laut des Abschlussberichts über die Auswertung regionaler Klimaprojektionen der Autoren Dalelane und Deuschländer (2012) davon auszugehen, dass die Anzahl an wärmeren und intensiveren Wetterextremen zunehmen wird. Wechselhafte Temperaturen während der Jugendentwicklung von Mais im Frühjahr könnten mit einer Abnahme der Niederschläge das Risiko von Trocken- und Kältestress erhöhen. Durch Trockenheit wird die P-Aufnahme von Pflanzen stark gehemmt, so dass es zum Auftreten von P-Mangel kommen kann (Bergmann 1993). Nach Turner (1985) zählt P-Mangel zu den ersten Folgen unter leichtem bis mäßigem Wasserstress. Dies ist auf eine noch geringere Mobilität von P-Ionen unter trockenen Bodenbedingungen zurückzuführen, da die Diffusion von P-Ionen entlang von wassergefüllten Poren oder Bodenpartikel-benetzenden Wasserfilmen erfolgt (Peuke und Rennenberg 2004; Marschner und Rengel 2012). Die Wirkung der P-Blattdüngung unter akutem P-Mangel müsste jedoch unter verschiedenen Stadien von Trockenstress wissenschaftlich untersucht werden. Des Weiteren sollte auch überprüft werden, wie lange Maispflanzen von einer P-Blattapplikation zehren können bzw. ob die Maisgenetik (Zahn-, Hartmais) die Blattdüngung beeinflusst.

Nach der Aufnahme kann die P-Blattdüngung als sehr effizient angesehen werden, wie in der Studie in Kapitel 2 dokumentiert werden konnte. Dennoch müsste die Effizienz während des

Applikationsvorgangs erhöht werden. Die Ergebnisse in Hydrokultur zeigen eine geringe Effizienz (< 32%), aufgrund hoher Verluste an Applikationslösung während der Behandlung (Kapitel 1; 2). Aufgrund der Applikationstechnik in den Versuchen aus Kapitel 3, kann auch dort von einer niedrigen Effizienz ausgegangen werden. In der Literatur wird aber in Abhängigkeit der Applikationstechnik (Feindosierspritzen) eine Aufnahmeeffizienz von bis zu 95% erzielt (Peirce et al. 2016; 2019; McBeath et al. 2011; 2020). Daher müsste vor allem die Forschung hinsichtlich der Applikationstechnik vorangetrieben werden, um das vorhandene Potential einer P-Blattdüngung besser ausnutzen zu können (GPS, Pflanzenerkennung und Bandspritzung wie z.B. AmaSelect Row/Spot). Dies würde zudem auch die Applikationsgenauigkeit bei kleinerem Blattflächenindex verbessern. Außerdem kann aus den Daten der Kapitel 1 bis 3 geschlussfolgert werden, dass eine Benetzung beider Blattseiten eine höhere P-Aufnahme gewährleisten würde. Daher wäre es von Vorteil, beide Seiten des Blattes zu behandeln, um eine möglichst große Anwendungsfläche und damit die größtmögliche Penetrationsfläche zu erhalten (Kombination aus Dropleg- und Flachstrahldüsen). Hierzu müssten jedoch ebenfalls weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Die eindeutigen Konzentrationserhöhungen (um bis zu 200%, Kapitel 1; um bis zu 150%, Kapitel 2; um bis zu 44%, Kapitel 3) lassen vermuten, dass eine mehrfache Blattapplikation von Phosphor als strategische Maßnahme zur Behebung von P-Mangel eingesetzt werden kann. Fehlende eindeutige Ertragseffekte in Kapitel 3 deuten darauf hin, dass es keine ausreichenden Beweise dafür gibt, ob eine P-Startdüngung reduziert werden könnte. Dies müsste, unter der Berücksichtigung der Applikationstechnik, -konzentration und -häufigkeit, in Feldversuchen überprüft werden.

## 5.8 Referenzen

Allen, M. (1960): The uptake of metallic ions by leaves of apple trees: II. The influence of certain anions on uptake from magnesium salts. In: *Hortic. Sci.* 35 (2), S. 127–135. DOI: 10.1080/00221589.1960.11513978.

Arsic, M.; Le Tougaard, S.; Persson, D. P.; Martens, H. J.; Doolette, C. L.; Lombi, E. et al. (2020): Bioimaging techniques reveal foliar phosphate uptake pathways and leaf phosphorus status. In: *Plant Physiol.* 183 (4), S. 1472–1483. DOI: 10.1104/pp.20.00484.

Assuero, S. G.; Mollier, A.; Pellerin, S. (2004): The decrease in growth of phosphorus-deficient maize leaves is related to a lower cell production. In: *Plant Cell Environ.* 27 (7), S. 887–895. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2004.01194.x.

Aung, K.; Lin, S.-I.; Wu, C.-C.; Huang, Y.-T.; Su, C.-L.; Chiou, T.-J. (2006): *pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. In: *Plant Physiol.* 141 (3), S. 1000–1011. DOI: 10.1104/pp.106.078063.

Bari, R.; Datt Pant, B.; Stitt, M.; Scheible, W.-R. (2006): PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. In: *Plant Physiol.* 141 (3), S. 988–999. DOI: 10.1104/pp.106.079707.

Benbella, M.; Paulsen, G. M. (1998): Efficacy of treatments for delaying senescence of wheat leaves: II. Senescence and grain yield under field conditions. II. Senescence and Grain Yield under Field Conditions. In: *Agron. J.* 90 (3), S. 332–338. DOI: 10.2134/agronj1998.00021962009000030004x.

Bergmann, W. (1993): Ernährungsstörungen bei Kulturpflanzen. 3. Aufl. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

Biddulph, O.; Biddulph, S.; Cory, R.; Koontz, H. (1958): Circulation patterns for phosphorus, sulfur and calcium in the bean plant. In: *Plant Physiol.* 33 (4), S. 293–300. DOI: 10.1104/pp.33.4.293.

Bieleski, R. L.; Laties, G. G. (1963): Turnover rates of phosphate esters in fresh and aged slices of potato tuber tissue. In: *Plant Physiol.* 38 (5), S. 586–594. DOI: 10.1104/pp.38.5.586.

Bukovac, M. J.; Wittwer, S. H. (1957): Absorption and mobility of foliar applied nutrients. In: *Plant Physiol.* 32 (5), S. 428–435. DOI: 10.1104/pp.32.5.428.

Burkhardt, J.; Eiden, R. (1994): Thin water films on coniferous needles. In: *Atmospheric Environment* 28 (12), S. 2001–2011. DOI: 10.1016/1352-2310(94)90469-3.

Cakmak, I.; Hengeler, C.; Marschner, H. (1994): Partitioning of shoot and root dry matter and carbohydrates in bean plants suffering from phosphorus, potassium and magnesium deficiency. In: *J. Exp. Bot.* 45 (9), S. 1245–1250. DOI: 10.1093/jxb/45.9.1245.

Carstensen, A.; Szameitat, A. E.; Frydenvang, J.; Husted, S. (2019): Chlorophyll a fluorescence analysis can detect phosphorus deficiency under field conditions and is an effective tool to prevent grain yield reductions in spring barley (*Hordeum vulgare* L.). In: *Plant Soil* 434 (1-2), S. 79–91. DOI: 10.1007/s11104-018-3783-6.

Chamel, A. (1988): Chapter 3 - Foliar uptake of chemicals studied with whole plants and isolated cuticles. In: P. M. Neumann (Hg.): *Plant Growth and Leaf-Applied Chemicals*. 1st ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, S. 27–48.

Dalelane, C.; Deutschländer, T. (2012): Auswertung regionaler Klimaprojektionen für Deutschland hinsichtlich der Änderung des Extremverhaltens von Temperatur, Niederschlag und Windgeschwindigkeit. Hg. v. Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe, Bundesanstalt Technisches Hilfswerk, Deutscher Wetterdienst und Umweltbundesamt. Online verfügbar unter [https://www.dwd.de/DE/klimaumwelt/klimaforschung/klimaprojektionen/extremereignisse/abschlussbericht-2012.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=1](https://www.dwd.de/DE/klimaumwelt/klimaforschung/klimaprojektionen/extremereignisse/abschlussbericht-2012.pdf?__blob=publicationFile&v=1), zuletzt geprüft am 18.03.2021.

Driscoll, S. P.; Prins, A.; Olmos, E.; Kunert, K. J.; Foyer, C. H. (2006): Specification of adaxial and abaxial stomata, epidermal structure and photosynthesis to CO<sub>2</sub> enrichment in maize leaves. In: *J. Exp. Bot.* 57 (2), S. 381–390. DOI: 10.1093/jxb/erj030.

Eichert, T. (2019): Was ist besonders an der Blattdüngung. Was es mit dem Deliqueszenzpunkt auf sich hat. In: *Besseres Obst* (4), S. 24–27. Online verfügbar unter <https://www.besseres-obst.at/content/dam/wein-und-obst/besseres-obst/de/web/pdf/2019/4/BO%2004-2019%2024-27.pdf>.

Eichert, T.; Burkhardt, J. (2001): Quantification of stomatal uptake of ionic solutes using a new model system. In: *J. Exp. Bot.* 52 (357), S. 771–781. DOI: 10.1093/jexbot/52.357.771.



- Eichert, T.; Fernández, V. (2012): Chapter 4 - Uptake and release of elements by leaves and other aerial plant parts. In: H. Marschner und P. Marschner (Hg.): Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3rd ed. Amsterdam, Boston, MA: Academic Press, S. 71–84.
- Eichert, T.; Goldbach, H. E. (2008): Equivalent pore radii of hydrophilic foliar uptake routes in stomatous and astomatous leaf surfaces - further evidence for a stomatal pathway. In: *Physiol. Plant.* 132 (4), S. 491–502. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2007.01023.x.
- Eichert, T.; Goldbach, H. E.; Burkhardt, J. (1998): Evidence for the uptake of large anions through stomatal pores. In: *Bot. Acta* 111 (6), S. 461–466. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1998.tb00733.x.
- Fernández, V.; Bahamonde, H. A.; Javier Peguero-Pina, J.; Gil-Pelegrín, E.; Sancho-Knapik, D.; Gil, L. et al. (2017): Physico-chemical properties of plant cuticles and their functional and ecological significance. In: *J. Exp. Bot.* 68 (19), S. 5293–5306. DOI: 10.1093/jxb/erx302.
- Fernández, V.; Brown, P. H. (2013): From plant surface to plant metabolism: the uncertain fate of foliar-applied nutrients. In: *Front. Plant Sci.* 4, S. 289. DOI: 10.3389/fpls.2013.00289.
- Fernández, V.; Eichert, T. (2009): Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves. Current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. In: *Crit. Rev. Plant Sci.* 28 (1-2), S. 36–68. DOI: 10.1080/07352680902743069.
- Fernández, V.; Guzmán, P.; Peirce, C. A. E.; McBeath, T. M.; Khayet, M.; McLaughlin, M. J. (2014b): Effect of wheat phosphorus status on leaf surface properties and permeability to foliar-applied phosphorus. In: *Plant Soil* 384 (1-2), S. 7–20. DOI: 10.1007/s11104-014-2052-6.
- Fernández, V.; Sancho-Knapik, D.; Guzmán, P.; Peguero-Pina, J. J.; Gil, L.; Karabourniotis, G. et al. (2014a): Wettability, polarity, and water absorption of holm oak leaves: Effect of leaf side and age. In: *Plant Physiol.* 166 (1), S. 168–180. DOI: 10.1104/pp.114.242040.
- Fernández, V.; Sotiropoulos, T.; Brown, P. H. (2013): Foliar fertilization. Scientific principles and field practices. Paris: International fertilizer industry association (IFA). Online verfügbar unter <http://catalogue.bnf.fr/ark:/12148/cb435815768>.
- Fredeen, A. L.; Rao, I. M.; Terry, N. (1989): Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in Glycine max. In: *Plant Physiol.* 89 (1), S. 225–230. DOI: 10.1104/pp.89.1.225.

- Girma, K.; Martin, K. L.; Freeman, K. W.; Mosali, J.; Teal, R. K.; Raun, W. R. et al. (2007): Determination of optimum rate and growth stage for foliar-applied phosphorus in corn. In: *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 38 (9-10), S. 1137–1154. DOI: 10.1080/00103620701328016.
- Greenway, H.; Gunn, A. (1966): Phosphorus retranslocation in *Hordeum vulgare* during early tillering. In: *Planta* 71 (1), S. 43–67. DOI: 10.1007/BF00384642.
- Heldt, H. W.; Piechulla, B. (2015): 13 Durch den Phloemtransport erreichen die Photoassimilate ihre Verbrauchsorte. In: H. W. Heldt und B. Piechulla (Hg.): *Pflanzenbiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 323–334.
- Knoche, M.; Bukovac, M. J. (1992): Surfactants influence foliar absorption of gibberellic acid by sour cherry leaves. In: *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 117 (1), S. 80–84. DOI: 10.21273/JASHS.117.1.80.
- Koontz, H.; Biddulph, O. (1957): Factors affecting absorption and translocation of foliar applied phosphorus. In: *Plant Physiol.* 32 (5), S. 463–470. DOI: 10.1104/pp.32.5.463.
- Lauer, M. J.; Pallardy, S. G.; Blevins, D. G.; Randall, D. D. (1989a): Whole leaf carbon exchange characteristics of phosphate deficient soybeans (*Glycine max* L.). In: *Plant Physiol.* 91 (3), S. 848–854. DOI: 10.1104/pp.91.3.848.
- Lee, J.; Holbrook, N. M.; Zwieniecki, M. A. (2012): Ion induced changes in the structure of bordered pit membranes. In: *Front. Plant Sci.* 3, S. 55. DOI: 10.3389/fpls.2012.00055.
- Li, C.; Wang, P.; Lombi, E.; Wu, J.; Blamey, F. P. C.; Fernández, V. et al. (2018b): Absorption of foliar applied Zn is decreased in Zn deficient sunflower (*Helianthus annuus*) due to changes in leaf properties. In: *Plant Soil* 433 (1-2), S. 309–322. DOI: 10.1007/s11104-018-3841-0.
- Luan, M.; Tang, R.-J.; Tang, Y.; Tian, W.; Hou, C.; Zhao, F. et al. (2017): Transport and homeostasis of potassium and phosphate: limiting factors for sustainable crop production. In: *J. Exp. Bot.* 68 (12), S. 3091–3105. DOI: 10.1093/jxb/erw444.
- Marschner, H.; Kirkby, E. A.; Engels, C. (1997): Importance of cycling and recycling of mineral nutrients within plants for growth and development. In: *Bot. Acta* 110 (4), S. 265–273. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1997.tb00639.x.
- Marschner, P.; Rengel, Z. (2012): Chapter 12 - Nutrient availability in soils. In: H. Marschner und P. Marschner (Hg.): *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3rd ed. Amsterdam, Boston, MA: Academic Press, S. 315–330.

- Martin, C.; Glover, B. J. (2007): Functional aspects of cell patterning in aerial epidermis. In: *Curr. Opin. Plant Biol.* 10 (1), S. 70–82. DOI: 10.1016/j.pbi.2006.11.004.
- Mauer, L. J.; Taylor, L. S. (2010): Water-solids interactions: Deliquescence. In: *Annu Rev Food Sci Technol* 1, S. 41–63. DOI: 10.1146/annurev.food.080708.100915.
- McBeath, T. M.; Facelli, E.; Peirce, C. A. E.; Arachchige, V. K.; McLaughlin, M. J. (2020): Assessment of foliar-applied phosphorus fertiliser formulations to enhance phosphorus nutrition and grain production in wheat. In: *Crop Pasture Sci.* 71 (9), S. 795. DOI: 10.1071/CP20241.
- McBeath, T. M.; McLaughlin, M. J.; Noack, S. R. (2011): Wheat grain yield response to and translocation of foliar-applied phosphorus. In: *Crop Pasture Sci.* 62 (1), S. 58. DOI: 10.1071/CP10237.
- Mimura, T. (1995): Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants. In: *Plant Cell Physiol.* 36 (1), S. 1–7. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078724.
- Mimura, T. (1999): Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. In: *International Review of Cytology*, Bd. 191, S. 149–200.
- Mimura, T.; Dietz, K. J.; Kaiser, W.; Schramm, M. J.; Kaiser, G.; Heber, U. (1990): Phosphate transport across biomembranes and cytosolic phosphate homeostasis in barley leaves. In: *Planta* 180 (2), S. 139–146. DOI: 10.1007/BF00193988.
- Mimura, T.; Sakano, K.; Shimmen, T. (1996): Studies on the distribution, re-translocation and homeostasis of inorganic phosphate in barley leaves. In: *Plant Cell Environ.* 19 (3), S. 311–320. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1996.tb00253.x.
- Mimura, T.; Yin, Z.-H.; Wirth, E.; Dietz, K. J. (1992): Phosphate transport and apoplastic phosphate homeostasis in barley leaves. In: *Plant Cell Physiol.*, S. 563–568. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078290.
- Morcuende, R.; Bari, R.; Gibon, Y.; Zheng, W.; Pant, B. D.; Bläsing, O. et al. (2007): Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of Arabidopsis in response to phosphorus. In: *Plant Cell Environ.* 30 (1), S. 85–112. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2006.01608.x.
- Mosali, J.; Desta, K.; Teal, R. K.; Freeman, K. W.; Martin, K. L.; Lawles, J. W.; Raun, W. R. (2006): Effect of foliar application of phosphorus on winter wheat grain yield, phosphorus uptake, and use efficiency. In: *J. Plant Nutr.* 29 (12), S. 2147–2163. DOI: 10.1080/01904160600972811.

- Neumann, P. M. (1979): Rapid evaluation of foliar fertilizer-induced damage: N, P, K, S on Corn. In: *Agron. J.* 71 (4), S. 598–602. DOI: 10.2134/agronj1979.00021962007100040019x.
- Neumann, P. M.; Ehrenreich, Y.; Golab, Z. (1981): Foliar fertilizer damage to corn leaves: relation to cuticular penetration. In: *Agron. J.* 73 (6), S. 979–982. DOI: 10.2134/agronj1981.00021962007300060017x.
- Noack, S. R.; McBeath, T. M.; McLaughlin, M. J. (2010): Potential for foliar phosphorus fertilisation of dryland cereal crops: a review. In: *Crop Pasture Sci.* 61 (8), S. 659. DOI: 10.1071/CP10080.
- Peirce, C. A. E. (2015): Foliar fertilisation of wheat plants with phosphorus. Dissertation. The University of Adelaide, Adelaide. School of Agriculture, Food and Wine.
- Peirce, C. A. E.; McBeath, T. M.; Fernández, V.; McLaughlin, M. J. (2014): Wheat leaf properties affecting the absorption and subsequent translocation of foliar-applied phosphoric acid fertiliser. In: *Plant Soil* 384 (1-2), S. 37–51. DOI: 10.1007/s11104-014-2245-z.
- Peirce, C. A. E.; McBeath, T. M.; Priest, C.; McLaughlin, M. J. (2019): The timing of application and inclusion of a surfactant are important for absorption and translocation of foliar phosphoric acid by wheat leaves. In: *Front. Plant Sci.* 10, S. 1532. DOI: 10.3389/fpls.2019.01532.
- Peirce, C. A. E.; Priest, C.; McBeath, T. M.; McLaughlin, M. J. (2016): Uptake of phosphorus from surfactant solutions by wheat leaves: Spreading kinetics, wetted area, and drying time. In: *RSC Soft Matter* 12 (1), S. 209–218. DOI: 10.1039/C5SM01380A.
- Peng, Z.; Li, C. (2005): Transport and partitioning of phosphorus in wheat as affected by P withdrawal during flag-leaf expansion. In: *Plant Soil* 268 (1), S. 1–11. DOI: 10.1007/s11104-004-0297-1.
- Peuke, A. D.; Rennenberg, H. (2004): Carbon, nitrogen, phosphorus, and sulphur concentration and partitioning in beech ecotypes (*Fagus sylvatica* L.): phosphorus most affected by drought. In: *Trees* 18 (6), S. 639–648. DOI: 10.1007/s00468-004-0335-x.
- Plénet, D.; Etchebest, S.; Mollier, A.; Pellerin, S. (2000): Growth analysis of maize field crops under phosphorus deficiency. I. Leaf Growth. In: *Plant Soil* 223 (1/2), S. 117–130. DOI: 10.1023/A:1004877111238.

- Raghothama, K. G. (1999): Phosphate acquisition. In: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, S. 665–693. DOI: 10.1007/s11104-004-2005-6.
- Revilla, P.; Fernández, V.; Álvarez-Iglesias, L.; Medina, E. T.; Caverro, J. (2016): Leaf physico-chemical and physiological properties of maize (*Zea mays* L.) populations from different origins. In: *Plant Physiol. Biochem.* 107, S. 319–325. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.06.017.
- Sattelmacher, B. (2001): The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. In: *New Phytol.* 149 (2), S. 167–192. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2001.00034.x.
- Sattelmacher, B.; Mühlhling, K.-H.; Penneweiß, K. (1998): The apoplast - its significance for the nutrition of higher plants. In: *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.* 161 (5), S. 485–498. DOI: 10.1002/jpln.1998.3581610502.
- Schlegel, T. K.; Schönherr, J.; Schreiber, L. (2006): Rates of foliar penetration of chelated Fe(III): Role of light, stomata, species, and leaf age. In: *J. Agric. Food Chem.* 54 (18), S. 6809–6813. DOI: 10.1021/jf061149i.
- Schönherr, J. (2000): Calcium chloride penetrates plant cuticles via aqueous pores. In: *Planta* 212 (1), S. 112–118. DOI: 10.1007/s004250000373.
- Schönherr, J. (2001): Cuticular penetration of calcium salts: effects of humidity, anions, and adjuvants. In: *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164 (2), S. 225–231. DOI: 10.1002/1522-2624(200104)164:2<225::AID-JPLN225>3.0.CO;2-N.
- Schreel, J. D. M.; Leroux, O.; Goossens, W.; Brodersen, C.; Rubinstein, A.; Steppe, K. (2020): Identifying the pathways for foliar water uptake in beech (*Fagus sylvatica* L.): a major role for trichomes. In: *Plant J* 103 (2), S. 769–780. DOI: 10.1111/tpj.14770.
- Turner, L. B. (1985): Changes in the phosphorus content of capsicum annum leaves during water stress. In: *J. Plant Physiol.* 121 (5), S. 429–439. DOI: 10.1016/S0176-1617(85)80079-1.
- Vance, C. P.; Uhde-Stone, C.; Allan, D. L. (2003): Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. In: *New Phytol.* 157 (3), S. 423–447. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2003.00695.x.
- White, P. J. (2012): Chapter 3 - Long-distance Transport in the Xylem and Phloem. In: H. Marschner und P. Marschner (Hg.): *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3rd ed. Amsterdam, Boston, MA: Academic Press, S. 49–70.

Will, S.; Eichert, T.; Fernández, V.; Möhring, J.; Müller, T.; Römheld, V. (2011): Absorption and mobility of foliar-applied boron in soybean as affected by plant boron status and application as a polyol complex. In: *Plant Soil* 344 (1-2), S. 283–293. DOI: 10.1007/s11104-011-0746-6.

## Zusammenfassung

Phosphor (P) ist ein unentbehrlicher Makronährstoff für das Wachstum von Pflanzen. Zum Beispiel hat Mais während der Jugendentwicklung einen hohen Bedarf an anorganischem Phosphat im wurzelnahen Raum. Kälte und Trockenheit können zudem die P-Aneignung von Mais verringern und sich negativ auf den Ertrag auswirken. Außerdem kommt erschwerend hinzu, dass herkömmliche P-Düngemittel eine geringe Nutzungseffizienz aufweisen. Dies verstärkt die Problematik der diffusen P-Verluste von landwirtschaftlich genutzten Flächen. Unter dem Aspekt einer effizienteren P-Versorgung von Kulturpflanzen, könnte die P-Blattdüngung eine Möglichkeit zur gezielten Behebung von auftretenden P-Mangelsituationen darstellen.

Zwar ist die P-Blattdüngung kein neues Verfahren, jedoch ist wenig über die Aufnahme von P über das Blatt unter Mangelbedingungen bekannt. Die wissenschaftlichen Schwerpunkte dieser Arbeit lagen dabei in der Verteilung des blattapplizierten Phosphors auf die subzellulären Kompartimente Apoplast und Symplast, auf der Translokation innerhalb der Pflanze, auf der Entwicklung der Biomasse sowie auf dem Einfluss der Konzentration der Applikationslösung auf die Aufnahme und die notwendige Applikationshäufigkeit.

In Hydrokultur, unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus, konnte gezeigt werden, dass Maispflanzen mit akutem P-Mangel blattappliziertes Phosphat aufnehmen können. Dabei stellte sich heraus, dass die P-Konzentrationen von behandelten Pflanzen vor allem innerhalb der ersten 6 Stunden nach erfolgter Applikation in allen Pflanzenteilen stark angestiegen sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Zellwandeigenschaften und die Ionenverhältnisse im Blattapoplasten keinen negativen Einfluss auf die Bewegung der blattapplizierten P-Ionen hat. Vielmehr wurde das blattapplizierte P unmittelbar in die metabolisch aktiven zellulären Kompartimente der Epidermis- und Mesophyllzellen aufgenommen. Dabei erfolgte die Aufnahme von blattappliziertem P unabhängig von der benetzten Blattseite (ad-, abaxial).

Die deutlich erhöhte P-Konzentration in den Leitbündeln belegte zudem eine rasche Translokation von blattappliziertem P aus dem Blatt. Dabei dominierten die Wurzeln und der wachsende Spross als Sinkorgane.

Eine dreimalige Blattapplikation führte nicht nur zu einer erhöhten P-Konzentration und einem verstärkten Spross- und Wurzelwachstum, sondern konnte auch einem P-Mangel,

beispielsweise in Form von verfrühter Blattseneszenz oder verringerter Blattfläche entgegenwirken.

Durch eine Verdoppelung der Nährstoffkonzentration, bei gleichbleibender P-Aufwandmenge, konnte auf eine zusätzliche Blattapplikation verzichtet werden. Dennoch sollte die P-Konzentration nicht beliebig erhöht werden, da stark erhöhte Konzentrationen zu Schädigungen der Blattstruktur oder von physiologischen Prozessen im Blatt führen.

In Gefäßversuchen mit Bodensubstrat führte die P-Blattdüngung zu einer höheren Konstanz der Trockenmasse und des Kornertrags. Der Anstieg der P-Konzentration war bei Pflanzen mit keiner oder geringer P-Bodendüngung stärker. Eine vollständige Translokation des blattapplizierten Phosphats erfolgte jedoch erst während der Kornfüllungsphase. Warum sich der aus einer Blattdüngung resultierende Effekt auf den P-Status der Pflanze nicht in einer signifikant erhöhten Biomasse oder einem höheren Kornertrag niedergeschlagen hat, muss jedoch in weiteren Forschungsvorhaben untersucht werden.

Die Ergebnisse der vorgelegten Dissertation zeigen anschaulich, dass die P-Blattdüngung nicht nur als eine strategische Anwendung in günstigen Jahreszeiten zur Ausschöpfung des Ertragspotentials genutzt werden kann, sondern auch unter starken Mangelbedingungen die Möglichkeit zur Verbesserung des Nährstoffhaushaltes bieten kann.



## Summary

Phosphorus (P) is an essential macronutrient for plant growth. For example, maize has a high demand for inorganic P in the root zone during juvenile development. Cold and drought conditions can reduce P acquisition by maize and negatively impact yield. In addition, conventional P fertilizers have a low fertilizer-use efficiency. This increases the problem of diffuse P losses from agricultural land. Foliar P fertilization might however provide a more efficient P supply and specifically ameliorate P deficiencies.

Although foliar P fertilization is not a new technique, little is known about foliar P uptake under deficiency conditions. The scientific focus of this work has been on the distribution of foliar-applied P to subcellular compartments of the leaf (e.g., apoplast and symplast), translocation within the plant, biomass development, and the influence of spray concentration on uptake and required application frequency.

In the greenhouse, maize plants grown under conditions of acute P deficiency by hydroponics have been shown to be able to take up foliar applied P. The P concentrations within the treated plants increase significantly in all parts of the plant, especially during the first 6 hours after application. Moreover, cell wall properties and ion ratios in the leaf apoplast do not negatively affect the movement of foliar applied P ions. Instead, foliar applied P is taken up directly into the metabolically active cellular compartments of the epidermal and mesophyll cells. In addition, the uptake of foliar applied P occurs independently of the wetted leaf side (ad-, abaxial).

The markedly increased P concentration in the vascular bundles provides evidence of the rapid translocation of foliar applied P from the leaf. The roots and the growing shoot dominate as sink organs.

On the one hand, a triple foliar application results in an increased P concentration and enhanced shoot and root growth, and on the other hand, counteracts symptoms of P deficiency, e.g., premature leaf senescence or reduced leaf area.

By doubling the nutrient concentration, but at the same P application rate, an additional foliar application can be omitted. Nevertheless, the P concentration should not be increased arbitrarily, since strongly increased concentrations lead to damage of the leaf structure or of physiological processes in the leaf.

The results of this work show that foliar P fertilization not only can be used as a strategic application in favorable seasons to exploit yield potential, but can also provide the opportunity to improve nutrient balance under severe deficiency conditions.

## Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Karl Hermann Mühling danken, der mir eine Promotion am Lehrstuhl für Pflanzenernährung erst „schmackhaft“ machte. Vielen Dank, dass Sie mich jederzeit fachlich unterstützt haben, dass Sie mir die Möglichkeiten geboten haben, mich nicht nur wissenschaftlich sondern auch persönlich weiterzuentwickeln. Danke, dass ich meine Arbeit auch des Öfteren auf Tagungen präsentieren durfte. Aber vielmehr weiß ich zu schätzen, dass Sie mir das Vertrauen entgegengebracht haben, meiner eigenen wissenschaftlichen Idee nachzugehen.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle Mitarbeiter des Instituts für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit, die wir zusammen hatten. Ein besonderer Dank geht an Bärbel, Steffi, Monika und Stefan. Ihr habt immer versucht alle meine Wünsche zu ermöglichen. Egal ob es ein ungewöhnlicher Erntetermin war, die Ernte viel länger dauerte als angedacht oder einfach die Anzahl an Proben kein Ende genommen hat.

Jens, vielen Dank für die gemeinsame und entspannte Arbeitszeit. Zum Glück konnten wir die unzähligen Stunden in unserem gemeinsamen Büro mit „fachlichen“ Gesprächen über die Jagd und mit dem einen oder anderen „Getränk“ überbrücken.

Ein riesen Dank geht an dich, Jon, dass du so oft freiwillig deine Zeit geopfert hast und mir unter die Arme gegriffen hast. Ohne dich hätte ich so viel mehr Stunden im Gewächshaus verbringen müssen! Es hat mir riesen Spaß gemacht mit dir zusammen zu arbeiten. Es erfüllt mich mit Stolz, dass du meine begonnene Arbeit fortsetzen wirst!

Gute Freunde sind unbezahlbar! Ich danke all meinen engsten Freunden die mich während der gesamten Zeit unterstützt haben. Die durch Jagdwochenenden, Kochabende mit gutem Wein, Calzoneabende, „Kaffee“ auf dem Markt oder Klönschnack in der Küche nicht nur für Abwechslung sorgen, sondern mein Leben sehr bereichern. Im Besonderen möchte ich aber nochmal Malte, Marten, Lasse und Mirja für jegliche Unterstützung und Ablenkung in den letzten Monaten danken.

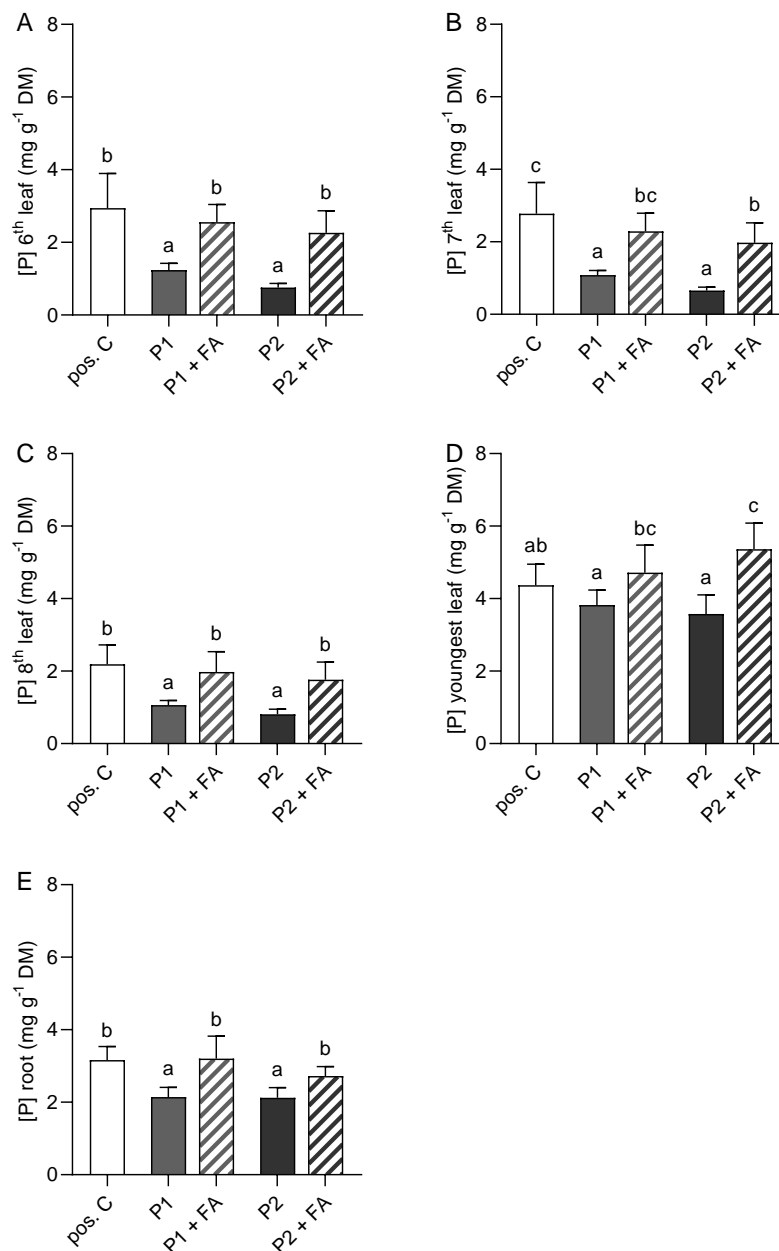
Auch dir, Martin, danke ich für die vielen einzelnen Gespräche mit gutem Wein am Strand von Fuerteventura oder zu Hause in der Küche über den Sinn, das Vorhaben, die Durchführung

und die Höhen und Tiefen einer Promotion. Und natürlich auch für die unleserlichen Korrekturen.

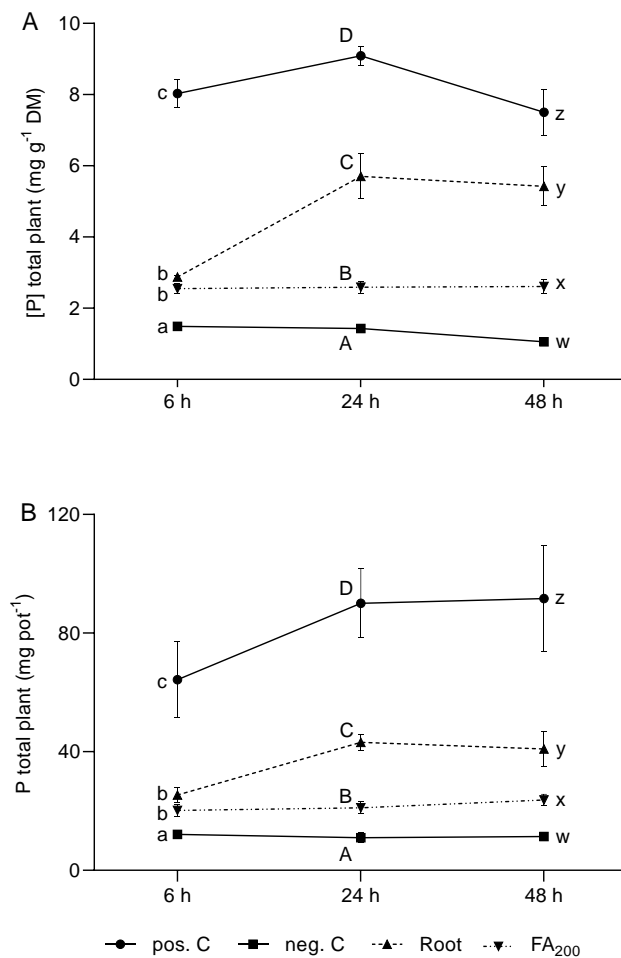
Danke Harry für jegliche Unterstützung und vor allem für die zahlreichen Exemplare der weltbesten Salami.

Vor allem möchte ich meiner Familie einen besonderen Dank aussprechen, die immer für mich da ist und mich einfach in jeder Lebenslage unterstützt. Danke Mama und Martin, Papa und Heike, Harry, Omas und Opas. Danke Franziska, Marianne, Leopold und Luke, Ihr seid die besten Geschwister die man sich vorstellen kann.

Zu guter Letzt danke ich aus tiefstem Herzen meiner Mama und meinem Papa. Es gibt keine Worte die nur ansatzweise ausdrücken können, wie dankbar ich euch über all das bin was ihr mir bis hierhin ermöglicht habt! Jeder Fluss braucht auf der linken und rechten Seite ein Ufer.



**Figure 1:** Phosphorkonzentration im 6. Blatt (A), 7. Blatt (B), 8. Blatt (C), jüngsten noch nicht erschienenem Blatt (D) und Wurzel (E) von Maispflanzen aus einem Zwischenversuch 14 Tage nach der letzten von drei Blattapplikationen. Pos. C (Positivkontrolle) mit einer Phosphorversorgung von 2,0 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kaliumdihydrogenphosphat) in der Nährlösung (NS); P1 mit einer Phosphorversorgung von 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in der NS; P2 mit einer Phosphorversorgung von 0,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in der NS. Nährlösungszusammensetzung und -wechsel erfolgte wie in Kapitel 1 Abschnitt 2.2 beschrieben. Die Blattapplikationen (FA) erfolgten 21, 27 und 35 Tage nach der Aussaat mit einer Applikationskonzentration von 96 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (P1) und 144 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (P2) in den frühen Morgenstunden zwischen 6:30-7:30 Uhr. Die Blattapplikation erfolgte nach demselben Prinzip wie in Kapitel 1 Abschnitt 2.2 beschrieben. Die einzelnen Blätter wurden nach der Ernte dreimal gewaschen, anschließend getrocknet und gemahlen. Die Analyse von Phosphor erfolgte wie in Kapitel 1 Abschnitt 2.4 beschrieben. Balken stellen Mittelwerte + SD dar ( $n = 5$ ). Kleine Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen (ANOVA mit Duncan-Test,  $p \leq 0,05$ ).



**Figure 2:** Phosphor-Gesamtkonzentration (A) und Gesamtgehalt (B) der Maispflanzen aus Kapitel 2 ohne 5. Blatt. Das 5. Blatt wurde für die Infiltrations-Zentrifugations-Methode (AWF-Extraktion) verwendet (Kapitel 2, Material & Methoden). Pos. C (Positivkontrolle), 0,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kaliumdihydrogenphosphat) in der Nährlösung (NS); neg. C (Negativkontrolle), 0,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in der NS in Woche 1 und 0,01 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in der NS für die restlichen zwei Wochen; Root (Wiederzugabe über die Wurzeln), 0,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in der NS in Woche 1, 0,01 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in der NS in Woche 2 und 3 und 0,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in der NS als Wiederzugabe in Woche 4; FA<sub>200</sub> (Blattapplikation), 0,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in der NS in Woche 1, 0,01 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in der NS in Woche 2 und 3 und 0,0 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in Woche 4 + 200 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  als Wiederzugabe über das Blatt in Woche 4. Graphen stellen Mittelwerte + SD dar ( $n = 4$ ). Kleine und große Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen (ANOVA mit Duncan-Test,  $p \leq 0,05$ ).