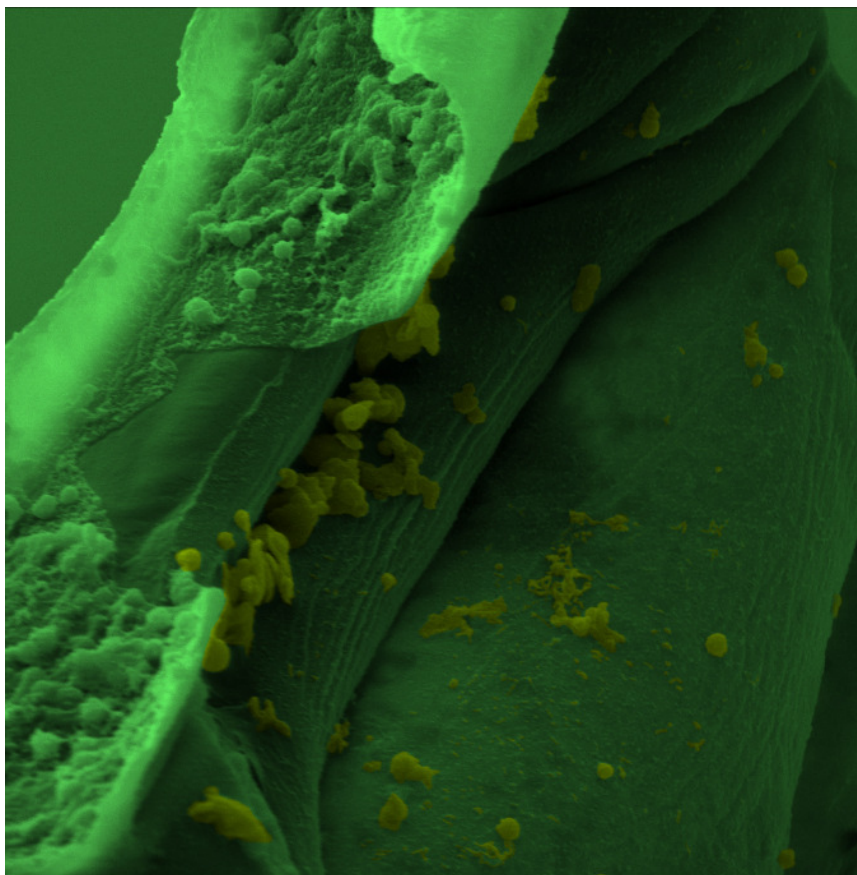


Dr. Hartmut Kaiser

hkaiser@bot.uni-kiel.de

Abschlussbericht

Nachweis von Mineralpartikeln in den substomatären Höhlen von Haferblättern nach AGROSOL-Behandlung



Einleitung

In Feld- und Laborexperimenten wurden fördernde Wirkungen einer Applikation des auf fein vermahlene Calciumcarbonate basierenden Präparates „Agrosol“ auf die Biomasseproduktion von Kulturpflanzen festgestellt. Die Mechanismen hinter diesen Ertragssteigerungen sind bisher nicht bekannt. Mögliche Wirkmechanismen könnten u. a. im Bereich der Photosyntheseprozesse, der Veränderung der Wassernutzungseffizienz, der Allokation des Biomassezuwachses, der Zufuhr des Wachstums limitierender Nährelemente oder auch in einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegenüber Umweltstressoren vermutet werden. Im Auftrag der Firma Agrosolution führte die Universität Kiel einen Forschungsauftrag zur Erforschung der spezifischen Wirkungen einer Blattdüngung mit dem Produkt „Agrosol“ auf die Physiologie und die Biomasseproduktion von ausgewählten Nutzpflanzen durch. Um die Wirkungsweise von Agrosol zu erforschen, ist die Kenntnis des Wirkungsortes der Mineralpartikel von zentraler Bedeutung. Deshalb wurde im Rahmen des Forschungsauftrages mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht, ob und unter welchen Bedingungen Agrosol-Partikel durch die Stomata ins Blattinnere gelangen können.

Der Nachweis, dass bei dem Aufsprühen von suspendierten Partikeln auf die Blattoberfläche auch Partikel durch die Stomata ins Blatt gelangen, ist problematisch, da nicht sicher ausgeschlossen werden kann, dass Partikel bei der Präparation der Proben für die Elektronenmikroskopie nachträglich ins Blattinnere gelangen. Zur Lösung dieses Problems wird hier ein differentieller Nachweis geführt. Es werden Blätter verglichen, die entweder bei geöffneten oder geschlossenen Stomata behandelt wurden und die anschließend in identischer Weise bei geschlossenen Stomata präpariert wurden. Unterschiede in der Partikelhäufigkeit in den Interzellularen sollten dann ausschließlich auf dem Öffnungsgrad der Stomata zur Zeit der Behandlung beruhen und, unabhängig von einer möglichen zusätzlichen Einschleppung von Partikeln während der Präparation, damit ein Eindringen von Partikeln bei der Behandlung belegt werden kann. Zur zusätzlichen Absicherung, dass es sich bei den im Blatt festgestellten Partikeln um Calciumcarbonat handelt, wurde die atomare Zusammensetzung der Partikel mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) untersucht.

Methoden und Experimente

Kultur der Pflanzen

Die Experimente wurden mit *Avena sativa* var. Flämingsstolz durchgeführt, die in Substratkultur gekeimt und in Klimakammern bei 22°C, ca. 60-80% Luftfeuchtigkeit und einer photosynthetisch wirksamen Quantenflussdichte (PPFD) von ca. 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bis zu einer Größe von ca. 25-30 cm kultiviert wurden.

Agrosol-Behandlung

Zur Herstellung der Spritzlösung für die Behandlung wurden 15 ml der von AGROSolution zur Verfügung gestellten Suspension mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter verdünnt, was einer Endkonzentration von 10 g/l entspricht. Die Spritzlösung enthielt das Benetzungsmittel Silwet Gold (Spiess-Urania) in einer Konzentration von 0.1%.

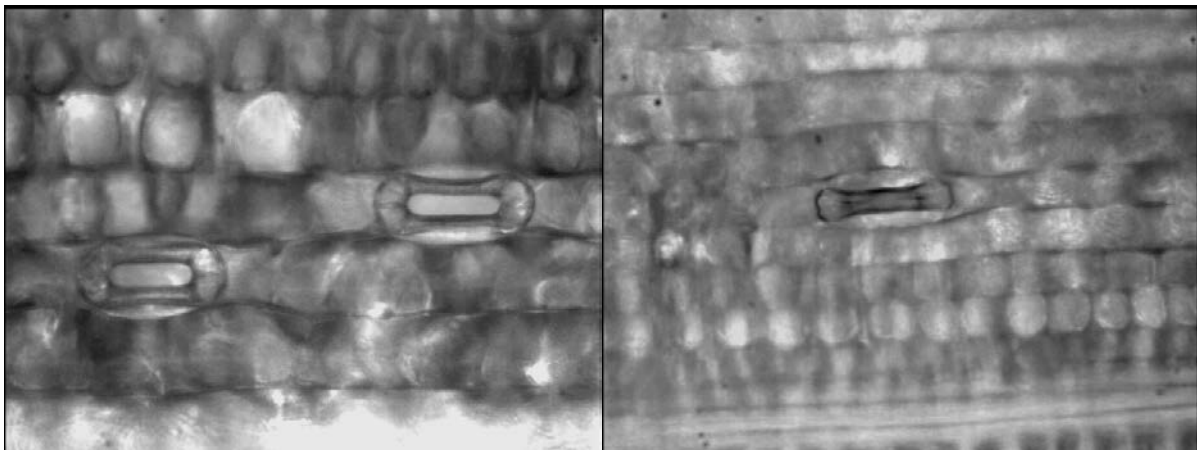


Abb. 1

Lichtmikroskopische Aufnahmen von Spaltöffnungen der untersuchten Haferblätter unmittelbar vor der Behandlung mit Agrosol/Silwet. Links geöffnete, rechts geschlossene Spaltöffnungen.

Präparation der Proben

Um sicherzustellen, dass die Blätter entweder im Zustand weit geöffneter oder vollständig geschlossener Spaltöffnungen mit Agrosol behandelt werden, wurden die zu untersuchenden Blätter in eine Temperatur-, Licht-, Feuchte- und CO₂-kontrollierte CO₂/H₂O-Gaswechsellkuvette installiert, die eine mikroskopische Untersuchung der Blattunterseite und damit eine direkte *in-situ*-Messung des Öffnungsgrades der Spaltöffnungen erlaubt (Kaiser & Legner, 2007). Die Blätter wurden nach mindestens 24-stündiger Akklimatisation Bedingungen ausgesetzt, die eine maximale Spaltöffnungsweite ermöglichen sollten. (PPFD von ca. 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, rH von 95%, Absenkung der CO₂-Konzentration auf Werte < 200ppm) bzw. vollständiges

Schließen der Stomata (Dunkelheit, Luftfeuchte von ca. 50%, auf ca. 600-1000 ppm angehobene CO₂-Konzentration). Die Wirkung dieser Behandlung wurde mikroskopisch kontrolliert (Abb. 1) und nur wenn entweder weit offene oder völlig geschlossene Stomata beobachtet wurden, wurde die Agrosolbehandlung durchgeführt. Zur Behandlung wurden die Blätter der Küvette entnommen und innerhalb von 30 sec. mittels einer Handsprühflasche (Gloria Hobby 100) bei einem Sprühdruk von ca. 3 bar beidseitig bis zur vollständigen Benetzung besprüht.

Anschließend wurden die Blätter wieder in die Küvette installiert und nach Einstellung von Bedingungen die das Schließen der Stomata fördern (Dunkelheit, erhöhte CO₂-Konzentration, abgesenkte Luftfeuchte) das Schließen der Stomata kontrolliert. Erst nach vollständigem Schließen der Stomata wurden die Blätter abgeschnitten und für die REM-Aufnahmen präpariert. Dies Vorgehen diente dazu, die Gefahr der Verschleppung von oberflächlich deponierten Partikeln ins Blattinnere während der Präparation zu minimieren. Die Blätter wurden zunächst in mehreren Schritten, die Vakuumfiltration beinhalteten, fixiert (Glutaraldehyd, Formalin, Cacodylat, Osmiumtetroxid), dann in einer Ethanolreihe dehydriert und kritische-Punkt-getrocknet (Baltec CPD 30 Critical point dryer, Baltec GmbH, Schalksmühle, D). Nach dem Trocknen wurden die Blätter in Längsrichtung gebrochen, mittels Leitsilber auf 12,5 mm Aluminium-Probentellern fixiert und mit Gold besputtert (Baltec SCD 050 Sputter Coater, Baltec GmbH, Schalksmühle, D). Die für die EDX-Analysen vorgesehenen Blätter wurden nach einem abgewandelten Protokoll ohne Verwendung von Cacodylat und Osmiumtetroxid fixiert und statt mit Gold mit Kohlenstoff besputtert.

Elektronenmikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Elektronenmikroskop DSM 9400 (Fa. Zeiss) mit Aufrüstung zur digitalen Erfassung von Bildern aufgenommen. Dabei wurde das Innere der substomatären Höhlen, die an der Bruchfläche exponiert sind, auf Partikel untersucht. Daneben wurden auch Aufnahmen der Blattoberfläche und des Mesophylls angefertigt.

Um die Partikelbeladung der substomatären Höhlen zu quantifizieren, wurden die REM-Bilder der bei geöffneten und der bei geschlossenen Poren mit Agrosol/Silwet behandelten Blätter photometrisch mit Hilfe der Software ImageJ (NIH, U.S.) ausgewertet. Dazu wurde die Fläche jedes identifizierten Partikels ausgemessen. Gelegentlich auftretende Partikel, die aufgrund ihrer Form und Oberflächenbeschaffenheit eindeutig als Bruchfragmente der Zellwand erkannt werden konnten, wurden nicht mit erfasst. Unter der vereinfachenden Annahme einer Kugelform, wurde für jedes Partikel das Volumen bestimmt und das gesamte Partikelvolumen einer substomatären Höhle aufsummiert. Hierbei wurde berücksichtigt, dass nicht die gesamte

substomatäre Höhle sichtbar war, sondern neben dem unmittelbaren Bereich der Schließzellen nur einige angrenzende Epidermis- und Mesophyllzellen im Blickfeld des Elektronenmikroskops waren. Aufgrund der generellen Beobachtung, dass die Partikel vor allem im Bereich der gut sichtbaren Spaltöffnung konzentriert waren, wurde geschätzt, dass ca. 80% der Partikel einer substomatären Höhle im REM Bild sichtbar waren und die Partikelbelegung einer substomatären Höhle entsprechend korrigiert.

Probenumfang:

	Behandlung	behandelte Blätter	untersuchte substomatäre Höhlen
a)	Mit Agrosol/Silwet behandelt bei geöffneten Stomata	5	173
b)	Mit Agrosol/Silwet behandelt bei geschlossenen Stomata	5	206

Die EDX-Analysen wurden am Centrum für Materialanalytik der technischen Fakultät der Universität Kiel an einem mit EDX-Detektor (X-act, Oxford Instruments) ausgestatteten Rasterelektronenmikroskop (Carl Zeiss Ultra Plus) durchgeführt.

Statistische Verfahren

Zum Test auf signifikante Unterschiede wurde Student's t-Test verwendet. In den Fällen, in denen die Proben nicht normalverteilt oder homoskedastisch waren, wurde der Mann-Whitney Rangsummen-Test verwendet oder ein Permutationstest auf Signifikanz durchgeführt (Moore & McCabe, 2005). Alle Berechnungen wurden mit dem Programm SigmaPlot Vers. 12 durchgeführt.

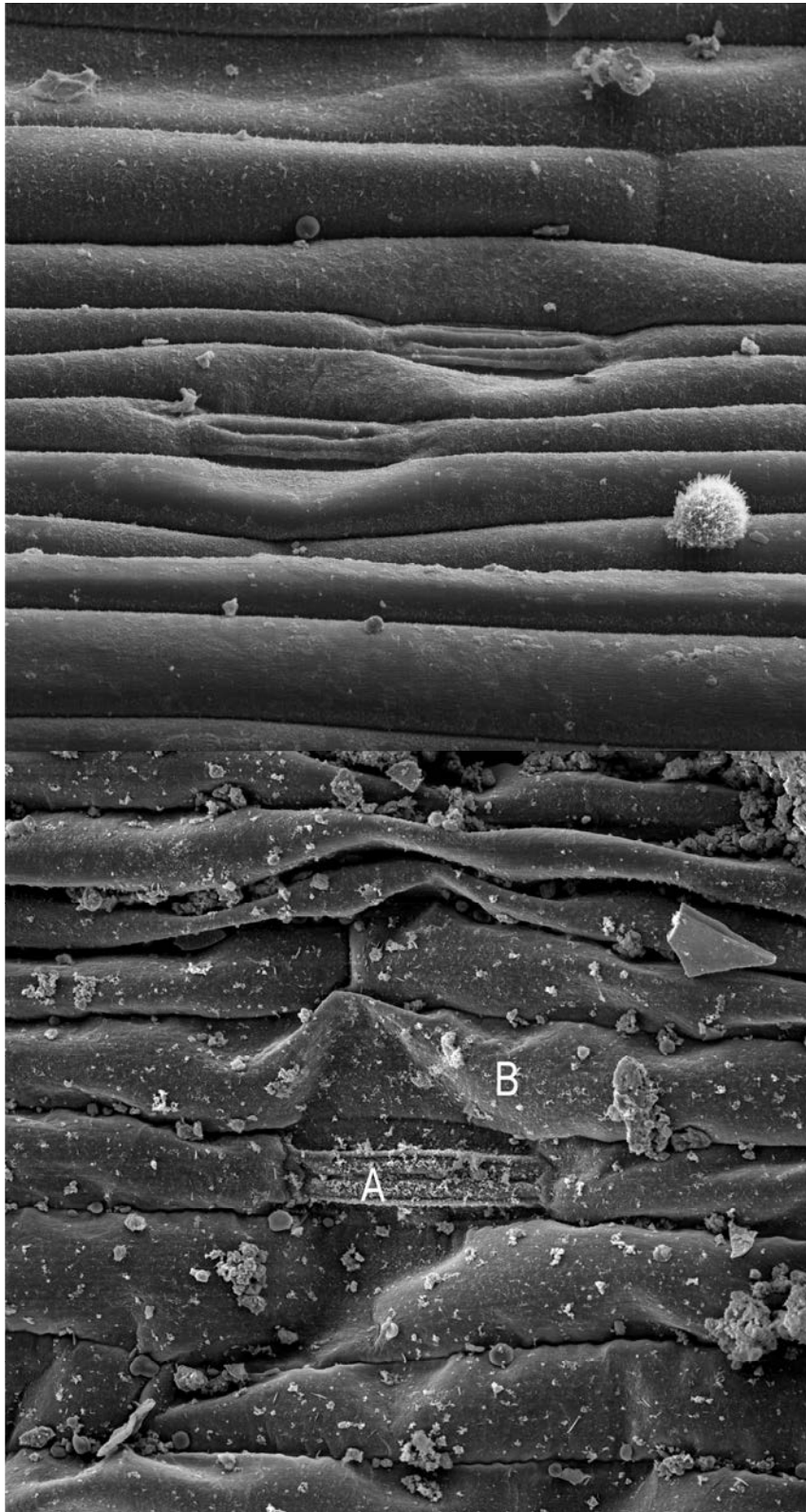
Ergebnisse

Nach der Behandlung mit Agrosol unter Zusatz des Netzmittels Silwet Gold war die Blattoberfläche relativ gleichmäßig mit Partikeln und Aggregaten von Partikeln unterschiedlicher Größe belegt (Abb. 2). Ein unbehandeltes Blatt wies dagegen nur relativ wenige Partikel auf. Im Blattinneren wurden in der Umgebung der Spaltöffnungen ebenfalls Partikel gefunden (Abb. 3-5) deren Anzahl zwischen 0 und über 40 Partikel variierte. Im Mesophyll, das nicht in unmittelbarer Umgebung der Spaltöffnungen lag, wurden nur sehr wenige Partikel gefunden (Abb. 6). Die Partikel im Blattinneren wurden aufgrund der Ähnlichkeit mit den Partikeln auf der Außenseite als Agrosolpartikel identifiziert. Der Öffnungsgrad der Stomata

zum Zeitpunkt der Behandlung hatte einen Einfluss auf die Menge der Partikel, die in der substomatären Höhle gefunden wurden. Die Partikelbeladung war am größten, wenn bei geöffneten Stomata behandelt wurde (Abb. 3 und 4). Erfolgte die Behandlung bei geschlossenen Stomata, waren häufig keine oder nur wenige Partikel zu finden (Abb. 5).

Die photometrische Quantifizierung der Partikelbeladung der substomatären Höhlen (Abb. 7) zeigt, dass bei Behandlung von Blättern mit geschlossenen Stomata ca. 22% der substomatären Höhlen ohne Partikel waren, gegenüber 36% bei im geöffneten Zustand behandelten Blättern. Zusätzlich traten sehr hohe Partikelbeladungen ausschließlich bei geöffnet behandelten Blättern auf. Als durchschnittliches Partikelvolumen ergab sich dementsprechend bei Blättern mit geöffneten Stomata $38,4 \mu\text{m}^3$ und bei geschlossenen Stomata $13,0 \mu\text{m}^3$. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p= 0.0449$, Bootstrap/Permutationstest). Die Variation der Partikelbeladung, insbesondere bei den mit geöffneten Stomata behandelten Blättern war sehr groß. Drei von fünf untersuchten Blättern unterschieden sich in der Partikelbeladung kaum von den geschlossen behandelten Blättern (Abb. 8) während die beiden anderen Blätter eine deutlich höhere Partikelbeladung aufwiesen. Die Größenverteilung der in den substomatären Höhlen gefundenen Partikel unterschied sich zwischen den Behandlungsvarianten. Wurden die Behandlung bei geöffneten Stomata durchgeführt, war ein höherer Anteil großer Partikel zu finden (Abb. 9). Der Unterschied war signifikant bei $p < 0.006$ (Bootstrap/Permutationstest). Mittels EDX wurde an 16 Partikeln, die in den substomatären Höhlen gefunden wurden, die atomare Zusammensetzung bestimmt (Abb. 7). Bei vier Partikeln waren Calcium und Sauerstoff die dominierenden Elemente mit einem Verhältnis von ca. 1:3, das der atomaren Zusammensetzung von Calciumcarbonat entspricht. Die anderen Partikel enthielten entweder zu geringe Mengen an Calcium, oder zu große Anteile anderer Elemente (Na, Mg, Al, P, S) unterschiedlicher Zusammensetzung, um sie als Calciumcarbonat einzustufen.

Eine grobe Abschätzung der ins Blattinneren aufgenommenen Partikelmasse wurde unter der Annahme, dass es sich bei den beobachteten Partikeln um CaCO_3 -Partikel handelt durchgeführt. Da die EDX-Analyse zeigte, dass auch Partikel anderer chemischer Zusammensetzung unklarer Herkunft vorkamen, ist diese Abschätzung als Obergrenze anzusehen. Unter Berücksichtigung der an Haferblättern ermittelten stomatären Dichte von $21.5 \text{ Stomata/mm}^2$ und der Dichte von CaCO_3 ergab sich eine Gesamtpartikelbeladung des Blattinneren von 2.2 bzw. 0.8 mg/m^2 Blattfläche bei geöffnet bzw. geschlossen behandelten Stomata.



10000 V

7 mm

500 X

20 μ m

8282

Zentrale Mikro

Abb. 2

Vergleich eines unbehandelten (oben) mit einem mit Agrosol unter Zusatz des Netzmittels Silwet Gold behandelten Blattes. Nach der Behandlung sind Partikel unterschiedlicher Größe und Form relativ gleichmäßig auf der Blattoberfläche verteilt. A: Geschlossene Spaltöffnung, B: Epidermiszelle.

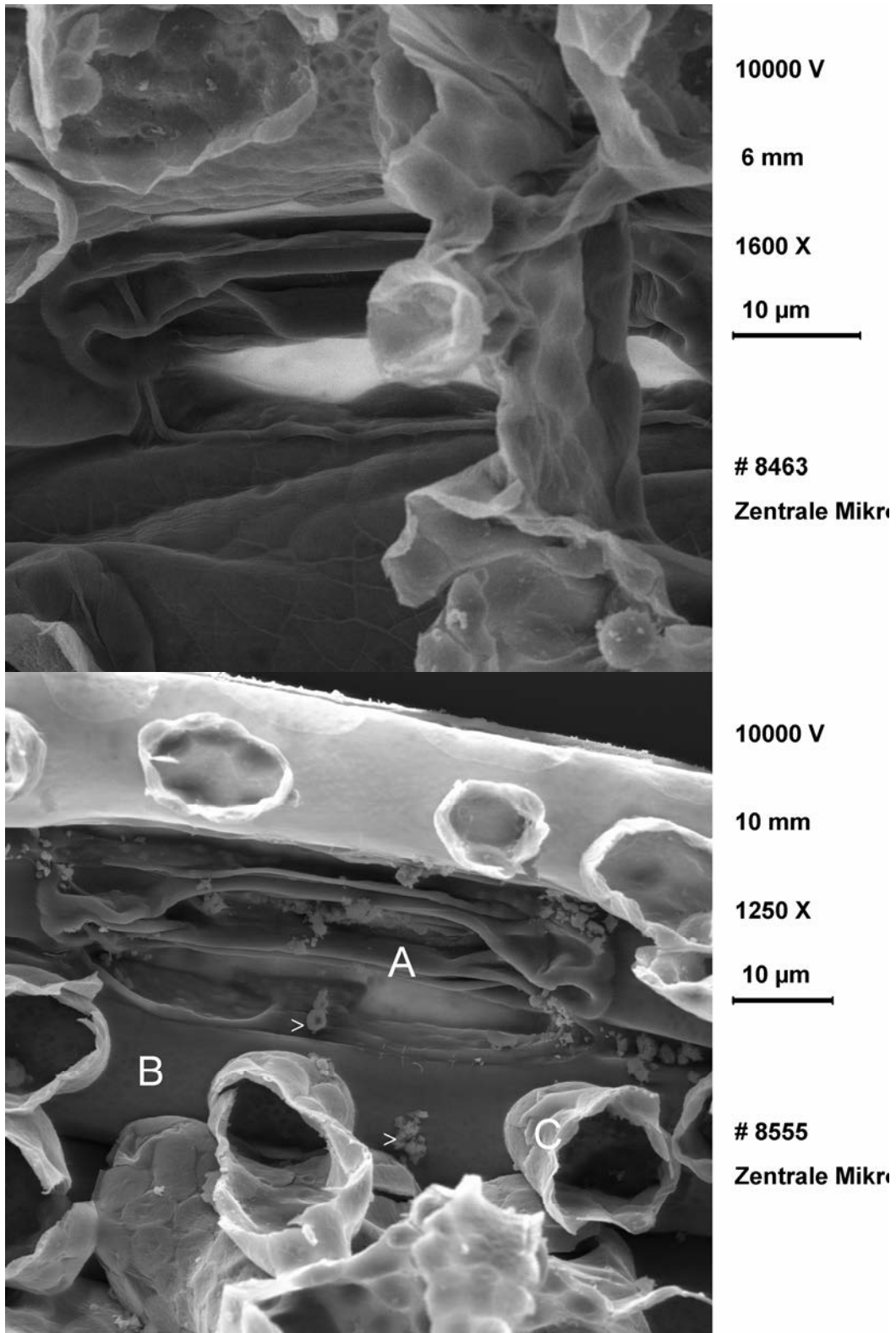


Abb. 3
 Blick auf Spaltöffnungen von innen nach außen aus Richtung der substomatären Höhle. Oben ist ein unbehandeltes, unten ein bei geöffneten Spaltöffnungen mit Agrosol/Silwet-behandeltes Blatt mit ungewöhnlich starker Belegung der Umgebung der Pore mit Partikeln gezeigt. A: geschlossenen Spaltöffnung, B: Epidermiszelle, Zelle des Schwammparenchyms. Die Pfeile markieren Partikel, bzw. Partikelaggregate die als Agrosolpartikel angesprochen wurden.

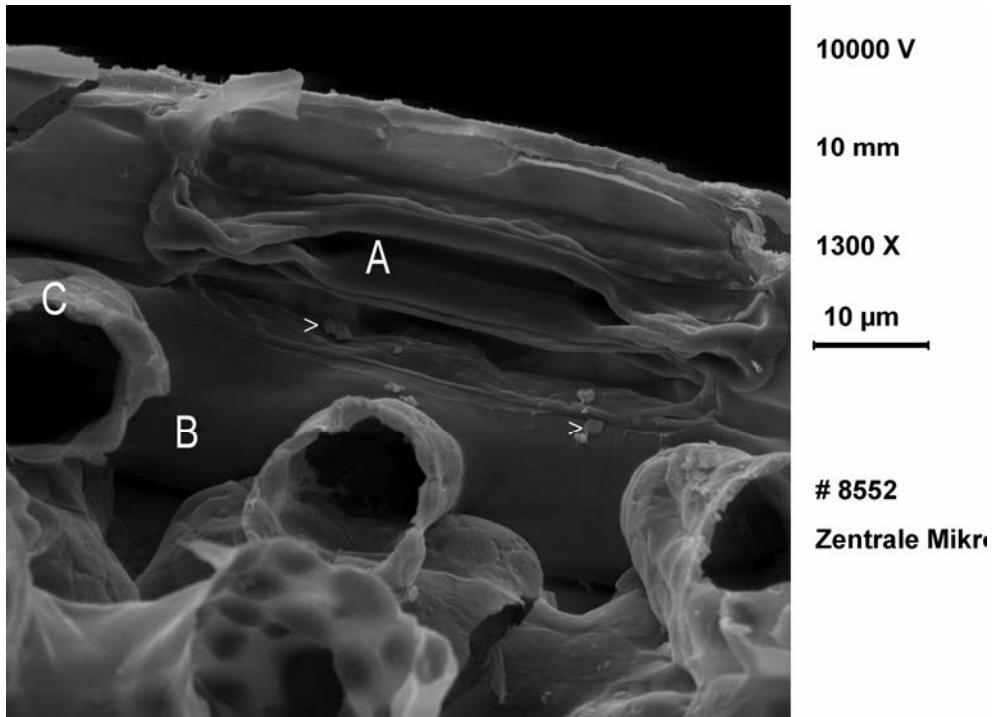


Abb. 4

Blick auf eine Spaltöffnung von innen nach außen aus Richtung der substomatären Höhle. Hier ist eine typische Partikelbelegung nach Agrosol/Silwet-Behandlung bei geöffneten Stomata gezeigt.

A: geschlossene Spaltöffnung, B: Epidermiszelle, C: Zelle des Schwammparenchyms. Die Pfeile markieren Partikel, die wahrscheinlich bei der Behandlung ins Blatt eingedrungen sind.

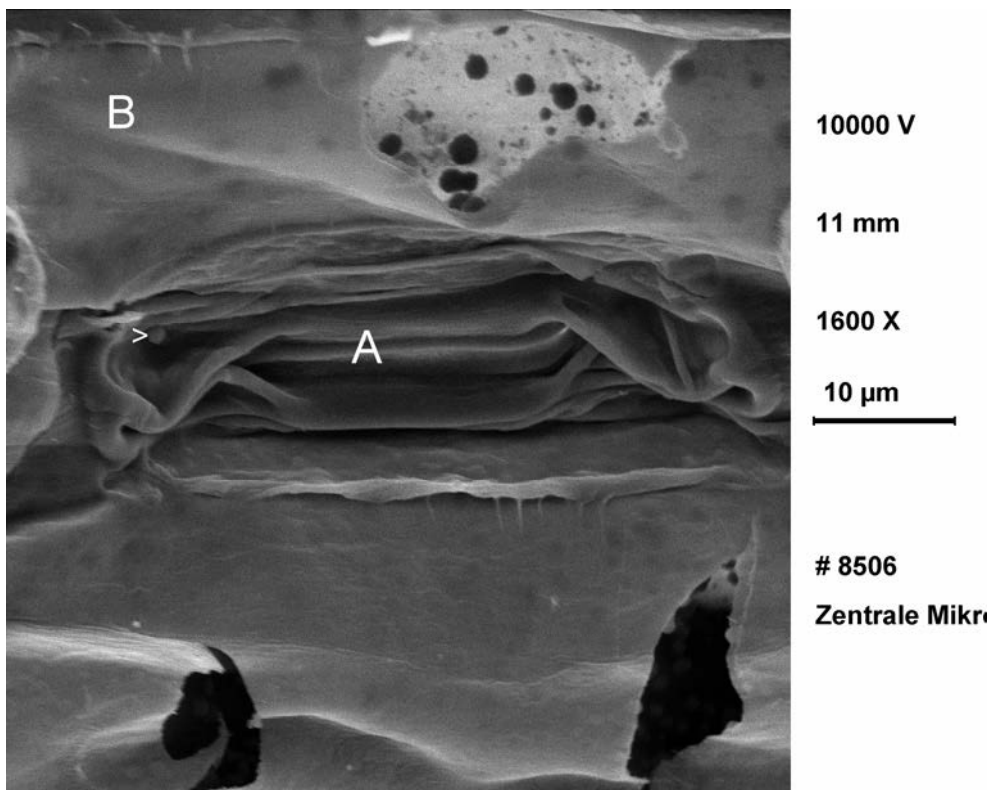


Abb. 5

Blick auf eine Spaltöffnung von innen nach außen aus Richtung der substomatären Höhle. Hier ist eine typische Partikelbelegung nach Agrosol/Silwet-Behandlung bei geschlossenen Stomata gezeigt. A: geschlossene Spaltöffnung, B: Epidermiszelle. Der Pfeil markiert ein Partikel, das entweder bei der Behandlung oder bei der nachfolgenden REM-Präparation ins Blatt eingedrungen sind.

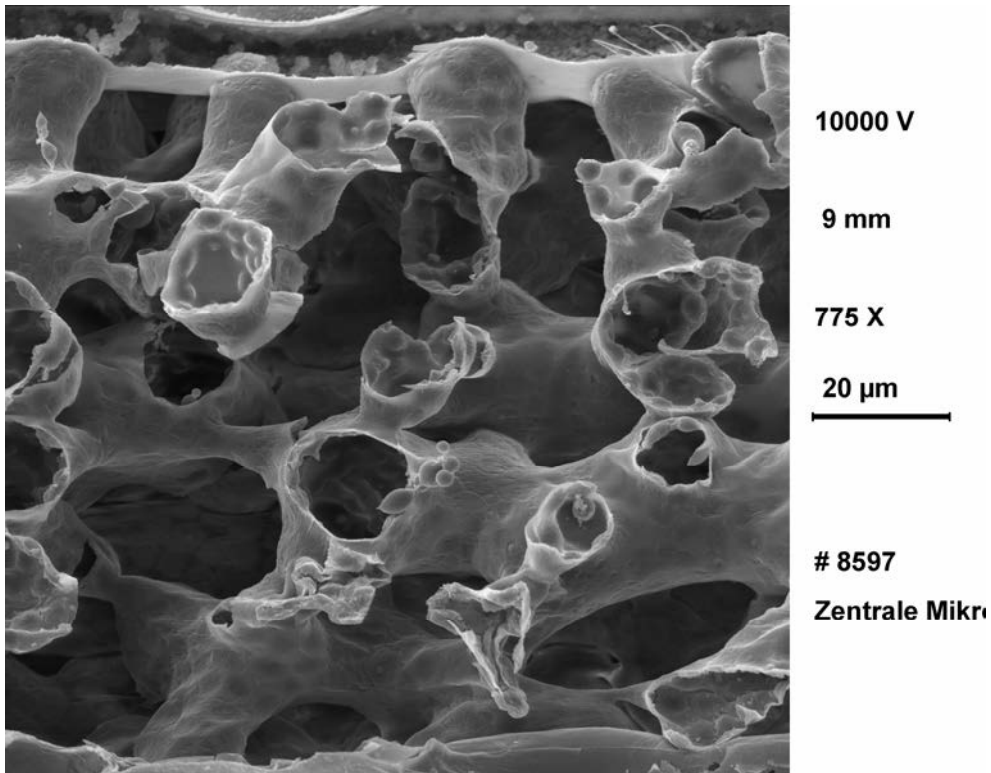


Abb. 6

Aufsicht auf den längs gebrochenen Blattquerschnitt eines mit geöffneten Stomata mit Agrosol/Silwet behandelten Blattes. Die hier gezeigten Bereiche des Mesophylls, die nicht in direkter Nähe einer substomatären Höhle liegen, zeigen keine Partikelbelastung.

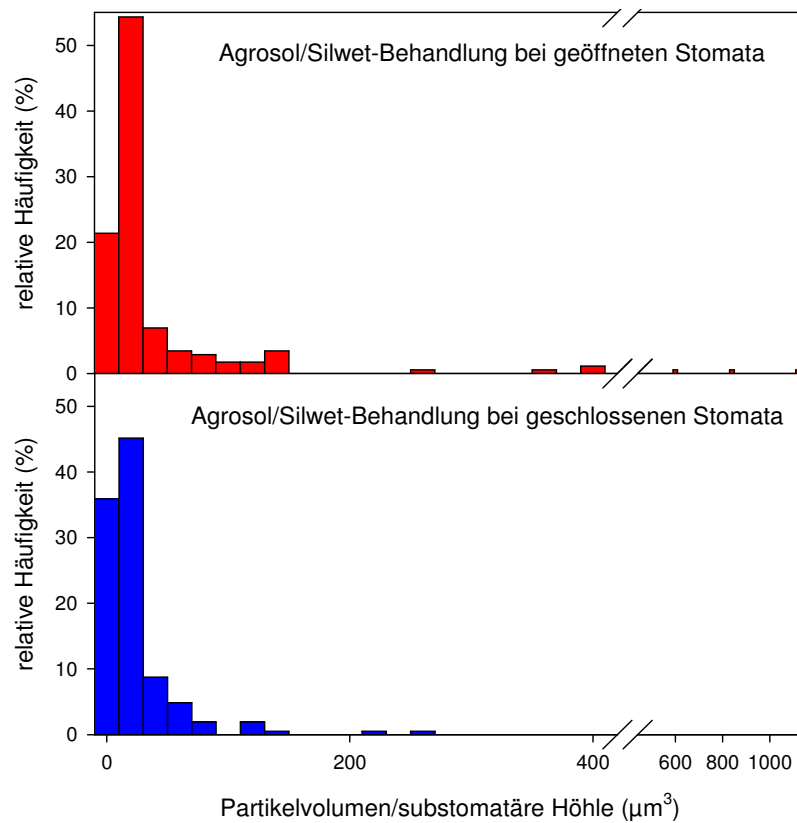


Abb. 7

Die Häufigkeitsverteilung der Partikelbelastung substomatärer Höhlen bei Behandlung der Blätter im Zustand geschlossener bzw. geöffneter Stomata. Die Balken stellen die relative Häufigkeit der jeweiligen Klasse der Partikelbelastung dar.

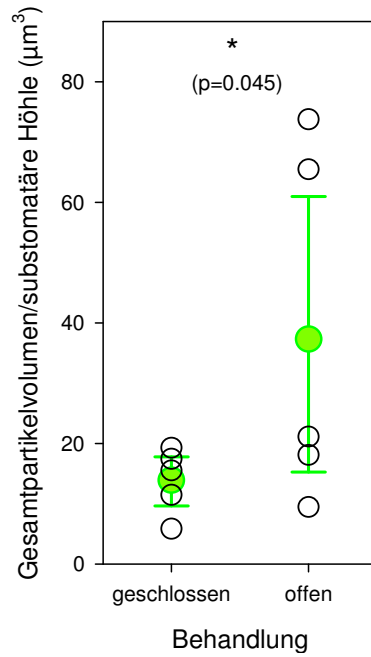


Abb. 8

Die mittlere Partikelbeladung der substomatären Höhlen. Dargestellt sind Mittelwerte über alle substomatären Höhlen der einzelnen untersuchten Blätter (schwarze Kreise) und Mittelwerte über alle Blätter einer Behandlung sowie deren 95% Konfidenzintervalle (grün).

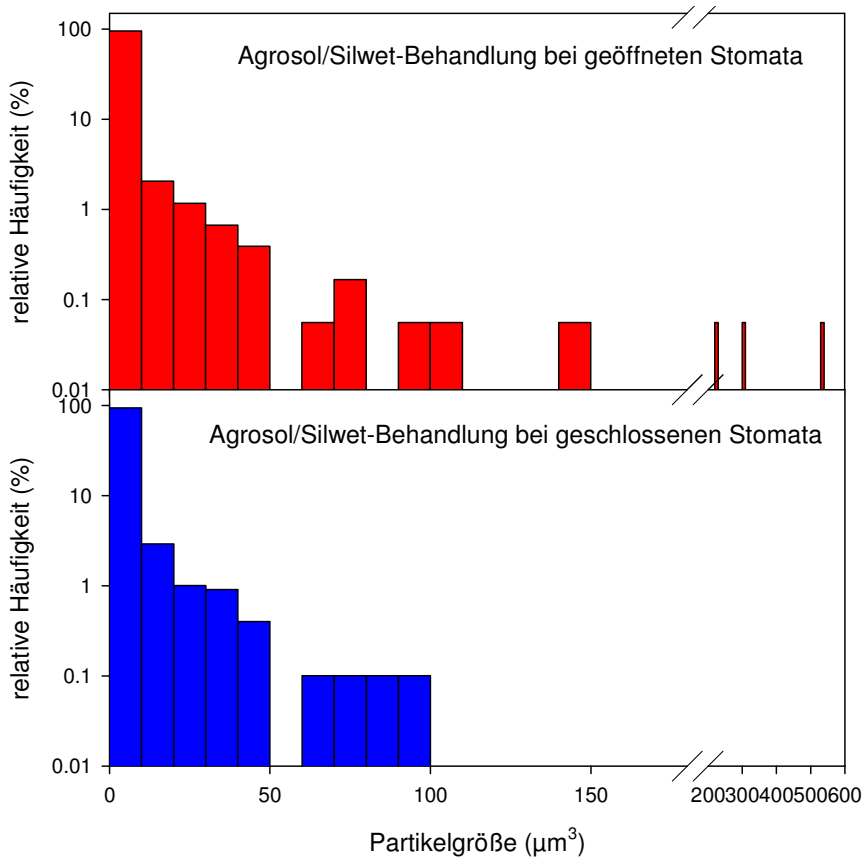


Abb. 9

Die Häufigkeitsverteilung der Partikelgrößen bei Behandlung der Blätter im Zustand geschlossener bzw. geöffneter Stomata. Die Balken stellen die relative Häufigkeit der jeweiligen Klasse der Partikelgrößen dar. Die Häufigkeit ist logarithmisch skaliert, um die Unterschiede in der Häufigkeit größerer Partikel hervorzuheben.

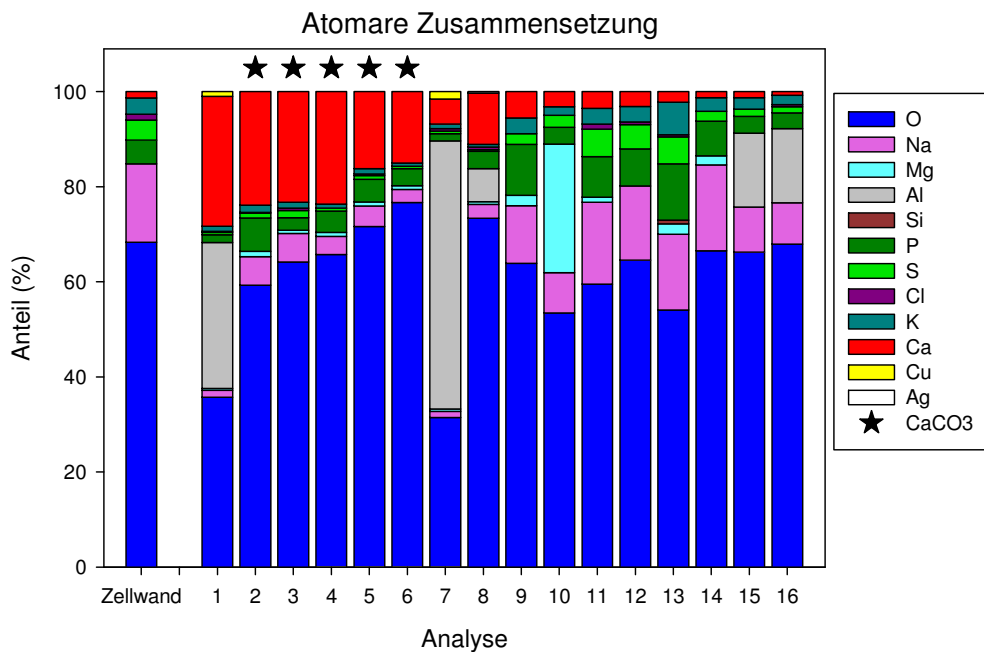


Abb. 10

Die atomare Zusammensetzung von Partikeln in der substomatären Höhle nach Behandlung der Blätter mit Agrosol/Silwet im Zustand geöffneter Stomata. Partikel die aufgrund ihres Calcium-Sauerstoff-Verhältnisses als Calciumcarbonat identifiziert wurden, sind mit einem Stern markiert.

Diskussion

Ziel dieser Untersuchung war die Frage, ob und in welchem Umfang bei der Behandlung mit Agrosol unter Verwendung des Netzmittels "Silwet Gold" Partikel durch die Stomata ins Blattinnere aufgenommen werden.

Das Problem des elektronenmikroskopischen Nachweises von Partikeln im Blattinneren ist die prinzipiell nicht auszuschließende Möglichkeit, dass während der Aufbereitung der Proben für die Elektronenmikroskopie Partikel, die ursprünglich auf der Blattoberfläche deponiert waren, sekundär ins Blattinnere gelangen. Dies kann entweder bei der Vakuuminfiltration während der Fixierung der Proben, oder auch beim Brechen der Proben nach der Trocknung geschehen, wenn Bruchpartikel sich auf den frisch exponierten Bruchflächen ablagern. Um diese Einschleppung während der Präparation möglichst zu minimieren, wurde darauf geachtet und mikroskopisch überprüft, dass die Stomata beim Beginn der Fixierung geschlossen waren. Trotz der verbleibenden prinzipiellen Möglichkeit der nachträglichen Einschleppung erlaubt der Vergleich mit den bei geschlossenen Stomata behandelten Blättern den differentiellen Nachweis der Partikelaufnahme. Beide durchliefen mit anfänglich geschlossenen Stomata den gleichen Präparationsprozess. Wenn ausschließlich während der Präparation Partikel ins Blatt gelangt wären, hätte die Partikelbeladung sich nicht unterscheiden dürfen. Die höhere Partikelbeladung

der mit geöffneten Stomata behandelten Blätter gegenüber den mit geschlossenen Stomata behandelten Blättern macht also eine Aufnahme von Partikeln während der Behandlung wahrscheinlich. Die deutlich nachweisbare Partikelbelastung der mit geschlossenen Stomata behandelten Blätter kann dagegen entweder auf direkter Aufnahme während der Behandlung oder auf Eindringen während der nachfolgenden Präparationsschritte beruhen. Dies kann anhand dieser Experimente nicht entschieden werden.

Auch die Größenverteilung der Partikel deutet auf ein Eindringen von Partikeln durch die Spaltöffnungen hin. Ein Eindringen von Partikeln durch geöffnete Poren sollte einen höheren Anteil größerer Partikel zur Folge haben, als ein Eindringen bei geschlossenen Stomata während der Präparationsschritte, die eine Vakuuminfiltration beinhalten. Dieses Indiz für eine stomatare Aufnahme während der Behandlung wurde auch tatsächlich festgestellt.

Die mittels EDX festgestellte atomare Zusammensetzung der Partikel zeigt, dass Calciumcarbonatpartikel in den substomatären Höhlen vorhanden waren. Allerdings traten auch Partikel anderer, nicht eindeutig identifizierbarer, chemischer Zusammensetzung auf. Diese könnten möglicherweise schon vor der Behandlung auf der Blattoberfläche deponierte Partikel sein (Staub, Aerosol), die dann durch die Behandlung mit Netzmittel remobilisiert wurden und zusammen mit den Agrosol-Partikeln in das Blattinnere eindringen konnten. Andererseits könnten es auch Bruchfragmente von Zellbestandteilen sein.

Diese Ergebnisse belegen zusammengenommen, dass Partikel während einer Behandlung mit einer Suspension mineralischer Partikel unter Verwendung eines wirksamen Netzmittels durch geöffnete Stomata ins Blattinnere eindringen können.

Dies liegt in einer Linie mit neuere Ergebnissen, dass die Stomata keine prinzipielle Barriere für den Durchtritt wässriger Lösungen sein müssen (Burkhardt et al., 2012). Auch die Aufnahme von Nanopartikeln wurde bereits nachgewiesen (Eichert et al., 2008).

Für mineralische partikuläre Blattdünger bedeutet dieses Ergebnis, dass eine notwendige Voraussetzung für eine Wirkung im Blattinneren, das Eindringen der Partikel in den Interzellularraum des Blattes, als möglich angesehen werden kann. Aufgrund der geringen aufgenommenen Mengen kommen Wirkungsmechanismen in Betracht, die entweder nur geringer Stoffmengen bedürfen oder über die pflanzliche Signaltransduktion verstärkt werden und z.B. zu geänderten Entwicklungsabläufen führen. Denkbar wäre z.B. eine Freisetzung von Ionen, die eine bestehende Unterversorgung ausgleichen. Es wäre zu untersuchen, ob die vermutlich langsamere Freisetzung aus mineralischen Partikeln Vorteile gegenüber der bei flüssig appliziertem Blattdünger schnell einsetzenden aber weniger nachhaltigen Zufuhr von Nährelementen bietet. Ein Ansatzpunkt für eine Wirkung könnte auch die Calciumfreisetzung aus Calciumcarbonatpartikeln sein, entweder über eine direkte Verbesserung der Pflanzen-

ernährung oder über die Rolle von Calcium in der Signaltransduktion. Ebenfalls denkbar wäre eine Beeinflussung des apoplastischen pH, der in Interaktion mit Abscisinsäure eine wichtige regulative Rolle bei der Reaktion auf Wasserstress und andere Stressoren spielt (Wilkinson & Davies, 2008; Geilfus & Mühling, 2012).

Die quantitative Abschätzung der Partikelaufnahme enthält eine Reihe von vereinfachenden Annahmen und kann nur die ungefähre Größenordnung angeben. Insbesondere das Ergebnis aus den EDX-Analysen, dass viele der im Blattinneren nachgewiesene Partikel kein Calciumcarbonat sind, zeigt, dass eine vorsichtige Interpretation erforderlich ist.

Eine direkte Extrapolation dieser Ergebnisse auf die Partikelaufnahme während der praktischen Anwendung des Präparates ist noch nicht möglich. Diese Ergebnisse wurden an einer Pflanze mit ungewöhnlich großen Stomata durchgeführt, die während der Behandlung unter Einstellung optimaler Licht- Luftfeuchte- und CO₂-Bedingungen eine maximale Spaltöffnungsweite hatten. Diese Bedingungen sind im Freiland nur selten gegeben. Um die Relevanz dieser Ergebnisse für eine realistische Anwendersituation zu prüfen, sollten daher elektronenmikroskopische Untersuchungen der Partikelaufnahme bei unterschiedlichen stomatären Öffnungsgraden durchgeführt werden. Sinnvolle wären auch Messungen der Partikelaufnahme nach der landwirtschaftlichen Praxis entsprechenden Behandlung im Freiland.

Literatur

Burkhardt J, Basi S, Pariyar S, Hunsche M. 2012. Stomatal penetration by aqueous solutions – an update involving leaf surface particles. *New Phytologist* **196**: 774–787.

Eichert T, Kurtz A, Steiner U, Goldbach HE. 2008. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiologia Plantarum* **134**: 151–160.

Geilfus C, Mühling KH. 2012. Transient alkalization in the leaf apoplast of *Vicia faba* L. depends on NaCl stress intensity: an in situ ratio imaging study. *Plant, Cell & Environment* **35**: 578–587.

Kaiser H, Legner N. 2007. Localization of mechanisms involved in hydropassive and hydroactive stomatal responses of *Sambucus nigra* to dry air. *Plant Physiology* **143**: 1068–1077.

Moore DS, McCabe GP. 2005. *Introduction to the Practice of Statistics*. New York: W.H. Freeman and Co.

Wilkinson S, Davies WJ. 2008. Manipulation of the apoplastic pH of intact plants mimics stomatal and growth responses to water availability and microclimatic variation. *Journal of Experimental Botany* **59**: 619–631.

Hartmut Kaiser
Kiel, den 5.2.2013