

**Untersuchungen zu
Phloembeladungsmechanismen bei
Laubbäumen am Beispiel von *Quercus robur*
und *Fraxinus excelsior***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät der Mathematik und Naturwissenschaften der

Bergischen Universität Wuppertal

angefertigt in der

Arbeitsgruppe für molekulare Pflanzenforschung/Pflanzenbiochemie (Botanik)

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Soner Öner-Sieben

Wuppertal, im Juni 2014

Referentin: Prof'in Dr. Gertrud Lohaus, Bergische Universität Wuppertal

Co-Referentinnen: Prof'in Dr. Gela Preisfeld, Bergische Universität Wuppertal

Prof'in Dr. Andrea Polle, Georg-August-Universität Göttingen

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20140813-122526-9

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20140813-122526-9>]

Für Semiha und Muhsin Öner.

„Man merkt nie, was schon getan wurde, man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.“

Marie Curie

Inhaltverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG.....	2
2.1	AUFBAU DES PHLOEMS UND TRANSPORT.....	2
2.2	MECHANISMEN DER PHLOEMBELADUNG	4
2.2.1	<i>Apoplastische Phloembeladung</i>	<i>5</i>
2.2.1.1	Funktion und Struktur von Saccharose-Transportern	6
2.2.2	<i>Symplastische Phloembeladung.....</i>	<i>7</i>
2.2.3	<i>Passive Beladung.....</i>	<i>9</i>
2.2.4	<i>Phloemtransport in Bäumen</i>	<i>10</i>
2.3	FRAGESTELLUNG	11
3	MATERIALEN UND METHODEN	12
3.1	PFLANZENMATERIAL	12
3.2	ANZUCHT UND EXPERIMENTELLE BEDINGUNGEN	12
3.3	BAKTERIEN- UND HEFESTÄMME.....	13
3.4	PLASMIDE	13
3.5	OLIGONUKLEOTIDE.....	14
3.6	EXTRAKTION VON METABOLITEN AUS PFLANZENGEWEBEN.....	14
3.6.1	<i>Chloroform-Methanol-Extraktion.....</i>	<i>14</i>
3.6.2	<i>Sammlung von Phloemsaft aus Blattstielen.....</i>	<i>15</i>
3.6.3	<i>Gewinnung von Phloemsaft mit der Laser-Aphiden-Technik</i>	<i>15</i>
3.6.4	<i>Gewinnung von Apoplastensaft</i>	<i>16</i>
3.7	MESSUNG DER OSMOLALITÄT	16
3.8	CHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON ZUCKERN.....	17
3.9	ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN	17
3.9.1	<i>RNA-Isolierung.....</i>	<i>18</i>
3.9.1.1	<i>PINE-Methode.....</i>	<i>18</i>
3.9.1.2	<i>TRIZOL-Methode</i>	<i>19</i>
3.9.2	<i>DNA-Isolierung</i>	<i>20</i>
3.9.2.1	<i>Isolierung von genomischer DNA</i>	<i>20</i>
3.9.2.2	<i>Isolierung von Plasmid DNA (Mini-Prep).....</i>	<i>20</i>
3.10	BESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREKONZENTRATIONEN	21
3.11	HYDROLYSE VON DNA.....	22
3.12	cDNA-SYNTHESE	22
3.13	AMPLIFIKATION VON DNA-FRAGMENTEN	22
3.13.1	<i>Primerdesign</i>	<i>22</i>
3.13.2	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	<i>23</i>

3.13.3 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE).....	24
3.13.3.1 3'-RACE.....	24
3.13.3.1.1 cDNA-Synthese	24
3.13.3.1.2 PCR.....	24
3.13.3.2 5'-RACE.....	26
3.13.3.2.1 cDNA-Synthese	26
3.13.3.2.2 Aufreinigung der cDNA	26
3.13.3.2.3 Terminale Transferase Reaktion	26
3.13.3.2.4 1. PCR-Reaktion.....	26
3.13.3.2.5 Nested PCR.....	27
3.13.4 Kolonie-PCR	28
3.13.5 DNA-Sequenzierung	28
3.14 QUANTITATIVE ECHTZEIT-PCR (qRT-PCR).....	29
3.15 KLONIERUNGSMETHODEN.....	32
3.15.1 Aufreinigung von PCR-Produkten	32
3.15.2 Dephosphorylierung	33
3.15.3 A-Tailing	33
3.15.4 Ligation.....	34
3.15.5 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	34
3.15.6 Transformation von <i>E. coli</i>	35
3.15.7 Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
3.15.8 Herstellung von Dauerkulturen	37
3.16 DNA-GRÖßENAUFRENNUNG MIT AGAROSEGELEN.....	38
3.17 IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS VON QrSUT1 UND FeSUT1	38
3.17.1 Herstellung von polyklonalen Antikörpern	38
3.17.2 Antikörper-Färbung an Handschnitten.....	39
3.18 ¹⁴ C-SACCHAROSE AUFNAHMETEST IN TRANSFORMIERTEN HEFEN	40
3.19 NICHT-WÄSSRIGE FRAKTIONIERUNG (NWF)	40
3.19.1 Marker-Enzym-Bestimmung.....	41
3.19.1.1 Protein-Extraktion	41
3.19.1.2 Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford	42
3.19.1.3 Bestimmung von PEP-Cx	42
3.19.1.4 Bestimmung von α -Mannosidase.....	43
3.19.1.5 Bestimmung der Chloroplasten.....	43
3.20 TRANSMISSIONEN-ELEKTRONEN-MIKROSKOPIE (TEM)	43
3.21 BIOINFORMATISCHE ARBEITEN	44
4 ERGEBNISSE	45
4.1 ABSCHNITT I: SCREENING VERSCHIEDENER BAUMARTEN UND SUCHE NACH MODELLPFLANZEN FÜR UNTERSCHIEDLICHE PHLOEMBELADUNGSTYPEN	46
4.1.1 Zuckerkomposition in Exsudaten aus Blattstielen	46

4.1.2	Zuckergehalte in Blattextrakten.....	48
4.1.3	Suche nach Saccharose-Transportern in verschiedenen Baumarten.....	48
4.1.4	Phylogenetische Analyse der gefundenen SUT-Sequenzen	51
4.2	ABSCHNITT II: KONZENTRATIONSGRADIENTEN ZWISCHEN DEM CYTOSOL DER MESOPHYLLZELLEN UND DEM PHLOEM BEI <i>QUERCUS ROBUR</i> UND <i>FRAXINUS EXCELSIOR</i> SCHLIEßEN EINE PASSIVE PHLOEMBELADUNG AUS	56
4.3	ABSCHNITT III CHARAKTERISIERUNG VON QRSUT1 UND FESUT1 UND LOKALISATION VON FESUT1	85
4.4	ABSCHNITT IV: EXPRESSION UND REGULATION VON <i>QRSUT1</i> UND <i>FESUT1</i>	113
5	GESAMTDISKUSSION.....	137
5.1	MÖGLICHE PASSIVE PHLOEMBELADUNG BEI SALICACEAE.....	137
5.2	PASSIVE BELADUNG DES PHLOEMS GILT NICHT FÜR ALLE LAUBBAUMARTEN	138
5.3	AKTIVE APOPLASTISCHE PHLOEMBELADUNG IN <i>Q. ROBUR</i>	140
5.4	PHLOEMBELADUNG BEI <i>F. EXCELSIOR</i> IST SOWOHL APOPLASTISCH ALS AUCH SYMPLASTISCH	141
5.5	SUT EXPRESSION IN ALLEN ORGANEN UND WÄHREND DER GESAMTEN VEGETATIONS-PERIODE	143
5.6	ZUSAMMENFASSUNG UND OFFENE FRAGEN	145
6	APPENDIX	147
7	REFERENZEN	149
	DANKSAGUNG.....	164
	ERKLÄRUNG	165

1 Zusammenfassung

Phloembeladung ist ein zentraler Mechanismus in der Translokation von Fotoassimilaten von den Orten der Fotosynthese zu den heterotrophen Organen einer Pflanze. Das Wissen über diesen Prozess stammt in erster Linie aus Untersuchungen an krautigen Pflanzen – wenig ist über diesen Mechanismus in Bäumen bekannt. Aufgrund einiger physiologischer Besonderheiten von Bäumen werden diese überwiegend zu den passiven Phloembeladern gezählt, während bei krautigen Pflanzen bekannt ist, dass die Phloembeladung aktiv apoplastisch oder aktiv symplastisch abläuft. Da nur wenige empirische Daten über die Beladung des Phloems in Gehölzen vorliegen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Phloembeladung an zwei repräsentativ ausgewählten Baumarten im Detail untersucht. Ausgehend von der Anatomie der kleinsten Blattadern (*minor veins*) und der im Phloem transportierten Zucker wird *Quercus robur* (Stiel-Eiche) zu den passiven Phloembeladern gezählt, während *Fraxinus excelsior* (Gemeine Esche) einen für aktiv symplastische Belader typischen Aufbau des Phloems aufweist.

Es konnte mithilfe der Nicht-wässrigen Fraktionierung (NWF) gezeigt werden, dass in beiden Arten das Phloem aktiv beladen werden muss, da ein steiler Konzentrationsgradient der Transportzucker in Richtung Mesophyll eine rein passive Diffusion verhindert. Zusätzlich wurden Saccharose-Transporter (SUT) für *Q. robur* (QrSUT1) und *F. excelsior* (FeSUT1) isoliert und in Hefe charakterisiert. Es zeigte sich, dass beide Transporter Saccharose transportieren können und über SUT-typische Substrataffinitäten verfügen (QrSUT1 = 6,78 mM, FeSUT1 = 2,08 mM). Der Transporter FeSUT1 konnte mit spezifischen Antikörpern in den Geleitzellen des Phloems nachgewiesen werden, was seine Bedeutung für die Beladung des Phloems mit Saccharose unterstreicht.

Quantitative Real-Time PCR-Analysen zeigten, dass in beiden Arten die Transporter in allen untersuchten Geweben und zu jeder Jahreszeit exprimiert wurden. Bei *Q. robur* ist die Expression von QrSUT1 in *source*-Blättern am stärksten, während FeSUT1 bei *F. excelsior* vor allem in Wurzeln exprimiert wird. Für *Q. robur* spielt der SUT-vermittelte apoplastische Beladungsweg vermutlich eine geringere Rolle als für *F. excelsior*.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der für Bäume generell postulierte passive Beladungsmechanismus in den beiden untersuchten Arten nicht zutrifft. Vielmehr ist davon auszugehen, dass das Phloem in ähnlicher Weise wie bei krautigen Pflanzen aktiv beladen wird. *Q. robur* ist wahrscheinlich ein aktiver apoplastischer Belader, während *F. excelsior* das Phloem aktiv symplastisch und apoplastisch belädt.

2 Einleitung

Als Primärproduzenten sind Pflanzen in der Lage atmosphärischen Kohlenstoff über die Fotosynthese in Form energiereicher Kohlenhydrate zu binden und Biomasse aufzubauen. Der wichtigste Transportzucker für die Versorgung von heterotrophen Geweben wie Wurzeln, Blüten, Samen oder Knollen durch die autotrophen Organe ist das chemisch inerte Disaccharid Saccharose; daneben werden in manchen Familien zusätzlich Zuckeralkohole und Oligosaccharide der Raffinosefamilie (RFO) transportiert (Zimmermann und Ziegler 1975). Die Verteilung von Kohlenhydraten in der Pflanze erfolgt über das Phloem, welches im Gegensatz zum Xylem nicht vom Transpirationssog der Blätter abhängig ist und Stoffe lateral als auch vertikal transportieren kann.

2.1 Aufbau des Phloems und Transport

Das Phloem besteht aus langen Siebröhren, die aus Einheiten von Siebelementen und Geleitzellen (SE-CC-Komplex) gebildet werden und in denen die Siebelemente über Siebplatten miteinander verbunden sind. Zusätzlich finden sich Phloemparenchymzellen im Phloemgewebe, deren genaue Funktion noch nicht geklärt ist. Die Siebelemente sind durch das Fehlen von Zellkern sowie der meisten Zellorganellen charakterisiert, verfügen aber über eine intakte Zellmembran und sind über zahlreiche Plasmodesmen mit den Geleitzellen verbunden (van Bel 2003). Geleitzellen sind im Gegensatz zu den Siebelementen reich an Mitochondrien und ihre Hauptaufgaben sind die Versorgung der Siebelemente sowie ihre Beladung. Die Blattadern werden anhand ihrer Größe und Vernetzung in verschiedene Ordnungen unterteilt. Die kleinsten Blattadern 4. bis 8. Ordnung (*minor veins*), in denen die Phloembeladung stattfindet, vereinigen sich bis zum Blattstiel mit weiteren Gefäßen zu den Adern 1. Ordnung (Gamalei 1989, van Bel 1993). Im Stamm von Bäumen liegt das für den axialen Stofftransport verantwortliche sekundäre Phloem entlang der Sprossachse im Bast und wird durch das Kambium vom darunterliegenden Holzgewebe getrennt. Vertikal verlaufende Phloemstrahlen, die die Verlängerung der Markstrahlen des Holzes in das Phloem darstellen, dienen als Stoffreserve und zur Versorgung des Holzes (van Bel 1990).

Neben dem Transport von Kohlenhydraten zu den Netto-Kohlenstoffimporteuren (*sink*) von den Netto-Kohlenstoffexporteuren (*source*) werden viele weitere Stoffe im Phloem transportiert, darunter Aminosäuren, Proteine und Nukleinsäuren (Byrne und Miller 1990, Riens et al. 1991, Winter et al. 1992, Lohaus et al. 1995, 1998, Lohaus und Möllers 2000, Knop et al. 2001, Kehr 2006, Atkins et al. 2011, Bai et al. 2011) sowie anorganische Ionen (Hall und Baker 1972, Hayashi und Chino 1986, Ohshima et al. 1990). Die genaue Funktion

der Makromoleküle ist nicht abschließend geklärt, aber es wird angenommen, dass diese sowohl in der Signaltransduktion zwischen einzelnen Geweben eine Rolle spielen als auch für Wartung und Erhalt der Siebröhren wichtig sind (Atkins et al. 2011).

Die treibende Kraft für den Stofftransport im Phloem ist der osmotische Druck zwischen den *source*- und *sink*-Geweben einer Pflanze; beschrieben in der sogenannten Druckstromtheorie von Münch (1930). Durch das ständige Entfernen von Assimilaten aus dem Phloem in heterotrophen Organen und dem kontinuierlichen Beladen des Phloems in den fotosynthetisch aktiven Blättern wird ein Konzentrationsgradient aufrechterhalten, der den Stofffluss gewährleistet (Abb. 2.1).

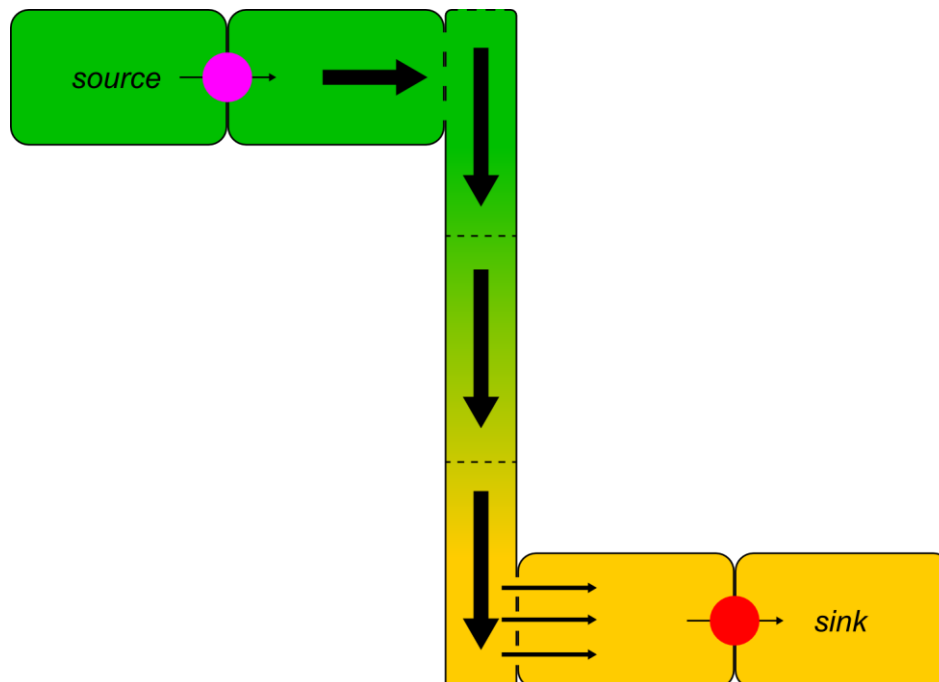


Abb. 2.1 Schema zur Darstellung der Druckstromtheorie von Münch (1930). In den *source*-Organen wird das Phloem mit Transportzuckern beladen (pinker Kreis), während in den *sink*-Organen der Zucker aus dem Phloem in die Zellen transportiert wird (roter Kreis). Dadurch wird ein Konzentrationsgradient in den Siebröhren aufgebaut, der den Stofftransport (schwarze Pfeile) aufrecht erhält.

Ein wichtiger Schritt in der Translokation von Zuckern ist die Beladung des Phloems in den Geleitzellen (Slewinski et al. 2013), welcher bisher vor allem an krautigen Pflanzen untersucht wurde. Das Wissen um die Phloembeladung in Bäumen ist noch sehr rudimentär, wobei aufgrund der physiologischen Besonderheiten verholzter Pflanzen mitunter andere Beladungsmechanismen postuliert werden als für krautige Pflanzen (Davidson et al. 2011).

2.2 Mechanismen der Phloembeladung

Es werden drei mögliche Typen der Beladung des Phloems mit Kohlenhydraten postuliert, die sich hinsichtlich der Morphologie der *minor veins* (Gamalei 1989, van Bel 1993), der transportierten Zucker (Zimmermann und Ziegler 1975), dem Vorhandensein von Konzentrationsgradienten für Transportzucker zwischen dem Mesophyll und dem Phloem (Lohaus et al. 1995, Nadwodnik und Lohaus 2008) und der Bedeutung von Saccharose-Transportern (SUT) (Riesmeier et al. 1992, Sauer und Stolz 1994) unterscheiden: a) Apoplastischer aktiver Transport mittels SUT (Riesmeier et al. 1992), b) Symplastisch aktiver Transport durch *polymer trapping* von Raffinose-Oligosacchariden (RFO) (Turgeon und Gowan 1990) und c) Passiver Transport durch Diffusion (Turgeon und Medville 1998) (Abb. 2.2).

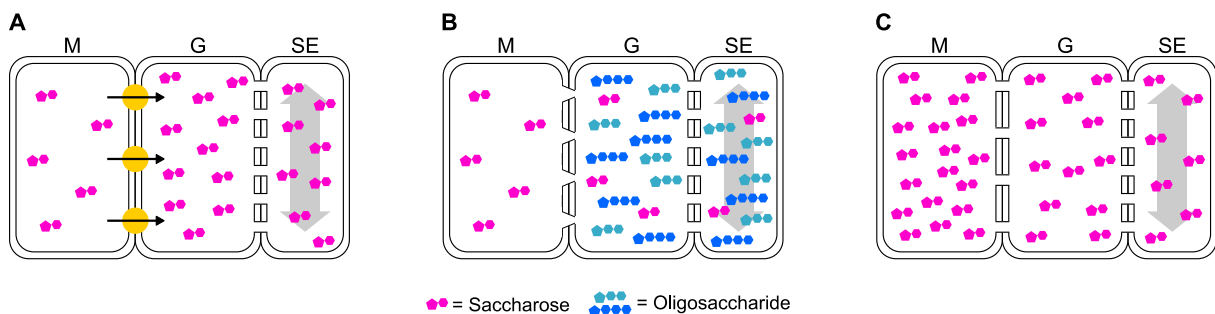


Abb. 2.2 Schematische Darstellung verschiedener Beladungsmechanismen des Phloems. M = Mesophyll, G = Geleitzelle, SE = Siebelement. A: Apoplastischer Transport. Saccharose wird mithilfe von H^+ -Symportern (gelbe Kreise) aus dem Apoplasten in die Geleitzellen transportiert. B: *Polymer trapping*. Saccharose diffundiert in die Geleitzelle und wird dort zu Oligosacchariden der Raffinosefamilie synthetisiert. C: Passive Beladung. Saccharose diffundiert von den Mesophyllzellen entlang eines Konzentrationsgradienten in die Siebelemente.

Die Fähigkeit einer Pflanze einen bestimmten Beladungsmechanismus zu nutzen ist mit charakteristischen Strukturen in den *minor veins* assoziiert. Gamalei (1989) hat verschiedene Typen von *minor veins* definiert und diese bestimmten Beladungsmechanismen zugeordnet. Der sogenannte offene Typ (Typ 1) ist gekennzeichnet durch eine Vielzahl von Plasmodesmen zwischen Geleit- und Mesophyllzellen, während die Geleitzellen des geschlossenen Typs (Typ 2a-2c) kaum oder keine Verbindungen zu den umliegenden Mesophyllzellen aufweisen. Durch die symplastische Isolierung sind Typ 2-Spezies durchweg apoplastische Belader, die sich untereinander noch in der Anzahl der Plasmodesmen sowie der Geleitzellstruktur unterscheiden (Pate und Gunning 1969, Gamalei 1989). Der Haupttransportzucker in diesen Arten ist Saccharose oder Saccharose mit Zuckeralkoholen (Zimmermann und Ziegler 1975, Lohaus et al. 1995, Nadwodnik und Lohaus 2008).

Pflanzen, die eine Typ 1 *minor vein*-Anatomie aufweisen, wurden anhand ihrer Geleitzellen von Davidson et al. (2011) nochmals in zwei Untergruppen aufgeteilt: Typ 1 (IC) haben

Intermediärzellen (IC) die durch Felder asymmetrisch verzweigter Plasmodesmen mit den umliegenden Mesophyllzellen verbunden und spezifisch für RFO transportierende Spezies sind (Turgeon et al. 1993, Knop et al. 2001, Voitsekhovskaja et al. 2009). Typ 1 (CC) Spezies verfügen über sogenannte gewöhnliche Geleitzellen (CC), d.h. sie haben eine glatte Zellwand und sind über symmetrische Plasmodesmen mit den Mesophyllzellen verbunden. Sie ähneln morphologisch den Geleitzellen des Typs 2, weisen im Gegensatz zu diesen aber eine erhöhte Anzahl an Plasmodesmen zu den umliegenden fotosynthetisch aktiven Mesophyllzellen auf. Es wird postuliert, dass sie das Phloem passiv beladen, da aufgrund der symplastischen Verbindungen Saccharose entlang eines Konzentrationsgradienten frei diffundieren könnte (Turgeon und Medville 1998). Aus evolutionärer Perspektive werden die unterschiedlichen Beladungsformen des Phloems als Weiterentwicklung und Anpassung an Umweltbedingungen aufgefasst, von denen der passive Beladungstyp als ursprünglich angesehen wird (De Schepper 2013).

2.2.1 Apoplastische Phloembeladung

Durch die symplastische Isolierung der Geleitzellen von den umliegenden Mesophyllzellen muss Saccharose zunächst die Mesophyllzellen verlassen, um anschließend in die Geleitzellen aufgenommen zu werden. Der Mechanismus des Saccharose-Exports war lange Zeit unverstanden, doch in den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass u. a. SWEET-Proteine an diesem Prozess beteiligt sind (Chen et al. 2012). Es sind allerdings weitere Untersuchungen nötig, um den Export von Saccharose aus den Zellen in den Apoplasten im Detail zu verstehen. Diese Transporter wurden an der Plasmamembran von Phloemparenchymzellen lokalisiert und transportieren nach dem Prinzip der vereinfachten Diffusion Saccharose entlang eines Konzentrationsgradienten aus den Zellen in den Apoplasten (Baker et al. 2012, Chen et al. 2012). Abbildung 2.3 zeigt eine schematische Darstellung der apoplastischen Beladung des Phloems in *source*-Gewebe. Saccharose wird zunächst über SWEET und mögliche andere Transporter in den Apoplasten exportiert, anschließend von H⁺-abhängigen Symportern in die Geleitzellen aufgenommen, von wo aus sie dann in die Siebelemente diffundieren. Bereits Sovonick et al. (1974) zeigten, dass die Phloembeladung in der Rübe (*Beta vulgaris*) ein an ATP gebundener aktiver Prozess ist. Spätere Arbeiten bestätigten die Vermutung, dass Plasmamembran lokalisierte Transporter für die Beladung des Phloems verantwortlich sind (Giaquinta 1977, 1979, Delrot und Bonnemain 1981, Riesmeier et al. 1993, Sauer et al. 1994).

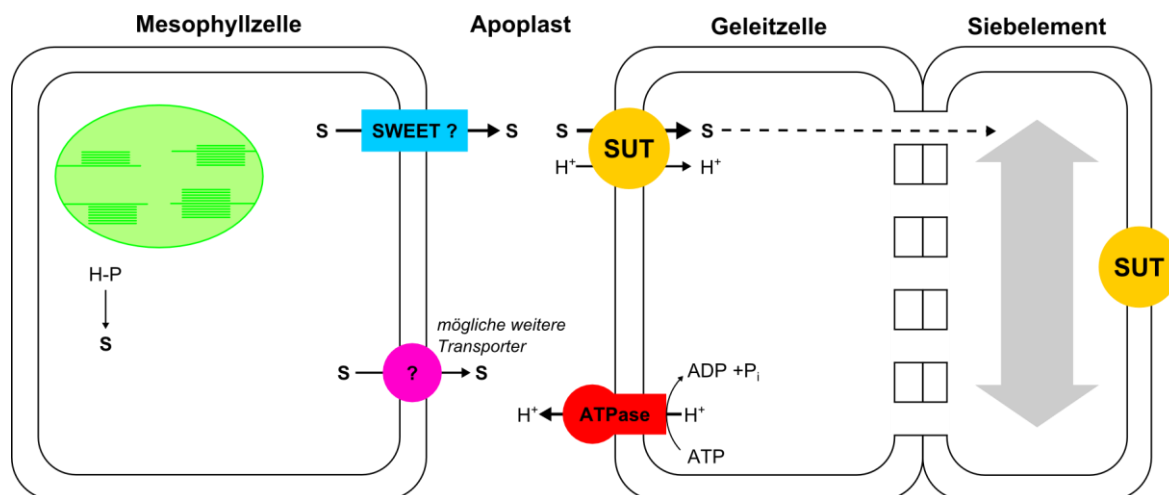


Abb. 2.3 Schematische Darstellung der apoplastischen Phloembeladung. Die aus Hexose-Phosphaten (H-P) synthetisierte Saccharose (S) aus den Mesophyllzellen wird vermutlich über SWEET und mögliche andere Transporter in den Apoplasten exportiert. Von dort transportieren membranständige Saccharose-Transporter (SUT) Saccharose zusammen mit Protonen (H^+) in die Geleitzellen. Der Protonengradient wird durch H^+ ATPasen aufrechterhalten, die durch SUT eingebrachte Protonen aus dem Cytosol der Geleitzellen wieder in den Apoplasten pumpen. Saccharose-Transporter sind neben den Geleitzellen auch in der Plasmamembran der Siebelemente lokalisiert.

2.2.1.1 Funktion und Struktur von Saccharose-Transportern

Eine essentielle Rolle für das Beladen des Phloems mit Kohlenhydraten über den Apoplasten spielen Saccharose-Transporter (Ludewig und Flügge 2013). Die erste Transporter-cDNA wurde von Riesmeier et al. (1992) aus Spinat (*Spinacia oleracea*) isoliert und in Hefe überexprimiert. Mittlerweile sind eine Vielzahl weiterer Transporter isoliert und charakterisiert worden, die alle ähnliche strukturelle Eigenschaften aufweisen (Rentsch et al. 1998, Lemoine 2000, Williams et al. 2000, Aoki et al. 2003, Kühn 2003, Sauer 2007, Shiratake 2007, Braun und Slewinski 2009, Kühn und Grof 2010, Geiger 2011, Reinders 2012). Saccharose-Transporter bilden eine funktionelle Gruppe mit glycosid-pentosid-hexuronid (GPH) Symportern und sie sind Teil einer großen Gruppe von Membranproteinen, der sogenannten *major facilitator superfamily* (MFS) (Marger und Saier 1993, Lalonde 2004, Saier et al. 2006). Sie verfügen über 12 Transmembrandomänen (TMD) mit einem längerem cytoplasmatischen Loop zwischen TMD 6 und TMD 7 (Abb. 2.4, da S6 und S7) (Kühn 2003, Sauer 2007) und die K_M -Werte der meisten charakterisierten Transporter variieren von 0,07 mM bis 20 mM Saccharose (Kühn und Grof 2010). Phylogenetische Analysen haben ergeben, dass SUT grob in die drei Untergruppen Typ I, Typ II und Typ III eingeteilt werden können (Sauer 2007, Braun und Slewinski 2009, Reinders 2012).

cf4e5e66-d213-442b-99be-d425427a56aa.seqjob

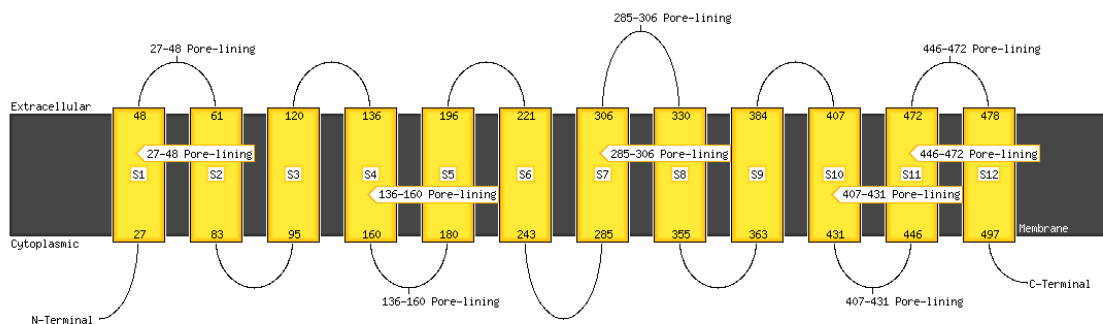


Abb. 2.4 Grundstruktur von Saccharose Transportern. Die membranständigen Transporter bestehen aus 12 Transmembrandomänen (TMD) mit einem längeren cytoplasmatischen Loop zwischen TMD 6 und TMD 7 sowie cytoplasmatischen N- und C-Termini. Die durchschnittliche Proteinlänge beträgt etwa 500 bis 600 Aminosäuren. Strukturmodell vom Typ I-Transporter FeSUT1 aus *Fraxinus excelsior* (Accession Nr: KF736981, Öner-Sieben und Lohaus 2014) erstellt auf dem PSIPREP Server (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psiprep/>).

Typ I-Transporter kommen nur in Dikotyledonen vor und werden primär mit der Beladung des Phloems assoziiert, während Typ II-SUT aus vielen verschiedenen Pflanzengruppen isoliert wurden. Diese Gruppe wurde nochmals in Typ IIA und Typ IIB unterteilt (Braun und Slewinski 2009, Reinders 2012). Typ IIB-Transporter sind spezifisch für Monokotyledone und es konnte gezeigt werden, dass sie für die Beladung des Phloems notwendig sind (Braun und Slewinski 2009). Sie erfüllen damit funktionell die gleiche Aufgabe wie Typ I-Transporter, sind aber strukturell eine distinkte Gruppe innerhalb der Transporter in Gefäßpflanzen. Die Funktion von Typ IIA ist weitestgehend unbekannt. Es wurde vermutet, dass sie als Saccharose-Sensoren eine Rolle spielen, da sie über einen sehr viel längeren zentralen Loop verfügen, doch RNAi Experimente in *Arabidopsis thaliana* konnten diese Vermutung nicht bestätigen (Barker et al. 2000, Meyer 2000, Kühn 2003, Braun und Slewinski 2009). Sie sind ubiquitär im Pflanzenreich verteilt, man findet sie auch im Genom vom Moosfarn *Selaginella moellendorffii* sowie dem Laubmoos *Physcomitrella patens*. Auch innerhalb einer Pflanze werden sie in verschiedenen Geweben exprimiert, insbesondere in *sink*-Organen (Meyer et al. 2000, Aoki et al. 2003, Banks et al. 2011, Lalonde und Frommer 2012, Reinders et al. 2012). Saccharose-Transporter vom Typ III sind am Tonoplasten lokalisiert und spielen eine wichtige Rolle im Export von Saccharose aus der Vakuole in das Zytoplasma (Endler et al. 2006, Eom et al. 2011, Payyavula et al. 2011, Frost et al. 2012, Schneider et al. 2012).

2.2.2 Symplastische Phloembeladung

Bei der symplastischen Beladung diffundiert Saccharose aus den Mesophyllzellen durch asymmetrisch verzweigte Plasmodesmen in die Intermediärzellen des Phloems (Abb. 2.5). Dort wird sie zusammen mit Galactinol durch das Enzym Raffinosesynthase zu Raffinose synthetisiert. Durch die weitere Addition von Galactose an Raffinose entsteht Stachyose durch die Aktivität der Stachyosesynthase (Beebe und Turgeon 1992, Turgeon 1996,

McCaskill und Turgeon 2007, Voitsekhovskaja et al. 2009, Cao et al. 2013). Die Verlängerung mit Galactinol wird in einigen Arten bis zur Verbascose fortgeführt (Turgeon und Medville 2010). Diese Oligosaccharide können aufgrund ihrer Größe nicht zurück durch die Plasmodesmen in das Mesophyll diffundieren und werden mit dem Stofffluss im Phloem wegtransportiert. Turgeon und Gowan (1990) schlugen diesen Weg der Phloembeladung vor, nachdem sie feststellten, dass ein Teil der Beladung des Phloems in der Buntnessel (*Coleus blumei*) nicht durch die Behandlung mit dem SUT-Inhibitor PCMSB (*p*-Chlorquecksilber-Benzosulfonsäure) beeinflusst wurde. Daraus schlossen sie, dass es einen Transporter unabhängigen symplastischen Transportweg geben muss, der in hohen Zuckerkonzentrationen im Phloem resultiert. Inzwischen liegen zahlreiche experimentelle Befunde vor, die diese These stützen, wobei die unterschiedliche Größe der Plasmodesmen noch nicht gezeigt wurde (Turgeon und Beebe 1991, Haritatos et al. 1996, Knop et al. 2001, Lalonde et al. 2003, Turgeon und Medville 2009, Voitsekhovskaja et al. 2006, 2009, Gil et al. 2011). Intermediärzellen spielen bei diesem Vorgang eine entscheidende Rolle, weil sie über die anatomischen und synthetischen Voraussetzungen für diese Art der „Molekül-Falle“ verfügen (Flora und Madore 1996, Voitsekhovskaja et al. 2009). Neben den Intermediärzellen befinden sich im Phloem von symplastischen Beladern gewöhnliche Geleitzellen von denen vermutet wird, dass sie zusätzlich einen apoplastischen Beladungsmechanismus des Phloems ermöglichen (Knop et al. 2004).

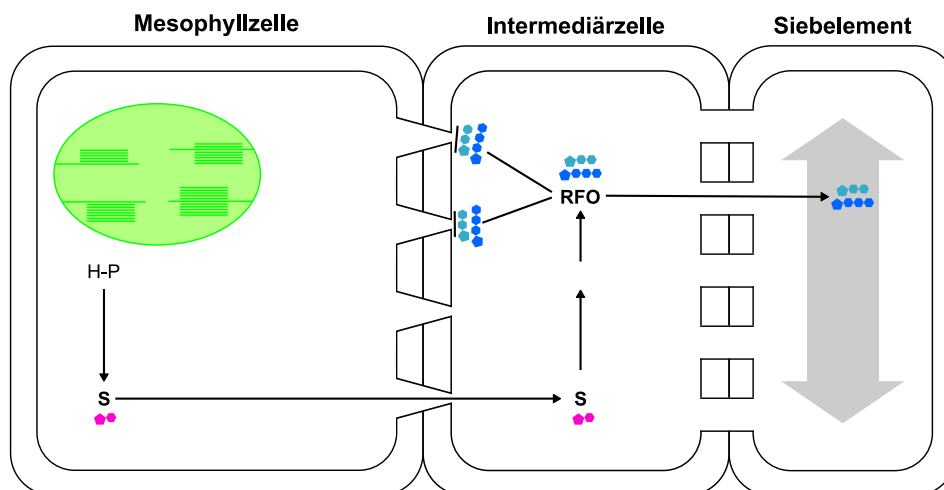


Abb. 2.5 Polymer trap-Modell. Saccharose (S) diffundiert durch Felder asymmetrisch verzweigter Plasmodesmen von den Mesophyllzellen in die Intermediärzellen der *minor veins*. Dort wird sie zusammen mit Galactinol zu Raffinose-Oligosacchariden (RFO) synthetisiert, die aufgrund der Größenselektivität der Plasmodesmen nicht zurück in die Mesophyllzellen diffundieren können. Durch den aufgebauten Druckstrom im Phloem gelangen die RFO in den Stofffluss und werden weitertransportiert. Die Synthese von RFO hält einen Konzentrationsgradienten für Saccharose in Richtung SE-CC-Komplex aufrecht.

2.2.3 Passive Beladung

Eine offene Phloemanatomie stellte zusammen mit der Tatsache, dass einige Pflanzen fast ausschließlich Saccharose und daneben manchmal Zuckeralkohole transportieren, die Frage nach einer alternativen Phloembeladung in den Raum (Zimmermann und Ziegler 1975, Gamalei 1989). Plasmodesmen zwischen den Mesophyllzellen und dem SE-CC-Komplex würden den Aufbau eines Konzentrationsgradienten für Saccharose durch SUT verhindern und das Fehlen von RFO im Phloemsaft sowie von Intermediärzellen in den *minor veins* schließt auch einen *polymer trap* Mechanismus aus. Das Fehlen eines Gradienten aber würde der Münch'schen Druckstromtheorie widersprechen, weil in diesem Falle die treibende Kraft für den Stofffluss ausbleiben würde. Demnach müsste es eine weitere Beladungsform geben, die Zucker nicht gegen ein Konzentrationsgefälle pumpt, sondern bei der Saccharose einem Gradienten folgend in das Phloem transportiert wird. Die Beladung des Phloems ohne Energieverbrauch wurde das erste Mal nach Versuchen an der Trauerweide (*Salix babylonica*) durch Turgeon und Medville (1998) postuliert (Abb. 2.6).

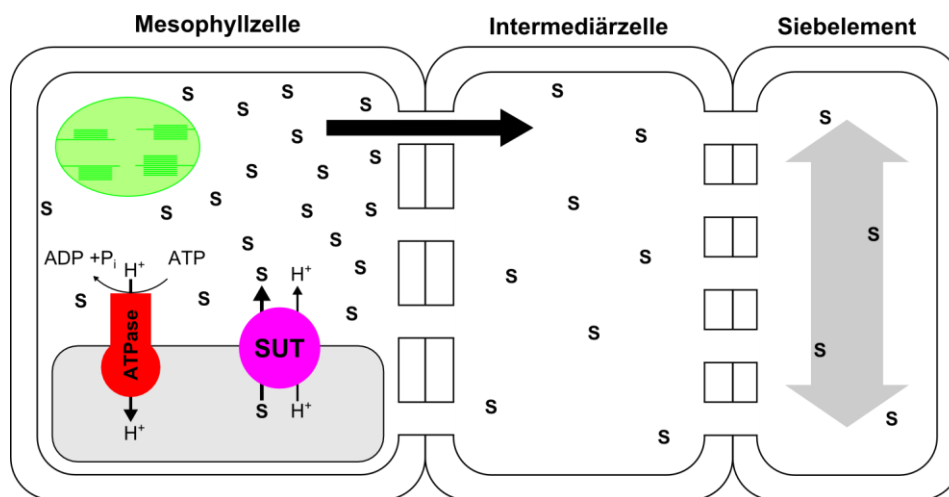


Abb. 2.6 Phloemtransport durch passive Diffusion. Die Konzentration von Saccharose (S) ist in den Mesophyllzellen am höchsten. Die symmetrisch verzweigten Plasmodesmen zwischen Mesophyllzellen und SE-CC-Komplex erlauben das freie Diffundieren in die Geleitzellen. Von dort gelangt der Zucker in das Phloem und wird wegtransportiert. In der Vakuole gespeicherte Saccharose wird mit Tonoplast lokalisierten SUT4 Symportern in das Cytosol der Mesophyllzellen transportiert.

Sie beschrieben, dass in Plasmolyseexperimenten das Plasmalemma im Phloem sich bei ungefähr der gleichen Konzentration des Osmotikums von der Zellwand löste wie bei Zellen des Mesophylls, während bei Tabak (*Nicotiana tabacum*) das Phloem bei deutlich höheren Konzentrationen plasmolysierte als das Mesophyll. Des Weiteren konnten sie keine Akkumulation von ^{14}C -markiertem Kohlenstoff und ^{14}C -Saccharose in den Blattadern in Autoradiographien feststellen. Zusammen mit der offenen Phloemstruktur der Weide, die potenziell das freie Diffundieren von Saccharose ermöglicht, schlussfolgerten sie, dass es einen Konzentrationsgradienten vom Mesophyll in Richtung Phloem geben muss und Saccharose durch passive Diffusion in das Phloem gelangt (Abb. 2.6). Der Ort der höchsten

Zuckerkonzentration lag damit im Gegensatz zu den anderen aktiven Beladungstypen im Cytosol der Mesophyllzellen und nicht im Phloem und sank kontinuierlich in Richtung der *sink*-Organe. Weitere Autoradiografie-Experimente mit radioaktiv markiertem CO₂ oder ¹⁴C-Zuckern bei verschiedenen Pflanzenarten zeigten, dass einige Arten keine Akkumulation von Kohlenhydraten im Phloem aufwiesen (Reidel et al. 2007, Rennie und Turgeon 2009, Turgeon und Medville 2009, Fu et al. 2011).

2.2.4 Phloemtransport in Bäumen

Anatomisch gehören die *minor veins* der meisten Bäume zum offenen Typ, wobei darunter der Typ 1 (CC) dominierend ist (Gamalei 1989, Davidson et al. 2011). Kohlenstoff wird überwiegend in Form von Saccharose transportiert, in manchen Familien findet man zusätzlich noch Zuckeralkohole und RFO (Zimmermann und Ziegler 1975). Im Vergleich zu krautigen Pflanzen ist die Gesamtosmolarität der Blätter von Bäumen relativ hoch, was auf eine hohe Konzentration an gelösten Stoffen hindeutet (Fu et al. 2011). Zusammen mit Befunden aus Autoradiographien, bei denen keine Akkumulation von radioaktiv markiertem Kohlenstoff in den Venen von verschiedenen Gehölzen festgestellt wurde, wird der passive Beladungsmechanismus als der dominante Beladungstyp bei Bäumen postuliert (Turgeon und Medville 1998, Reidel et al. 2009, Rennie und Turgeon 2009, Turgeon 2010a).

Die im Phloem transportierten Zucker sind innerhalb einer Familie ähnlich (Zimmermann und Ziegler 1975). Arten aus den Familien der Betulaceae, Fagaceae, Salicaceae und Sapindaceae gelten aufgrund des überwiegenden Transports von Saccharose als typische passive Belader, während Arten der Oleaceae mit hohen Gehalten an RFO im Phloemsaft potentiell einen aktiven symplastischen Weg zur Phloembeladung nutzen.

2.3 Fragestellung

Die Phloembeladung ist ein entscheidender Schritt in der Verteilung von Fotoassimilaten innerhalb von Pflanzen. Die meisten Untersuchungen zu diesem Themenkomplex wurden an krautigen Pflanzen durchgeführt, was vor allem durch die physiologischen Besonderheiten von Gehölzen bedingt ist, welche etablierte Analyseverfahren erschweren. Hinzu kommt, dass durch die lange Generationsfolge und langsame Wachstumsraten von Bäumen experimentelle Arbeiten sehr zeitintensiv sind. In dieser Arbeit wurde die Frage untersucht, welche Phloembeladungstypen in verschiedenen Laubbaumarten vorliegen. Dazu wurden folgende Aspekte untersucht:

- a) Welcher *minor vein*-Typ liegt in den untersuchten Arten vor?
- b) Welche Zucker werden im Phloem transportiert?
- c) Liegen Konzentrationsgradienten zwischen dem Cytosol der Mesophyllzellen und dem Phloem vor?
- d) Werden Saccharose-Transporter, die an der Phloembeladung beteiligt sind, exprimiert?
- e) Wenn ja, welche biochemischen Eigenschaften haben diese Transporter und in welchen Zelltypen sind sie lokalisiert?
- f) Welche Umwelt- bzw. pflanzeninternen Faktoren beeinflussen den Zuckerstoffwechsel und die Expression von Saccharose-Transportern?

Für die Beantwortung dieser Fragen wurden biochemische und molekularbiologische Methoden angewendet. Um eine evolutive Perspektive hinzuzufügen, wurde einige als ursprünglich angesehene Gymnospermen als potentiell passive Belader in die Untersuchung mit einbezogen (Jensen et al. 2012).

3 Materialien und Methoden

3.1 Pflanzenmaterial

Die untersuchten Bäume sind weitverbreitete Arten der gemäßigten Zone. Sie wurden entweder auf dem Campus der Universität Wuppertal beprobt oder in einem Kaltgewächshaus als 3-jährige Setzlinge angezogen. Einige Proben stammen aus dem Botanischen Garten Wuppertal. Es wurden Phloemexsudate angefertigt und anhand dieser und weiterer Daten Arten zur weiteren Analyse ausgewählt.

Tabelle 3.1 Liste der untersuchten Pflanzen.

Art	Trivialname	Familie	Standort
<i>Alnus glutinosa</i>	Schwarz-Erle	Betulaceae	Campus
<i>Carpinus betulus</i>	Hain-Buche	Betulaceae	Campus
<i>Castanea sativa</i>	Ess-Kastanie	Fagaceae	Campus
<i>Fagus sylvatica</i>	Rot-Buche	Fagaceae	Campus
<i>Quercus petraea</i>	Trauben-Eiche	Fagaceae	Campus
<i>Quercus robur</i>	Stiel-Eiche	Fagaceae	Campus
<i>Quercus rubra</i>	Rot-Eiche	Fagaceae	Campus
<i>Fraxinus excelsior</i>	Gemeine Esche	Oleaceae	Campus
<i>Populus tremula</i>	Zitter-Pappel	Salicaceae	Campus
<i>Salix caprea</i>	Sal-Weide	Salicaceae	Campus
<i>Salix viminalis</i>	Korb-Weide	Salicaceae	Campus
<i>Acer campestre</i>	Feld-Ahorn	Sapindaceae	Campus
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgo	Ginkgoaceae	Bot. Garten Wuppertal
<i>Abies pinsapo</i>	Spanische Tanne	Pinaceae	Bot. Garten Wuppertal
<i>Pinus mugo</i>	Berg-Kiefer	Pinaceae	Bot. Garten Wuppertal

3.2 Anzucht und experimentelle Bedingungen

Um die Expression von SUT und die Zuckergehalte der Bäume unter natürlichen Bedingungen zu untersuchen wurden Proben von Bäumen genommen, die auf dem Campus der Universität Wuppertal (51° 14' 42" N, 7° 9' 5" O) zu finden waren. Von ausgewählten Arten wurden 3-jährige Setzlinge in offenen Kaltgewächshäusern in 5 l Töpfen gehalten. Die Pflanzen wurden von der Baumschule Selders (Haan) bezogen. Die Seitenwände der Gewächshäuser bestanden aus engmaschigem Draht, um freie Luftzirkulation zu ermöglichen. Das Dach war aus UV-durchlässigem Plexiglas und die Dachfenster waren so weit geöffnet, dass einerseits kein Regen hinein konnte und sich andererseits keine Hitze stauen konnte. Die Pflanzen wurden regelmäßig gegossen.

Über drei Jahre hinweg wurden jeden Monat der Vegetationsperiode zur gleichen Tageszeit drei Blattproben von je drei individuellen Bäumen ausgewählter Arten genommen und die Proben bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Zur Analyse von Tagesverläufen wurden ebenfalls drei Proben von drei Bäumen aus dem Gewächshaus über einen 24 h Zeitraum genommen. Zusätzlich wurde das gleiche Experiment mit Pflanzen durchgeführt, die nach 17 h Belichtung 43 h im Dauerdunkel gehalten wurden.

3.3 Bakterien- und Hefestämme

Zur Klonierung von SUT-Fragmenten wurde der Stamm *Escherichia coli* DH5 α (Woodcock et al. 1989) verwendet.

Genotyp: F⁻ (Φ dlacZ Δ M15) *recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17* ($r_k^- m_k^+$) *supE44 relA1 deoR* Δ (*lacZYA-arfF*) U169

Für die Überexpression von SUT wurde der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* SEY2102 (Emr et al. 1983) verwendet.

Genotyp: MAT α , *leu2-3, his4-519, ura3-52, suc2-D9, gal2*

3.4 Plasmide

Tabelle 3.2 Verwendeten Plasmide

Vektor	Selektionsmarker	Quelle
pGEM-T [®]	Amp ^r	Fa. Promega
NEV-E	Amp ^r , URA3	Sauer und Stolz (1994)

3.5 Oligonukleotide

Für die verschiedenen PCR-Reaktionen wurden Primer entworfen und bei der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) bestellt.

Tabelle 3.3 Oligonukleotide, die für PCR, qRT-PCR und RACE verwendet wurden.

Name	Sequenz	Zielgen, Amplikon bp
Actin_fs_for	GGTCGTGATCTCACTGATGC	Aktin, 448 (AM063027)
Actin_fs_rev	GCCACAACCTTAATCTTCATGC	Olbrich et al. 2005
Pintae_SUT1_for	ATGATTGGCAATGTTAGCTCAG	SUT, 334 (BI077135)
Pintae_SUT1_rev	ACAGCAGGCTTGTAAGTAGTC	
ST1f	GCIGCIGGIRTICARTTYGGITGGGC	SUT, ca. 350, Knop et al. 2001
ST1r	GCIACRTCIARDATCCARAAICC	
ST1lg1r	CCCATCCARTCIGTRTCRWA	SUT, mit ST1 ca. 1000
Oligo(dT)-Anchor Primer	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTT TTTTTTTTTV	Poly-A-Tail, RACE
PCR Anchor Primer	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	Oligo dT-Anchor Primer, RACE
FeSUT1EcoR1fab	TAAGCAGAATTCAAGCTTGTA AAAA GAAAT GGAGGTTGATGGAAGCAAATTG	Klonierung in NEV-E
FeSUT1EcoR1rab	TAAGCAGAATTCTCAATGAAATCCTCCGG CGCT	Klonierung in NEV-E
QrSUT1EcoR1fab	TAAGCAGAATTCAAGCTTGTA AAAA GAAAT GGAAGTTGAAAGAGCTAGTTCTGA	Klonierung in NEV-E
QrSUT1EcoR1rab	TAAGCAGAATTCTCAATGACAAGCAGTGA TGACAGG	Klonierung in NEV-E
ACT2f	AGAGATTCCGTTGCCAGAA	qRT-PCR, Zusammen mit Actin_fs_rev
QrSUT1f	CGCCGTAGACCCTTTATT	qRT-PCR
QrSUT1r	AAAACCCAACCACAAACA	qRT-PCR
FeSUT1f	GCTCTCCTTGTTGACTCC	qRT-PCR
FeSUT1r	ATTGTCACTGTAGTAGCCA	qRT-PCR

3.6 Extraktion von Metaboliten aus Pflanzengewebe

3.6.1 Chloroform-Methanol-Extraktion

Für die Zuckeranalyse der einzelnen Gewebe einer Pflanze wurden diese in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistille zu einem feinen Pulver verrieben. Etwa 200 mg des Pulvers wurden in ein Schraubröhrchen überführt, mit 5 ml Chloroform/Methanol-Puffer versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die genau abgewogene Menge wurde notiert, um später auf die per HPLC ermittelten Konzentrationen pro Gramm Frischgewicht (FW) umrechnen zu können. Nach der Inkubation wurden der Lösung 3 ml H₂O zugesetzt, gevortext und kurz

zentrifugiert (4500 rpm, EBA 3S, Fa. Hettich). Die wässrige Phase wurde in ein 100 ml Rundkolben überführt und die Extraktion mit 2 ml H₂O wiederholt. Nachdem die wässrigen Phasen im Rundkolben vereint wurden, folgte die Trocknung in einem Rotationsverdampfer (RV 10, Fa. VWR). Die Zucker wurden anschließend in 1 ml H₂O gelöst, mit einer 1 ml Spritze aufgenommen und durch einen Spitzenfilter (Nylonmembran mit 0,2 µm Porengröße, Fa. Roth) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (RG) filtriert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung.

3.6.2 Sammlung von Phloemsaft aus Blattstielen

Für eine qualitative Analyse des Phloemsaftes konnten Exsudate aus geschnittenen Petiolen gesammelt werden (Gessler et al. 2004, Atkins et al. 2011). Dazu wurden mehrere Blätter mit einem Skalpell von ihrem Ast abgetrennt und in ein mit 1 ml H₂O gefülltes 2 ml RG gesteckt, so dass die Schnittstellen in das Wasser ragten. Um zu verhindern, dass durch Transpiration das Wasser in die Blätter aufgenommen wurde, lagerten die Proben in einer großen Styroporbox, die mit feuchten Papiertüchern ausgelegt war, was zu einer vollständigen Sättigung der Luft führte. Nach einer Inkubation für mindestens 5 h bei Raumtemperatur wurden die Blätter verworfen und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.6.3 Gewinnung von Phloemsaft mit der Laser-Aphiden-Technik

Mit der Laser-Aphiden-Technik ist es möglich, reinen Phloemsaft zu gewinnen (Barlow und McCully 1972, Wright und Fisher 1980, Kawabe et al. 1980, Fisher und Frame 1984, Riens et al. 1991, Lohaus et al. 1995, Knop et al. 2001, Palmer et al. 2013). Dabei wird der Stechrüssel von Blattläusen mit einem Laserstrahl abgetrennt, nachdem diese eine Blattader angestochen hatten. Für die Versuche wurden Blattläuse verwendet, die auf den Pflanzen gefunden wurden. Als Pflanzenmaterial wurden 15 bis 50 cm kleine Bäume in 5 l Töpfen verwendet.

Mit einem angefeuchteten Pinsel wurden 15-20 Läuse in einem kleinen Käfig gefangen und auf die Blattunterseite der zu untersuchenden Pflanze fixiert. Nach einer Inkubationsphase von 4-18 h (je nach Baumart) hatten die meisten Läuse ihre Stechrüssel in die Siebröhren eingestochen. Der Käfig wurde entfernt und das Blatt mit den Läusen vorsichtig in eine gepolsterte Plastikhalterung vor der Okularlinse der Laser-Apparatur eingespannt. Mithilfe von Mikromanipulatoren konnte der Stechrüssel einer Laus exakt vor das Okularstrichkreuz positioniert werden. Die Positionierung und Ausrichtung erfolgte mit einem 10x Objektiv. Für die Abtrennung des Stechrüssels wurde ein 40x Objektiv verwendet, durch dessen Strahlengang ein Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 1,06 µm führte (LG 760, Fa. Schott). Dessen Energie betrug 1 Joule und die Ladespannung des Lasers war auf 1300 Volt eingestellt. Die Auslösung des Lasers erfolgte manuell. Nachdem der Stechrüssel

durchtrennt war, wurde die Apherde vorsichtig entfernt und eine Mikrokapillare (500 nl Kapazität) so über den Stechrüssel positioniert, dass sie plan auf der Blattunterseite auflag. Die Kapillare verblieb so lange auf dem Blatt, bis keine Flüssigkeit aus dem Stechrüssel mehr hinaufstieg. Um Verdunstungen der sehr kleinen Volumina zu vermeiden, wurde dem Blatt kontinuierlich Wasserdampf zugeführt, sodass die Luftfeuchte etwa 90%-95% betrug (BH860E, Fa. Honeywell).

Mithilfe eines Lineals wurde die Menge an gesammeltem Phloemsaft bestimmt, anschließend in 50 µl Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.6.4 Gewinnung von Apoplastensaft

Die Extraktion von Apoplastensaft erfolgte nach Lohaus et al. (2001). Dabei wird der Apoplastenraum mit Infiltrationslösung gefüllt und dieser durch Zentrifugation isoliert. Dadurch werden die im Apoplasten vorhandenen Metabolite gelöst.

Blätter wurden in eine 60 ml Spritze mit 40 ml 4 °C kaltem MES-Puffer (100 mM, pH 5,5) gegeben. Durch die Betätigung des Kolbens wurde ein Unterdruck von etwa 20 kPa erzeugt durch den der Puffer in den apoplastischen Raum gelangte. Infiltrierte Blätter waren dunkel und sanken schnell nach unten. Die Blätter wurden anschließend vorsichtig getrocknet und zügig in ein Behältnis mit durchbohrtem Boden, unter dem ein 1,5 ml RG angebracht war, überführt und für 4 min und 4 °C bei 72x g zentrifugiert (5804R, Fa. Eppendorf). Das Isolat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Um Kontaminationen mit zellulären Bestandteilen zu detektieren, wurde die Aktivität der Malat-Dehydrogenase gemessen. Die Berechnung der Metabolitkonzentrationen im Apoplastensaft erfolgte unter Einbeziehung des folgenden Verdünnungsfaktors (VF):

$$VF = (V_{H_2O} + V_{Luft}) / V_{H_2O}$$

wobei V_{H_2O} dem Apoplastensaft entspricht und V_{Luft} dem Gasraum des Apoplasten (Lohaus et al. 2001).

3.7 Messung der Osmolalität

Für die Bestimmung der Osmolalität (osmol/kg) wurden Blattstücke in 2 ml RG platziert, bei -20 °C eingefroren und anschließend wieder aufgetaut. Durch das Einfrieren und Auftauen wurden die Zellen durch die entstandenen Wasserkristalle zerstört und der Zellsaft wurde durch Zentrifugation für 5 min bei > 15.000x g gesammelt. Die Messung erfolgte mit einem Osmometer (5100 B, Fa. Wescor). Die Osmolalität von Phloemsaft und Zellkompartimenten wurde mit Zuckerlösungen gemessen, die die identischen Zucker-Kompositionen hatten, wie die Ergebnisse der HPLC-Analysen (Kap. 3.8) sie anzeigten. Andere osmotisch relevante

Verbindungen wurden mit dieser Methode nicht erfasst, womit die ermittelten Werte die tatsächliche Osmolalität etwas unterschätzte.

3.8 Chromatografische Bestimmung von Zuckern

Die Bestimmung der Zucker aus Gewebeextrakten, Phloemsaft, Exsudaten und Apoplastensaft erfolgte mithilfe einer HPLC-Anlage nach Nadwodnik und Lohaus (2008). Dafür wurden die Extrakte mit Spritzenfiltern (0,2 µm Porengröße, Fa. Roth) gereinigt und mit H₂O soweit verdünnt (1:5 bis 1:10), dass die Konzentration der Zucker im linearen Detektionsbereich (50-500 µM) des puls-amperometrischen Detektors lag (Zelle: #5040, Amperometer: Coulochem II, Model 5200, Fa. ESA). Die Pulseinstellungen sind in Tabelle 3.4 aufgeführt.

Tabelle 3.4 Einstellungen für die Pulsmessungen am Amperometer

Dauer	Modus	Spannung
500 ms	Messung	50 mV
540 ms	Reinigung	700 mV
540 ms	Regeneration	-800 mV

Zur Beschickung der Anionenaustauscher-Säule (Vorsäule: CarboPac PA10 Guard; Hauptsäule: CarboPac PA10, Fa. Dionex) erfolgte über einen Autosampler (2157, Fa. LKB Pharmacia), der die Proben über ein Ventil in die Eluenten-Zufuhr (100 mM NaOH) der Säule einspritzte. Um die erforderliche Flussgeschwindigkeit von 0,8 ml/min bei ca. 140 bar zu erreichen, wurde eine Zweikolben-Hochleistungspumpe verwendet (LC-9A, Fa. Shimadzu). Die Auftrennung erfolgte über die Anionen-Bindekapazität der stationären Phase und der Anzahl negativer Ladungen an den Zuckermolekülen in der mobilen Phase.

Bei jedem Probenlauf wurde eine Standardkurve zur Konzentrations-Bestimmung mit Zuckerkonzentrationen von 50, 100, 250 und 500 µM erstellt. Die gesammelten chromatografischen Daten wurden an einem Computer mit der Software PeakNet (Version 5.1, Fa. Dionex) analysiert.

3.9 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Nukleinsäuren ist eine molekularbiologische Grundagenteknik. Dabei wird zwischen der Isolierung von RNA und DNA unterschieden. RNA-Analysen geben Auskunft über den Transkriptionsstatus eines Gewebes zu einem gegebenen Zeitpunkt und erlauben damit die Untersuchung von Expressionsmustern bestimmter Gene, was mit DNA nicht möglich ist.

3.9.1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung von RNA wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet, da der Isolierungserfolg je nach Art sehr verschieden war. Neben den manuellen Verfahren wurden kommerzielle Isolierungskits verwendet (RNeasy Plant Mini Kit, Fa. Qiagen).

3.9.1.1 PINE-Methode

Das verwendete Protokoll ist eine Abwandlung der Vorgehensweise von Chang et al. (1993) zur Isolierung von RNA aus Pflanzen mit einem hohen Gehalt an phenolischen Verbindungen. Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien waren doppelt autoklaviert und die Arbeitsflächen wurden vor jeder Isolierung mit RNase AWAY® (Fa. Roth) abgewischt um RNase Kontaminationen zu vermeiden. Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff in einer Reibschale und mit einer Pistille zu einem feinen Pulver verrieben, wovon ca. 50-150 mg in ein 2 ml Reaktionsgefäß (RG) abgewogen wurden. Die Proben durften nicht auftauen, weshalb sie bis zur Zugabe von 65 °C warmen CTAB-Puffer in flüssigen Stickstoff gelagert wurden. Nach Zugabe von 800 µl CTAB-Puffer wurden die Proben auf einem Thermoschüttler (TS1, Fa. Biometra) für 15 min bei 1400 rpm inkubiert. Anschließend wurden 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol (C/I, 24:1, v/v) hinzugeben, die Proben 30 sec gevortext (2500 rpm, VV3, Fa. VWR) und bei > 13.000x g für 2 min zentrifugiert (5424, Fa. Eppendorf). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml RG überführt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, die Interphase nicht zu berühren. Es wurden wieder 800 µl C/I (24:1) hinzugefügt und wie oben beschrieben extrahiert. Die Extraktion mit C/I wurde solange wiederholt, bis keine Interphase mehr vorhanden war, mindestens jedoch drei Mal. Die wässrige Phase der letzten Extraktion wurde in ein 1,5 ml RG überführt und mit dem 0,25-fachen Volumenanteil 10 M Lithiumchlorid (LiCl) versetzt und invertiert, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Die Proben wurden auf Eis über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank für maximal 18 h inkubiert. Dieser Schritt kann auch verkürzt werden, indem die LiCl-Fällung bei -20 °C für 1-2 h durchgeführt wird, was jedoch die Ausbeute etwas reduziert. Die Proben wurden anschließend bei 4 °C für 20 min zentrifugiert (> 15.000x g, Mikro 200 R, Fa. Hettich) und der Überstand gründlich entfernt. Das Pellet wurde in 400 µl 65 °C warmen SSTE-Puffer für 10 min auf einem Thermoschüttler (45 °C, 1400 rpm) gelöst, mit 400 µl C/I (24:1) versetzt und wie oben beschrieben gevortext und zentrifugiert. Die Extraktion mit C/I (24:1) wurde so lange wiederholt, bis keine Interphase mehr sichtbar war. Die wässrige Phase der letzten Extraktion wurde mit 2-fachem Volumen Ethanol p.A. versetzt, geschüttelt und für 1 h bei -80 °C inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 4 °C (s.o.) wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 500 µl sowie 80 µl 70%igem Ethanol gewaschen (jeweils 1 min Zentrifugation nach jeder Waschung). Nach der Entfernung des Ethanols wurde das Pellet bei 45 °C getrocknet und anschließend mit 20 µl RNase freiem DEPC-behandeltem Wasser auf einem Thermoschüttler gelöst (10 min, 45 °C, 850 rpm).

Zur Integritätsprüfung wurden 1 µl RNA auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, mit Ethidiumbromid (0,01 % v/v) gefärbt und auf einem UV-Tisch fotografiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

CTAB-Puffer:	2 %	CTAB (w/v)
	100 mM	Tris-HCl pH 8,0
	25 mM	EDTA
	2 M	NaCl
	2 %	PVP (v/v)
	2 %	Mercaptoethanol (frisch zugesetzt)

SSTE-Puffer:	0,5 %	SDS (w/v)
	10 mM	Tris-HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA
	1 M	NaCl

3.9.1.2 TRIZOL-Methode

Dieses Verfahren basiert auf dem Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987). Pflanzenmaterial wurde wie oben beschrieben gemörsert und abgewogen. Es wurden 1 ml Trizol hinzugefügt, gevortext und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C für 10 min zentrifugiert (s.o.) und der Überstand in ein neues RG überführt. Es wurden 200 µl C/I (24:1) hinzugefügt, für 30 s gevortext und zentrifugiert (2 min, 4 °C, > 15.000x g). Der wässrige Überstand wurde wieder in ein neues 1,5 ml RG überführt und die C/I-Waschung wurde solange durchgeführt, bis keine Interphase mehr vorhanden und kein Geruch von Phenol mehr wahrzunehmen war. Zum letzten Überstand wurde ein halbes Volumen Isopropanol und ein halbes Volumen HSP-Puffer hinzugefügt, invertiert, für 10 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (15 min, 4 °C, > 15.000x g). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet je zweimal mit 900 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach der Trocknung bei 45 °C wurde das Pellet in 20 µl RNase-freies DEPC-H₂O gelöst.

Trizol-Reagenz:	38 %	Phenol (v/v) pH 5,0 (Roti®-Aqua-Phenol)
	800 mM	Guanidiumthiocyanat
	400 mM	Ammoniumthiocyanat
	1 M	Na-Acetat
	5 %	Glycerin (v/v)
HSP-Puffer:	800 mM	Natriumcitrat
	1,2 M	Natriumchlorid

3.9.2 DNA-Isolierung

DNA wurde in Form von genomischer DNA aus Pflanzengewebe und als Plasmide aus *E. coli* isoliert.

3.9.2.1 Isolierung von genomischer DNA

Für die Isolierung von DNA wurden ca. 150 mg Gewebepulver (s.o.) in ein 2 ml RG abgewogen, mit 1 ml Extraktionspuffer versetzt und in einem Thermoschüttler inkubiert (20 min, 65 °C, 850 rpm). Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (5 min, RT, > 13.000x g), der Überstand in ein neues 2 ml RG überführt, mit 400 µl C/I (24:1) versetzt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues RG überführt. Zur Fällung der DNA wurde die Lösung mit dem doppelten Volumen an CTAB-Präzipitationspuffer versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Die DNA wurde pelletiert (10 min, RT, > 13.000x g), der Überstand abgenommen und das Pellet in 350 µl 1,2 M NaCl durch leichtes Schütteln gelöst. Nach einer weiteren Waschung mit 350 µl C/I (24:1), wurde die wässrige Phase in einem neuen 1,5 ml RG dem zweifachen Volumen an Isopropanol versetzt, invertiert und für 30 min bei -80 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei 4 °C und > 15.000x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen. Nach Entfernung der Restflüssigkeit und anschließender Trocknung wurde die DNA in 100 µl RNase-H₂O bei 45 °C und 850 rpm auf einem Thermoschüttler gelöst.

Extraktionspuffer:

1,4 M	NaCl
20 mM	EDTA
2 %	CTAB (w/v)
0,1 M	Tris-HCl, pH 8,0

CTAB-Präzipitationspuffer:

0,5 %	CTAB (w/v)
40 mM	NaCl

RNase-H₂O:

98 µl	H ₂ O + 2 µl RNase A (10 mg/ml)
-------	--

3.9.2.2 Isolierung von Plasmid DNA (Mini-Prep)

Plasmid DNA wurde aus *E. coli* Stämmen aus 3 ml Übernachtskulturen isoliert. Dabei wurden kommerzielle Kits benutzt (GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Fa. Thermo), falls die isolierten Plasmide für Sequenzierungen verwendet werden sollten. Für Re-Transformationen und Kontrollhydrolysen wurde die STEL-Methode verwendet. Sie basiert auf der Lyse der bakteriellen Zellmembran durch Lysozym und Triton-X 100. Diese Methode liefert schnell hohe Mengen an Plasmiden, die allerdings einen geringen Reinheitsgrad haben und somit nicht für sensitive Reaktionen wie Sequenzierungen geeignet sind.

Die Zellen wurden pelletiert (2 min, RT, > 13.000x g), in 150 µl STEL-Puffer resuspendiert und bei 100 °C für 30 s erhitzt. Nach anschließender Zentrifugation (20 min, RT, > 13.000x g) wurde das Pellet vorsichtig mit einem Zahnstocher entfernt. Es wurden 180 µl Isopropanol hinzugefügt, gut geschüttelt und für 10 min bei RT inkubiert. Die gefällte Plasmid-DNA wurde pelletiert (5 min, RT, > 13.000x g), der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen. Anschließend wurde die Flüssigkeit entfernt, das Pellet bei 45 °C getrocknet und in 50 µl RNase-H₂O auf dem Thermoschüttler gelöst (10 min, 45 °C, 1400 rpm).

Zur Kontrolle auf das richtige Insert wurden die Plasmide einer Restriktionshydrolyse unterzogen und anschließend auf einem Agarosegel untersucht. Dazu wurden 3 µl Plasmid-DNA mit 0,5 µl EcoR1 (10 U/µl, Fa. Thermo) in einem 10 µl Puffer-Ansatz versetzt und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Erhitzen auf 65 °C für 20 min deaktiviert. Von der Lösung wurden 5 µl auf ein Agarosegel (1%) (Kap. 3.16) aufgetragen und analysiert.

STEL-Puffer:	8 %	Saccharose (w/v)
	5 %	Triton-X-100 (v/v)
	50 mM	Tris-HCl pH 8,0
	50 mM	EDTA
	0,5 mg/ml	Lysozym (jedes Mal frisch eingewogen)

3.10 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentrationen wurde eine spezielle Mikroliterküvette verwendet (LabelGuard™, Fa. Implen). Diese erlaubt es, Konzentrationen ohne Verdünnungsschritt zu ermitteln und mithilfe von zwei Deckeln mit unterschiedlichen Verdünnungsfaktoren (VF_{Deckel}) verschiedene Konzentrationsbereiche abzudecken. Dazu wurden 3 µl der Nukleinsäurelösung auf die Küvette gegeben und bei 260 nm gemessen (GENESYS™ 10S, Fa. Thermo). Die Konzentration wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{RNA [ng/}\mu\text{l]} = E_{260} \times 40 \times VF_{\text{Deckel}}$$

$$\text{DNA [ng/}\mu\text{l]} = E_{260} \times 50 \times VF_{\text{Deckel}}$$

Für die Bestimmung der Reinheit wurde der Koeffizient zwischen E_{260} und E_{280} ermittelt. Bei Werten zwischen 1,8 und 2,1 waren die Nukleinsäuren hoch rein.

3.11 Hydrolyse von DNA

Bei der Isolierung von RNA waren auch immer geringe Mengen an genomischer DNA (gDNA) Kontaminationen vorhanden. Damit diese die quantitativen PCR Analysen nicht beeinträchtigten, wurde vor der cDNA-Synthese eine Hydrolyse mit DNase I vorgenommen (DNase I, RNase free, Fa. Thermo). Dazu wurden 2 µg RNA mit 2 µl DNase I (1 U/µl) und 2 µl Puffer (10x Reaction Buffer with MgCl₂) in einem 20µl Ansatz gemischt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nachdem die DNA abgebaut war, wurde der Lösung 2 µl EDTA (50 mM) hinzugefügt und für 10 min bei 65°C erhitzt um die DNase zu deaktivieren.

3.12 cDNA-Synthese

1 µg RNA wurde mit 1 µl Oligo(dT)₁₈ (100 µM) auf 12 µl mit H₂O aufgefüllt und zur Auflösung etwaiger Sekundärstrukturen für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 4 µl Puffer (5x Reaction Buffer), 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl), 2 µl dNTP Mix (10mM) und 1 µl reverser Transkriptase (200 U/µl, RevertAid M-MuLV) wurde die Synthese bei 42 °C für 60 min durchgeführt. Alle Komponenten stammen aus dem RevertAid 1st strand cDNA Synthesis Kit (Fa. Thermo). Die reverse Transkriptase wurde durch Erhitzen für 5 min bei 70 °C inaktiviert.

3.13 Amplifikation von DNA-Fragmenten

3.13.1 Primerdesign

Für das Screening auf SUT im Transkriptom von Arten, von denen noch keine SUT-Sequenzen vorliegen, wurden degenerierte Primer verwendet (Knop et al. 2001). Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht artspezifisch, sondern templatespezifisch an eine Sequenz binden, weil *wobble*-Basen in der Primersequenz mehrere Bindungsmöglichkeiten erlauben. Dadurch lassen sich Sequenzen einer Genfamilie und ihre Homologen aus einer nicht sequenzierten Art isolieren. Die Primer wurden anhand von konservierten Regionen aus Alignments der DNA- bzw. Aminosäure-Sequenzen von bekannten SUT abgeleitet und stammen aus dem ersten und vierten membranumspannenden Bereich (Knop 2001). Für das Design von spezifischen als auch degenerierten Primern, gelten einige allgemeine Regeln. Die Länge der Primer sollte 18 bis 30 Basen betragen, der GC-Gehalt etwa 40-60 % liegen und die Schmelztemperatur (T_M) sollte zwischen 55 °C und 80 °C liegen. Der T_M -Wert gibt an, bei welcher Temperatur sich die Primer von dem Template lösen. Sie sollten für beide Primer in einer PCR etwa gleich hoch sein. Die gewählte Temperatur für die PCR (T_A) liegt ca. fünf Grad unter der errechneten T_M . Zur ungefähren Berechnung der T_M kann folgende Faustformel verwendet werden:

$$T_M = 4 \times (\text{Anzahl G bzw. C}) + 2 \times (\text{Anzahl A bzw. T})$$

Am 3'-Ende des Primers sollten ein bis zwei Guanin oder Cytosin enthalten sein, jedoch nicht mehr als drei. Die genannten Anforderungen lassen sich mithilfe von Primerdesign Software erfüllen. Dazu wurde für diese Arbeit das Programm PerlPrimer (Version 1.1.21) verwendet.

3.13.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Standardmethode zur Amplifizierung von spezifischen DNA-Fragmenten (Mullis und Faloona 1987). Das Prinzip basiert auf der zyklischen Wiederholung von Denaturierung, Anlagerung der Primer (Annealing) und Verlängerung (Elongation) der 3'-Enden durch eine thermostabile Polymerase, was im Idealfall zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA-Stücke führt. Die PCR-Reaktion wurde in Thermocyclern mit beheizbarem Deckel durchgeführt (Mastercycler[®] Gradient, Fa. Eppendorf). Tabelle 3.5 zeigt die Komponenten einer Standard-PCR.

Tabelle 3.5 Zusammensetzung einer Standard-PCR

Komponente	Menge
10x Puffer B (Bio&Sell)	2,5 µl
MgCl ₂ 25 mM	2 µl
dNTPs 10 mM	0,5 µl
Forward Primer 10 µM	0,5 µl
Reverse Primer 10 µM	0,5 µl
Taq-Polymerase 5 U/µl (Bio&Sell)	0,3 µl
Template	1 µl
H ₂ O	ad 25 µl

Die einzelnen Parameter des PCR-Programms sowie der Reaktionsansätze wurden den spezifischen Bedingungen angepasst, um ein optimales Ergebnis zu erzielen. Der Erfolg der PCR wurde mithilfe von TAE-Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.16) überprüft.

Tabelle 3.6 Standard PCR-Programm

Temperatur	Zeit	Schritt
94 °C	5 min	Initialdenaturierung
94 °C	10 s	Denaturierung
50 °C*	30 s	Annealing
72 °C	30 s	Elongation
		Wiederholung des Zyklus 38-44x
72 °C		finale Elongation
4 °C	∞	Lagerung

* die Annealingtemperatur ist abhängig von den verwendeten Primern

3.13.3 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Mithilfe der RACE ist es möglich Vollängenklone eines Gens zu erhalten, von dem Teilsequenzen bekannt sind. In dieser Arbeit lieferten die mit degenerierten Primern exprimierten Sequenzteilstücke (EST) die Matrize für die Amplifizierung der cDNA Endstücke. Vollängenklone wurden für SUT aus *Quercus robur* und *Fraxinus excelsior* angefertigt (*QrSUT1*, *FeSUT1*). Für die RACE-Experimente wurde das 5'/3' RACE-Kit der Firma Roche verwendet.

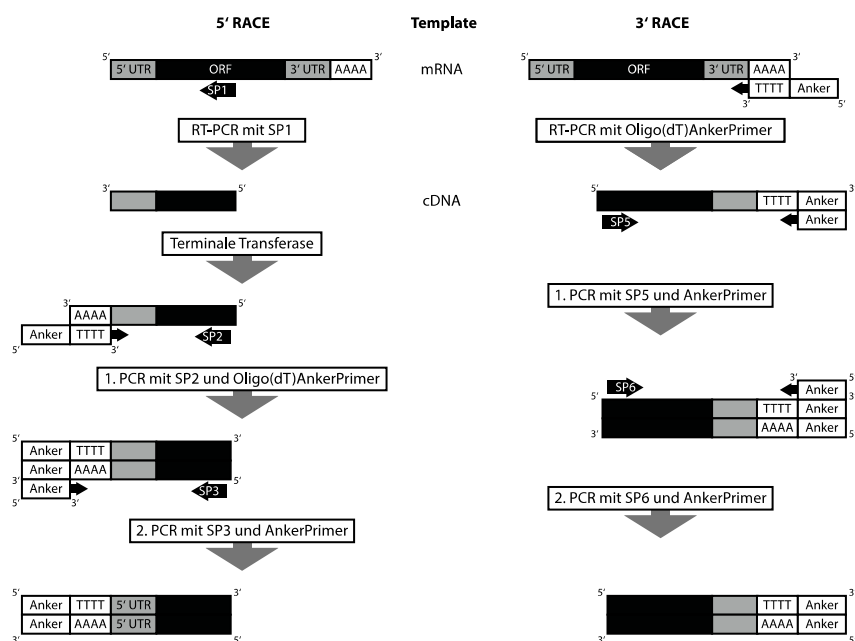


Abb. 3.1 Schematischer Ablauf eines RACE-Experimentes

3.13.3.1 3'-RACE

Bei der Amplifizierung des 3' cDNA-Endes wird ein Oligo(dT)-Primer mit angehängtem Ankerbereich (Kap. 3.5) zur cDNA-Synthese verwendet. Anschließend erfolgt eine PCR mit einem ankerspezifischem sowie einem genspezifischen Primer.

3.13.3.1.1 cDNA-Synthese

Für die Synthese von cDNA wurden folgende Komponenten in einem 0,2 µl RG gut gemischt und auf 20 µl mit H₂O aufgefüllt: 4 µl 5x RT-Puffer, 2 µl dNTP-Mix (10µM), 1 µl Oligo(dT)-Anker-Primer (37,5 µM), 1µg RNA, 1 µl RT-Enzym (80 U/µl). Der Ansatz wurde für 60 min bei 55 °C inkubiert und die Deaktivierung des RT-Enzyms erfolgte bei 85 °C für 5 min.

3.13.3.1.2 PCR

Durch die cDNA-Synthese mit dem Oligo(dT)-Anker-Primer wurde eine Ankerregion an das 3'-Ende jeder transkribierten cDNA angefügt. Um gezielt die Transkriptsequenzen für die Saccharose-Transporter zu isolieren, wurde eine PCR mit einem genspezifischen Forward-Primer und dem passenden Anker-Primer durchgeführt (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7 Zusammensetzung einer 3'-RACE-PCR

Komponente	Menge
10x Puffer B (Bio&Sell)	5 µl
MgCl ₂ 25 mM	2,5 µl
dNTPs 10 mM	1 µl
genspezifischer Primer (SP5) 12,5 µM	1 µl
PCR Anchor Primer 12,5 µM	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase 5 U/µl (Bio&Sell)	0,5 µl
cDNA	1 µl
H ₂ O	ad 38 µl

Das PCR-Programm unterschied sich von einer Standard-PCR (Tabelle 3.6) neben einer anderen T_A insbesondere durch die Einteilung in zwei Phasen. Die erste Phase entsprach einer gewöhnlichen PCR-Reaktion, während in der zweiten Phase nach jedem Elongationsschritt die Elongationszeit um 20 s erhöht wurde, da die genaue Länge des Transkriptes unbekannt war (Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8 Temperatur-Profil einer 3'-RACE-PCR

Temperatur	Zeit	Schritt
94 °C	2 min	Initialdenaturierung
94 °C	15 s	Denaturierung
64 °C	30 s	Annealing
72 °C	40 s	Elongation
		Wiederholung des Zyklus 10x
94 °C	15 s	Denaturierung
64 °C	30 s	Annealing
72 °C	40 s	Elongation
		Wiederholung des Zyklus 10x
	+20 s	Zeitinkrement nach jeden Zyklus
72 °C	7 min	finale Elongation
4 °C	∞	Lagerung

Das Ergebnis der PCR wurde per Agarosegelelektrophorese überprüft. Wenn auf dem Gel die Menge der PCR-Produkte zu gering war, wurde eine weitere PCR mit den gleichen Primern und dem PCR-Produkt als Template durchgeführt. Durch das Zeitinkrement beim zweiten Zyklusblock entstanden PCR-Produkte unterschiedlicher Länge, da nur einer der Primer spezifisch war. Die ungefähre Länge des erwarteten 3'-Produktes lag bei ca. 1.400 bis 1.700 bp, da die degenerierten Primer aus der ersten und vierten Transmembrandomäne (TMD) der Saccharose-Transporter abgeleitet wurden und das Amplikon mindestens die Länge der restlichen acht TMD aufweisen musste (Knop 2001). Banden im richtigen Größenbereich wurden aus einem präparativen Agarosegel ausgeschnitten, kloniert und

sequenziert. Auf das Zeitinkrement wurde in folgenden 3'-RACE Reaktionen verzichtet, um spezifischere Banden zu erhalten.

3.13.3.2 5'-RACE

Die Amplifizierung der 5'-Enden erfordert zusätzliche Schritte, da keine äquivalente Struktur zum Poly-A-Schwanz vorhanden ist, in den ein Primer gesetzt werden kann (Abb. 3.1). Daher muss eine Poly-A-Primerbindungstelle enzymatisch mit terminaler Transferase (TdT) an das 3'-Ende der durch spezifischen Primer synthetisierten cDNA angefügt werden.

3.13.3.2.1 cDNA-Synthese

Die Transkription der mRNA zu cDNA erfolgte in gleicher Weise wie oben beschrieben für die 3'-RACE. Anstelle des Oligo(dT)-Anker-Primer (37,5 µM) wurde für die Synthese ein genspezifischer Primer (SP1, 12,5 µM) verwendet. Bei der Auswahl der Primer sowohl für die 3'- als auch die 5'-RACE wurde darauf geachtet, dass sich ein großer Bereich der Sequenzen überlappte. Dadurch wird die bioinformatische Assemblierung der Teilsequenzen deutlich erleichtert und die Komplementärsequenzen erlauben eine Kontrolle, ob die richtigen Teilstücke amplifiziert wurden.

3.13.3.2.2 Aufreinigung der cDNA

Nach der Synthese der cDNA ist eine Aufreinigung notwendig, um alle Nukleotide zu entfernen, da die TdT jedes Nukleotid einbauen kann und somit ein spezifisches Poly-A-tailing nicht stattfinden würde. Die Reinigung wurde mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Fa. Roche) durchgeführt. Zu dem cDNA-Ansatz wurden 100 µl Binding-Buffer hinzugefügt, auf eine Silica-Membran-Säule gegeben und für 30 s bei 8000x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Membran mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und für 30 s bei 8000x g zentrifugiert. Ein weiterer Waschschrift mit 200 µl Waschpuffer erfolgte bei 13.000x g für 3 min. Die nun trockene Säule wurde in ein neues 1,5 ml RG überführt und 50 µl Elutionspuffer wurde direkt auf die Membran gegeben. Die DNA wurde durch Zentrifugation für 30 s bei 8000x g eluiert und für die anschließende terminale Transferase Reaktion verwendet.

3.13.3.2.3 Terminale Transferase Reaktion

Von der zuvor gereinigten cDNA wurden 19 µl mit 2,5 µl 10x TdT-Reaktionsbuffer und 2,5 µl dATP (2 mM) versetzt und für 3 min bei 94 °C inkubiert. Nach der Abkühlung der Lösung auf Eis, wurde 1 µl terminale Transferase (80 U/µl) hinzugefügt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min beendet.

3.13.3.2.4 1. PCR-Reaktion

Durch die Verwendung eines genspezifischen Primers bei der cDNA-Synthese, lag das 5'-Ende des Saccharose-Transporter-Transkriptes in komplementärer Form vor. Dadurch

war es möglich mithilfe der terminalen Transferase Adenosin-Reste anzufügen. Diese wurden genutzt, um mit dem Oligo(dT)-Anker Primer eine Ankersequenz bei der 1. PCR zu etablieren (Tabelle 3.9).

Tabelle 3.9 Zusammensetzung einer 5'-RACE-PCR

Komponente	Menge
10x Puffer B (Bio&Sell)	5 µl
MgCl ₂ 25 mM	2,5 µl
dNTPs 10 mM	1 µl
genspezifischer Primer (SP2) 12,5 µM	1 µl
Oligo(dT)-Anker-Primer 37,5 µM	1 µl
Taq-Polymerase 5 U/µl (Bio&Sell)	0,5 µl
cDNA	5 µl
H ₂ O	ad 34 µl

Die Reaktionsansätze wurden in einem Thermocycler inkubiert. Das Programm war bis auf die Annealing-Temperatur identisch mit dem aus der 3'RACE (Tabelle 3.10).

Tabelle 3.10 Temperatur-Profil einer 5'-RACE-PCR

Temperatur	Zeit	Schritt
94 °C	2 min	Initialdenaturierung
94 °C	15 s	Denaturierung
63 °C	30 s	Annealing
72 °C	40 s	Elongation
		Wiederholung des Zyklus 10x
94 °C	15 s	Denaturierung
63 °C	30 s	Annealing
72 °C	40 s	Elongation
		Wiederholung des Zyklus 10x
	+20 s	Zeitinkrement nach jeden Zyklus
72 °C	7 min	finale Elongation
4 °C	∞	Lagerung

3.13.3.2.5 Nested PCR

Die zweite PCR wurde mit einem weiter innen liegenden genspezifischen Primer (SP3) in Kombination mit dem PCR Anker Primer durchgeführt. Durch die Verwendung des Oligo(dT)-Anker Primers in der ersten PCR wurde die Bindungsstelle für den PCR Anker Primer an der Zielsequenz etabliert, die sich deutlich besser für PCR-Reaktionen eignet als ein Oligo(dT)-Primer. Die Reaktionsbedingungen waren die gleichen wie zuvor, nur dass anstatt cDNA als Template 1 µl PCR-Produkt (1:10 verdünnt bzw. unverdünnt) der ersten PCR verwendet wurde (Tabelle 3.9, Tabelle 3.10).

Das Ergebnis wurde per Agarosegelelektrophorese überprüft und die passende Bande (ca. 500-600 bp) aus dem Gel aufgereinigt.

3.13.4 Kolonie-PCR

Eine Methode, um schnell eine große Anzahl von Bakterienklonen auf das richtige Insert zu testen ist die Kolonie-PCR. Dies ist insbesondere dann von Vorteil, wenn der verwendete Plasmidvektor keinen Indikator für Transgene wie etwa das *lacZ*-Gen für die Blau-Weiß-Selektion aufweist. Dabei wird auf die Aufreinigung des Plasmids verzichtet und der Test auf das richtige Insert erfolgt anstatt über einen Restriktionsverdau (Kap. 3.9.2.2) und anschließende Größenanalyse mittels Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.16), über eine Standard-PCR mit insertspezifischen Primern. Dazu werden ganze Zellen in die PCR-Reaktion gegeben. Durch das alkalische Milieu des PCR-Puffers und der hohen Temperatur bei den Denaturierungsschritten wurden die Zellwände der Bakterien zerstört und die frei werdenden Plasmide dienten als Template für die Amplifikation.

Um die Kolonie-PCR durchzuführen, wurden der Anzahl der zu untersuchenden Kolonien entsprechend 25 µl Standard-PCR-Ansätze in 0,2 ml RG (Kap. 3.13.2) vorbereitet. Parallel dazu wurden ebenfalls in 0,2 ml RG die gleiche Anzahl an 50 µl LB-Medium mit Selektionsantibiotikum angesetzt. Diese konnten dann gegebenenfalls zur Animpfung einer Übernachtskultur (Kap. 3.15.6) verwendet werden. Die Kolonien wurden mit sterilen Zahnstochern aufgenommen und kurz in den PCR-Ansatz getaucht. Dabei gingen ausreichend viele Zellen in Lösung und dienten als Template. Anschließend wurde das LB-Medium mit dem Zahnstocher durch eintauchen und rühren angeimpft. Nach der PCR wurde das Ergebnis auf einem Agarosegel analysiert.

3.13.5 DNA-Sequenzierung

DNA-Fragmente wurden zur Sequenzierung in den Vektor pGEM[®]-T easy (Fa. Promega) kloniert und anschließend zur Firma Eurofins Genomics geschickt. Der Vektor pGEM[®]-T easy enthält die Promotorsequenzen T7 und SP6, die das Insert flankieren und somit eine Sequenzierung ermöglichen. Die Vektorkonstrukte wurden aus Übernachtskulturen gewonnen und 750-1500 ng Vektor in 15 µl Tris-HCl pH 8,5 wurden je Sequenzierung verschickt.

3.14 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Die Methode der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR) erlaubt es, den relativen Transkriptionsstatus eines *gene of interest* (GOI) zu einem unregulierten *housekeeping gene* (HKG) zu bestimmen (Higuchi et al. 1993, Chiang et al. 1996, Gibson et al. 1996, Pfaffl et al. 2004b, van Guilder et al. 2008, Olbrich et al. 2008, Regier und Frey 2010). Vom Prinzip her wird eine Standard-PCR in Echtzeit „beobachtet“, indem das Fluoreszenzsignal von SYBR Green I (Schneeberger et al. 1995) nach jedem Amplifikationszyklus gemessen wird (Wittwer et al. 1997). Die gemessenen Fluoreszenzwerte werden in einem XY-Diagramm gegen die Zyklenzahl aufgetragen und aus der resultierenden sigmoidalen Kurve wird der Ct-Wert (*cycle threshold*) bestimmt (Abb. 3.2). Dieser Wert wird in der exponentiellen Steigungsphase gemessen, kurz nachdem die Fluoreszenz der PCR-Reaktion das Hintergrundsignal übertrifft, da in dieser Phase die Effizienz der Reaktion annähernd 100 % beträgt. Eine absolute Bestimmung der Ausgangskonzentration der mRNA ist nur schwer möglich, da die Effizienz der reversen Transkriptase-Reaktion stark schwankt, weshalb eine Normalisierung des GOI durch das HKG notwendig ist. Zur Bestimmung der relativen Expressionsrate wird der Ct-Wert des GOI in Relation zum Ct-Wert des HKG gesetzt wobei man annimmt, dass das HKG durch das Experiment nicht in seiner Regulation beeinflusst wird (Pfaffl 2004a, Wong und Medrano 2005, Olbrich et al. 2008).

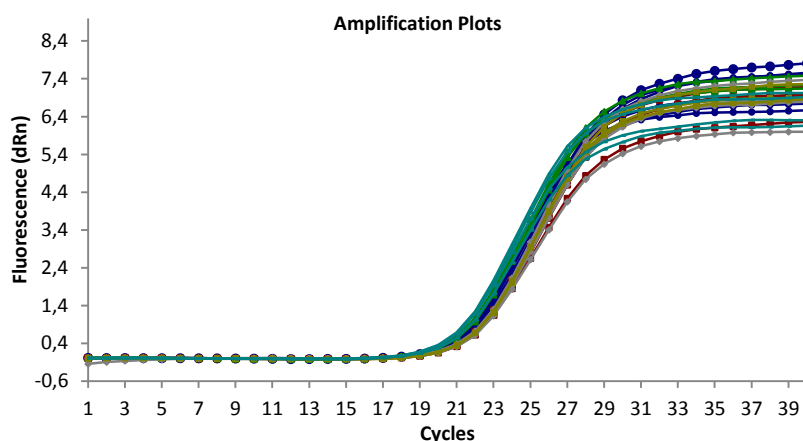


Abb. 3.2 Beispiel für den Verlauf mehrerer paralleler qRT-PCR Reaktionen. Die exponentielle Wachstumsphase liegt etwa zwischen den Zyklen 19 und 23, in der die Ct-Werte bestimmt werden.

Zunächst wurde aus einer RNA-Isolierung mit anschließendem gDNA-Verdau (Kap. 3.9.1) cDNA synthetisiert (Kap. 3.12). Von einer cDNA wurden je 4 Ansätze für das GOI und das HKG angefertigt und zusammen mit anderen Proben auf einer 96-Well Platte aufgetragen. Die Reaktion fand in einem Thermocycler mit Fluoreszenzmessung statt (qPCR-System Mx3005p, Fa. Stratagene).

Tabelle 3.11 Zusammensetzung einer qRT-PCR-Reaktion

Komponente	Menge
2x qPCR MasterMix (Maxima SYBR Green, Fa. Thermo)	10 µl
ROX (5 µM)	0,08 µl
Forward Primer (10 µM)	1,2 µl
Reverse Primer (10µM)	1,2 µl
cDNA	4 µl
H ₂ O	3,52 µl

Ein wichtiges Maß um die relative Expressionsrate eines Gens akkurat bestimmen zu können, ist die Effizienz der PCR-Reaktion (Wong und Medrano 2005, Kubista et al. 2006, Regier und Frey 2010). Unter optimalen Bedingungen wird die Ziel-DNA bei jedem Amplifikationsschritt verdoppelt, was zu einer exponentiellen Vermehrung führt und einer Reaktionseffizienz von 100 % entspricht. Dieser Fall tritt allerdings selten ein, da verschiedene Faktoren die PCR-Reaktion beeinflussen. Deshalb wurde für jedes Primerpaar die Effizienz experimentell bestimmt. Dazu wurden die cDNAs aus einem Experiment gepoolt und anschließend mithilfe einer Verdünnungsreihe von 1:2 bzw. 1:5 eine Standardkurve angefertigt. Die Steigung der Regressionsgeraden gab die Reaktionseffizienz wieder (Pfaffl 2001). Werte zwischen 95 % und 105 % wurden als akkurat angenommen und für die Bestimmung der relativen Expression verwendet. Die Berechnungen erfolgten automatisiert innerhalb der Analysesoftware MxPro (Version 4.10, Build 389, Fa. Stratagene).

Tabelle 3.12 Schema der Primeroptimierung für die qRT-PCR

	Forward			
Revers	100 nM	300 nM	600 nM	900 nM
100 nM	100 nM/100 nM	100 nM/300 nM	100 nM/600 nM	100 nM/900 nM
300 nM	300 nM/100 nM	300 nM/300 nM	300 nM/600 nM	300 nM/900 nM
600 nM	600 nM/100 nM	600 nM/300 nM	600 nM/600 nM	600 nM/900 nM
900 nM	900 nM/100 nM	900 nM/300 nM	900 nM/600 nM	900 nM/900 nM

Da SYBR Green I an jede doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet und somit auch für unspezifische Bindungen sowie Primerdimere ein Signal abgibt, muss die Spezifität der PCR-Reaktion vor allem über die Optimierung der Primer und deren Konzentration erfolgen. Die optimale Kombination von Forward und Reverse Primer wurde über ein Optimierungsschema bestimmt (Tabelle 3.12). Mit den unterschiedlichen Primerkombinationen wurden qRT-PCR-Assays durchgeführt und sowohl die Ct-Werte als auch die finale Fluoreszenz bestimmt. Die Kombination aus Primern, mit dem kleinsten Ct-Wert und der höchsten Fluoreszenz wurde für die darauffolgenden Reaktionen gewählt. Voraussetzung war, dass die Dissoziationskurve (s.u.) ein spezifisches Produkt anzeigte.

Tabelle 3.13 Programm für die qRT-PCR

Temperatur	Zeit	Schritt
95 °C	10 min	Initialdenaturierung und Aktivierung der Polymerase
95 °C	15 s	Denaturierung
60 °C	30 s	Annealing und Elongation
		Wiederholung des Zyklus 44x
55-95 °C		Dissoziationskurve
95 °C	30 s	finale Denaturierung

Die Dissoziationskurve dient zur Kontrolle der Spezifität des PCR-Produktes (Ririe et al. 1997). Durch die schrittweise Anhebung der Temperatur lösen sich zuerst alle unspezifischen Bindungen, was keinen signifikanten Abfall der Fluoreszenz zur Folge hat. Bei Erreichen einer spezifisch hohen Temperatur denaturieren alle dsDNA des gebildeten PCR-Produktes, was zu einem schlagartigen Verlust des Fluoreszenzsignals führt. Wird der Fluoreszenzverlust als Funktion der Temperatur aufgetragen, resultiert dies in einem Peak. Eine optimal abgelaufene PCR-Reaktion ist durch das Vorhandensein eines distinkten Peaks charakterisiert (Abb. 3.3 A). Sind weitere Peaks vorhanden, so haben sich Nebenprodukte wie Primerdimere gebildet (Abb. 3.3 B).

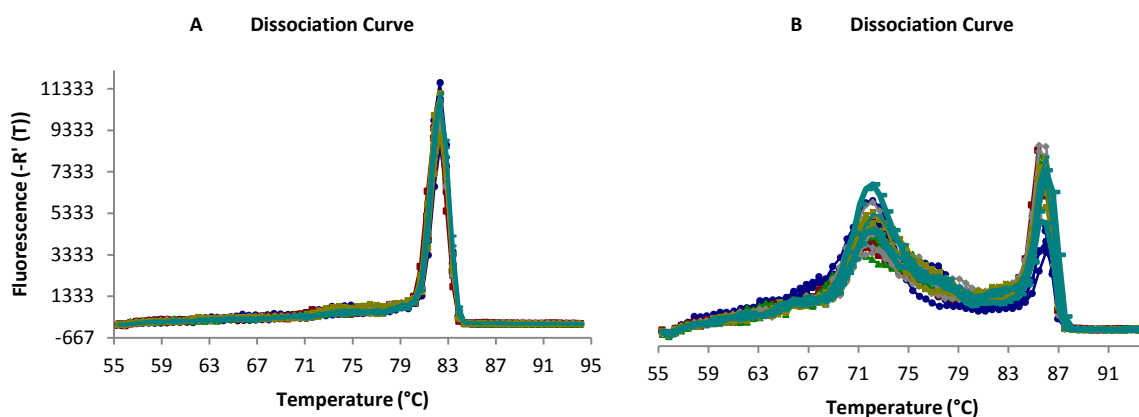


Abb. 3.3 Beispiele für Dissoziationskurven. A: Dissoziationskurve bei einem sauberen Produkt. Der einzelne Peak zeigt die Spezifität der Reaktion an. B: Dissoziationskurve von qRT-PCR-Assays mit unspezifischen Nebenprodukten. Der kleinere Peak bei ca. 71 °C deutet auf das Vorhandensein von Primerdimeren hin. Diese verfälschen die Ergebnisse, weshalb die Reaktionsbedingungen weiter optimiert werden müssen.

3.15 Klonierungsmethoden

Die Klonierung von DNA-Fragmenten wurde für Sequenzierungen und zur Erstellung von Expressionskonstrukten durchgeführt.

3.15.1 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für erfolgreiche Klonierungen ist es notwendig, dass möglichst saubere DNA verwendet wird. Dazu müssen amplifizierte PCR-Produkte gereinigt werden. Wenn im Anschluss einer PCR auf dem Kontrollgel eine distinkte Bande der erwarteten Größe zu sehen war, so wurde das Produkt mit einem kommerziellen Kit auf Basis von Silica-Membranen aufgereinigt (PCR-Purification Kit, Fa. Qiagen). Zu dem PCR-Ansatz wurden das 5-fache Volumen Bindungspuffer (PB-Puffer) hinzugeben und gut geschüttelt. Die DNA bindet nur an die Silica-Membran, wenn der pH-Wert unter pH 7,5 liegt, weshalb ein pH-Indikator verwendet wurde. War die Lösung nach Zugabe des PB-Puffers violett, so war der pH über 7,5. Durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat pH 5,0 wurde der pH-Wert der Lösung wieder unter 7,5 gebracht, was durch eine Gelbfärbung angezeigt wurde. Danach wurde die Lösung auf eine Silica-Membran-Säule gegeben und für 30 s bei $> 18.000x g$ zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Membran wurde durch Zugabe von 750 µl Waschpuffer (PE-Buffer) und Zentrifugation wie zuvor gewaschen. Der Durchfluss wurde wieder verworfen und die leere Säule für 1 min bei $> 18.000x g$ zentrifugiert, wodurch die Membran getrocknet wurde. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 30 bis 50 µl Elutionspuffer (EB-Buffer, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5) in ein 1,5 ml RG eluiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 5 µl der DNA auf ein Agarosegel aufgetragen und mit einem Massenstandard verglichen (Kap. 3.10).

War nach einer PCR auf dem Kontrollgel mehr als eine Bande zu sehen, so wurde über eine Größenauftrennung die Bande von Interesse mit Hilfe eines Kits (E.Z.N.A.[®] Gel, Extraction Kit, Fa. Omega) isoliert. Das präparative Agarosegel wurde so gewählt, dass die Taschen eine große Menge an PCR-Ansatz aufnehmen konnten, da mitunter mehrere identische 25 µl PCR-Ansätze vereinigt wurden, um eine ausreichend große Menge an DNA für die Isolierung zu erhalten. Nach der Auftrennung der Banden wurde das gewünschte Produkt nach der Färbung mit Ethidiumbromid auf einem UV-Tisch visualisiert, mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein zuvor gewogenes 2 ml RG überführt. Es wurde darauf geachtet, dass die Bestrahlung mit UV-Licht so kurz wie möglich gehalten wurde, um die Degradierung der DNA auf ein Minimum zu reduzieren. Ferner wurde überschüssige Agarose entfernt. Das Gewicht des Agaroseblocks wurde bestimmt und die dem entsprechende Menge an Bindungspuffer (Binding Buffer XP2) hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation bei 60 °C und 1400 rpm auf einem Thermoschüttler für 7 min um das Gelstück im Puffer aufzulösen. Nachdem das Gel vollständig gelöst war und keine Schlieren mehr zu erkennen waren,

wurde die Färbung der Lösung überprüft. War die Lösung gelb, so war der pH im richtigen Bereich, war die Lösung hingegen orange oder rot, so musste durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat pH 5,0 der pH wieder in den optimalen Bereich gebracht werden. Die Lösung wurde nun auf eine Silica-Membran-Säule (HiBind DNA Mini Column) gegeben und für 1 min bei 10.000x g zentrifugiert. Falls das Volumen die Kapazität der Säule (700 µl) überstieg, so wurde ein weiteres Mal mit der restlichen Lösung zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Membran mit 300 µl Bindungspuffer (Binding Buffer XP2) gewaschen (1 min bei 13.000x g). Dieser Schritt wurde mindestens noch zweimal wiederholt, um alle Reste von Agarose zu entfernen, da subsequentielle enzymatische Reaktionen (z.B. Ligationen) sehr stark durch Agarose gehemmt werden. Anschließend wurde zur Entfernung der Salze die Säule zweimal mit je 750 µl Waschpuffer (SPW Wash Buffer) gewaschen. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, folgte die Trocknung der Silica-Membran durch eine Zentrifugation bei > 13.000x g für eine Minute. Die Säule wurde auf ein frisches 1,5 ml RG gesetzt und 30 bis 50 µl Elutionspuffer (Elution Buffer, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5) wurden direkt auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur wurde die DNA durch Zentrifugation für 1 min bei > 13.000x g eluiert und wie oben beschrieben quantifiziert.

3.15.2 Dephosphorylierung

Damit eine Ligation zwischen einem Plasmidvektor und dem Insert effektiv stattfinden konnte, wurden nach der Linearisierung die entstandenen Schnittenden des Plasmids dephosphoryliert, was eine Religation verhindert. Erst durch den Einbau des Inserts wurde wieder eine Rezirkularisierung des Plasmidkonstruktes möglich. Für bereits linearisierte Plasmide wie pGEM[®]-T easy war keine Phosphatase-Behandlung notwendig, da an den Enden vorhandene T-Überhänge eine Selbstligation verhinderten.

Nachdem der Vektor mit einem geeigneten Restriktionsenzym hydrolisiert wurde, erfolgte die Dephosphorylierung. Dazu wurden 1 µg linearisierte Plasmid-DNA in einem 20 µl Ansatz mit 2 µl 10x Puffer (FastAP Buffer, Fa. Thermo) und 1 µl Phosphatase (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Fa. Thermo) versetzt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 75 °C für 5 min gestoppt. Das nun dephosphorylierte Plasmid konnte anschließend für die Ligation verwendet.

3.15.3 A-Tailing

Wenn bei PCR-Reaktionen Polymerasen mit Korrekturlesefunktion wie etwa *Pfu*-Polymerase verwendet wurden, so entstanden Amplifikate mit glatten (*blunt*) Enden. Eine Ligation mit dem Vektor p-GEM[®]-T easy ist hierbei schwieriger, da dieser über T-Überhänge verfügt, die komplementär zu den durch die *Taq*-Polymerase an die PCR-Produkte angefügte A-Überhänge sind. Um trotzdem eine T/A-Klonierung durchführen zu können, wurden an die

3'-Enden der PCR-Produkte Adenosin-Reste angefügt. Dazu wurden in einem 10 µl Ansatz 6,2 µl gereinigtes PCR-Produkt mit 1 µl 10x PCR-Puffer (Puffer B, s.o.), 0,8 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl ATP (2 mM) und 1 µl *Taq* (5 U/µl) gemischt und für 30 min bei 72 °C inkubiert. Von diesem Ansatz wurde 2 µl für die Ligation eingesetzt.

3.15.4 Ligation

Für die Konstruktion von Plasmiden mit einem mittels PCR hergestelltem und durch Silica-Membranen aufgereinigtem Insert, musste eine Ligation vorgenommen werden. Für die Ligation mit dem Vektor pGEM[®]-T easy konnten entweder aufgereinigte Produkte einer *Taq*-PCR direkt verwendet werden oder durch *Pfu*-PCR erzeugte Produkte nach dem Anhängen von Adenosinresten. Ein vorheriger Restriktionsverdau und Desphosphorylierung des Vektors waren nicht nötig. Bei der Verwendung von NEV-E hingegen musste ein Restriktionsverdau mit anschließender Desphosphorylierung durchgeführt werden. Das mit dem gleichen Enzym geschnittene Insert konnte anschließend mit dem Plasmid ligiert werden. Das optimale molare Verhältnis von Vektor zu Insert für eine hohe Transformationsrate liegt im Bereich von 3:1 und 5:1. Die benötigte Menge an Insert wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{ng \text{ Vektor} \times kb \text{ Insertgröße}}{kb \text{ Vektorgröße}} \times \text{molares Verhältnis von Insert zu Vektor} = ng \text{ Insert}$$

Die berechnete Menge an Insert wurde mit 2 µl 10x Ligations Puffer, 1 µl Ligase (5 U/µl, Fa. Thermo), 0,5 µl Vektor (0,5 ng/µl) versetzt und mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Alternativ wurde die Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur durchgeführt, was allerdings eine deutlich reduzierte Anzahl an Transformanten zur Folge hatte.

3.15.5 Herstellung kompetenter *E. coli*

Die verwendete Methode basiert auf einem Protokoll von Hanahan (1983). Für die Herstellung von kompetenten *E. coli* wurden in 5 ml SOC-Medium Bakterien über Nacht bei 37 °C und 250 rpm auf einem Schüttler angezogen. Mit dieser Vorkultur wurden 50 ml SOC Medium in einem 200 ml Erlenmeyer-Kolben angeimpft und bei 37 °C sowie 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 wachsen gelassen. Da keine Antibiotika verwendet werden konnten, musste auf absolute Sterilität geachtet werden. So waren alle Glasgefäße autoklaviert und alle Arbeiten wurden unter einer Sterilbank vorgenommen. Nachdem die Zelldichte hoch genug war, wurde die Suspension auf zwei sterile 50 ml Falcon-Tubes aufgeteilt und bei 2200x g und 4°C für 5 min in einem Ausschwingrotor (A-4-44, Fa. Eppendorf) pelletiert. Die geernteten Zellen wurden anschließend in 25 ml kaltem Transformationspuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 2200x g wurden die Zellen in 5 ml Transformations-

puffer und 20 % Glycerin (v/v) gelöst. 200 µl Aliquots wurden auf 1,5 ml RG verteilt und bei -80 °C eingelagert.

Transformationspuffer	100 mM	CaCl ₂
	50 mM	RbCl
	40 mM	MnCl ₂
		Steril filtrieren

SOC-Medium (für 1 l):	20 g	Trypton
	5 g	Hefe-Extrakt
	0,5g	NaCl
	0,19g	KCl

Der pH wurde mit NaOH auf 7.0 eingestellt und anschließend autoklaviert.

5 µl/ml	2 M MgCl ₂ (steril filtriert)
20 µl/ml	1 M Glucose (steril filtriert)

3.15.6 Transformation von *E. coli*

Die bei -80 °C eingelagerten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Zu einem 200 µl Aliquot wurden 5-20 µl des Ligationsansatzes (Kap. 3.15.4) hinzu pipettiert und auf Eis für 30 min inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s wurden die Zellen erneut auf Eis für 2 min inkubiert. Anschließend wurden 800 µl SOC-Medium (Kap. 3.15.5) hinzugegeben, vorsichtig gemischt und bei 37 °C auf einem Thermoschüttler (200 rpm) inkubiert.

Nach der Transformation wurden die Zellen auf LB-X-Gal-Amp-Selektionsagarplatten ausplattiert. Dazu wurden auf eine Platte 100 µl der Zellsuspension gegeben. Die verbliebenen Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert und 700 µl des Mediums abgenommen. Das Pellet wurde im verbliebenen Medium erneut durch vorsichtiges pipettieren gelöst und auf einer Selektionsplatte ausplattiert. Die Anzucht der Kolonie erfolgte über Nacht bei 37 °C. Wurde der Vektor pGEM[®]-T (Kap. 3.4) verwendet, so war die Überprüfung des Transformationserfolges mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion möglich. Das im Vektor enthaltene *lacZ*-Gen kodiert für das Enzym β-Galactosidase welches das dem Medium zugesetzte Glycosid X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) spaltet. Das vom Galactose-Rest abgespaltene 5-Brom-4-chlor-indoxyl dimerisiert durch Oxidation zu 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo, was zu einer Blaufärbung führt. Die Einbaustelle des Inserts in den Vektor liegt innerhalb der ORF des *lacZ*-Gens, weshalb ein Einbau die Bildung des Enzyms verhindert. Somit erscheinen erfolgreich transformierte Kolonien weiß. Mit dem Vektor NEV-E war keine Blau-Weiß-Selektion möglich, weshalb durch eine Restriktionshydrolyse nach Plasmidisolierung (Kap. 3.9.2.2) mit anschließender

Agarosegelelektrophorese oder Kolonie-PCR der Transformationserfolg überprüft werden musste.

Von geeigneten Bakterienkolonien wurden Übernacht-Flüssigkulturen angefertigt. Dazu wurden die Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen, auf einer Sicherungsplatte zweimal ausgestrichen und anschließend wurden die Zahnstocher in Reagenzgläser mit 3-5ml LB-Amp Medium gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 400 rpm.

LB-Medium (für 1 l):

10 g	NaCl
5 g	Hefe-Extrakt
10 g	Trypton

Mit NaOH wurde der pH auf 7,2 bis 7,5 eingestellt und autoklaviert. Für die Herstellung von LB-X-Gal-Amp-Platten wurde vor dem Autoklavieren 1,5 % Agar hinzugegeben und nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C Ampicillin (100 mg/ml) und X-Gal (50 mg/ml). Für LB-Amp Medium wurde nur Ampicillin (100 mg/ml) nach dem Autoklavieren hinzugegeben.

3.15.7 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Charakterisierung von pflanzlichen Saccharose-Transportern eignet sich der Hefestamm SEY2102 (Emr et al.1983). Die Transformation der Hefen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Soni et al. (1992).

Von einer Dauerkultur wurden 20 ml YPD-Medium in einem Erlenmeyer-Kolben angeimpft und über Nacht bei 30 °C auf einem Schüttler (200 rpm) inkubiert. Die Zelldichte wurde bestimmt und in weiteren 20 ml auf eine OD_{600} von 0,5 verdünnt. Die Zellen wurden bis zu einer $OD_{600} = 2,0$ wachsen gelassen, was etwa 3-5 h dauerte. Anschließend wurden 1,4 ml der Kultur in ein steriles 2 ml RG überführt und die Zellen wurden bei $> 13.000x g$ für 20 s sedimentiert. Der Überstand wurde komplett abgenommen und die Zellen mit 5 μ l Carrier-DNA (20 mg/ml) sowie mit 4 μ l des Plasmidvektors versetzt. Nach kurzem Mischen wurde der Lösung 500 μ l LP-Mix hinzugefügt und erneut gut gemischt. Es folgte die Zugabe von 55 μ l DMSO, eine Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur und ein Hitzeschock bei 42 °C für 15 min. Zur Verdünnung des im Puffer enthaltenen PEG wurden 500 μ l steriles H₂O hinzugegeben und die Zellen bei 400x g für 1 min sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Pellet in 1 ml H₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert (1.500x g, 2 min). Die Zellen wurden in 80 μ l H₂O gelöst und auf CAA-Agar-Platten ausplattiert.

Der verwendete Hefestamm SEY2102 ist Uracil-defizitär und kann auf einem Mangelmedium wie CAA nicht wachsen. Der Vektor NEV-E enthält das Uracil-Gen und dient damit als

Selektionsmarker, da es den Phänotyp von SEY2102 komplementiert. Für die Transformation wurden keine Ligationsansätze verwendet sondern isolierte Plasmidkonstrukte, weil NEV-E keinen Transformationsmarker enthält und somit keine Unterscheidung zwischen Kolonien mit oder ohne Insert im Plasmid möglich gewesen wäre. Da NEV-E nur eine EcoR1 Schnittstelle zum Einbau des Inserts hat und somit keine gerichtete Klonierung durchgeführt werden konnte, musste die Orientierung des Inserts durch Sequenzierungen (Kap. 3.13.5) ermittelt werden. Es wurden je eine Transformation mit Inserts in Sense und Anti-Sense Orientierung durchgeführt.

YPD-Medium (für 1 l): 20 g Trypton
 10 g Hefeextrakt
 20 g Glucose
 Autoklaviert

CAA-Platten (für 1l): 6,72 g Yeast Nitrogen Base without Amino Acids
 10 g Casaminsäuren
 20 g Glucose
 20 g Agar
 Autoklaviert

Carrier-DNA: 2 mg Heringssperma-DNA wurden in einem 2 ml RG mit 1 ml H₂O versetzt und autoklaviert. Dadurch wurde die DNA geschert, sterilisiert und gelöst.

LP-Mix: 40% Polyethylenglykol (PEG) 4000
 0,1 M Lithiumacetat
 10 mM Tris-HCl pH 7,5
 1 mM EDTA
 Autoklaviert

3.15.8 Herstellung von Dauerkulturen

Von Hefe- bzw. Bakterien-Übernachtskulturen wurden 500 µl Zellsuspension in einem 1,5 ml RG mit 500 µl Glycerin versetzt und gut gemischt bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Die RG wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C dauerhaft gelagert.

3.16 DNA-Größenauftrennung mit Agarosegelen

Zur Erfolgskontrolle, Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen (Kap. 3.13), Plasmidisolierungen (Kap. 3.9.2) und Restriktionshydrolysen (Kap. 3.9.2.2) sowie zur Qualitätskontrolle von RNA-Isolierungen (Kap. 3.9.1) wurden TAE-Agarosegele verwendet. Zur Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurden 3 g Agarose in 300 ml 1x TAE-Puffer gemischt und in einer Mikrowelle durch Kochen in Lösung gebracht. Im flüssigen Zustand wurde das Gel in Gelkammern mit einer Dicke von etwa 0,5-1 cm aufgetragen und zur Bildung von Beladungstaschen wurden Kämmen eingesetzt. Nach dem Erkalten wurden die Taschen mit 5 µl Probe gefüllt, die zuvor mit 1/5-Gelladepuffer versetzt wurden und das Gel wurde in 1x TAE-Puffer mit bis zu 150 mA unter Spannung gesetzt. Als Größenstandard diente der O'GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fa. Thermo). Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad (1 µl/ml) für 20 min inkubiert und anschließend auf einem UV-Tisch fotografiert.

50x TAE-Puffer:

2 M	Tris
1 M	Acetat
50 mM	EDTA pH 8,0

3.17 Immunologischer Nachweis von QrSUT1 und FeSUT1

Für die Lokalisation von den membranständigen Saccharose-Transportern QrSUT1 und FeSUT1 wurden Primär-Antikörper hergestellt, die dann durch Sekundär-Antikörper gegen die schwere und leichte Kette des Immunglobins G aus Kaninchen nachgewiesen werden sollten (Anti-Rabbit IgG (H+L), CF™ 488A antibody produced in goat, Fa. Sigma). Alle Arbeiten der Immunolokalisation sowie der Western-Blots wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Ruth Stadler am Lehrstuhl Molekulare Pflanzenphysiologie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt. Es wurden in der Literatur beschriebene Standardmethoden verwendet (Laemmli 1970, Sauer und Stadler 1993, Gahrtz et al. 1994, Knop 2001).

3.17.1 Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Nachdem durch RACE die offenen Leseraster (ORF) von QrSUT1 und FeSUT1 identifiziert waren, wurden anhand der korrespondierenden Proteinsequenzen Peptid-Antikörper hergestellt. Dies wurde bei der Firma Pineda Antikörperservice (Berlin) in Auftrag gegeben. Nach einer bioinformatischen Protein-Epitopenanalyse wurden für beide SUT geeignete Peptidsequenzen ausgewählt. Bei dem Peptid aus FeSUT1 wurde zur Verbesserung der Antikörperbindung ein immunologisch nicht relevantes Glycin (G) an den Anfang hinzugefügt.

Peptid für Anti-QrSUT1: KLAEKARNGHPVAT Pos. 368-381

Peptid für Anti-FeSUT1: GQAEPPENIGHGVVK Pos. 251-264

Zur erfolgreichen Immunisierung war es notwendig, die Peptide an das Carrier-Protein KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) zu koppeln. Diese Proteinkonstrukte wurden jeweils drei ausgewählten Kaninchen injiziert und die Antikörper-Produktion nach einer zwei monatigen Basis-Immunisierung nach 30 Tagen anhand von Kontrollfärbungen an Handschnitten (Kap. 3.17.2) überprüft. Waren die Tests positiv, wurden die Blutseren verwendet. Fielen die Tests unbefriedigend aus, so wurden die Tiere „geboostet“ das heißt, sie wurden erneut mit dem Proteinkonstrukt immunisiert.

3.17.2 Antikörper-Färbung an Handschnitten

Acht bis zehn dünne Querschnitte von Blattstielen der jeweiligen Pflanze wurden angefertigt und in 1,5 ml RG mit 1 ml Fixierungslösung inkubiert. Das Fixanz wurde entfernt, durch 300 µl frischem Fixanz ersetzt und für 90 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Fixanz entfernt und die Schnitte drei Mal je 1 min mit 400 µl 1x TBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde mit Block-Puffer zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindstellen 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden dann mit 30 µl Blutserum mit Anti-SUT-Antikörpern (1:200 mit Blockpuffer verdünnt) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden zuvor identisch behandelte Schnitte mit 30 µl Blockpuffer versetzt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit 400 µl Block-Puffer für 30 min gewaschen, wobei nach 5 und 15 min der Puffer gewechselt wurde. Zur Bindung des Sekundär-Antikörpers wurden die Proben nach Entfernung des Block-Puffers mit 50 µl anti-Kaninchen IgG-Antikörper (1:500 verdünnt mit Blockpuffer) für 45 min im Dunkeln inkubiert. Zum Abwaschen überschüssiger Antikörper wurden die Proben 20 min lang mit 400 µl Block-Puffer gewaschen, wobei der Puffer alle 5 min gewechselt wurde. Als weitere Waschschrte folgten drei Inkubationen für 1 min mit 1x TBS-Puffer. Die Schnitte wurden anschließend in einem Tropfen Einbettungsmedium (50 % Glycerin in 1x TBS) auf einem Objektträger gelegt, mit einem Deckgläschen fixiert und auf einem Fluoreszenzmikroskop (BZ-8000, Fa. Keyence) betrachtet.

5x TBS: 250mM Tris-HCl pH 7,5

750mM NaCl

Blockpuffer: 1x TBS

0,1 % Triton (v/v)

1 % Trockenmilch (w/v)

1h rühren bei Raumtemperatur

Fixierungslösung: 75% Ethanol p.A. (v/v)
 25% Eisessig (v/v)

3.18 ¹⁴C-Saccharose Aufnahmetest in transformierten Hefen

Die Bestimmung der Transportaktivität von QrSUT1 und FeSUT1 wurde mit ¹⁴C-Saccharose Aufnahmetests in transformierten Hefen durchgeführt (Kap. 3.15.7). Dazu wurden die Hefen aus einer Vorkultur in 100 ml CAA-Medium über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ = 2 wachsen gelassen, auf zwei 50 ml Falcon-Tubes aufgeteilt und die Zellen für 4 min bei 3500x g pelletiert. Die Pellets wurden in 20 ml 25 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Puffer pH 5,5 resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Hefen im selben Puffer auf eine Dichte von 20 OD/ml eingestellt und auf Eis gelagert. In einen 25 ml Erlenmeyerkolben wurden 1 ml Zellsuspension gegeben und für 1 min bei 29 °C geschüttelt. Nach der Zugabe von 10 µl Glucose wurde eine weitere Minute lang geschüttelt und anschließend 11 µl des radioaktiven Substrats hinzugegeben.

Sofort nach Zugabe wurde die erste 100 µl Probe entnommen und in einer Absaugvorrichtung mit Nitrocellulosemembran abfiltriert. Die Hefezellen wurden ein weiteres Mal mit H₂O gewaschen, um überschüssige Radioaktivität zu entfernen. Weitere Proben wurden nach 30 s, 1 min, 2 min, 4 min, 6 min, 8 min, 10 min genommen und mit einem Gesamtwert verglichen. Nachdem die Proben genommen waren, wurden sie in Szintillationsröhrchen mit 4 ml Szintillationscocktail überführt und die Radioaktivität gemessen. Für die Km-Wert Bestimmungen wurden folgende Saccharose-Konzentrationen verwendet: 50 mM, 100 mM, 300 mM, 500 mM, 700 mM und 1 M.

3.19 Nicht-wässrige Fraktionierung (NWF)

Die Nicht-wässrige Fraktionierung erlaubt die Auftrennung der Zellkompartimente entlang eines Dichtegradienten aus n-Heptan und Tetrachlorethylen (Gerhard und Heldt 1984, Riens et al. 1991, Nadwodnik und Lohaus 2008).

Blätter wurden wie oben beschrieben (Kap. 3.6) zu einem sehr feinen Pulver verrieben und anschließend lyophilisiert (Christ alpha 2–4, Fa. Martin Christ). Von dem getrockneten Material wurden ca. 5 g auf Eis in 20 ml Lösung B in einem 50 ml Falcon-Röhrchen resuspendiert. Zum weiteren Zellaufschluss wurde die Suspension mit einem Ultraschallstab für 95 s (5s Puls, 5 s Pause, 65 % Intensität) behandelt (Sonopuls HD 60, Fa. Bandelin). Anschließend wurde die Suspension über einem Nylonnetz (20 µm Porengröße) gefiltert, das Netz dreimal mit 10 ml n-Heptan gespült und für 10 min bei 3200x g und 4 °C zentrifugiert (5804R, Fa. Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2,5 ml Lösung B

resuspendiert. Zur Erstellung des Dichtegradienten wurden die beiden Kammern eines Gradientenmischers mit 12 ml Lösung A und 13 ml Lösung B gefüllt. Durch einen Teflonschlauch wurde das Gemisch in ein 50 ml Falcon-Röhrchen geleitet, in dem 5 ml von Lösung A vorgelegt waren, wodurch sich ein Dichtegradient bildete. Nachdem der Gradient angelegt war, wurde dieser mit der Zellsuspension vorsichtig beladen und das Röhrchen anschließend für 80 min bei 4500x *g* und 4 °C in einem Ausschwingrotor (A-4-44) zentrifugiert. Um ruckartige Bewegungen zu verhindern, die den Gradienten zerstören könnten, wurden die Beschleunigungswerte für den Anlauf und das Abbremsen auf die niedrigste Stufe gestellt. Nach der Zentrifugation hatten sich mehrere Fraktionen gebildet, wobei die Vakuolen sich im Bereich der höchsten Dichte anreicherten, die Chloroplasten im Bereich der niedrigsten Dichte und das Cytosol in der Phase mittlerer Dichte. Es wurden insgesamt sechs Fraktionen auf fünf 1,5 ml RG verteilt. Als Referenzwert wurden vor der Beladung des Gradienten Aliquots der Gesamtfraktion entnommen. Die Proben wurden anschließend in einem Vakuum-Konzentrator getrocknet (Concentrator 5301, Fa. Eppendorf) und in einem Exsikkator unter Luftabschluss gelagert.

Lösung A: schwereres Gemisch aus n-Heptan und Tetrachlorethylen

Lösung B: leichteres Gemisch aus n-Heptan und Tetrachlorethylen

3.19.1 Marker-Enzym-Bestimmung

Durch die NWF ist eine Auftrennung der Kompartimente Vakuole, Cytosol und Chloroplasten möglich, jedoch liegen in jeder Fraktion die drei Komponenten in unterschiedlichen Anteilen vor. Durch die Bestimmung von Marker-Enzymen lassen sich die Kompartimente in jeder Fraktion quantifizieren (Gerhard und Heldt 1984).

3.19.1.1 Protein-Extraktion

Für die Enzym-Bestimmung wurden Protein-Extrakte nach Stitt et al. (1983) angefertigt. Dazu wurden die getrockneten Fraktionen mit 500 µl STITT-Puffer versetzt, das Pellet durch Vortexen gelöst und für 10 min bei 20.000x *g* und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml RG überführt und auf Eis gelagert.

STITT-Puffer:

50 mM	Hepes pH 7,4
5 mM	MgCl ₂
1 mM	EDTA
0,1 %	Triton-X (v/v)
10%	Glycerin (v/v)

3.19.1.4 Bestimmung von α -Mannosidase

Die Quantifizierung der Vakuole erfolgte über die α -Mannosidase. Dieses Enzym katalysiert die Spaltung von p-Nitrophenol- α -D-Manno-Pyranosid (PNP-Mannosid) zu Mannose und p-Nitrophenol (p-NP), wobei letzteres bei 405 nm photometrisch bestimmt werden kann.

Für eine Probe wurden 500 μ l Citratpuffer mit 50 μ l Protein-Extrakt in einem 2 ml RG vorgelegt und auf einem Thermoschüttler bei 800 rpm und 37 °C vorinkubiert. Bei der Blindprobe wurde auf die Zugabe des Protein-Extraktes verzichtet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 μ l PNP-Mannosid (10 mM) gestartet und nach 65 min durch Zugabe von 500 μ l Boratlösung (800 mM, pH 9,8) gestoppt. Der Blindprobe wurde nach dem Beenden der Reaktion 50 μ l Protein-Extrakt zugefügt. Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung des p-NP.

Citratpuffer: 100 mM Citrat
Mit KOH auf pH 4,5 einstellen.

3.19.1.5 Bestimmung der Chloroplasten

Für die Bestimmung der Chloroplasten wurden die Chlorophyll-Gehalte jeder Fraktion bestimmt.

Dazu wurde das getrocknete Pellet in 1 ml Ethanol (p.A.) gelöst und für zwei Minuten bei > 15.000x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit Ethanol (p.A.) 1:10 verdünnt und der Chlorophyll-Gehalt bei 652 nm Wellenlänge photometrisch bestimmt. Als Blindwert wurde eine Küvette mit reinem Ethanol verwendet.

3.20 Transmissionen-Elektronen-Mikroskopie (TEM)

Die Struktur des Phloems wurde anhand von TEM-Aufnahmen analysiert. Die Arbeiten für die Probenvorbereitung, Schnitte und Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung Elektronenmikroskopie des Zentrum für Anatomie und Hirnforschung unter Leitung von Dr. Klaus Zanger an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Aufnahmen wurden von Ultradünnschnitten von in Kunstharz eingebetteten Blattstücken auf einem TEM (H 600, Fa. Hitachi) angefertigt (Spurr 1969).

3.21 Bioinformatische Arbeiten

Für die computergestützten Arbeiten kamen verschiedene Softwarepakete, Webserver und Programme zum Einsatz, die in folgender Tabelle aufgeführt sind.

Tabelle 3.14 Verwendete bioinformatische Software und Server

Name	Ver.	Funktion	Internetadresse	Referenzen
NCBI		Datenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	
BLAST		Sequenzvergleich	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Altschul et al. 1990
ChromasPro	1.5	DNA-Sequenzierung	http://technelysium.com.au/	
Bioedit	7.2.25	Sequentalignment und Analyse	http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html	Hall 1999
Phyre2	2.0	3D Proteinstrukturanalyse	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index	Kelley und Sternberg 2009
PSIPREP		Proteinstrukturanalyse/ Transmembrananalyse	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/	Buchan et al. 2013, Jones et al. 1994, Jones 1997, 1999, Nugent und Jones 2009
PerlPrimer	1.1.21	Primerdesign	http://perlprimer.sourceforge.net/	
MEGA	6.06	Phylogentische Analysen	http://www.megasoftware.net/	Tamura et al. 2013

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse werden in der folgenden Struktur dargestellt:

Abschnitt I: Bestimmung der Zuckerzusammensetzung in Blattexsudaten, Blattextrakten und Isolierung von SUT-Homologen von verschiedenen Baumarten zur Ermittlung geeigneter Modellpflanzen, die unterschiedliche Typen der Phloembeladung repräsentieren.

Abschnitt II: Analyse der *minor vein* Struktur, der Transportzucker im Phloem, der Konzentrationsgradienten für die Transportzucker zwischen dem Cytosol des Mesophylls und des Phloem sowie die Isolierung von SUT-Homologen aus *Quercus robur* und *Fraxinus excelsior*.

Diese Ergebnisse sind in dem Artikel „Apoplastic and symplastic phloem loading in *Quercus robur* und *Fraxinus excelsior*“ (*Journal of Experimental Botany*, 2014, Vol. 65, Nr. 7, S. 1905-1916) dargestellt.

Abschnitt III: Biochemische Charakterisierung von isolierten Saccharose-Transportern aus *Q. robur* und *F. excelsior*. Zelluläre Lokalisation von FeSUT1 in Geweben von *F. excelsior* mittels spezifischer Antikörper.

Die Analysen wurden zusammen mit Dr. Ruth Stadler und Christine Rappl von der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt und die Ergebnisse sind in dem Manuskript „Heterologous expression and characterization of sucrose transporters from *Quercus robur* (QrSUT1) and *Fraxinus excelsior* (FeSUT1). Immunolocalization of FeSUT1 in the phloem of *Fraxinus excelsior*.“ dargestellt.

Abschnitt IV: Untersuchungen zu saisonalen und circadianen Einflussfaktoren auf den Zuckerstoffwechsel und die Expression von Saccharose-Transportern in *Q. robur* und *F. excelsior*.

Die Ergebnisse dieser Analysen sind in dem Manuskript „Influence of seasons and light conditions on carbon partitioning and expression of sucrose transporters in *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior*“ dargestellt.

4.1 Abschnitt I: Screening verschiedener Baumarten und Suche nach Modellpflanzen für unterschiedliche Phloembeladungstypen

Für die Bestimmung geeigneter Modellpflanzen, an denen die Phloembeladung im Detail untersucht werden konnte, wurden die Zucker in Blattextrakten und in Exsudaten analysiert. Des Weiteren wurden Screenings auf SUT mit Hilfe degenerierter Primer durchgeführt.

4.1.1 Zuckerkomposition in Exsudaten aus Blattstielen

Um die Transportzucker in verschiedenen Laubbaumarten zu bestimmen, wurden die Exsudate ausgewählter Arten, die für Mitteleuropa typisch sind, analysiert. Zum Vergleich wurden drei Gymnosperm-Arten mit untersucht. Eine Konzentrationsbestimmung der gefundenen Zucker war mit dieser Methode nicht möglich, da nicht gemessen werden konnte, wie viel Phloemsaft in das Wasser exsudierte. Somit dienten die Werte aus Tabelle 4.1 einer groben Orientierung. Eine genauere Bestimmung der Zuckergehalte in $\mu\text{mol g}^{-1}$ Frischgewicht (FG) wurde in Blattextrakten durchgeführt, bei denen die Probenmenge exakt eingewogen werden konnte (Tabelle 4.2).

Der Haupttransportzucker im Phloem in fast allen in der Vergangenheit untersuchten Arten war die chemisch inerte Saccharose (Zimmermann und Ziegler 1975, Lohaus et al. 1994, 1995). Daneben verwendeten einige Arten RFO und Zuckeralkohole für die Translokation von Kohlenstoff, doch war auch in diesen Arten Saccharose ein wichtiger Transportzucker (Geiger et al. 1973, Zimmermann und Ziegler 1975, Knop et al. 2001, Nadwodnik und Lohaus 2008, Reidel et al. 2009, Davidson et al. 2011). Reduzierende Monosaccharide wie Hexosen wurden nicht im Phloem nachgewiesen und etwaige Spuren konnten auf Kontaminationen durch zerstörte Zellen bzw. die Aktivität von Invertasen zurück geführt werden (Fisher und Frame 1984, Weibull et al. 1990, Riens et al. 1991, Winter et al. 1992, Liu et al. 2012). Die bei der Analyse der Exsudate verschiedener Arten gefundenen, teilweise sehr hohen Hexose-Konzentrationen sind vermutlich ebenfalls zum Teil auf Kontaminationen aus geschädigten Zellen zurück zu führen (Tabelle 4.1). Untersuchungen zeigten, dass die Vakuolen von Mesophyllzellen hohe Konzentrationen an Hexosen aufweisen, die durch Beschädigungen in die Exsudate gelangen (Nadwodnik und Lohaus 2008). Eine weitere Erklärung für den sehr hohen Anteil von Hexosen am Gesamtzucker der Exsudate ist die Aktivität von Saccharose-spaltenden Enzymen, die ebenfalls aus den beschädigten Zellen stammen können (Roitsch und González 2004, van Bel und Hess 2008, Liu et al. 2012).

Tabelle 4.1 Identifizierte Zucker aus Exsudaten von verschiedenen Baumarten. Der prozentuale Anteil der einzelnen Zucker am Gesamtzuckergehalt ist angegeben (n = 3). (++++) = ab 40 %, (++++) = 15 bis 40 %, (++) = 5 – 15 %, (+) = 2 bis 5 %, (†) = Spuren bis 2 %, u.d.N = unter der Nachweisgrenze. ZuAlc = Zuckeralkohole, Hex = Hexosen (Glucose/Fructose), Suc = Saccharose, RFO = Raffinose-Oligosaccharide, Mal = Maltose.

Art	Familie	ZuAlc	Hex	Suc	RFO	Mal
Angiospermen						
<i>Alnus glutinosa</i>	Betulaceae	†	++++	+++	†	†
<i>Carpinus betulus</i>	Betulaceae	+++	++++	†	u.d.N.	++
<i>Castanea sativa</i>	Fagaceae	++	++++	+	u.d.N.	u.d.N.
<i>Fagus sylvatica</i>	Fagaceae	++	++++	+	u.d.N.	u.d.N.
<i>Quercus petraea</i>	Fagaceae	†	++++	+	u.d.N.	u.d.N.
<i>Quercus robur</i>	Fagaceae	+	++++	+	u.d.N.	u.d.N.
<i>Quercus rubra</i>	Fagaceae	†	++++	+++	u.d.N.	u.d.N.
<i>Fraxinus excelsior</i>	Oleaceae	++++	+++	†	++	u.d.N.
<i>Populus tremula</i>	Salicaceae	+	++++	++	u.d.N.	u.d.N.
<i>Salix caprea</i>	Salicaceae	†	++++	+	u.d.N.	u.d.N.
<i>Salix viminalis</i>	Salicaceae	++	++++	+++	u.d.N.	u.d.N.
<i>Acer campestre</i>	Sapindaceae	+	++++	+++	†	++

Gymnospermen						
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgoaceae	†	++++	++	u.d.N.	+++
<i>Abies pinsapo</i>	Pinaceae	+	++++	†	u.d.N.	++
<i>Pinus mugo</i>	Pinaceae	+++	++++	u.d.N.	u.d.N.	u.d.N.

Durch die lange Inkubation der Exsudate für mindestens 5 h bei Raumtemperatur ist es wahrscheinlich, dass diese Enzyme zu einem Abbau von Saccharose geführt haben. Die Degradierung ging teilweise so weit, dass kaum Saccharose mehr in Arten gemessen werden konnte, von denen bekannt ist, dass Saccharose der einzige Transportzucker ist (Tabelle 4.1, *Quercus robur*, Zimmermann und Ziegler 1975). Daher ist davon auszugehen, dass der prozentuale Anteil von Saccharose im Phloemsaft an den Gesamtzuckern deutlich höher ist, als die Exsudat-Messungen es vermuten lassen. Neben Saccharose waren in vielen Arten Zuckeralkohole in größeren Anteilen vorhanden, insbesondere Sorbitol bei den Arten aus der Familie der Rosaceae und Mannitol bei *Fraxinus excelsior* (Oleaceae) (Zimmermann und Ziegler 1975, Watari et al. 2004, Reidel et al. 2009, Nadwodnik und Lohaus 2008, Fu et al. 2011). In relevanten Mengen waren RFO nur in *Fraxinus excelsior* nachweisbar und die gemessenen Maltosewerte sind wahrscheinlich auf Kontaminationen und die Degradierung von Stärke während der Inkubationszeit zurück zu führen.

4.1.2 Zuckergehalte in Blattextrakten

Die Analyse der Zucker aus Blattextrakten zeigte, dass im Unterschied zu den Exsudaten Saccharose das dominante Fotosynthese-Produkt in vielen untersuchten Arten war (Tabelle 4.2). Als weitere Zucker waren vor allem Hexosen und in geringerem Umfang Zuckeralkohole und RFO in den Extrakten vorhanden. Maltose kam in einigen Arten ebenfalls in hohen Gehalten vor, während sie in vielen Arten nicht nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 4.2 Zuckerkonzentration und -komposition in Blattextrakten ausgewählter Baumarten. Die Blattproben wurden in der Mitte der Lichtperiode gesammelt und mit Chloroform/Methanol extrahiert. Die Stichprobengröße lag zwischen $n = 1$ und $n = 15$. ZuAlc = Zuckeralkohole, Hex = Hexosen (Glucose/Fructose), Suc = Saccharose, RFO = Raffinose-Oligosaccharide, Mal = Maltose, u.d.N = unter der Nachweisgrenze.

Art	Familie	ZuAlc	Hex	Suc	RFO	Mal
Angiospermen						
<i>Alnus glutinosa</i>	Betulaceae	2,7 ± 0,7	36,9 ± 9,0	26,8 ± 7,2	1,4 ± 1,2	39,2 ± 16,5
<i>Carpinus betulus</i>	Betulaceae	0,2 ± 0,02	10,7 ± 2,9	18,7 ± 1,4	3,0 ± 1,0	9,6 ± 2,3
<i>Castanea sativa</i>	Fagaceae	0,6 ± 0,3	15,2 ± 2,1	9,5 ± 1,1	1,1 ± 0,4	0,8 ± 0,2
<i>Fagus sylvatica</i>	Fagaceae	0,4 ± 0,2	3,0 ± 0,8	37,8 ± 7,6	u.d.N.	u.d.N.
<i>Quercus petraea</i>	Fagaceae	0,7	27,5	28,7	u.d.N.	u.d.N.
<i>Quercus robur</i>	Fagaceae	2,3 ± 2,3	18,7 ± 2,8	41,0 ± 5,9	u.d.N.	u.d.N.
<i>Quercus rubra</i>	Fagaceae	1,1 ± 0,6	19,9 ± 2,9	26,9 ± 5,6	u.d.N.	u.d.N.
<i>Fraxinus excelsior</i>	Oleaceae	30,2 ± 3,4	15,3 ± 3,3	9,5 ± 3,7	2,2 ± 0,8	u.d.N.
<i>Populus tremula</i>	Salicaceae	0,7 ± 0,5	18,6 ± 6,2	22,5 ± 1,8	0,9 ± 0,2	u.d.N.
<i>Salix spec.</i>	Salicaceae	1,1 ± 1,1	40,7 ± 17,6	33,9 ± 11,3	0,3 ± 0,3	u.d.N.
<i>Acer campestre</i>	Sapindaceae	2,3 ± 2,1	8,2 ± 1,4	16,5 ± 1,1	u.d.N.	0,8 ± 0,8

Gymnospermen						
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgoaceae	1,0	22,2	31,9	1,4	u.d.N.
<i>Abies spec.</i>	Pinaceae	1,3 ± 1,4	27,3 ± 12,5	31,2 ± 13,4	23,9 ± 40,6	23,5 ± 15,7
<i>Pinus spec.</i>	Pinaceae	2,2 ± 2,3	25,8 ± 13,3	26,7 ± 14,2	u.d.N.	41,6 ± 33,6

4.1.3 Suche nach Saccharose-Transportern in verschiedenen Baumarten

Die Analyse von Saccharose-Transportern kann wichtige Hinweise auf den Modus der Phloembeladung geben, da sich diese Transporter hinsichtlich ihrer Funktion und Lokalisation unterscheiden. Aus *source*-Blättern verschiedener Baumarten isolierte RNA wurde für RT-PCR-Experimente (Kap. 3.12, Kap. 3.13) verwendet, um mithilfe von degenerierten Primern (Kap. 3.5) SUT-Homologe zu isolieren. Diese Vorgehensweise stellte sicher, dass am stärksten exprimierte SUT amplifiziert wurden. Der anschließende Vergleich der *expressed sequence tags* (EST) mit bekannten SUT-Sequenzen mithilfe von BLAST (Altschul et al. 1990) zeigte, dass die hier isolierten Stücke Teile von SUT-Homologen waren.

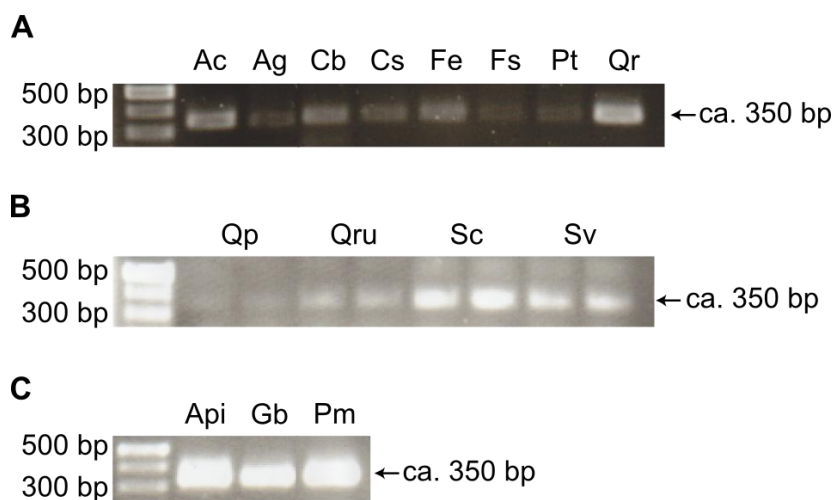


Abb. 4.1 Screening auf SUT-Homologe mit cDNA aus verschiedenen Baumarten. Die amplifizierten Produkte hatten eine erwartete Größe von etwa 350 bp. **A:** *Acer campestre* (Ac), *Alnus glutinosa* (Ag), *Carpinus betulus* (Cb), *Castanea sativa* (Csa), *Fraxinus excelsior* (Fe), *Fagus sylvatica* (Fs), *Populus tremula* (Pt), *Quercus robur* (Qr). **B:** *Quercus petraea* (Qp), *Quercus robur* (Qru), *Salix caprea* (Sc), *Salix viminalis* (Sv). **C:** *Abies pinsapo* (Api), *Ginkgo biloba* (Gb), *Pinus mugo* (Pm).

Die Amplifikationsprodukte der erfolgreichen PCRs wurden kloniert und sequenziert. Nicht aus jeder Art ist es gelungen SUT-Homologe zu isolieren, da teilweise die PCR-Bedingungen nicht optimal waren oder die Ausgangsmenge an SUT-mRNA nicht ausreichte. In Tabelle 4.3 sind die erfolgreich sequenzierten ESTs aufgeführt. Aus *Fagus sylvatica* konnte eine etwa 690 bp lange Teilsequenz isoliert werden, da es hier gelungen ist, mit einem weiter außen liegenden degenerierten Reverse-Primer (St1rlg, Kap. 3.5) ein größeres Fragment eines SUT-Homologen zu isolieren als in der ursprünglichen PCR (Abb. 4.1).

Für *Quercus robur* und *Fraxinus excelsior* wurden Vollängenklone der gefundenen SUT angefertigt, die weiter unten beschrieben werden.

Die EST für die Gymnospermen *Abies pinsapo*, *Ginkgo biloba* und *Pinus mugo* wurden mit Primern gewonnen, die von einer bekannten Sequenz aus *Pinus taeda* (Accession-Nr. [BI077135](#)) abgeleitet wurden (Kap. 3.5), da die Verwendung von degenerierten Primern keine Produkte lieferte.

Tabelle 4.3 Sequenzen der isolierten EST für Saccharose-Transporter aus verschiedenen Baumarten. Api = *Abies pinsapo*, Ac = *Acer campestre*, Ag = *Alnus glutinosa*, Cb = *Carpinus betulus*, Csa = *Castanea sativa*, Fs = *Fagus sylvatica*, Gb = *Ginkgo biloba*, Pmu = *Pinus mugo*, Pt = *Populus tremula*, Qp = *Quercus petraea*, Qru = *Quercus rubra*, Sc = *Salix caprea*, Sv = *Salix viminalis*, SUT = Sucrose uptake transporter.

EST	Sequenz
Angiospermen	
<i>AcSUT1</i> 332 bp	TATGCAGTTTGGGTGGGCGTTGCAGCTTTCTCTGCTCACACCTTATGTGCAGCTTCTGGGTATTCCACATCAATGGTTCGT CGTTGATCTGGCTTTGTGGGCCCGTCTCCGGCATGATTGTTTCAGCCAGTCGTCGGCTACCATAGCGACAACCTGTACCTCC AGATTTGGTCGTCGTAAGCCTTTTATAGCCGCCGGTGCTGTACTTGTGCAATTGCTGTCTTCTTAATCGGCTACGCCGC CGATTTCCGTCACCTTGTGGCGACCCGAAAGAGGAATCAAACCCGGGCTATCGCGTTTTTTCGTTCTCGGCTTCTGGA TCCTGACGTCGC
<i>AgSUT1</i> 338 bp	GCGGCGGGGATGCAGTTTGGGTGGGCGCTGCAGCTCTCGCTGCTGACGCCGTACGTGCAGGAGCTGGGGATCCCGCACGC CTGGGCCAGCGTGATATGGCTGTGCGGGCCGCTCTCGGGGCTCGTGGTGCAACCTCTGGTCGGTCACATGAGCGACCGCT GCACCAGCCGCTTCGGCCGCGGAGGCCGTTTACTACTCGCCGGGGCGGTGTCGATCGCCGCTCCGTCCTTATTATCGGA TACTCGGCGACATCGGTTGGCTTCTCGGCGACCGTGGCTCGTTCAGGCCAGGGCCGTGGCTGCGTTCGTTGTTGGCTT CTGGATTTTCGACGTCGC
<i>CbSUT1</i> 344 bp	GCGGCGGGGATGCAGTTTCGGGTGGGCGCTACAGCTGTGCTCTTGACCCCTTACGTGCAGCTTCTGGGCATTCCACACAC GTGGGCCCATTCATCTGGCTCTGCGGGCCATTTCCGGCTTGTTTCGTCACGCTGTCGTCGGCTACTACAGCGACCGCT GCACTTCCCGCTTCGGCCGCGCCGACCCCTTATCGCCGCGGCTCATTCCTCGTTGCCATCGCTGTATTCTCATCGGC TACGCCGCCGACCTCGGGCGCGTGTTCGGCGACCCAGCGACAATACCACGAAAACCCGCGCCATCGCCATTTTCGTTGT CGGCTTTTGGATCTTCGACGTCGC
<i>CsaSUT1</i> 344 bp	GCGGCGGGGATGCAGTTTGGGTGGGCTCTACAGCTTCTTTGTTGRCCCATATGTTTCAGCTTTTGGGTATTCTCTCACAA ATGGGCTGCTTTCATTTGGCTCTGTGGTCTATCTCCGGCATGCTTGTTCACCCATAGTTGGCTATTACAGCGACCGTT CCACCTCTCGTTTCGGTCGCCGTAGACCCCTTATTCGGCCGGAGCTTCCCTCGTCGCCGCGCTGTTTTCTCATCGGA TATGCTGCTGACTTTGGTCACCTCTCTGGTGATTCCTTAAACAAACCATAAAGCCACGTGCAATTGTTGTGTTTGGT TGGCTTYTGATYCTCGACGTCGC
<i>FsSUT1</i> 692 bp	CTTGTCACCCATCGTCGGTTATCACAGCGATCGTTGTACCTCCCGTTCCGGGCGACCGCTCCCTTCATCGCTGCTGG GTCGTCCTCGTTGCTCCGCCGTTTCTCATCGGCTACGCTGCTGATCTCGGTCATCTCTGTTGACCGCTTAGACA AAGCCACGAAGCCACGTGCAATTGCTGTTTTGCTTGTGGGATTCTGGATCCTTGATGTTGTAATAACATGTTGCAAGGT CCGTGCCGTGCACTCCTTGGGACCTCTCTGCAACGATCAGAAAAGGATGCGCACAGCCAATTCTTGTATTATTCTT CATGGCTGTGGGTAATGTCCTTGGATTTCGGCTGATTCTTACACTCATCTTACAAGCTTTTCCCTTTCACAATGACCA AAGCTTGTGATGCTACTGTGCCAACCTCAAGAGTTGTTTTCTTCTCTATTACATTGCTGTTGATTCTCACCACCTG GCTCTCACTGCAGTCAAGGAAGAAATTGTTTCAAACCAGAACAGGAGATTCCGACGACTCCTCTGCTTCTGG GGCTCCCTTTTTTGGTGATATAATGAATGCTTTCAAAGAGCTACAAGACCAATGTGGGTTTTGCTCTTGGTGACGTGTC TCAATTGGATTGCCGTTCCCTTTCTTGCTGTACGATACCGATTGGATGGG
<i>PtSUT1</i> 338	GCGGCGGGGATGCAATTTCGGGTGGGCGTTACAGCTCTCTCTTAAACCCCTACGTGCAGGAGCTAGGAATCCCTCACAA ATGGGCCAGTATAATCTGGTTGTGCGGCCATTATCGGGATTGTTTGTGCAACCTCTTGTGGCGTCATGAGCGATCGGT GCACCAGCCGTTTGAAGGCGGAGCCGTTTATTTTTCGGGTTGCTTCTGATTGCGATATCGGTTTTGATTATCGGT CATTCGCTGACATTGGGTGGTGGTTAGGCGATAGAGGAGGTGTAGACCAAGAGCAATTGGCGCTTTTGTGTTTGGCTT CTGGATTCTCGACGTCGC
<i>QpSUT1</i> 344 bp	GCGGCGGGGATGCAGTTTGGGTGGGCTCTACAGCTATCTTTGCTGACCCCATATGTTTCAGCTTTTGGGTATTCTCTCACAA ATGGGCTGCTTTCATTTGGCTCTGTGGTCTATCTCCGGCATGCTTGTTCACCCATAGTTGGCTATTACAGCGACCGTT CCACCTCTCGTTTCGGTCGCCGTAGACCCCTTATTCGGCCGGAGCTGCCCTCGTCGCCGCGCTGTTTTCTCATCGGA TATGCTGCTGACTTTGGTCACCTCTCTGGTGGTTCCTTAAACAAACCCTCGAAGCCACGTGCAATGCTTGTGTTTGGT TGGCTTTTGGATCTCGACGTCGCA

Fortsetzung Tabelle 4.3

<i>QruSUT1</i> 344	GCGGCGGGGATGCAGTTCGGGTGGGCTCTACAGCTATCTTTGTTGACCCCATATGTTTCAGCTTTTGGGTATTCTCTCACAA ATGGGCTGCTTTTCATTTGGCTCTGTGGTCTATCTCTGGCATGCTTGTTC AACCCCTAGTTGGCTATTACAGCGACCGTT CCACCTCTCGTTTCGGTTCGCGTAGACCCCTTATTGCCGCGGAGCTGCCCTCGTCGCCCGCTGTTTTCTCATCGGA TATGCTGCTGACTTTGGTACCTCTCTGGTGATTCCTTAAACAAACCTCGAAGCCACGTGAATCGTTGTGTTTGTGGT TGGCTTTTGGATCCTCGACGTCGC
<i>ScSUT1</i> 338 bp	GCGGCGGGGATGCAGTTCGGGTGGGCTTACAGCTCTCTCTTAACTCCCTACGTGCAGGAGCTAGGAATTCCTCACAA ATGGGCCAGTATTATCTGGTTGTGGGTCATTATCGGGATTGTTCTGTCAGCCTCTTGTGGCGTCATGAGCGATCGGT GCACCAGCCGGTTTGAAGACGGAGGCCGTTTATTGTTGCCGGTTCGGTTTTGATTGCGATATCGGTTTTGATAATCGGT CATTCCGCTGACATTGGGTGGTGGTTAGGCGATAGAGGAGATGTTAGACCAAGAGCAATTGGCGCTTTTGTTTTTGGCTT CTGGATTCTCGATGTCGC
<i>SvSUT1</i> 338 bp	GCGGCGGGGATGCAGTTCGGGTGGGCTTACAGCTCTCTCTTAACTCCCTACGTGCAGGAGCTAGGAATTCCTCACAA ATGGGCCAGTATTATCTGGTTGTGGGTCATTATCGGGATTGTTCTGTCAGCCTCTTGTGGCGTCATGAGCGATCGGT GCACCAGCCGGTTTGAAGACGGAGGCCGTTTATTGTTGCCGGTTCGGTTTTGATTGCGATATCGGTTTTGATAATCGGT CATTCCGCTGACATTGGGTGGTGGTTAGGCGATAGAGGAGATGTTAGACCAAGAGCAATTGGCGCTTTTGTTTTTGGCTT TTGGATTTTCGACGTCGC
Gymnospermen	
<i>ApiSUT1</i> 335 bp	ATGATTGGCAATGTTAGCTCAGTCAAAGCTGCATCAGTTGTTTTATTGGCCCTTTTAGGGTTTCCATTGGCGATAACATA CAGTGACCTTTTTCTGTGACTTCCGAGTTGACTGCAGATGCTGGAGGCGTCAAGGTTGGCTATTGGCGTTTTGAACC TTTCGATTGTTATTCCTCAGATTATCGTTGCTCTTGGAGCTGGCCCATGGGATGCTTTGTTTGGAGGAGGAAATGTACCT GCCTTGTCTTGGCTTCTGTATTTGCACCTGCAGCTGGAATTATCGCAGTGATTAAGTTACCCCGCTTTCAAGGACTAC TTACAAGCCTGCTGT
<i>GbSUT1</i> 337	AGTGATTGGCAATGTTAGCTCAGTCAAAGCTGCATCAGTTGTTTTATTGGCCCTTTTAGGGTTTCCATTGGCAATAACATA TACAGCGTTCCCTTTTCTGTGACTGCCGAGTTGACTGCAGATGCTGGAGGTGGTCAAGGTTGGCGATTGGTGTCTGAA TCTCTCTATTGTTGTTCCCTCAGATGATTGTGCCCTTGGTGCGGGCCATGGGATGCTCTGTTTGGAGGAGGAAATGTAC CAGCGTTTGTCTGGCTTCTGTATTTGCACCTGCAGCTGGGATTATTGCAGTGATCAGTAACCCCGCTTTCAAGGACT ACTTACAAGCCTGCTGT
<i>PmuSUT1</i> 335 bp	ATGATTGGCAATGTTAGCTCAGTCAAAGCTGCAGCAGTTGTTTTATTGGCCCTTTTAGGGTTTCCATTGGCAATAACATA CAGTGACCTTATTCCGTGACTGCCGAGTTGACTGCAGATGCTGGAGGAGTCAAGGTTGGCTATTGGTGTCTAAACC TTTCAATTACTGTTCCCTCAGATGATTGTGCTCTTGGAGCTGGTCCATGGGATGCTTTATTGGAGGAGGAAACGTACCT GCCTTGTGTTGGCTTCTGTATTTGCACCTGCAGCTGGAATTATTTCAGTGACTAGGTTACCCCGCTTTCAAGGACTAC TTACAAGCCTGCTGT

4.1.4 Phylogenetische Analyse der gefundenen SUT-Sequenzen

Seit der Klonierung des ersten Saccharose-Transporter durch Riesmeier et al. (1992) wurden viele weitere SUT beschrieben und festgestellt, dass sie Teil einer großen Familie von membranständigen Transportproteinen, der *major-facilitator superfamily*, sind (MFS, Marger und Saier 1993). Saccharose-Transporter sind H⁺-abhängige Symporter und für ihre Funktionsfähigkeit auf die Aktivität von P-Typ-ATPasen angewiesen (Giaquinta 1979, DeWitt et al. 1991, Krügel et al. 2013). Sie werden in drei bis fünf Typen unterteilt, die sich hinsichtlich ihrer Funktion, Lokalisation und Familienzugehörigkeit unterscheiden (Kühn 2003, Sauer 2007, Braun und Slewinski 2009, Kühn und Grof 2010, Reinders et al. 2012). Für die hier gezeigten Ergebnisse wurde die Nomenklatur von Reinders et al. (2012) verwendet. Die isolierten ESTs wurden in die korrespondierenden Aminosäuren-Sequenzen

Typ I-SUT kommen ausschließlich in Dikotyledonen vor und sind an der Phloembeladung beteiligt (Sauer 2007, Reinders et al. 2012). Neben ihrer Rolle bei der apoplastischen Phloembeladung wurden Typ I-SUT auch in anderen Geweben wie Holz und Knollen nachgewiesen, was ihre wichtige Funktion bei Kohlenstoff-Verteilung und beim Transport unterstreicht (Kühn et al. 2003, Decourteix et al. 2008, Liesche et al. 2011a, Mahboubi et al. 2013). Die Inhibierung der Expression von *AtSUC2* in *Arabidopsis thaliana* beispielsweise führte zu verschiedenen phänotypischen Aberrationen wie gestörte Entwicklung, geringe Größe und Sterilität sowie einer Störung des Transports von Zuckern über das Phloem (Gottwald et al. 2000). Durch weitere Untersuchungen der Transporter anderer Pflanzenarten und ihrer Lokalisation *in vivo* konnte die große Bedeutung von Typ I-SUT für die apoplastische Phloembeladung gezeigt werden (Stadler et al. 1995, Stadler und Sauer 1996, Kühn et al. 1996, Lemoine et al. 1996, Bürkle et al. 1998, Truernit 2001).

Tabelle 4.4 In dieser Arbeit isolierte ESTs aus verschiedenen Baumarten und ihre Einordnung in die SUT-Untertypen nach Reinders et al. (2012). Bereits aus anderen Baumarten isolierte SUT-Sequenzen sind gesondert dargestellt.

Typ I	Typ II	Typ III
<i>Acer campestre</i> (AcSUT1)	<i>Abies pinsapo</i> (ApiSUT1)	<i>Alnus glutinosa</i> (AgSUT1)
<i>Carpinus betulus</i> (CbSUT1)	<i>Ginkgo biloba</i> (GbSUT1)	<i>Populus tremula</i> (PtSUT1)
<i>Castanea sativa</i> (CsSUT1)	<i>Pinus mugo</i> (PmSUT1)	<i>Salix caprea</i> (ScSUT1)
<i>Fagus sylvatica</i> (FsSUT1)		<i>Salix viminalis</i> (SvSUT1)
<i>Fraxinus excelsior</i> (FeSUT1)		
<i>Quercus petraea</i> (QpSUT1)		
<i>Quercus robur</i> (QrSUT1)		
<i>Quercus rubra</i> (QruSUT1)		
----- Weitere SUT-Sequenzen aus verschiedenen Baumarten		
<i>Betula pendula</i> (BpSUC1), AAD45932		<i>Hevea brasiliensis</i> (HbSUT4), ABK60191
<i>Citrus sinensis</i> (CsSUT1), AAM29150		<i>Malus domestica</i> (MdSUT1), AAR17700
<i>Hevea brasiliensis</i> (HbSUT3), ABK60190		<i>Populus tremula x alba</i> (PtaSUT4), ADW94617
<i>Juglans regia</i> (JrSUT1), AAU11810		
<i>Populus tremula x alba</i> (PtaSUT1), ADW94615		

Wie in Abbildung 4.2 zu erkennen ist, bilden sich innerhalb einer Typ-Kladde Untergruppen von miteinander verwandten Arten. So bilden die Mitglieder der Ordnung Fagales eine distinkte Gruppe (FsSUT1, *Fagus sylvatica*; CsaSUT1, *Castanea sativa*; CbSUT1, *Carpinus betulus*; JrSUT1, *Juglans regia*; QpSUT1, *Quercus petraea*; QrSUT1, *Quercus robur*; QruSUT1, *Quercus rubra*). AcSUT1 gruppiert mit CsSUT1 aus *Citrus sinensis* (Accession-Nr. [AAM29150](#)), beides Mitglieder der Ordnung Sapindales. Der Transporter aus *Fraxinus excelsior* zeigte große Sequenz-Homologien mit den Transportern AbSUT1 aus *Asarina*

barclaiana (AAF04294), AmSUT1 aus *Alonsoa meridionalis* (AAF04295) sowie mit PmSUC2 aus *Plantago major* (CAA53390), die alle drei zu der Ordnung Lamiales gehören. In den beiden Scrophulariaceae *A. barclaiana* und *A. meridionalis* wird das Phloem vermutlich sowohl mit der *polymer trap*-Methode symplastisch als auch apoplastisch mithilfe von SUT beladen, wobei sich das Verhältnis von beiden Beladungsmechanismen und damit der transportierten Zucker deutlich unterscheiden (Knop et al. 2001, 2004, Voitsekhovskaja et al. 2006, 2009). FeSUT1 clustert mit SUT aus Arten, die RFO oder Zuckeralkohole als Transportzucker verwenden, was ein guter Hinweis auf einen möglichen symplastischen Beladungsweg in *F. excelsior* ist.

Saccharose-Transporter vom Typ III sind im Tonoplasten lokalisiert und beim Export von Saccharose aus der Vakuole in das Cytosol beteiligt (Enders et al. 2006, Reinders et al. 2008, Braun und Slewinski 2009, Payyavula et al. 2011, Schneider et al. 2012). Sie unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Lokalisation von Typ I-SUT, sondern durch ihre geringere Substrataffinität und ihrer höheren Kapazität (Weise et al. 2000, Kühn 2003). Daneben wurden Typ III-Homologe isoliert, die in Expressionsversuchen in Hefen nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion unabhängig von Protonen Saccharose transportieren konnten (Zhou et al. 2007). Für den passiven Beladungsmechanismus des Phloems spielen Typ III-SUT vermutlich eine wichtige Rolle, da sie wie ein Ventil zwischen der Vakuole als Saccharosespeicher und dem Cytosol fungieren (Reinders et al. 2008, Schneider et al. 2012). Passive Belader haben dadurch die Möglichkeit, den Stofffluss in das Phloem zu regulieren (Payyavula et al. 2011). Die Transporter aus *Salix caprea* (ScSUT1) und *Salix viminalis* (SvSUT1) gruppieren mit dem vakuolären Transporter PtaSUT4 aus der Pappel, die zu den passiven Beladern gezählt wird. Somit könnte die Tatsache, dass Typ III-SUT stark in *source*-Blättern von *S. viminalis* und *S. caprea* exprimiert werden ein Hinweis darauf sein, dass der Mechanismus und die Regulation vom Phloemtransport in Weiden ähnlich abläuft wie in Pappeln, die beide zu den Salicaceae gehören. Die ebenfalls in dieser Gruppe eingeordnete Sequenz PtSUT1 war identisch mit PtaSUT4 (Abb. 4.2). AgSUT1 aus *Alnus glutinosa* gruppiert ebenfalls bei Typ III. Transporter vom Typ III haben vermutlich noch weitere, bisher unbekannte Funktionen in Pflanzen.

Die Saccharose-Transporter des Typs II unterteilen sich in Typ IIA und Typ IIB (Abb. 4.2, Reinders et al. 2012). Die Typ IIB-Transporter sind spezifisch für Monokotyledone und von einigen Transportern konnte gezeigt werden, dass sie für die apoplastische Phloembeladung in Poaceae, d.h. auch in vielen Getreidepflanzen, Reis und Mais, verantwortlich sind (Hirose et al. 1997, Scofield et al. 2007, Slewinski et al. 2009). Sie ähneln funktionell den SUT vom Typ I, unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Struktur und Substrataffinität, was die frühe

evolutionsgeschichtliche Trennung von Mono- und Dikotyledonen aufzeigt (Reinders et al. 2012).

In den Genomen von dem Laubmoos *Physcomitrella patens* und dem Moosfarn *Selaginella moellendorffii* wurden SUT-Homologe identifiziert, die in die Typ IIA-Kategorie gruppieren, von denen die genaue Funktion noch nicht bekannt ist (Abb. 4.2, Rensing et al. 2008, Braun und Slewinski 2009, Banks et al. 2011, Reinders et al. 2012). In *A. thaliana* und *P. major* konnten in Phloem-assoziierten Zellen und in Siebelementen Typ IIA-SUT nachgewiesen werden, doch zeigten AtSUT2-Mutanten in *Arabidopsis* keinen spezifischen Phänotyp (Meyer et al. 2000, 2004, Barth et al. 2003). Die AS-Sequenzen der EST aus den drei Gymnospermen *Abies pinsapo* (ApiSUT1), *Pinus mugo* (PmuSUT1) und *Ginkgo biloba* (GbSUT1) gruppieren bei den Typ IIA-SUT. In diesen Typ gruppieren bereits früher aus Gymnospermen isolierte SUT-Sequenzen (PsiSUT1, *Picea sitchensis*, [ADE77095](#); PitaSUT1, *Pinus taeda*, [BI077135](#)). Welche Funktion sie in den Gymnospermen haben, ist bisher unklar. Von allen bisher untersuchten Genomen der Angiospermen wurde jeweils eine Sequenz für Typ IIA-SUT gefunden, was darauf hindeutet, dass vermutlich diese als ursprüngliche Form der SUT zu betrachten sind (Reinders et al. 2012).

Auf Grundlage der vorangegangenen Analyseergebnisse wurden zwei Arten exemplarisch für weitere Untersuchungen ausgewählt, die hauptsächlich Saccharose oder Saccharose und RFO transportieren und aus denen Typ I-SUT isoliert werden konnten.

- *Quercus robur* als Vertreter der Fagaceae ist ein wichtiger Laubbaum Mitteleuropas. Eichen stellen knapp 10 % des Baumbestandes in Deutschland und sind nach den Rot-Buchen die am weitesten verbreiteten Laubbäume. *Q. robur* wurde als Modellpflanze für einen aktiven apoplastischen oder passiv symplastischen Phloembeladungsmechanismus ausgewählt, da hauptsächlich Saccharose im Phloem transportiert wird und ein Typ I-SUT aus den *source*-Blättern isoliert werden konnte.
- *Fraxinus excelsior* gehört zu der Familie der Oleaceae und ist ein ebenfalls in Mitteleuropa weit verbreiteter Laubbaum. *F. excelsior* transportiert vermutlich neben Saccharose auch RFO im Phloem. Wie andere Oleaceae auch enthält *F. excelsior* große Mengen an Mannitol in den Blättern. Aufgrund der transportierten Zucker und der gelungenen Isolierung eines Typ I-SUT wurde diese Art als Modellpflanze für einen aktiv symplastischen Phloembeladungsmechanismus ausgewählt.

4.2 Abschnitt II: Konzentrationsgradienten zwischen dem Cytosol der Mesophyllzellen und dem Phloem bei *Quercus robur* und *Fraxinus excelsior* schließen eine passive Phloembeladung aus

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse zu den morphologischen Strukturen der *minor veins* von *Q. robur* und *F. excelsior* sowie die Zuckerkonzentrationen im Phloemsaft und das Vorhandensein von Konzentrationsgradienten zwischen dem Mesophyll und dem Phloemsaft dargestellt.

Das Manuskript ist bereits im *Journal of Experimental Botany* veröffentlicht (Öner-Sieben und Lohaus 2014, Vol. 65, (7): 1905-1916).

Title page

Title: Apoplastic and symplastic phloem loading in *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior*

Short statement: Concentration gradients of sugars between the cytosol of mesophyll cells and the phloem reveal that *Quercus robur* is probably an apoplastic phloem loader and *Fraxinus excelsior* a mixed phloem loader.

Authors: Soner Öner-Sieben email: oeners@uni-wuppertal.de
Gertrud Lohaus* email: lohaus@uni-wuppertal.de
phone: +49 202 439 2521

Institute: Molekulare Pflanzenforschung/Pflanzenbiochemie
Bergische Universität Wuppertal
Gaußstraße 20, D-42119 Wuppertal, Germany

Date of submission: 24. January 2014

Number of tables: 3

Number of figures: 3

Total word count: 8404

Colour in print: none

Supplementary data: 2 tables

2 figures

*Author to whom correspondence should be addressed.

Abstract

Whereas most of the research on phloem loading is performed on herbaceous plants, less is known about phloem loading strategies in trees. In this study the phloem loading mechanisms of *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior* were analyzed. Following features were examined: the minor vein structure, the sugar concentrations in phloem sap by the laser-aphid-stylet technique, the distribution of photoassimilates in the mesophyll cells by non-aqueous fractionation, gradients of sugar concentrations and osmotic pressure, and the expression of sucrose transporters.

The minor vein configurations of *Q. robur* and *F. excelsior* belong to the open type. *Q. robur* contained companion cells in the minor veins whereas *F. excelsior* showed intermediary cells in addition to ordinary companion cells. The main carbon transport form in *Q. robur* was sucrose (about 1 M). In *F. excelsior* also high amounts of raffinose and stachyose were transported. However, in both tree species the osmolality of phloem sap was higher than the osmolality of the mesophyll cells. The concentration gradients between phloem sap and the cytoplasm of mesophyll cells for sucrose were 17-fold and 14-fold for *Q. robur* and *F. excelsior*, respectively. Independent of the kind of translocated sugars, sucrose transporter cDNAs were cloned from both species.

Our results indicate that phloem loading of sucrose and other metabolites must involve active loading steps in both tree species. *Q. robur* seems to be an apoplastic phloem loader while *F. excelsior* shows indications of a symplastic or mixed symplastic-apoplastic phloem loader.

Keywords: *Fraxinus excelsior*, non-aqueous fractionation, phloem loading, *Quercus robur*, subcellular metabolite concentration, sucrose transporter, sugar

Abbreviations:

BSC, bundle-sheath cell; CC, companion cell; cDNA, complementary DNA; IC, intermediary cell, MC, mesophyll cell; RFO, raffinose oligosaccharide; RT-PCR, reverse transcription PCR; SUT, sucrose transporter; TC, transfer cell

Introduction

The split of work between autotrophic source tissues and heterotrophic sink organs in higher plants makes an efficient vascular system necessary to transport carbohydrates and other metabolites. In higher plants long distance transport of assimilates takes place in the phloem and phloem transport is depending on the loading of the phloem with sugars in source tissues and the removal of sugars out of the phloem into the sink tissues. Several factors determine the mode of phloem loading in leaves: (i) the organization of the interface between mesophyll and phloem (Gamalei 1989) and the kind of companion cells (CCs; minor vein structure), (ii) the types of transport sugars (Zimmermann and Ziegler 1975), (iii) the existence of sucrose uptake transporters in the phloem (Riesmeier et al. 1992, Sauer and Stolz 1994), (iv) sensitivity of phloem loading to *p*-chloromercuribenzenesulfonic acid (PCMBS) (van Bel et al. 1994) and (v) the existence of concentration gradients between the mesophyll cells (MC) and the phloem (Lohaus et al. 1995, Nadwodnik and Lohaus 2008).

Most studies about phloem loading have been performed on herbaceous plants and those load the phloem mainly actively either apoplastically or symplastically or with a mix of both (Giaquinta 1976, Turgeon and Gowan 1990, van Bel et al. 1992, Riesmeier et al. 1992, Sauer and Stolz 1994, Voitsekhovskaja et al. 2009). The potential of the plant to use a symplastic and/or apoplastic route for phloem loading is indicated by the abundance of plasmodesmal connections between phloem CCs and bundle-sheath cells (BSC). Based on this feature Gamalei (1989) grouped plants into two main types: type 1 (open type) has the most numerous plasmodesmata in the minor vein phloem, and type 2 has the fewest (closed type). Two types of CCs within these groups show the highest degree of specialization. These are intermediary cells (ICs; Turgeon et al. 1993) with highly developed plasmodesmal connections to BSCs (belonging to the open type 1) and transfer cells (TCs; Pate and Gunning 1969) that have very few plasmodesmata (belonging to the closed type 2). In type 2 species phloem loading is apoplastic because of the symplastic isolation and depends on the activity of sugar transport proteins in the membranes whereas in type 1 species phloem loading is symplastic through plasmodesmata. Apoplastic phloem loaders transport nearly exclusively sucrose in the phloem or sucrose together with sugar alcohols (Lohaus et al. 1995, Nadwodnik and Lohaus 2008). Sucrose uptake transporters as well as sugar alcohol transporters have been cloned (Riesmeier et al. 1992, Sauer and Stolz 1994, Ramsperger-Gleixner et al. 2004) and shown to be expressed in the minor veins, which is in accordance with their supposed role in transporting their respective substrate from the apoplast into the phloem (Stadler et al. 1995, Stadler and Sauer 1996, Kühn et al. 1997). Symplastic phloem

loaders translocate high amounts of raffinose and stachyose in addition to sucrose (Voitsekhovskaja et al. 2006). The existence of these oligosaccharides was explained by the polymer trap model (Turgeon and Gowan 1990). According to this model raffinose and stachyose are synthesized from sucrose and galactinol in ICs. Furthermore it was postulated that the size exclusion limit of plasmodesmata connecting ICs to the BSCs enables the passage of disaccharides such as sucrose from mesophyll into the phloem whereas the tri- and tetrasaccharides raffinose and stachyose remain trapped in the phloem. Both types of phloem loading, apoplastic or symplastic, result in much higher sugar concentrations in the phloem sap compared to the MCs and therefore phloem loading takes place against a concentration gradient (Lohaus et al. 1995, Voitsekhovskaja et al. 2006). Several results indicated that at least some plants harbour redundant phloem loading strategies by the combination of active symplastic and apoplastic and/or passive loading mechanisms (Fisher 1986, van Bel et al. 1992, Voitsekhovskaja et al. 2006, Slewinski et al. 2013).

Minor veins that belong to the open type 1 group are heterogeneous in regard to the companion cells. Therefore type 1 group was further divided into type 1 (IC) with intermediary cells with abundant, highly branched plasmodesmata that are typical for RFO loaders and type 1 (CC) with ordinary CCs, but with a higher frequency of symmetrical plasmodesmata on the MC or BSC interface compared to CCs from type 2 minor veins (Davidson et al. 2011). Minor vein type 1 (CC) should correspond to passive phloem loading which is the third postulated loading mechanism and several tree species fall into this subcategory (Gamalei 1991, Rennie and Turgeon 2009, Davidson et al. 2011). Passive phloem loading is characterized as “thermodynamically downhill at the companion cell interface; transport compounds follow their concentration gradient into the companion cell” (Slewinski et al. 2013). This loading mode can only occur if the solute concentration in the phloem is lower than the concentration in the MCs (Rennie and Turgeon 2009, Slewinski et al. 2013). Supporting the passive loading hypothesis autoradiographs showed no accumulation of ^{14}C -labeled sugars in minor veins of some tree leaves whereas autoradiographs of herbs showed accumulation in veins compared to the surrounding tissue (Eschrich and Fromm 1994, Turgeon and Medville 1998). However, accumulation of sugars could be detected in ^{14}C -images of tulip tree (*Liriodendron tulipifera*) leaves after the removal of the epidermis (Goggin et al. 2001). The uptake of ^{14}C is an approved method to distinguish between putative active and passive phloem loaders. However, because some woody plants tend to have much thicker leaves than herbs, this method leads to variable results in some cases. Therefore additional parameters have to be taken into account in regard to phloem

loading strategies (Goggin et al. 2001). In addition, active phloem loading has also been shown in other type 1 (CC) tree species like *Clethra barbinervis* or *Liquidambar styraciflua* and the pathway is likely apoplastic (Turgeon and Medville 2004). These results contradict the assumption that loading strategies can be determined entirely by minor vein structures. Probably in the large and diverse group of tree species several loading strategies exist.

As described above the pathway and mechanism (active or passive) of phloem loading in tree species that belong to the open type 1 category are still a matter of debate. Active phloem loading describes the transport of sugars from the MCs into the phloem against a concentration gradient whereas passive loading can only occur when the solute concentration in the phloem is lower than the concentration in the MCs. In order to decide whether passive or active mechanisms are involved in phloem loading it is important to determine the concentration of sugars in the cytosol of mesophyll cells and in the phloem. Much of the information concerning subcellular metabolite concentrations in mesophyll cells is derived from studies on herbaceous plant species. In this study the subcellular concentrations of sugar alcohols and mono-, di- and oligosaccharides in *Quercus robur* (Fagaceae) and *Fraxinus excelsior* (Oleaceae) as well as the corresponding concentrations in the phloem sap were examined. These tree species were selected because *Q. robur* is a representative of the minor vein type 1 (CC) (Gamalei 1989) and translocates sucrose (Zimmermann and Ziegler 1975), whereas *F. excelsior* represents the minor vein type 1 (IC) (Gamalei 1989) and translocates sucrose, raffinose oligosaccharides and mannitol (Zimmermann and Ziegler 1975). Both species are commonly occurring in temperate forests. Based on the subcellular distribution the concentration gradients of the metabolites in the different compartments which are involved in phloem loading were calculated. The nature of such metabolite gradients can give important insights into the mechanisms by which phloem loading for different metabolites may occur. Together with results from morphological studies of the minor vein structure and the expression of sucrose transporters (SUT) the results are compared to predictions based on models of passive and active symplastic or apoplastic phloem loading that are currently discussed.

Materials and methods

Plant materials

Quercus robur and *Fraxinus excelsior* were grown in 5 l pots in compost soil in a green house. Three year-old plants were used for the experiments. Leaf samples were harvested in June and July after exposure to 8 h of illumination.

Non-aqueous fractionation of leaves

The chosen method is based on the comparison of metabolite and marker enzyme distributions in the vacuolar, chloroplastic and cytoplasmic compartments (Riens et al. 1991). For this analysis a leaf was treated as a uniform metabolic compartment representing an average mesophyll cell, subdivided in the three compartments listed above. Leaf samples were ground with mortar and pestle to a fine powder in liquid nitrogen and lyophilized (Christ alpha 2-4; Martin Christ, Osterode am Harz, Germany). Procedure was conducted according to Riens et al. (1991) and Nadwodnik and Lohaus (2008). For *Q. robur* density gradients between 1.33 and 1.50 g ml⁻¹ and for *F. excelsior* between 1.35 and 1.53 g ml⁻¹ were used. Six fractions were collected, aliquots of which were taken for the determination of the marker enzymes NADP-glycerine aldehyde phosphate (GAP)-dehydrogenase, chlorophyll, PEP-carboxylase and α -mannosidase as well as nitrate as markers for chloroplast, cytosol and vacuole, respectively (Klie et al. 2011), and of metabolites. The cytosolic compartment was found to be enriched in the middle region of the gradient; the chloroplast material appeared in the region of lower density whereas the vacuolar material was mainly found in the fraction of highest density. For determination of sugar concentrations in the gradient fractions, chloroform methanol extracts were prepared (see chapter extraction of sugars). For the evaluation of the subcellular distribution of sugars between the stromal, cytoplasmic, and vacuolar compartment a calculation procedure according to Riens et al. (1991) was used.

Extraction of sugars

The dried fractions of the gradients were used for the extraction of sugars. 5 ml chloroform:methanol (1,5:3,5 v/v) was added to the pellet, and the sample was homogenized and kept on ice for 30 minutes. The homogenate was then extracted twice with 3 ml water. The aqueous phases were combined and evaporated in a rotatory evaporator (RV 10 Digital; IKA, Staufen, Germany). The dried residue was dissolved in 1 ml ultrapure H₂O (Millipore; Billerica, MA, USA), syringe-filtrated (0.20 μ m nylon; Carl Roth, Germany) and stored at -80°C until analysis.

Collection of sieve tube sap

Sieve tube sap was obtained from severed stylets of aphids. For this method aphids found on other tree leaves were taken. Approximately 10 aphids were caged for about 5 h on the leaf of the experimental plant. Their stylets were cut by a laser beam (Lohaus et al. 1995).

The samples were ejected into 50 µl of ultrapure H₂O (Millipore; Billerica, MA, USA) and stored at -80° C.

Extraction of apoplastic wash fluids from leaves

The apoplastic wash fluids were collected according to Nadwodnik and Lohaus (2008) and were stored at -80°C until analysis.

Metabolite analysis

Sugars and sugar alcohols in tissue extracts, apoplastic fluid, and phloem sap were analyzed by HPLC according to Nadwodnik and Lohaus (2008).

Determination of the osmolality of the leaf sap

Discs were cut from leaves, placed in 2 mL Eppendorf tubes, and frozen at -20°C, then thawed on ice and centrifuged to extract cell sap from the tissue. This sap was used for the determination of the osmolality using the osmometer Wescor 5100B (Logan, Utah, USA).

Electron microscopy

Transmission electron microscopy was performed in cooperation with the Core Facility institute of Dr. Zanger at the University of Düsseldorf, Germany. The cross-sectional areas of the subcellular compartments were quantified with analysis software (IMAGE J; public domain software, developed at US National Institutes of Health, available at <http://rsbweb.nih.gov/ij/>)

Preparation of total RNA

RNA from whole leaves was isolated using a modified protocol from Chang et al. (1993). 100 - 200 mg leaf material was used. Integrity was checked by agarose gel electrophoresis and concentration was measured at 260 nm wavelength.

Synthesis of cDNA and polymerase chain reaction (PCR)

First-strand cDNA was synthesized from 1 ng of total RNA isolated from mature leaves using the ReverdAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas; St. Leon-Rot, Germany) with oligo (dT)₁₈ primer. The single-strand cDNA was used for PCR reaction with the following primers: Forward: 5'-GCI GCI GGI RTI CAR TTY GGI TGG GC-3', reverse: 5'-GCI ACR TCI ARD ATC CAR AAI CC-3' (Knop et al. 2001). The degenerate primers were designed from two conserved regions that are about 330 bp apart from each other, using sequence data

from the published amino acid sequences of several sucrose uptake transporters (Knop et al. 2001). To validate the sequences of the fragments a BLASTX search was performed (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Applying these fragments to RACE (5'/3' RACE Kit; Roche, Mannheim, Germany) full-length clones of putative sucrose transporters, named *FeSUT1* (Accession number: KF736981) and *QrSUT1* (Accession number: KF736982), were obtained. The ORFs of the full sequences were phylogenetically analyzed and compared with known SUTs using the MEGA software (Version 5, Build 5130517; <http://www.megasoftware.net/>) (Tamura et al. 2011).

Results

Minor vein structure

The minor vein structure was analyzed to confirm the classifications into different minor vein types of *Q. robur* and *F. excelsior* done by Gamalei (1989). The sieve elements (SEs) in the phloem of *Q. robur* were surrounded by CCs and phloem parenchyma cells (Fig. 1A). The SEs of minor veins were thick walled whereas larger veins also contained thin walled SEs (data not shown). CCs were joined to the SEs by branched plasmodesmata (Fig. 1B) which already has been shown for this interface in other species (Evert 1990). Plasmodesmata between phloem parenchyma cells and CCs were symmetrically branched (Fig. 1C) and did not occur in dense fields. CCs were densely cytoplasmic, with small or sometimes larger vacuoles and many mitochondria.

In the minor vein of *F. excelsior*, two types of CCs were present: intermediary cells (ICs) and ordinary CCs (Fig. 1D). The minor vein was flanked by two ICs. They showed dense cytoplasm, many small vacuoles, and extremely abundant plasmodesmata that connected them to adjacent BSCs (Turgeon et al. 1993). These plasmodesmata occurred in cluster and they had more branches on the IC side than on the BSC side (Fig. 1E). The ordinary companion cell (Fig. 1F) was connected to the SE by plasmodesmata but no further plasmodesmatal connections to the adjacent cells were found. The cytoplasm of this type CCs was dense, the vacuoles were variable in size and the nucleus occupied a relatively large portion of the cell volume. In adaxial position one or more parenchyma cells were commonly found, separating the sieve elements from the xylem vessels (Fig. 1D).

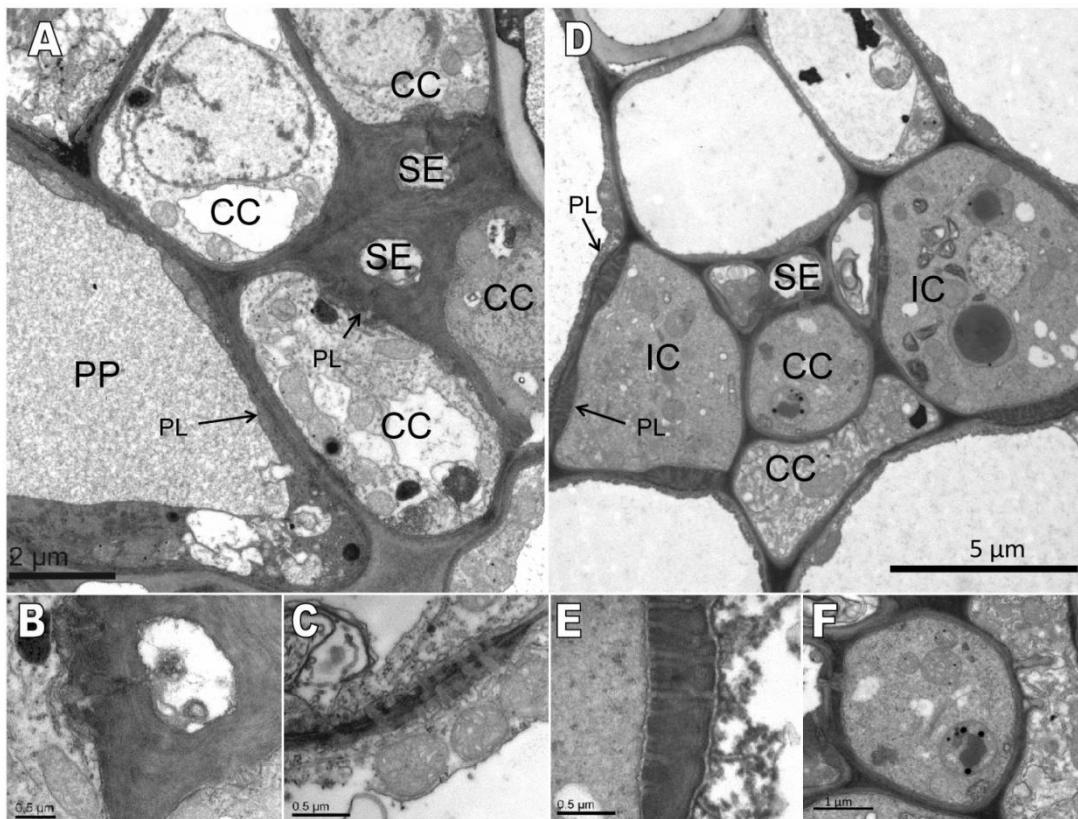


Fig. 1 Electron micrographs of *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior* minor veins and structures. CC Companion cell; SE Sieve element; IC intermediary cell; PP phloem parenchyma cell; PL and arrows indicate plasmodesmata. 1A-C Minor vein of *Q. robur*; 1A Minor vein configuration; 1B Plasmodesmal connection between CC and SE; 1C Symmetrical PL between CC and PP. Image was taken from another pair of CC and PP because PL at this interface in image 1A were not distinct; 1D-F Minor vein of *F. excelsior*; 1D Minor vein configuration; 1E Branched PL between IC and adjacent cells like PP or bundle-sheath cells; 1F Ordinary CC with plasmodesmal connection to SE.

Subcellular distributions of metabolites in leaves

For the analysis of possible phloem loading strategies it is important to determine the sugar concentrations in the cytosol of mesophyll cells and in the phloem. Cytosolic sugar contents can be determined by non-aqueous fractionation (Riens et al. 1991). The further conversion of the cytosolic sugar contents into concentrations requires an estimation of the volume of the compartments (see below). The overall knowledge about the sugar distribution in mesophyll cells on the subcellular level (vacuolar, chloroplastic and cytosolic compartment) allows for checking the validity of the data by comparing with former results. It should be mentioned that the non-aqueous fractionation technique does not resolve between the cytosol and endomembrane compartments. Therefore, the compartment was designated cytoplasm, which includes mitochondria, peroxisomes, and endoplasmatic reticulum.

The subcellular distribution of hexoses and sucrose as measured by non-aqueous fractionation in *Q. robur* are shown in Table 1. Sugar alcohols like mannitol or sorbitol and

RFOs were not found in leaves of this species. The subcellular distribution of hexoses and sucrose was very different. Sucrose was located in the vacuole and the cytoplasm whereas glucose and fructose were located mainly in the vacuole (Table 1).

Table 1 Content and percentage distribution of sugars among the vacuolar, stromal and cytoplasmic compartments of leaves from *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior*. Data present mean values from four independent fractionations \pm SD. n.d. = not detected

	Whole leaf content $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW	Vacuole %	Stroma %	Cytoplasm %
<i>Quercus robur</i>				
Mannitol	n.d.			
Glucose and fructose	9.2 ± 2.8	82.7 ± 8.9	1.9 ± 3.8	15.6 ± 9.1
Sucrose	14.6 ± 3.9	52.8 ± 8.2	9.0 ± 6.8	38.3 ± 8.3
Raffinose	n.d.			
Stachyose	n.d.			
<i>Fraxinus excelsior</i>				
Mannitol	14.4 ± 1.3	76.7 ± 1.5	20.7 ± 1.2	2.0 ± 2.6
Glucose and fructose	9.1 ± 3.0	85.0 ± 17.3	3.5 ± 6.0	11.5 ± 12.0
Sucrose	5.9 ± 1.3	73.0 ± 22.9	0.3 ± 0.6	26.7 ± 22.3
Raffinose	0.5 ± 0.2	80	20	0
Stachyose	1.3 ± 0.5	80	20	0

F. excelsior contained mannitol and oligosaccharides in addition to hexoses and sucrose (Table 1). The subcellular distribution of mannitol was very different from the distribution of hexoses and sucrose. Mannitol was located mainly in the vacuole (77 %) followed by the stroma of the chloroplasts (21%). In contrast, glucose and fructose were mainly located in the vacuole (85 %) and sucrose was mainly distributed among the vacuolar (73 %) and the cytoplasmic compartment (27 %). The concentration of oligosaccharides in whole leaves was low ($1.8 \mu\text{mol g FW}^{-1}$). This was probably the reason why it was not possible to assign raffinose and stachyose to certain compartments in each experiment (Table 1). Therefore only a raw allocation is shown in Table 1. The main portion of raffinose and stachyose was located in the vacuole and a lower portion in the chloroplast.

Subcellular volumes

The further conversion of subcellular contents based on gram fresh weight (Table 1) into concentrations required the knowledge of the relative volumes of the subcellular compartments. A determination was done by morphometric analysis of light and electron

micrographs. Supplementary Table S1 (available at *JXB* online) shows the relative volumes of the vacuolar, chloroplastic and cytoplasmic (sum of cytosol, peroxisomes, mitochondria) and nuclear compartments of the MCs. In both species the vacuole was the largest compartment within the cells and occupied 39.3 to 71.7 % of the total volume, followed by the chloroplasts with 15.9 to 31.8 %, the cytoplasm with 8.6 to 21.0 %, and nucleus with 3.9 to 7.8 %. The relative portion of mitochondria and peroxisomes of the cytoplasm was about 13 to 15 % and the portion of the stroma of the chloroplast ranged from 48 to 58 % (Winter et al. 1993). In dicots the main part of the aqueous volume of the leaf is occupied by the MCs (Winter et al. 1993). The relative volume of the sieve tubes/CCs of the aqueous space of the leaf is below 2% (Winter et al. 1993). Therefore, in *Q. robur* leaves with an average water content of $534 \mu\text{l g}^{-1}$ FW the volumes of the vacuolar, stroma and cytoplasmic compartment can be estimated as 209.9, 84.9 and $95.3 \mu\text{l g}^{-1}$ FW. In *F. excelsior* with an average water content of $628 \mu\text{l g}^{-1}$ FW the corresponding volumes are 450.3, 49.9 and $45.9 \mu\text{l g}^{-1}$ FW (Supplementary Table S2).

Subcellular metabolite concentrations

Table 2 Carbohydrate concentrations in the vacuolar, chloroplastic and cytoplasmic compartments of leaves from *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior*. The evaluation is based on volumes of vacuolar, stromal and cytoplasmic compartment shown in Supplementary Table S2. n.d. = not detected

	Concentration (mM)		
	Vacuole	Stroma	Cytoplasm
<i>Quercus robur</i>			
Mannitol	n.d.	n.d.	n.d.
Glucose and fructose	36.7 ± 11.7	1.4 ± 2.9	14.6 ± 8.4
Sucrose	35.9 ± 6.8	16.5 ± 13.6	59.8 ± 25.8
Raffinose	n.d.	n.d.	n.d.
Stachyose	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Fraxinus excelsior</i>			
Mannitol	24.2 ± 2.6	58.8 ± 9.6	3.1 ± 0.3
Glucose and fructose	6.7 ± 6.1	6.6 ± 11.5	17.4 ± 22.6
Sucrose	9.5 ± 5.0	0.3 ± 0.5	29.5 ± 20.6
Raffinose	0.8 ± 0.3	1.7 ± 0.7	0.0 ± 0.0
Stachyose	2.2 ± 0.8	5.3 ± 1.9	0.0 ± 0.0

Subcellular concentrations were calculated for each sugar based on the subcellular volumes and the subcellular sugar contents measured as described above. Sucrose was mainly concentrated in the cytoplasm (29.5 - 59.8 mM), followed by the vacuole (9.5 - 35.9 mM) and was lowest in the stroma (0.3 - 16.5 mM; Table 2). The highest concentrations of glucose

and fructose were found in the vacuole followed by the cytoplasm. In contrast, the highest concentration of mannitol was found in the stroma followed by the vacuole.

Phloem sap concentrations and concentration gradients

A comparison between the sugar concentrations in the cytosol of MCs and the phloem allows for determining the existence and direction of concentration gradients. The data that were obtained in this regard are summarized in Table 3. Phloem sap was collected by the laser-aphid-stylet technique. Using this method it is possible to obtain pure phloem sap from intact plants. The two species differed strongly in their distribution of transport sugars. Sucrose was the major sugar in the phloem sap of *Q. robur* (Table 3). No or only traces of glucose and fructose were found in the phloem (data not shown). In *F. excelsior*, however, high amounts of oligosaccharides and mannitol were translocated in addition to sucrose (Table 3).

Table 3 Carbohydrate concentrations in the cytoplasm of mesophyll cells of leaves as well as in the apoplast and in the phloem sap from *Q. robur* and *F. excelsior*. Mean values of n = 2-6 independent measurements are shown. n.d. = not detected

	Cytoplasm mM	Apoplast mM	Phloem sap mM	Ratio Phl/Apo	Ratio Phl/Cyt
<i>Quercus robur</i>					
Sucrose	59.8 ± 25.8	0.4 ± 0.2	1015 ± 119	2538	17
Oligosaccharides	n.d.	n.d.	n.d.		
Mannitol	n.d.	n.d.	n.d.		
<i>Fraxinus excelsior</i>					
Sucrose	29.5 ± 20.6	0.1 ± 0.03	403 ± 239	4030	14
Oligosaccharides	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	612 ± 169	n.d.	n.d.
Mannitol	3.1 ± 0.3	2.4 ± 0.4	147 ± 70	61	47

The sucrose concentration found in the phloem sap of *Q. robur* was very high (about 1 M, Table 3) whereas sucrose concentration in the cytoplasm of MCs was much lower. Therefore, the gradient of sucrose between the phloem sap and the cytoplasm of mesophyll cell was 17-fold (Table 3). In *F. excelsior* the sucrose concentration was also much lower in the cytoplasm of MCs than in phloem sap and the corresponding gradient of sucrose was 14-fold (Table 3).

Osmotic pressure in leaf extracts and the phloem

Plant species which are putative passive phloem loaders have higher osmolalities of the whole leaves than active loading species (Fu et al. 2011). Therefore the osmolality of the whole leaf sap and of the phloem sap was determined at the middle of the light period (Fig.

2). The values measured in whole leaf saps were 930 mOsmol kg⁻¹ for *Q. robur* and 1125 mOsmol kg⁻¹ for *F. excelsior*. For determination of the osmotic pressure in the phloem sap, the approximate values were measured in solutes containing the known concentrations of sugars in the phloem sap (summarized in Table 3). Because phloem sap contained also amino acids and different inorganic anions and cations the real osmolality of phloem sap is probably higher. The values of phloem sap were 1278 mOsmol kg⁻¹ for *Q. robur* and 1544 mOsmol kg⁻¹ for *F. excelsior*. These results show that in both species the osmolality of the phloem sap was always higher than those of whole leaf sap.

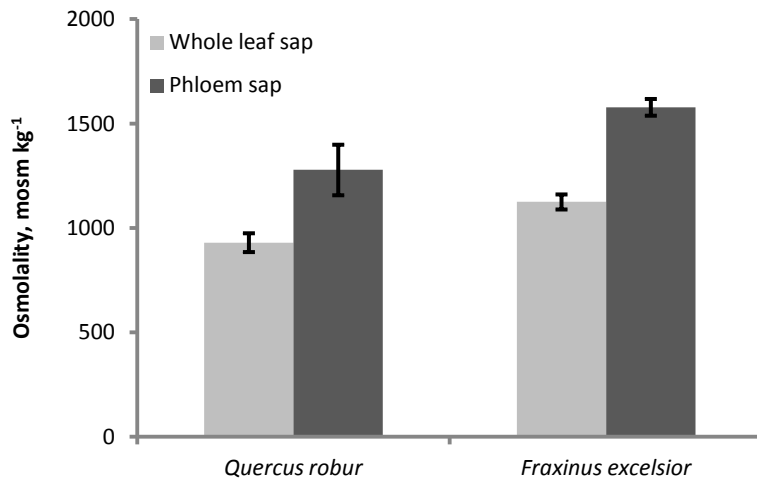


Fig. 2 Osmolalities of whole leaf sap and phloem sap of *Q. robur* and *F. excelsior*. Mean values from three independent measurements \pm SD are shown. The data of phloem sap are based on the sugar concentrations in phloem sap shown in Table 3.

The osmolalities of whole leaf sap of different plant groups are shown in Supplementary Figure S1. The osmolalities of trees were overall higher compared to those of herbs. They ranged from 340 mOsmol kg⁻¹ to 590 mOsmol kg⁻¹ in herbs and from 620 mOsmol kg⁻¹ to 1150 mOsmol kg⁻¹ in trees. The leaf water content of trees was between 54.4 % and 67.5 % whereas in herbs it was between 74.2 % and 88.7 % (Supplementary Fig. S2). A negative correlation between leaf water content and osmolality was obvious (Supplementary Fig. S2).

Isolation of sucrose transporters from source leaves of the two species

Type I sucrose transporters have been shown to play an important role in apoplastic phloem loading in several species (Reinders et al. 2012). As for potential apoplastic phloem loading pathways in *Q. robur* and *F. excelsior* that were indicated by the data obtained above the putative SUTs involved in this process were isolated. Full length sequences of SUTs were obtained by using degenerated primers followed by RACE-PCR from total RNA extracts from source leaves of *Q. robur* and *F. excelsior*. The sequences of *QrSUT1* (1.668 bp, Accession number KF736982) and *FeSUT1* (1.869bp, Accession number KF736981) contained open

reading frames of 500 and 517 amino acids, corresponding to a calculated molecular weight of 53.2 kDa and 54.2 kDa, respectively. Topology predictions indicated that both proteins possess 12 membrane-spanning regions with a longer central loop.

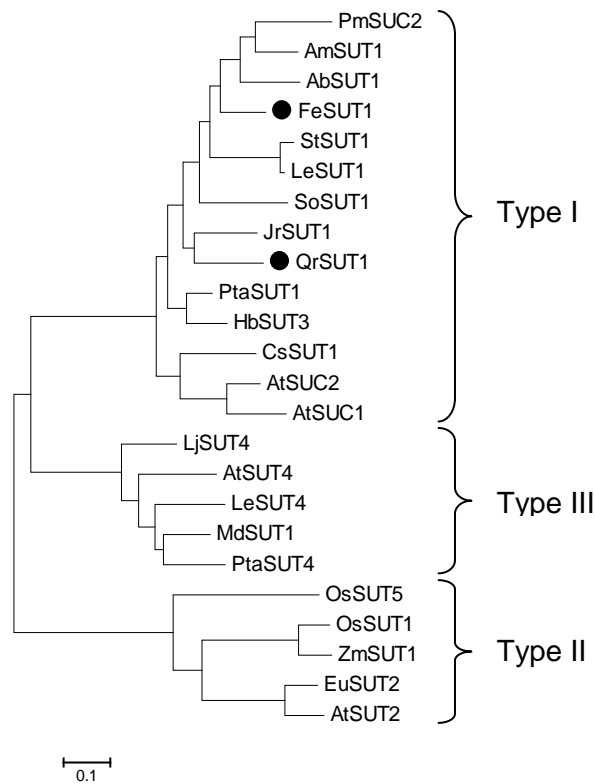


Fig. 3 Phylogenetic analysis of sucrose transporters of plants with *QrSUT1* and *FeSUT1*. Protein alignment was performed using Clustal W within the MEGA 5 software. The non homologues variable C- and N-termini of the protein sequences were trimmed. Maximum likelihood tree with 100 bootstrap repetitions was generated using MEGA 5 software. Numbers indicate percent of bootstrap analysis. Bar indicates evolutionary distance. *FeSUT1* (KF736981) and *QrSUT1* (KF736982) are marked with closed circles. *AmSUT1* (*Alonsoa meridionalis*; AF483211), *AbSUT1* (*Asarina barclaiana*; AAF04294), *AtSUC1*, *AtSUC2*, *AtSUT2*, *AtSUT4* (*Arabidopsis thaliana*; CAA53147, CAA53150, CAB92307, AAL59915), *CsSUT1* (*Citrus sinensis*; AAM29150), *DcSUT1a* (*Daucus carota*; CAA76367), *EuSUT2* (*Eucommia ulmoides*; AAX49396), *HbSUT3*, *HbSUT4* (*Hevea brasiliensis*; ABK60190, ABK60191), *JrSUT1* (*Juglans regia*; AAU11810), *LeSUT1*, *LeSUT4*, (*Lycopersicon esculentum*; CAA57726, AAG09270), *LjSUT4* (*Lotus japonicus*; CAD61275), *MdSUT1* (*Malus domestica*; AAR17700), *OsSUT1*, *OsSUT5* (*Oryza sativa*; BAA24071, BAC67165), *PmSUC2* (*Plantago major*; CAA53390), *PtaSUT1*, *PtaSUT4* (*Populus trichocarpa*; 18221401, HM749900), *SoSUT1* (*Spinacia oleracea*; CAA47604), *StSUT1* (*Solanum tuberosum*, CAA48915), *ZmSUT1* (*Zea mays*, BAA83501).

As shown in Figure 3, phylogenetic analysis revealed high similarities of the amino acid sequences of *QrSUT1* and *FeSUT1* with several other SUTs from herbaceous and tree species. SUT sequences form groups depending on their putative function and similarities on a family level and therefore they are categorized into groups from type I to type III (Aoki et al. 2003, Reinders et al. 2012). Both transporters which were found in this study group into the type I subcategory. Type 1 SUTs play an essential role in apoplastic phloem loading and it has been proven that several SUT1 transporters are located at the plasma membrane of

CCs (*PmSUC2*, Stadler et al. 1995; *AtSUC2*, Stadler et al. 1996; *AmSUT1*, Knop et al. 2006; *LeSUT1*, *StSUT1*, Schmitt et al. 2008). *FeSUT1* showed high sequence similarities with *AmSUT1* and *AbSUT1* from *Alonsoa meridionalis* and *Asarina barclaiana*, respectively. These species were reported to be putative mixed apoplastic and symplastic phloem loaders (Voitsekhovskaja et al. 2006). *QrSUT1* formed a group with *JrSUT1* from *Juglans regia* (Juglandaceae), which is a member of the order Fagales as well as *Q. robur*.

Discussion

The subcellular distributions of sugars are similar in leaves of herbaceous and tree species

The non-aqueous fractionation technique enables the determination of metabolites in the vacuolar, stromal and cytoplasmic compartment in the steady state of photosynthesis. For this analysis a leaf was treated as a uniform metabolic compartment representing an average mesophyll cell, subdivided in the three compartments listed above. This is obviously a simplification of a more complex pattern, but until now it is one of the best ways to obtain information about subcellular metabolite levels *in vivo*. This method provides highly reproducible results for metabolites that were exclusively confined to a single compartment. A higher variation was found for metabolites located in more than one compartment and the variability was greatest when the proportion found in a particular compartment was low. In those cases a formal evaluation of the standard deviations (SDs) illustrated the reproducibility of the data. Farré et al. (2001) estimated that the limit of detection of a compound in a particular compartment is around 5% of the total amount in the tissue. Non-aqueous fractionation with leaves of woody plant species was more difficult to perform than with herbaceous species. This can be seen e.g. for glucose and fructose. Hexoses are often confined to the vacuole (Riens et al. 1991, Nadwodnik and Lohaus 2008). In the case of *Q. robur* and *F. excelsior* this was true for part of the non-aqueous gradients but in other gradients a portion of glucose and fructose was also found in the cytoplasm which led to high standard deviations for the proportion of glucose and fructose in this compartment (Table 1). Probably this finding was an artefact of the technique. However, Voitsekhovskaja et al. (2006) have shown that concentrations of hexoses and sucrose in mesophyll cells measured either by single-cell technique or by non-aqueous fractionation were similar.

Whereas the method yields reasonable results for the subcellular distribution of mono- and disaccharides, it is less suitable for the determination of subcellular RFO concentrations. As RFOs were synthesized in intermediary cells and the concentration in the phloem was at least one order of magnitude higher than in the mesophyll cells, it was to be expected that a

considerable amount of RFOs associated to the mesophyll cells arose from the high content in the phloem. In this case the method tends to somewhat overestimate concentrations in the mesophyll compartments. However, even overestimated subcellular concentrations would not affect the conclusions about the direction of diffusion gradients between mesophyll and phloem as discussed below.

A comparison of the subcellular distributions of sugars in leaves of *Q. robur* and *F. excelsior* with other herbaceous plants showed several similarities. Hexoses were often confined to the vacuole in leaf cells of herbs (Riens et al. 1991, Winter et al. 1992, Voitsekhovskaja et al. 2006, Nadwodnik and Lohaus 2008). As shown in Table 1 these findings are also true for leaves of both tree species. The percentage of glucose and fructose found in the vacuole was between 83-85% (Table 1). On the other hand, between 53-73% of the sucrose detected in both tree species were located in the vacuole (Table 1). However, due to the smaller volume of the cytoplasm (Supplementary Table S2) relative to that of the vacuolar compartment, cytoplasmic sucrose concentrations were similar or higher than those in the vacuole. A similar distribution has been reported for leaves of other herbaceous species (Riens et al. 1991, Winter et al. 1992, Voitsekhovskaja et al. 2006, Nadwodnik and Lohaus 2008). The main portion of mannitol in *F. excelsior* occurred in the vacuolar compartment whereas the highest concentration was found in the stroma (Table 1 and 2). Similar results were shown for herbaceous plants like *Anthirrinum majus*, *Petroselinum hortense*, *Asarina barclaiana* or *Apium graveolens* (Moore et al. 1997, Voitsekhovskaja et al. 2006, Nadwodnik and Lohaus 2008).

Phloem loading mechanism in Q. robur

The pathway and mechanism of phloem loading in tree species that belong to the open type 1 (CC) minor vein subcategory (characterized by numerous plasmodesmata between the CC and adjacent cells) are still a matter of debate (Turgeon and Medville 1998, Goggin et al. 2001, Turgeon and Medville 2004, Fu et al. 2011, Slewinski et al. 2013). Gamalei (1989) has assigned the members of the genus *Quercus* to the open minor vein type and *Q. robur* was analyzed as a representative of this group to answer the question if the mechanism of phloem loading is active or passive. In view of the minor vein structure, members of the genus *Quercus* have one essential condition for passive transfer of sucrose into the phloem by diffusion and that is the abundance of symmetrically branched plasmodesmata at the CC-mesophyll cell interface (Fig. 1C). *Quercus coccinea*, another species of this genus was assigned to the group of passive phloem loaders by Fu et al. (2011) because this species

translocated sucrose and has shown high leaf osmolality. Indeed, the leaf osmolality of *Q. robur* and other trees was found always higher than in herbs (Supplementary Fig. S1). The higher osmolality was correlated with the lower leaf water content of trees (Supplementary Fig. S2). The sugar content in the leaves of *Q. robur* (Table 1) was higher or in some cases similar to the content in herbaceous species that were also measured at the second half of the light period (Riens et al. 1991, 1994, Knop et al. 2001, Nadwodnik and Lohaus 2008). However, the higher sugar contents in tree leaves cannot be the only reason for the higher osmolality in comparison with those of herbs. Additional solutes in tree leaves have to be taken into account for the increase of the overall osmolality. Fu et al. (2011) have shown that leaves of trees have higher concentrations of sugars as well as other polar metabolites than those of herbaceous plants. They have further assumed that the majority of trees (active and passive phloem loaders) require higher concentrations of foliar metabolites than herbs to maintain leaf turgor as a consequence of lower hydraulic conductance in trees.

Despite the high osmolality of the leaf sap of *Q. robur*, the osmolality of the phloem sap was much higher compared to the osmolality of the whole leaf sap (Fig. 2). Furthermore, the concentration gradient of sucrose between the cytoplasm of MCs and the phloem was about 17-fold (Table 3). This value corresponds well with the gradient in other apoplastic phloem loaders (Lohaus et al. 1995). Moreover, in tulip tree the osmotic potential of minor vein phloem, estimated by plasmolysis, was much higher than that of the mesophyll, demonstrating the presence of a strong solute gradient (Goggin et al. 2001) although tulip tree belongs to the open type 1 (CC) subcategory similar to *Q. robur*. In view of the higher osmolality in the phloem than in the mesophyll cells and the uphill concentration gradient of sucrose, it may seem doubtful that the transfer of sucrose from the MCs to the CCs is the result of passive diffusion. Instead active loading mechanisms are more probable.

Turgeon and Medville (2004) have shown that some tree species that belong to the open type I (CC) subgroup like *Clethra barbinervis* and *Liquidambar styraciflua* were active phloem loaders and these tree species load the phloem via the apoplast despite the fact that they had high plasmodesmatal counts in the minor veins. Furthermore they showed that the abundance of plasmodesmata in the minor veins correlate positively with high plasmodesmal connections between MCs and have concluded that this feature of leaf anatomy may not be directly related to phloem loading. The high plasmodesmatal frequency at the MC-CC interface in *Q. robur* and other tree species did not prevent active phloem loading (Goggin et al. 2001, Turgeon and Medville 2004). Evidence from these studies suggested active apoplastic phloem loading against a concentration gradient. Although it may seem contrary

to expectations for a plant that loads via the apoplast to have many plasmodesmata between CCs and MCs, it is possible that the size exclusion limit at this interface restricts diffusion of sucrose or that the pores close in response to differences in turgor pressure between the two joined cell types (Oparka and Prior 1992).

By means of RT-PCR, full-length sucrose transporter cDNAs were obtained from source leaves of *Q. robur* (*QrSUT1*; KF736982) and sequence comparison showed high homologies with known plant sucrose transporters that are involved in phloem loading of sucrose (Fig. 3). Although final proof is still missing, it seems possible that a sucrose transporter is also involved in the phloem loading of *Q. robur*.

Phloem loading mechanism in F. excelsior

The minor veins of *F. excelsior* contained intermediary cells (ICs), which are typical for RFO translocating species (Fig. 1D). In addition, the minor veins also contained one or two ordinary CCs (Fig. 1D). This diversity of CCs in the minor veins is also typical for RFO translocating species and the putative symplastic phloem loaders analyzed so far (Fisher 1986, van Bel et al. 1992, Turgeon et al. 1993, Knop et al. 2001).

Until now there has been little data available dealing with concentrations of sucrose, sugar alcohols, and RFOs in the phloem sap of trees. The total concentration of sugars in the phloem sap of *F. excelsior* was about 1.2 M, which was similar to the sucrose concentration in apoplastic loaders (about 0.8-1.5 M, Riens et al. 1991, Lohaus et al. 1995, Lohaus and Möllers 2000) and to the total sugar concentration in symplastic or mixed phloem loaders (about 0.8-1.3 M, Knop et al. 2001).

RFOs accounted for about 70% of the carbon exported from the leaf in *F. excelsior*, sucrose for 25% and mannitol for about 5% (Table 3). In this case sugar alcohols were not the main export form for carbon as in other tree species, which translocate only sucrose and sugar alcohols. In peach (*Prunus persica*) sorbitol accounted for about 70% of the exported carbon (Nadwodnik and Lohaus 2008). In *F. excelsior* the concentration gradient for mannitol between the cytoplasm of MCs and the phloem was about 47-fold (Table 3). Nadwodnik and Lohaus (2008) have shown lower or similar concentration gradients for sugar alcohols (2- to 40-fold) in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Apium graveolens*, and *P. persica* which likely exhibit an active phloem mode. The lowest gradient was found in *P. persica* because the cytoplasmic concentration of sugar alcohols was very high (Nadwodnik and Lohaus 2008). For several species polyol transporters were cloned (*Plantago major*, Ramsperger-Gleixner

et al. 2004; *Malus domestica*, Watari et al. 2004) and the function of the putative transporter proteins in phloem loading was corroborated by their specific localization in the minor phloem (Ramsperger-Gleixner et al. 2004, Watari et al. 2004). Unfortunately, no data of transporters exists for *F. excelsior*. In contrast, when leaf discs of *Asarina* ssp. or *Malus domestica* were provided with exogenous ^{14}C -mannitol or ^{14}C -sorbitol, the radiolabel does not accumulate in the minor veins as would be expected if it loads actively by transporters (Reidel et al. 2009). From these results it was concluded that in these species sorbitol were loaded symplastically and passively (Reidel et al. 2009). However, this loading mode seems unlikely for *F. excelsior* because the steep uphill concentration gradient for mannitol strongly suggests active transport systems. In *F. excelsior* mannitol has access to the intermediary cells from the mesophyll cells through plasmodesmata because mannitol is much smaller than sucrose. But this is not an explanation for the uphill gradient because no “polymer trapping” exists for sugar alcohols like for RFOs (Turgeon and Gowan 1990). *F. excelsior* contains two different kinds of companion cells (Fig. 1). Perhaps mannitol might be loaded actively into the ordinary companion cells whereas the function of the intermediary cells is mainly in the synthesis of RFOs. The possible existence of multiple loading modes in the same vein raises interesting questions concerning the coordination of transport rates of the different compounds (Reidel et al. 2009).

F. excelsior has a structural potential for symplastic phloem loading of assimilates as indicated by the presence of plasmodesmal fields in its ICs. Furthermore it translocated high amounts of raffinose oligosaccharides (Table 3), which is also a characteristic of putative symplastic phloem loaders. Earlier studies with Curcubitaceae and *Alonsoa meridionalis* indicated that stachyose is probably synthesized in the intermediary cells (Holthaus and Schmitz 1991, Beebe and Turgeon 1992, Voitsekhovskaja et al. 2009), which likely also applies to *F. excelsior*.

In compliance with the polymer-trap model, sucrose is expected to be present in the cytosol of mesophyll cells of symplastic loading species in higher concentrations than in the phloem. However, in *F. excelsior* the sucrose concentration in the phloem sap was about 14-fold higher as in the cytoplasm of mesophyll cells (Table 3). This value corresponds well with the values found in apoplastic phloem loaders that were about 5 to 30-fold (Lohaus et al. 1995, Lohaus and Möllers 2000, Knop et al. 2001) but it is much higher than the two-fold concentration gradient for sucrose in the RFO translocating species *Alonsoa meridionalis* (Scrophulariaceae) (Voitsekhovskaja et al. 2006). In view of the concentration gradient of sucrose, it may seem unlikely that the transfer of sucrose from the MCs to the phloem is the

result of a passive diffusion. Rather phloem loading in *F. excelsior* is an active process. Sucrose transporter cDNAs were also obtained from source leaves of *F. excelsior* (*FeSUT1*, KF736981). Although final proof is still missing, it seems possible that a sucrose transporter is also involved in the phloem loading in this RFO translocating species. Therefore, it is reasonable to assume that at least some of the sucrose loads via the apoplastic pathway. Furthermore, the data shows that sucrose would diffuse back into mesophyll cells rather than enter the phloem, if the opening of plasmodesmata in ICs were not regulated in *F. excelsior*. The degree of the turgor pressure difference might be the mechanism regulating opening/closure of the plasmodesmata (Oparka and Prior 1992).

The mixed phloem loader *Alonsoa meridionalis* contained two types of companion cells in the minor veins, ordinary companion cells as well as intermediary cells (Knop et al. 2001). The sucrose transporter protein was only present in the ordinary companion cells whereas the stachyose synthase gene was expressed only in ICs (Voitsekhovskaja et al. 2009). It could be assumed that the different function of the companion cells is similar to the situation in *F. excelsior* because these two types of companion cells were also present (Fig. 1). It seems likely that *F. excelsior* employs multiple loading strategies, even in the same vein.

Slewinski et al. (2013) have discussed that perhaps all plant species use more than one phloem loading mechanism, even if one mechanism is dominant. It was observed, that in cucurbits, which are categorized as symplastic loaders, a shift in sucrose to stachyose ratio occurred after an infection with cucumber mosaic virus (CMV) and an apoplastic loading pathway was activated (Gil et al. 2011). This indicates that phloem loading is highly affected by environmental influences. The existence of heterogeneous phloem loading mechanisms in one plant species may provide a more flexible physiological reaction of the plant to changing environmental conditions. Perhaps this is also the case for *F. excelsior*.

Conclusion

Data presented here highly suggests that at least portions of phloem loading happen to be active in both *F. excelsior* and *Q. robur*. The measured sugar contents in leaves and leaf exudates were in accordance with previous studies (Zimmermann and Ziegler 1975), however, it was the first time that actual sugar concentrations in cell compartments and phloem sap were compared. An uphill concentration gradient for sucrose between the cytoplasm of mesophyll cells and the phloem were shown for both tree species. *Q. robur* tends to be an apoplastic phloem loader whereas *F. excelsior* seems to be a mixed apoplastic-symplastic phloem loader. Further studies need to be carried out in order to clarify

the exact loading mechanisms. Since putative SUTs were obtained, immuno-localization experiments could give an insight into the role of these transporters in phloem loading.

Supplementary data

Supplementary data are available at JXB online.

Table S1. Relative volumes (%) of the subcellular compartments at the total volume of mesophyll cells from *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior*.

Table S2. Dry weight (n = 6), water - and gas space (n = 6), and volumes of subcellular compartments of mesophyll cells of leaves from *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior*.

Fig. S1. Osmolality of leaves of different plant groups.

Fig. S2. The leaf water content and the osmolality of the leaf sap of the different plant groups.

Acknowledgments

The authors would like to thank Tim Kreutzer for technical assistant, Sarah Rau for help with the electron micrographs, Simon Peterken as well as Anna Sieben for critical reading of the manuscript and the reviewers for the helpful comments.

References

- Aoki N, Hirose T, Scofield GN, Whitfield PR, Furbank RT.** 2003. The sucrose transporter gene family in rice. *Plant and Cell Physiology* **44**, 223–232.
- Beebe DU, Turgeon R.** 1992. Localization of galactinol, raffinose, and stachyose synthesis in *Cucurbita pepo* leaves. *Planta* **188**, 354-361.
- Chang S, Puryear J, Cairney J.** 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**, 113-116.
- Davidson A, Keller F, Turgeon R.** 2011. Phloem loading, plant growth form, and climate. *Protoplasma* **248**, 153–163.
- Eschrich W, Fromm J.** 1994. Evidence for two pathways of phloem loading. *Physiologia Plantarum* **90**, 699–707.
- Evert RF.** 1990. Dicotyledons. In: Behnke HD, Sjolund RD, eds. *Sieve elements: comparative structure, induction and development*. Springer: Berlin, 103-137.
- Farré EM, Tiessen A, Roessner U, Geigenberger P, Trethewey RN, Willmitzer L.** 2001. Analysis of the compartmentation of glycolytic intermediates, nucleotides, sugars, organic acids, amino acids, and sugar alcohols in potato tubers using a nonaqueous fractionation method. *Plant Physiology* **127**, 685–700.
- Fisher DG.** 1986. Ultrastructure, plasmodesmatal frequency, and solute concentration in green areas of variegated *Coleus blumei* Benth. leaves. *Planta* **169**, 141-152.
- Fu Q, Cheng L, Guo Y, Turgeon R.** (2011) Phloem loading strategies and water relations in trees and herbaceous plants. *Plant Physiology* **157**, 1518-1527.
- Gamalei Y.** 1991. Phloem loading and its development related to plant evolution from trees to herbs. *Trees - Structure and Function* **5**, 50–64.
- Gamalei Y.** 1989. Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs. A taxonomic review. *Trees - Structure and Function* **3**, 96–110.
- Giaquinta R.** 1976. Evidence for phloem loading from the apoplast: chemical modification of membrane sulfhydryl groups. *Plant Physiology* **57**, 872–875.
- Gil L, Yaron I, Shalitin D, Sauer N, Turgeon R, Wolf S.** 2011. Sucrose transporter plays a role in phloem loading in CMV-infected melon plants that are defined as symplastic loaders. *The Plant Journal* **66**, 366–374.
- Goggin FL, Medville R, Turgeon R.** 2001. Phloem loading in the tulip tree. Mechanisms and evolutionary implications. *Plant Physiology* **125**, 891–899.
- Holthaus U, Schmitz K.** 1991. Stachyose synthesis in mature leaves of *Cucumis-melo*. Purification and characterization of stachyose synthase (EC 2.4.1.67). *Planta* **184**,

525–531.

- Klie S, Krueger S, Krall L, Giavalisco P, Flügge UI, Willmitzer L, Steinhauser D.** 2011. Analysis of the compartmentalized metabolome - a validation of the non-aqueous fractionation technique. *Frontiers in Plant Science* **2**, 55.
- Knop C, Stadler R, Sauer N, Lohaus G.** 2004. AmSUT1, a sucrose transporter in collection and transport phloem of the putative symplastic phloem loader *Alonsoa meridionalis*. *Plant Physiology* **134**, 204–214.
- Knop C, Voitsekhovskaja O, Lohaus G.** 2001. Sucrose transporters in two members of the Scrophulariaceae with different types of transport sugar. *Planta* **213**, 80–91.
- Kühn C, Franceschi VR, Schulz A, Lemoine R, Frommer WB.** 1997. Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* **275**, 1298–1300.
- Lohaus G, Moellers C.** 2000. Phloem transport of amino acids in two *Brassica napus* L. genotypes and one *B. carinata* genotype in relation to their seed protein content. *Planta* **211**, 833–840.
- Lohaus G, Winter H, Riens B, Heldt HW.** 1995. Further-studies of the phloem loading in the apoplastic compartment with those in the cytosolic compartment and in the sieve tubes. *Botanica Acta* **108**, 270–275.
- Moore B, Palmquist D, Seemann J.** 1997. Influence of plant growth at high CO₂ concentrations on leaf content of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and intracellular distribution of soluble carbohydrates in tobacco, snapdragon, and parsley. *Plant Physiology* **115**, 241–248.
- Nadwodnik J, Lohaus G.** 2008. Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta* **227**, 1079–1089.
- Oparka KJ, Prior DAM.** 1992. Direct evidence for pressure-generated closure of plasmodesmata. *The Plant Journal* **2**, 741–750.
- Pate JS, Gunning BES.** 1969. Vascular transfer cells in angiosperm leaves. A taxonomic and morphological survey. *Protoplasma* **68**, 135-156.
- Ramsperger-Gleixner M, Geiger D, Hedrich R, Sauer N.** 2004. Differential expression of sucrose transporter and polyol transporter genes during maturation of common plantain CCs. *Plant Physiology* **134**, 147–160.
- Reidel JE, Rennie EA, Amiard V, Cheng L, Turgeon R.** 2009. Phloem loading strategies in three plant species that transport sugar alcohols. *Plant Physiology* **149**, 1601-1608.
- Reinders A, Sivitz AB, Ward JM.** 2012. Evolution of plant sucrose uptake transporters.

Frontiers in Plant Science **3**, 22.

- Rennie EA, Turgeon R.** 2009. A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 14162–14167.
- Riens B, Lohaus G, Heineke D, Heldt HW.** 1991. Amino acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiology* **97**, 227–233.
- Riens B, Lohaus G, Winter H, Heldt HW.** 1994. Production and diurnal utilization of assimilates in leaves of spinach (*Spinacia oleracea* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* **192**, 497–501.
- Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB.** 1992. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO Journal* **11**, 4705–4713.
- Sauer N, Stolz J.** 1994. SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *The Plant Journal* **6**, 67–77.
- Schmitt B, Stadler R, Sauer N.** 2008. Immunolocalization of Solanaceous SUT1 proteins in companion cells and xylem parenchyma: New perspectives for phloem loading and transport. *Plant Physiology* **148**, 187–199.
- Slewinski TL, Zhang C, Turgeon R.** 2013. Structural and functional heterogeneity in phloem loading and transport. *Frontiers in Plant Science* **4**, 244.
- Stadler R, Brandner J, Schulz A, Gahrtz M, Sauer N.** 1995. Phloem loading by the PmSUC2 sucrose carrier from *Plantago major* occurs into CCs. *The Plant Cell* **7**, 1545–1554.
- Stadler R, Sauer N.** 1996. The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in CCs. *Botanica Acta* **109**, 299–306.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S.** 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 2731–2739.
- Turgeon R, Gowan E.** 1990. Phloem loading in *Coleus blumei* in the absence of carrier-mediated uptake of export sugar from the apoplast. *Plant Physiology* **94**, 1244–1249.
- Turgeon R, Beebe DU, Gowan E.** 1993. The intermediary cell: minor-vein anatomy and raffinose oligosaccharide synthesis in the Scrophulariaceae. *Planta* **191**, 446–456.
- Turgeon R, Medville R.** 1998. The absence of phloem loading in willow leaves. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 12055–12060.
- Turgeon R, Medville R.** 2004. Phloem loading. A reevaluation of the relationship between plasmodesmatal frequencies and loading strategies. *Plant Physiology* **136**, 3795–3803.
- van Bel AJE, Ammerlaan A, van Dijk AA.** 1994. A three-step screening-procedure to identify the mode of phloem loading in intact leaves. Evidence for symplasmic and apoplasmic phloem loading associated with the type of companion cell. *Planta* **192**, 31–39.
- van Bel AJE, Gamalei YV, Ammerlaan A, Bik LPM.** 1992. Dissimilar phloem loading in leaves with symplasmic or apoplasmic minor-vein configurations. *Planta* **186**, 518–525.
- Voitsekhovskaja OV, Koroleva OA, Batashev DR, Knop C, Tomos AD, Gamalei YV, Heldt HW, Lohaus G.** 2006. Phloem loading in two Scrophulariaceae species. What can drive symplastic flow via plasmodesmata? *Plant Physiology* **140**, 383–395.
- Voitsekhovskaja OV, Rudashevskaya EL, Demchenko KN, Pakhomova MV, Batashev DR, Gamalei YV, Lohaus G, Pawlowski K.** 2009. Evidence for functional heterogeneity of sieve element-companion cell complexes in minor vein phloem of *Alonsoa meridionalis*. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1873–1883.
- Watari J, Kobae Y, Yamaki S, Yamada K, Toyofuku K, Tabuchi T, Shiratake K.** 2004. Identification of sorbitol transporters expressed in the phloem of apple source leaves. *Plant Cell Physiology* **45**, 1032–1041.
- Winter H, Robinson DG, Heldt HW.** 1993. Subcellular volumes and metabolite concentrations in barley leaves. *Planta* **191**, 180–190.
- Winter H, Lohaus G, Heldt HW.** 1992. Phloem transport of amino acids in relation to their cytosolic levels in barley leaves. *Plant Physiology* **99**, 996–1004.
- Zimmermann MH, Ziegler H** 1975. List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. In: Zimmermann MH, Milburn JA, eds. *Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 1, Transport in Plants: Phloem transport*. New York: Springer, 479-503.

Journal of Experimental Botany

Apoplastic and symplastic phloem loading in *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior*

Soner Öner-Sieben, Gertrud Lohaus

Supplementary Data

Table S1. Relative volumes (%) of the subcellular compartments at the total volume of mesophyll cells from *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior*. Data were obtained from morphometric analysis (n = 30-38). The total volume of a mesophyll cell is defined as 100 %. Cytoplasm is defined as cytosol, peroxisomes, mitochondria and endoplasmatic reticulum. Mean values \pm SD are shown.

	<i>Q. robur</i>	<i>F. excelsior</i>
Vacuole (%)	39.3 \pm 14.0	71.7 \pm 6.4
Chloroplast (%)	31.8 \pm 10.0	15.9 \pm 5.4
Nucleus (%)	7.8 \pm 3.1	3.9 \pm 1.1
Cytoplasm (%)	21.0 \pm 6.6	8.6 \pm 3.3

Table S2. Dry weight (n = 6), water - and gas space (n = 6), and volumes of subcellular compartments of mesophyll cells of leaves from *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior*. Subcellular volumes were calculated from relative volumes of the subcellular compartments (Table S1) and the water space. The water space was defined as fresh weight minus dry weight. The gas space of the leaves was defined as space outside of the symplast and the liquid apoplast and corresponds to the gaseous intercellular space.

	<i>Q. robur</i>	<i>F. excelsior</i>
Dry weight (mg g ⁻¹ FW)	466 \pm 85	372 \pm 120
Water space (μ l g ⁻¹ FW)	534 \pm 90	628 \pm 161
Gas space (μ l g ⁻¹ FW)	433 \pm 42	521 \pm 47
Vacuole (μ l g ⁻¹ FW)	209.9	450.3
Stroma (μ l g ⁻¹ FW)	84.9	49.9
Cytoplasm (μ l g ⁻¹ FW)	95.3	45.9

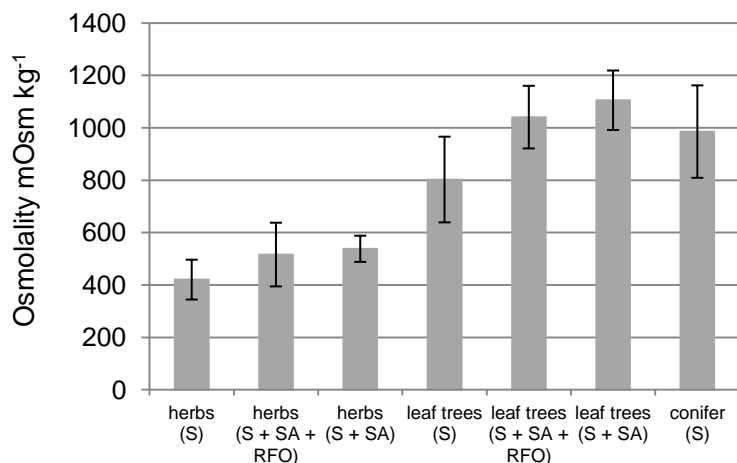


Fig. S1. Osmolality of leaves of different plant groups. The leaves contain different amounts of sucrose, raffinose-oligosaccharides and/or sugar alcohols. herbs (S): leaves of herbaceous plant containing sucrose (*Beta vulgaris*, *Brassica napus*, *Helianthus annuus*, *Pisum sativum*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare*); herbs (S + SA + RFO): leaves of herbaceous plant containing sucrose, sugar alcohols and raffinose-oligosaccharides (*Ajuga reptans*, *Alonsoa meridionalis*, *Asarina barclaiana*, *Lophospermum erubescens*, *Cucurbita maxima*, *Lamium album*, *Verbascum*); herbs (S + SA): leaves of herbaceous plant containing sucrose and sugar alcohols (*Plantago major*, *Apium graveolens*); leaf trees (S): leaves of tree species containing mainly sucrose (*Fagus sylvatica*, *Quercus robur*, *Acer campestre*); leaf trees (S + SA + RFO): leaves of tree species containing sucrose, sugar alcohols and raffinose-oligosaccharides (*Fraxinus excelsior*, *Syringa vulgaris*); leaf trees (S +SA): leaves of tree species containing sucrose and sugar alcohols (*Malus domestica*, *Prunus avium*, *Prunus persica*); conifers (S): leaves of conifers containing sucrose (*Abies grandis*, *Picea abies*, *Pinus sylvestris*).

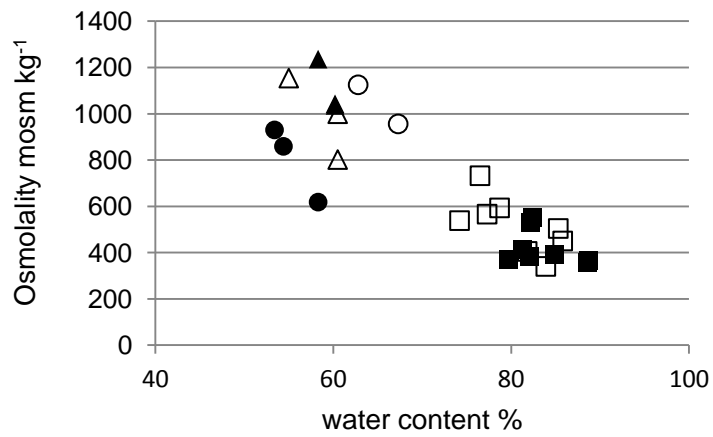


Fig. S2. The leaf water content and the osmolality of the leaf sap of the different plant groups (the same plant species shown in Fig. S1). Closed squares: herbs (S) and (S + SA), open squares: herbs (S + SA + RFO), closed circles: leaf trees (S), open circles: leaf trees (S + SA + RFO), closed triangles: leaf trees (S + SA), open triangles: conifers.

4.3 Abschnitt III Charakterisierung von QrSUT1 und FeSUT1 und Lokalisation von FeSUT1

In diesem Abschnitt sind die funktionelle Charakterisierung von QrSUT1 aus *Q. robur* und *FeSUT1* aus *F. excelsior* sowie die Lokalisation von FeSUT1 auf zellulärer Ebene dargestellt.

Die Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Ruth Stadler und Christine Rappl von der Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt. Das Manuskript ist in Vorbereitung zur Einreichung in einer Fachzeitschrift.

Title page

Title: Heterologous expression and characterization of sucrose transporters from *Quercus robur* (QrSUT1) and *Fraxinus excelsior* (FeSUT1). Immunolocalization of FeSUT1 in the phloem of *Fraxinus excelsior*.

Authors: Soner Öner-Sieben^{1†} Email: oener@uni-wuppertal.de
Christine Rappl^{2†} Email: christine.rappl@fau.de
Ruth Stadler² Email: ruth.stadler@fau.de
Gertrud Lohaus^{1*} Email: lohaus@uni-wuppertal.de

Institutes: ¹ Molekulare Pflanzenforschung/Pflanzenbiochemie (Botanik)
Bergische Universität Wuppertal
Gaußstraße 20, D-42119 Wuppertal, Germany
² Lehrstuhl Molekulare Pflanzenphysiologie Department Biologie
Universität Erlangen-Nürnberg
Staudtstrasse 5, D-91058 Erlangen, Germany

† These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence may be addressed.

Keywords: Immunolocalization, *Fraxinus excelsior*, heterologous expression, phloem loading, *Quercus robur*, sucrose transporter, yeast

Abstract

Sucrose transporters (SUTs) play an important role in plant sucrose partitioning, phloem loading and long distance transport in species with open as well as closed minor vein structure. So far, only SUT from herbaceous species have been characterized whereas less data from woody species is available. Sucrose transporters were cloned from the Fagaceae *Quercus robur* (open type 1(CC) minor vein structure with ordinary companion cells) and from the Oleaceae *Fraxinus excelsior* (open type 1 (IC) minor veins structure with intermediary cells). Recent studies revealed that *Q. robur* has properties for an apoplastic phloem loader while data indicated that *F. excelsior* is a putative mixed symplastic and apoplastic phloem loader. In this study the isolated SUTs were investigated by heterologues expression in *Saccharomyces cerevisiae*.

The vector NEV-E allowed for the transformation of yeast cells with either *QrSUT1* or *FeSUT1* under the control of *PMA1*-Promotor from yeast. Uptake measurements with ^{14}C -sucrose showed that both sequences translated into functional sucrose transporters that translocate sucrose across plasma membranes. The obtained K_M -values at pH 5.5 were $6,78 \pm 1,96$ mM sucrose for *QrSUT1* and $2,08 \pm 0,24$ mM sucrose for *FeSUT1*.

To analyze the possible function of *FeSUT1* in phloem loading a polyclonal antiserum against 15 amino acids from the central loop region was used. Fluorescence-labelling of Anti-*FeSUT1* on methacrylate sections of both petioles and leaves of *F. excelsior* showed that *FeSUT1* was located exclusively in phloem cells. Further comparison with electron micrographs and DAPI-staining revealed that the labelled cells were companion cells. The data presented indicate that phloem loading and retrieval of sucrose in *F. excelsior* are at least partly mediated by the activity of *FeSUT1* in addition to symplastic phloem loading.

Introduction

Photoassimilates that are produced in the autotrophic source-elements of plants are distributed through the phloem to heterotrophic sink-tissues such as roots, stem and flowers. A crucial step in this process is the loading of the phloem with sugars because establishing a concentration gradient towards the sink-elements drives the pressure flow (Münch 1930). There are three phloem loading mechanisms described in the literature: active apoplastic phloem loading via plasma membrane localized proton-coupled sucrose transporters (SUTs) (Riesmeier et al. 1994), active symplastic phloem loading by “polymer-trapping” that results in the translocation of raffinose-oligosaccharides (RFOs) (Turgeon and Gowan 1990) and passive diffusion of sugars through abundant plasmodesmal connections between mesophyll-cells (MC) and companion-cells (CC) of the sieve-element companion-cell complex (SE-CCC) (Turgeon and Medville 1998). Depending on the minor vein structure - open (type 1) or closed type (type 2) - species load their phloem in different ways (Gamalei 1989, 1991, van Bel et al. 1994).

Apoplastic phloem loading is associated with type 2 minor vein configurations (Gamalei 1989). The symplastic isolation of the SE-CCC due to none or very few plasmodesmatal connections to the adjacent MCs makes a transporter mediated loading mechanisms necessary (De Schepper et al. 2013). Sucrose as the major transport sugar gets released into the apoplast probably by SWEET-proteins und is subsequently transported into the CC by proton coupled transporters (Giaquinta 1977, 1979, Riesmeier et al. 1994, Chen et al. 2012). This process results in high concentrations of sucrose in the phloem feeding the bulk flow in the sieve tubes. Apoplastic loading seems to be the dominant form of phloem loading in herbaceous species (Davidson et al. 2011).

In regard to their phloem anatomy, species with an open type 1 minor vein structure were further subdivided into type 1 (CC) with ordinary companion cells and type 1 (IC) with intermediary cells. The phloem in type 1 (IC) species is loaded with the “polymer-trap” mechanism. Sucrose diffuses through fields of highly branched plasmodesmata from the MCs to the ICs where it gets metabolized to RFOs by the addition of galactinol (Turgeon and Gowan 1990, Turgeon et al. 1993, Hoffmann-Thoma et al. 2001, Voitsekhovskaja et al. 2009). The size exclusion limit of the plasmodesmata prevents RFOs from diffusing back into the MCs but allows sucrose to diffuse freely. A concentration gradient for sucrose towards the phloem is maintained by the constant synthesis of RFOs which results in high concentrations of RFOs in addition to sucrose and other sugars in the phloem sap of these species (Knop et al. 2001, Öner-Sieben and Lohaus 2014). In electron micrographs it appeared that ICs are very different from ordinary CC with high numbers of mitochondria, dense cytoplasm and many smaller vacuoles (Turgeon et al, 1993). *In situ* hybridization

experiments in the symplastic phloem loader *Alonsoa meridionalis* have shown that RFO synthesizing enzymes are exclusively located in the ICs (Voitsekhovskaja et al. 2009).

Type 1 (CC) species are associated with passive phloem loading and most tree species are confined to this minor vein type and loading mechanism (Gamalei 1989, Davidson et al. 2011). The phloem anatomy is similar to those of apoplastic loading species with ordinary CCs but the SE-CCC is symplastically connected to the surrounding cells with abundant symmetrically branched plasmodesmata (Davidson et al. 2011). Therefore, sucrose can potentially diffuse freely between these cells. Hence, a concentration gradient for sucrose from the MCs to the CCs is mandatory to allow passive phloem loading. In fact, plasmolysis experiments in willow revealed higher osmolarities in MCs than in the SE-CCC (Turgeon and Medville 1998). In addition, autoradiography experiments with ^{14}C -mark sugars showed no accumulation of photoassimilates in minor veins of several tree species, supporting the hypothesis of passive phloem loading in trees (Reidel et al. 2009, Rennie and Turgeon 2009, Davidson et al. 2011). However, a type 1 (CC) minor vein structure is not necessarily coupled with passive phloem loading. In tulip tree (*Liriodendron tulipifera*) and *Liquidambar styraciflua* apoplastic phloem loading has been shown to take place (Goggin et al. 2001, Turgeon and Medville 2004). Recent studies in oak (*Quercus robur*) and ash (*Fraxinus excelsior*) revealed that sucrose was more concentrated in the phloem sap than in the cytosol of MCs (Öner-Sieben and Lohaus 2014). Thus, sucrose has to be loaded actively into the phloem in both species. These results are especially interesting for oak because species of the genus *Quercus* were thought to be typical passive phloem loaders while ash had properties for RFO translocating species which are probably active symplastic phloem loaders (Slewinski et al. 2013). Congenial to the existence of steep concentration gradients for sucrose towards the sieve-tubes SUTs associated with phloem loading were isolated from both species.

Sucrose transporters are an important factor for carbohydrate partitioning in higher plants. Since the isolation of the first SUT from spinach by Riesmeier et al. (1992) many other transporters were isolated from different plants and tissues (Truernit 2001, Kühn 2003, Sauer 2007, Reinders et al. 2012). All SUTs feature 12 transmembrane domains (TMDs) where two clusters of six TMDs are connected through a longer central loop and form a pore. When sucrose and a proton get into the binding site of the protein a change in conformation translocates both substrates into the cell (Geiger 2011). Based on sequence homology SUTs were grouped in three subtypes: Type I, type II and type III (Reinders et al. 2012).

Type I SUTs were found in eudicots and they are mostly associated with apoplastic phloem loading and retrieval of sucrose along the phloem transport pathway. Reduction of type I SUT expression in several species resulted in severe phenotypical abbreviations that

underlined the importance of these proteins for apoplastic phloem loaders (Riesmeier et al. 1994, Kühn et al. 1996, Lemoine et al. 1996). Immunolocalization of type I SUTs showed specific expression in phloem cells in different tissues (Stadler et al. 1995, Stadler and Sauer 1996, Sivitz et al. 2005, Lauterbach et al. 2007, Schmitt et al. 2008). Functional characterization of heterologously expressed type I SUTs in yeast revealed that these transporters possess high substrate affinities with K_M values of 0,1 mM to 2 mM (Kühn 2003). The Type II SUTs were further divided into type IIA and type IIB (Reinders et al. 2012). Type IIB SUTs are specific for monocots and it has been shown that some of them are essential for apoplastic phloem loading (Braun and Slewinski 2009). The role of type IIA SUT is unclear. Initially they were thought to act as sucrose sensors since they have a longer central loop. However, RNAi experiments on *Arabidopsis thaliana* could not confirm this hypothesis (Meyer et al. 2000, Barker et al. 2000, Barth et al. 2003, Kühn 2003, Braun and Slewinski 2009). Type III SUTs have been shown to be localized at the tonoplast and to be catalyzing the export of sucrose from the vacuole (Endler et al. 2006, Eom et al. 2011, Payyavula et al. 2011, Frost et al. 2012, Schneider et al. 2012). They are of special interest for putative passive loading species since they can act as a valve between vacuole and cytosol and therefore regulate phloem transport in these species (Payyavula et al. 2011).

In a previous study, we have shown that high concentration gradients for sucrose were present in *Q. robur* and *F. excelsior*. Based on these results we assumed that phloem loading needs to be an active process although it was thought that especially *Q. robur* was a classic passive loading species because of the open minor vein structure without intermediary cells (type 1 (CC)) and sucrose being the only transport sugar. The phloem sap of *F. excelsior* contained high amounts of RFOs which is in accordance with its type 1 (IC) minor vein structure. Independent of the minor vein structure we were able to isolate SUT cDNAs from source leaves of both species.

In this study type I SUTs from the two tree species *Q. robur* (QrSUT1) and *F. excelsior* (FeSUT1) were expressed in yeast and functionally characterised by measuring the uptake of radio-labelled sucrose. Immunolocalization of FeSUT1 was performed on sections of ash-tissue to determine whether FeSUT1 may be involved in apoplastic phloem loading in the minor veins.

Material and methods

Plant material

Quercus robur and *Fraxinus excelsior* were grown in compost soil under greenhouse conditions as described by Öner-Sieben and Lohaus (2014). Samples were taken from three-year old plants.

Isolation of sucrose transporter

By means of RT-PCR as described in Öner-Sieben and Lohaus (2014) full-length cDNA-clones for SUTs from *Q. robur* (QrSUT1, Accession-Nr. KF736982) and *F. excelsior* (FeSUT1, Accession-Nr. KF736981) were isolated. Topology predictions were done on the PSIPRED-Server (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

Expression of QrSUT1 and FeSUT1 in S. cerevisiae and uptake experiments

The shuttle vector pNEV-E (Sauer and Stolz 1994) was used for heterologous expression of *QrSUT1* and *FeSUT1* in *S. Cerevisiae* under the control of the *PMA1*-promotor from yeast. To increase the expression rate the 5'-untranslated region of *PmSUC2* (5'-AAGCTTGTAAGAA-3'; Gahrtz et al. 1994, Sauer and Stolz 2000) was introduced to the full-length cDNA Sequences of *QrSUT1* and *FeSUT1* that were subsequently cloned into the *EcoRI* site of the vector.

For the transformation of the yeast strain SEY2102 (Emr et al. 1983) plasmids with inserts in sense and antisense orientations were used. Uptake was analyzed as described (Gahrtz et al. 1994).

Preparation of plasma membranes and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Isolation of yeast plasma membrane proteins and SDS-PAGE are described elsewhere (Laemmli 1970, Winzer 1999).

Production of anti-SUT antiserum

After topology analysis of the amino acid (aa) sequences of *QrSUT1* and *FeSUT1* two peptides were synthesized, coupled to keyhole limpet hemocyanin (KLH) and injected to immunize three rabbits per peptide (Pineda Antikörperservice, Berlin, Germany). The peptide-sequence for *QrSUT1* (KLAEKARNGHPVAT) corresponded with an extra cellular loop region between TMD 9 and TMD 10 and the peptide from *FeSUT1* derived from the central loop (QAEPENIGHGVVK). To increase immunization the peptide-carrier-protein was injected every month until day 120 and day 90 for *QrSUT1* and *FeSUT1*, respectively. The antisera were tested using membrane proteins from yeast cells that were transformed either with sense or antisense plasmids.

Preparation and fixation of A. meridionalis sections for light microscopy

The fixation of the material was carried out according to Stadler et al. (1995) and Knop et al. (2004).

Parts of leaves and midribs of *F. excelsior* were briefly degassed in 3 ml fixing solution (ethanol:acetic acid, 3:1 [v/v]) and the tissues were fixed at room temperature for 1h. After three washing steps with 70 % ethanol, 1mM DTT for each 30 min and one overnight step, the tissues were dehydrated with 80, 85, 90, and 95% ethanol, 1mM DTT for each 20 min on ice and finally two times with 99.8% ethanol, 10 mM DTT for each 20 min. The tissue was infiltrated with methacrylate in three sequential incubations in methacrylate mix (75% [v/v] butyl methacrylate, 25% [v/v] methyl methacrylate, 0.5% [w/v] benzoine ethyl ether, 10 mM DTT) at 4°C with increasing methacrylate mix:ethanol ratios (1st incubation overnight: 1:2; 2nd incubation for 6h: 1:1; 3rd incubation overnight: 2:1). After one additional 6 h incubation and two final overnight incubations at 4°C (all in 100% methacrylate mix) samples were transferred to ultrathin PCR tubes. Methacrylate was polymerized during incubation at 4°C for 15 h under UV light (310 nm) in 100% methacrylate mix. Semithin sections (about 2 µm) were prepared with an ultramicrotome (Ultracut R, Leica, Bensheim, Germany), and placed on poly-L-lysine-coated coverslips.

Staining of sections with fluorescent dyes

The staining procedure for antibody detection and nucleus visualization were performed as described in Knop et al. (2004).

For removal of methacrylate from the semithin sections, coverslips were incubated for 2 min in 100% acetone. Rehydration proceeded in a series of ethanol (100%, 70%, 30%) for each 30 sec. The coverslips were washed with TBS buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) for 30 sec, and incubated in blocking buffer (1% [w/v] skimmed milk powder in TBS) for 45 min. After overnight incubation with anti-FeSUT1 antiserum (diluted 1:500 to 1:5000 in blocking buffer), the coverslips were washed three times with blocking buffer and incubated for 1 h with anti-rabbit IgG-fluorescein isothiocyanate (FITC) isomer 1 conjugate (Sigma; diluted 1:300 in blocking buffer). For control sections the anti-FeSUT1 antiserum was omitted. After five final washes with blocking buffer for 5 min each, the coverslips were rinsed with water and mounted in 10 µl ProLong-Antifade Kit (Molecular Probes, Leiden, Netherlands). Photographs were taken with a fluorescence phase microscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) with an excitation light of 450 to 490 nm.

For double staining of the FeSUT1 protein with antiserum/FITC conjugate and of nuclei with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Serva, Heidelberg, Germany), sections were treated as described above. After the final rinsing with water, coverslips were incubated for 1 h at room temperature in DAPI (0.2 µg/ml). DAPI fluorescence was detected with an excitation light of 365 nm.

Results

Characterization of *QrSUT1* and *FeSUT1*

Recent studies have shown that *Q. robur* is a putative apoplastic phloem loader while *F. excelsior* is probably a symplastic phloem loader (Öner-Sieben and Lohaus 2014). From both species putative type I SUTs could be isolated from mRNA of source leaves.

```

1      CACACAAACAAAATCTAAGAGAACAGTCTCTTCTCCGCCATGGAAGTTGAAAGAGCTAGTCTGAAAGCAAAGCGAGTCC      80
1      M E V E R A S S E S K A S P      14
81     CGTGAGGAATATCTTCTGGTGTCTTCAATAGCAGCTGGGGTTCAATTTGGATGGGCTCTACAGCTATCTTTGCTGACCC      160
15     V R N I F L V S S I A A G V Q F G W A L Q L S L L T P      41
161    CATATGTTACAGTCTTTGGGTATTCTCACAATGGGCTGCTTTCATTTGGCTCTGTGGTCTATCTCCGGCATGCTTGT      240
42     Y V Q L L G I P H K W A A F I W L C G P I S G M L V      67
241    CAACCCATAGTTGGCTATTACAGCGACCGTTCACCTCTCGTTCGGTCGCGTAGACCCCTTATTCGCCCGGAGCTGC      320
68     Q P I V G Y Y S D R S T S R F G R R R P F I A A G A A      94
321    CCTCGTCGCGGCGCTGTTTCTCATCGGATATGCTGCTGACTTTGGTCACCTCTCTGGTGATTCTTAAACAAAACCT      400
95     L V A A A V F L I G Y A A D F G H L S G D S L N K T S      121
401    CGAAGCCACGTGCAATCGTTGTTTGTGGTGGGTTTGGATCCTTGATGTTGCTAACACATGTTACAAGTCCATGT      480
122    K P R A I V V F V V G F W I L D V A N N M L Q G P C      147
481    CGTGCTTTCTAGCTGATCTTCTCAAATGACCAGAAAAGAAATGCGTATAGCCAATAATTTGTTCTTCTTCTTCTGCG      560
148    R A F L A D L S S N D Q K R M R I A N N L F S F F M A      174
561    TGTTGGTAACGTATTAGGCTATACCTGCTGCTCAAAAACTCACACGATTTGCTTTCACACACACTAAAGCTT      640
175    V G N V L G Y T A G S L K K L Y T I L P F T H T K A C      201
641    GTGATGAGTATTGTGCAATCTCAAGACTTGTTTTTTTCATCTCTATTGCATTGTTGTTAACTTTGACCACATTGGCTCTC      720
202    D E Y C A N L K T C F F I S I A L L L T L T T L A L      227
721    ACTCTGGTGAAGAAAAACATTTTCAGAACCCAGAAAGTAGATTCTGCAGAAGAGGTTGTTAAAGTACCATGTTTTGGTGA      800
228    T L V K E K T F S E P E V D S A E E V V K V P C F G E      254
801    AATGGCGGGGGCTTTCAAAGACTTAAAAGACCCATGCGGATTTTGCTCTTGGTGACATGTTTCAACTGGATTGCATGGT      880
255    M A G A F K E L K R P M R I L L L V T C F N W I A W F      281
881    TCCCTTCTCTTCTATTGACACTGATTGGATGGGAGAGAGGTTTGGAGGTGATGCTACTGCGAAAGGAAAGCTGCTG      960
282    P F L L F D T D W M G R E V F G G D A T A K G K L L      307
961    GACTTGTACAACGTGGGTGTACGCACTGGTGCATTGGGGTTGATGCTTAACTCTGTGGTGTGGGTTTCACATCTTTAGG      1040
308    D L Y N V G V R T G A L G L M L N S V V L G F T S L G      334
1041   GGTGGAGCACTTGGCGCGTGGGGTGGGGGAGTGAAGCGTTTATGGCTATTGCTAATTTCTTGCTAGCTGCGTGTTTGG      1120
335    V E H L A R G V G G V K R L W A I A N F L L A A C L A      361
1121   CCATGACTGTGTTGTTACCAAGTTGGCCGAGAAGGCTCGCAATGGTATCCGGTGGCGACGACACCACCGGAGGCATT      1200
362    M T V L V T K L A E K A R N G H P V A T T P P G G I      387
1201   AAGGCCGCGCTTTGGCTCTCTTCGCCGTGTTGGGTGTACCACAAGCGGTGACTTATAGCATTCCCTTCGCTTTAGCTTC      1280
388    K A G A L A L F A V L G V P Q A V T Y S I P F A L A S      414
1281   CATATTTCTAGCACATCAGGCGCTGGCCAAGGACTTTCTTTGGGAGTTCTGAATCTTCAATCGTGGTACCTCAGATGA      1360
415    I F S S T S G A G Q G L S L G V L N L S I V V P Q M I      441
1361   TCGTATCGGTTACTAGTGGACCTGGGATTCCCTTATTCGGAGGTGTAATCTACCAGCATTCTGTGGTGGCGCTATTGCA      1440
442    V S V T S G P W D S L F G G G N L P A F V V G A I A      467
1441   GCTGCGATAAGTGAATATTGGCACTCACCATGCTCCCATCCCCACCCCTGATGTTAACAATTCAAAAGTGAAGGCC      1520
468    A A I S G I L A L T M L P S P P P D V N N S K S A R P      494
1521   TGTCATCACTGCTTGTCAATGAGAATTCCTCAAGTTCTTTTAGGTTTCATCCCCACTTTTATCGTGGGACGGTTGTAATAG      1600
495    V I T A C H      500
1601   AATAATTATTAGGTACTCTAGATAATGGTAATATGGTCTTCATTATAAATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA      1668

```

Fig. 1 Sequence of the full-length cDNA clone of *QrSUT1* encoding the type I SUT *QrSUT1* from *Q. robur*. Putative transmembrane domains (TMDs) are highlighted in grey. Start and stop codons are underlined.

```

1      CACTCTTTTCATGTAATAATTTACTGCATATACATATAGTGAGAGAAATCTATACATACACAATTTCTAAAGTGAGAGAGTG      80

81      AAGAGTTAAATTATATATATCCATGGAGGTTGATGGAAGCAAATTGAGTACTATTGTGCCAGAACCTCCACTTACGCCACCG      160
1      M E V D G S K L S T I V P E P P L T P P      20
161     CAAGAGCCGCTGAGAAAACCTCATTCCGGTGGCGGCCATAGCAGCGGGGTGCAATTCGGGTGGGCCCTTCAGCTCTCCTT      240
21      Q E P L R K L I P V A A I A A G V Q F G W A L Q L S L      47
241     GTTGACTCCGTACGTGCAGCTTCTGGGTATTTCCCATACCTGGGCTGCCTTCATCTGGCTGTGTGGGCCAGTCTCCGGCT      320
48      L T P Y V Q L L G I P H T W A A F I W L C G P V S G L      74
321     TGTTCTGTCAGCCGATTGTTGGCTACTACAGTGACAATTTGCTCCTCCCGCTTTGGGGCGGCGCCGCCCTTTATCGCCGCC      400
75      F V Q P I V G Y Y S D N C S S R F G R R R P F I A A      100
401     GGTGCCGCACTTGTCTGCTGTCGCCGTTTTCTCAATTGGATTTCGCCGGATATTGGTCATGCCTCCGGGGACCCCTGGG      480
101     G A A L V A V A V F L I G F A A D I G H A S G D P L G      127
481     CAACGACGGCAAGACGGCGAAGCCCGTCCCATTTGCTGTGTTTGTCTGCTGGATTTTGGATCCTTGACGTGGCCAACAACA      560
128     N D G K T A K P R A I A V F V V G F W I L D V A N N M      154
561     TGTTACAGGGACCTTGCAGAGCCCTGTTGGCTGATCTCTCTGGTGGAAATGCTCAGAAAATGAGGACTGCAATGCCTTT      640
155     L Q G P C R A L L A D L S G G N A Q K M R T A N A F      180
641     TTTTCTTTTTCATGGCGGTGGGAGCGTGCCTCGGTTATGACAGCTGGATCATACTCACTTGTTCAAAATATTTCCCTTT      720
181     F S F F M A V G S V L G Y A A G S Y T H L F K I F P F      207
721     TACCAAAACAAAAGCCTGTGATGTGATTTGTGCAAATCTCAAGAGCTGTTTTTCTCTCAATATTTCTTCTGTTGACTC      800
208     T K T K A C D V Y C A N L K S C F F L S I F L L L T L      234
801     TAACAATATTGGCTTTGACTATTGTGCGTGAAACGGCCTTTGTCCCTTCACAGGCGGAGCCACCAGAAAACATAGGTCAT      880
235     T I L A L T I V R E T A F V P S Q A E P P E N I G H      260
881     GGGTGGTTAAGAAGAGGAAAATACCAGTTTTGGGGGAGTTATTTGGTGCATTGAAGGCTTACCTAGGCCAATGAGGGC      960
261     G V V K K R K I P V L G E L F G A L K G L P R P M R A      287
961     TTTGCTCTTGGTGACTTGTAAATTGGATTGCTTGGTTCCTTCTTGTGTTGACACTGATTGGATGGGAAGGAGG      1040
288     L L L V T C L N W I A W F P F L L F D T D W M G K E V      314
1041    TGTACGGAGGGAAGTGGGGTAGGGAAGTTGTACAACCAAGGGGTGCGTGCAGGGCACTCGGGCTGATGCTGAGTGCT      1120
315     Y G G K V G V G K L Y N Q G V R A G A L G L M L S A      340
1121    GTGGTGGTGGGGTGGCCTCCCTCGCTCTTGTAGTTATTTGGCGCGTGGACTTGGTGGGGTGAAGCGCTTTGGGGTGTTC      1200
341     V V L G C A S L A L E L L A R G L G G V K R L W G V A      367
1201    CAACTTCTTGTAGCCATTTGCTTGGCCATGACCGTCTTGATAACCAAATTGGCGCAGTCTACACGCCGTCATGCCATCC      1280
368     N F L L A I C L A M T V L I T K L A Q S T R R H A I H      394
1281    ATAATGGTGATGCTAATCCACCACCGCCACTGGTGTCAAGTTCGGTGTCTTTGGCCCTCTTGTCTATTCTTGGCATTCCCT      1360
395     N G D A N P P P A T G V K V G A L A L F A I L G I P      420
1361    CAAGCGGTGACTTTTACGATCCCATTTGCTCTAGCGTCTATATTTTCTAGTATTCTGGGGCAGGACAAGTCTGTCACT      1440
421     Q A V T F S I P F A L A S I F S S D S G A G Q G L S L      447
1441    CGGAGTTCTAAATCTTGCTATAGTTGTACCACAGATGGTGTATCAGTCTGAGTGGACCGTGGGATGCCTTGTGGAG      1520
448     G V L N L A I V V P Q M V V S V L S G P W D A L F G D      474
1521    ACGGTAACCTTACCGCATTCGTTGTGGGCGCGTGGCAGCTGCGGATAGCGGATATTGCACTCACCTACTTCCATCT      1600
475     G N L P A F V V G A V A A A S G I F A L T I L P S      500
1601    TTACCTCCGATGTTTACCAGCCAAGCCATGAGCGCGGAGGATTTTCATTGAAATATCGATGCATCCTAAGCTAGATA      1680
501     L P S D V S P A K A M S A G G F H      517
1681    GTTTGTTCCTTCTCCTACCTTGTGTTTGGGTATTGTGATAGTCTTTCCTTTTTTTTGGCCCTTTCGACCGAAACTTCG      1760

1761    GCATTTTTTAGCCAAGGACATCAACTTATGTATAATAACTGTGATTTTGTAAATGTTGGACCGTCAACAGAATTGGG      1840

1841    GAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA      1869

```

Fig. 2 Sequence of the full-length cDNA clone of *FeSUT1* encoding the type I SUT *FeSUT1* from *F. excelsior*. Putative transmembrane domains (TMDs) are highlighted in grey. Start and stop codons are underlined.

Topology predictions revealed that *QrSUT1* and *FeSUT1* were putative SUTs with 12 TMDs. The clone for *QrSUT1* with an overall sequence length of 1668 bp encodes an open reading frame (ORF) of 1500 bp and thus a protein of 500 aa with a calculated molecular weight of 53.2 kDa (Fig. 1). The ORF of the 1869 bp long *FeSUT1*-clone had a length of 1551 bp which resulted in a protein with 517 aa and a calculated molecular weight of 54.2 kDa (Fig. 2).

The yeast system is commonly used for functional analysis of plant sucrose transporters (Sauer und Stolz 1994, Deol et al. 2013). In this study the shuttle vector pNEV-E (Sauer und Stolz 1994) was used for transformation of cells of the yeast strain SEY2102 (Emr et al. 1983) with sense and antisense inserts of the ORFs of *QrSUT1* (pNQrSUT1(+), pNQrSUT1(-)) and *FeSUT1* (pNFeSUT1(+), pNFeSUT1(-)). The antisense constructs were used as negative controls.

Yeast strains that contained the sense plasmid constructs transported ^{14}C -sucrose at high rates whereas sucrose uptake in the negative controls was negligibly low (Fig. 3). The alleged higher sucrose uptake from pNQrSUT1(-) transformed yeast cells can be explained by the higher resolution of the y-axis due of the overall lower transport activity of QrSUT1 (Fig. 3A). The results indicated that both QrSUT1 and FeSUT1 were in fact functionally sucrose uptake transporters.

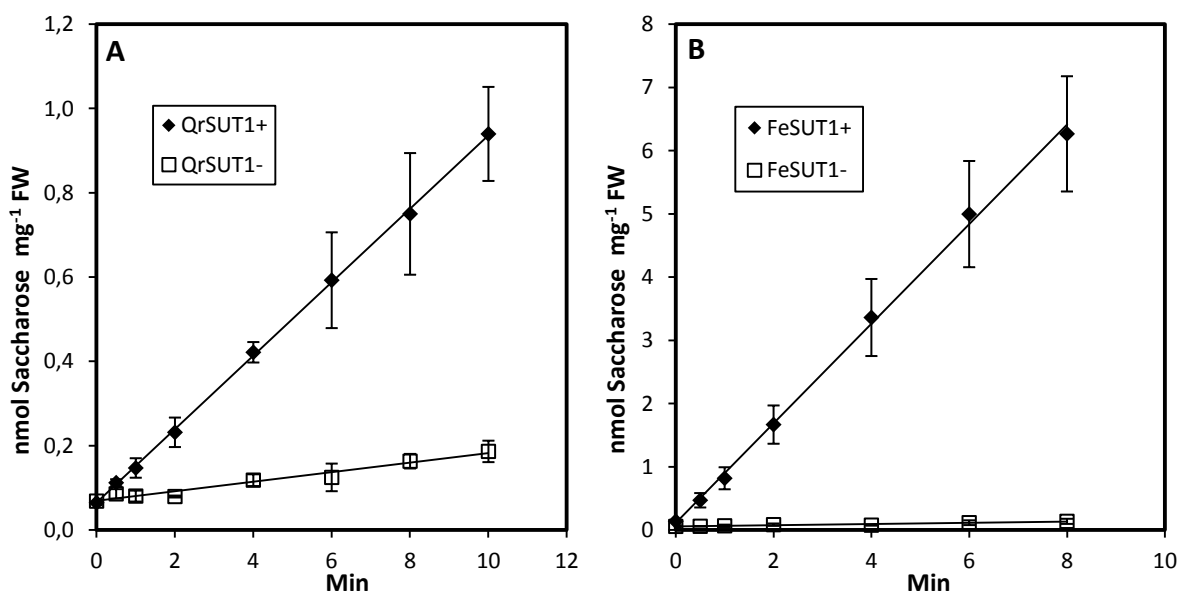


Fig. 3 Uptake of ^{14}C -sucrose into SEY2102 yeast cells that expressed either QrSUT1 (A) or FeSUT1 (B). The exogenous sucrose concentration was 1 mM and measurements were conducted three times with three different transformants.

For the determination of the K_M -values uptake experiments at pH 5.5 with sucrose concentrations from 50 mM to 1M were conducted. QrSUT1 had a K_M -value of $6,78 \pm 1,96$ mM sucrose whereas FeSUT1 had a K_M -value of $2,08 \pm 0,24$ mM sucrose (Fig. 4).

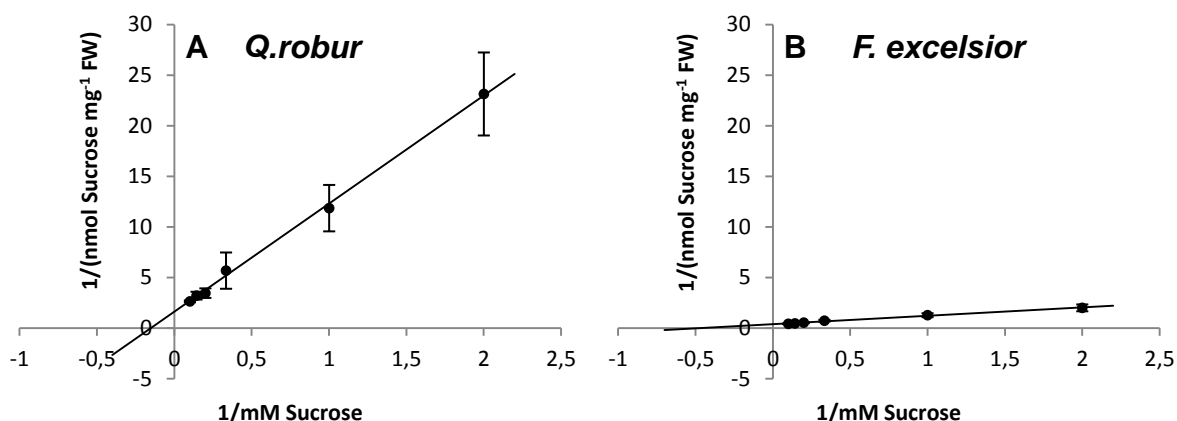


Fig. 4 Lineweaver-Burk-diagrams for the calculation of the K_M -values of QrSUT1 (A) and FeSUT1 (B).

Specificity of the antisera

Polyclonal antisera were raised by injecting specific protein carrier-coupled synthetic peptides into rabbits. The targeting sites of the resulting antibodies were an extracellular region connecting two TMDs from QrSUT1 and the central loop of FeSUT1. To test the specificity of the antisera plasma membranes of transgenic yeast cells were separated by SDS-PAGE and subsequently transferred to a nitrocellulose membrane where they were treated with the antisera. Specific binding of the antisera were made visible by using peroxidase coupled anti-Rabbit-IgG-antibodies (Fig. 5).

It appeared that the anti-QrSUT1-antiserum had no specific reactions which indicate that functional anti-QrSUT1-antibody was not available (Fig. 5, Lane 5-8). Analysis of the anti-FeSUT1-antiserum showed a single specific band at an apparent molecular weight of 43 kDa on the plasma membrane isolates from pNFeSUT1(+) transformants (Fig. 5, Lane 12). The corresponding band was missing on plasma membrane isolates from yeast cells that expressed *FeSUT1* in antisense direction (Fig. 5, Lane 11). Previous Western blot studies on SUTs showed that the calculated molecular weight was always higher than the molecular weight that appeared on the blotting membrane (Sauer and Stolz 1994, Gahrtz et al. 1994, Knop et al. 2004). This was also the case in this study in which the apparent molecular weight was about 11 kDa lower than the calculated weight which is typical for lipophilic membrane proteins (Sauer and Tanner 1984). On plasma membranes from pNQrSUT1(+) transformed yeast cells the anti-FeSUT1-antiserum showed a slight band with a molecular weight of 40 kDa (Fig. 5, lane 10) which was absent on the negative controls (Fig. 5, lane 9). The motif VVK from the peptide for the anti-FeSUT1-antiserum was also present in the central loop of QrSUT1 at the position 246-248 (Fig. 1). That was probably the reason for the cross reaction seen in Fig. 5 (lane 10).

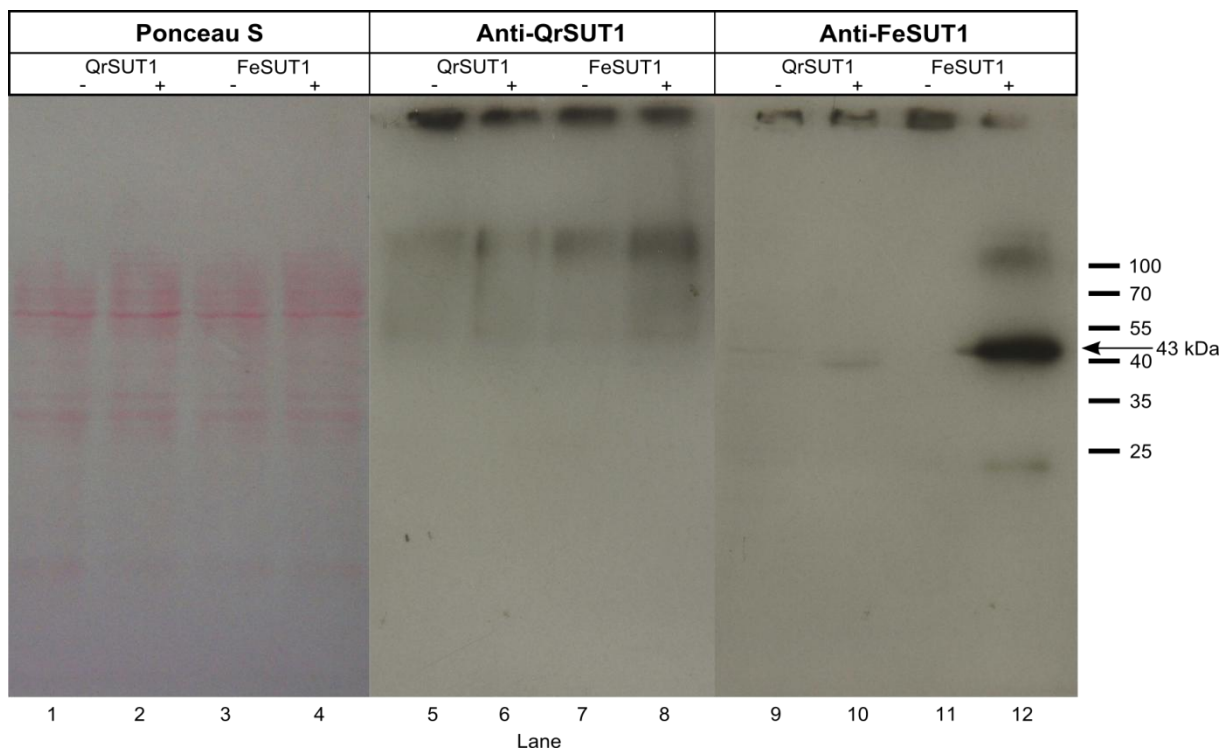


Fig. 5 Western blot analysis of antisera on isolated yeast plasma membranes. After SDS-PAGE the proteins were transferred on a nitrocellulose membrane and the success was controlled with Ponceau S staining (Lane 1-4). Anti-QrSUT1-antiserum showed no reaction on plasma membranes from yeast cells containing sense or antisense *QrSUT1* (Lane 5-8). The anti-FeSUT1-antiserum showed a strong specific band at 43 kDa on membranes from transgenic yeast that expressed *FeSUT1* in sense direction (Lane 12). A weaker band at 40 kDa occurred in *QrSUT1* sense transformants (Lane 10). The negative controls showed no reactions (Lane 9, 11).

Since anti-QrSUT1-antiserum showed no reaction on QrSUT1 the results shown hereafter are from the experiments on FeSUT1 with *F. excelsior*.

Immunolocalization of FeSUT1

To localize FeSUT1 on a cellular level anti-FeSUT1-antiserum was used on sections from leaves and petioles of *F. excelsior*. After incubation with anti-FeSUT1-antiserum and removal of remaining antiserum sections were stained with FITC-conjugated anti-Rabbit-IgG-antibody and observed under fluorescent light.

Figure 6 shows cross sections of the midrib of *F. excelsior*. As a negative control serum prior to immunization was used to exclude the possibility of non specific reactions (Fig 6A). Due to auto fluorescence cells containing phenolic compounds appeared red. In an overview section the FITC-labelled green cells were part of the transport phloem (Fig. 6B, 6C). The cells were of erratic shape and were adjacent to putative sieve-elements of the phloem which were identified by the sieve plate that could be detected in some cells (Fig. 6D).

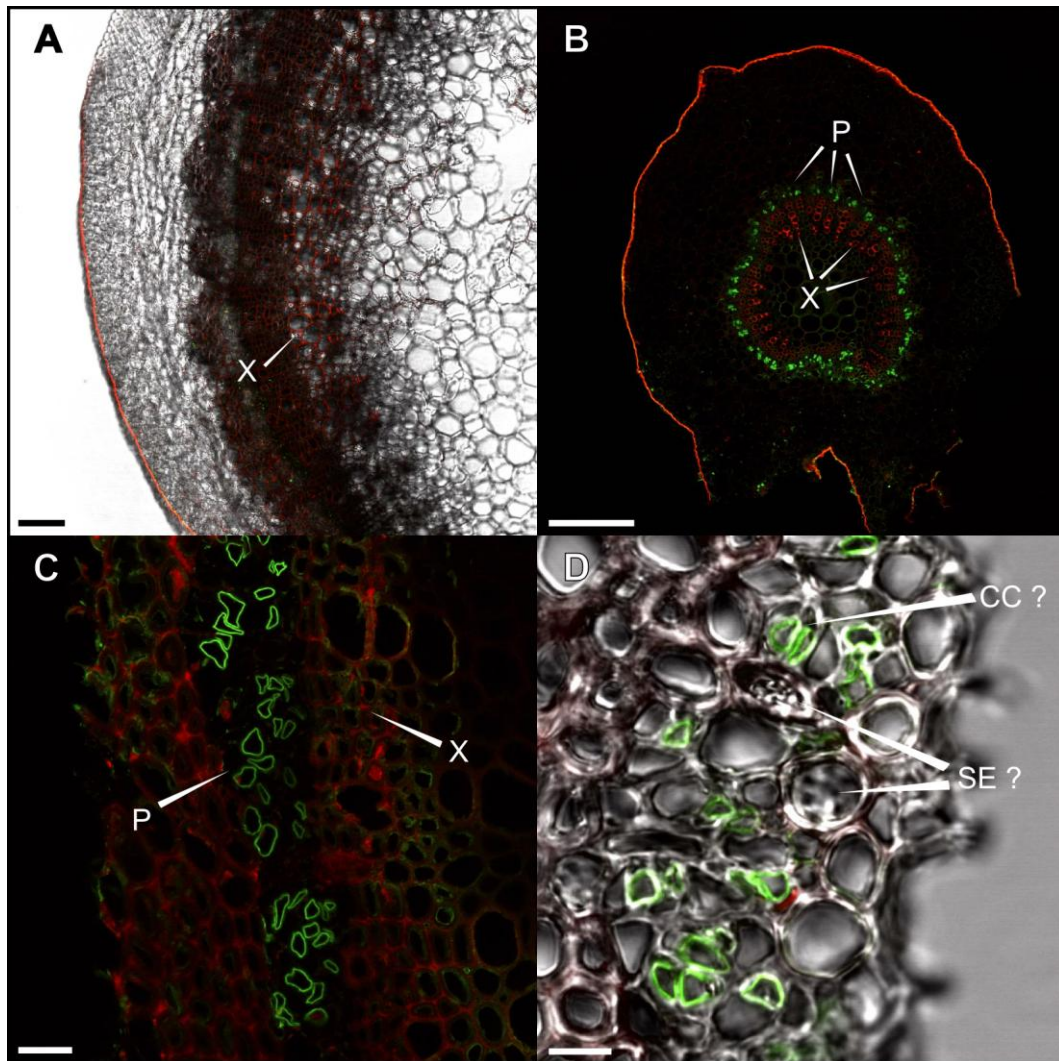


Fig. 6 Immunolocalization of FeSUT1 in leaflet midrib and rachis of *F. excelsior*. **A:** Cross section through the midrib of a leaflet of *F. excelsior* treated with pre anti-FeSUT1-antiserum and FITC coupled anti-Rabbit-IgG-antibody. The red autofluorescence of the Xylem (X) vessels was due to phenolic compounds in the cell walls. FITC induced green labelling was not seen. **B:** Overview of the same cross section treated with anti-FeSUT1-antiserum. Antibody binding was detected with secondary FITC-antibody. Labelling was seen in the circularly arranged transport phloem (P). **C:** Enlarged segment of the transport phloem in the rachis under fluorescence light. Irregular shaped cells of the phloem (P) were labelled green. **D:** Further enlarged segment of the transport phloem under normal- and fluorescence-light. FITC labelled cells were adjacent to putative sieve elements with sieve plates (SE) and therefore they were identified as putative companion cells (CC). Scale bars: A = 100 μm , B = 250 μm , C = 25 μm , D = 10 μm .

To further identify certain cell types longitudinal sections of the midrib of *F. excelsior* were stained with the nucleus marker 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in addition to the staining with FITC-antibody (Fig. 7). The resulting images showed that the cells that were labelled with anti-FeSUT1-antiserum and stained with FITC also harboured a nucleus and that FeSUT1 was localized at the plasma membrane of these cells (Fig. 7A). They were located nearby the xylem indicating that the cells are part of the phloem tissue. In cross sections however the localization of nuclei could not be determined with certainty (Fig. 7B).

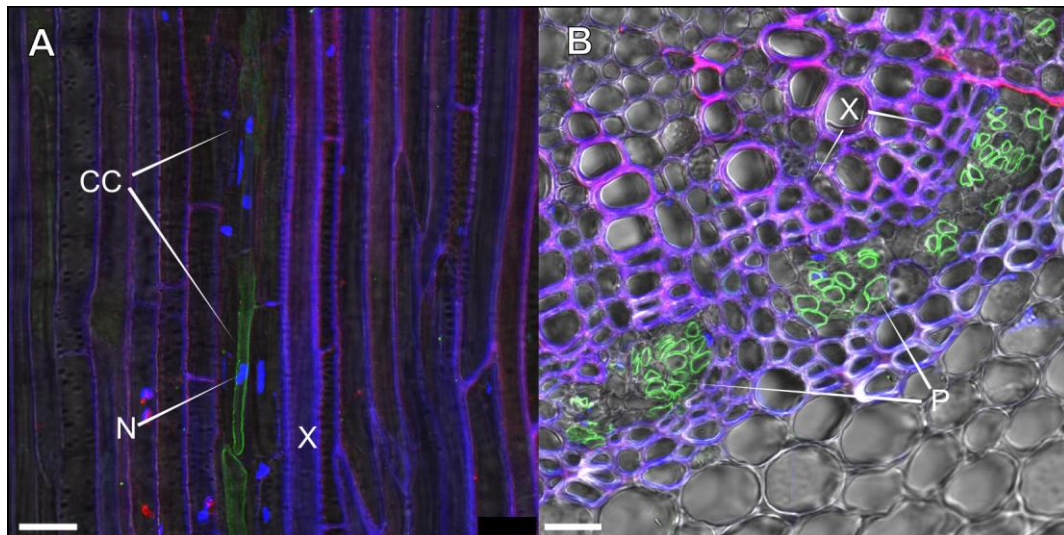


Fig. 7 Longitudinal and cross sections of the rachis of a *F. excelsior* leaf. Section were treated with anti-FeSUT1-antibody and stained with FITC coupled anti-Rabbit-IgG-antibody and DAPI. **A:** Overview of the longitudinal section. The green FITC labelling occurred in the transport phloem (P). Blue-purple label was caused by autofluorescence of phenolic compounds in the cell walls of the xylem vessels (X). **B:** Enlarged segment of the longitudinally cut transport phloem under fluorescence light. DAPI staining showed that the FITC labelled cells harbour a nucleus (N) and that they were probably companion cells (CC). **C:** Segment of a cross section of the rachis. FITC labelled cells were adjacent to Xylem vessels (X) and therefore part of the phloem (P). Scale bars: A = 50 μm , B, C = 25 μm .

The immunolocalization of FeSUT1 in minor veins was investigated in cross sections of leaflets of *F. excelsior* (Fig. 8). In accordance with previous results FITC induced green fluorescence was seen in the phloem sections of the vascular system (Fig. 8A). The minor veins contained marked cells that could be either companion cells, intermediary cells or sieve elements whereby a distinction between those cell types was not possible with light microscopy (Fig. 8B, 8C). Indications about the type of the cells could be raised by comparing the fluorescence images with electron micrographs of minor veins from the same order. Based on their disposition the anti-FeSUT1-antiserum marked cells are probably ordinary companion cells or sieve elements rather than intermediary cells (Fig. 8D).

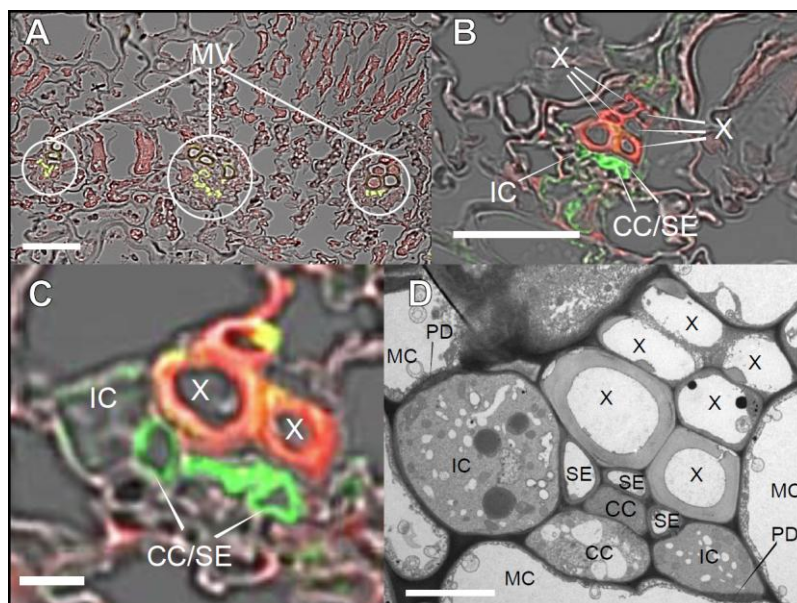


Fig. 8 Fluorescence and TEM images of minor veins in leaflets from *F. excelsior*. **A:** Cross section of a leaflet with three minor veins (MV). FITC labelled cells were located in the phloem. **B,C:** Images of minor veins containing xylem (X), intermediary cells (IC), companion cells (CC) and sieve elements (SE). Green labelled cells are either companion cells or sieve elements. **D:** Electron micrograph of a minor vein from the same order as B. The phloem cells were arranged in the same way and the cell types were identified from their structure. Two intermediary cells (IC) with dense cytoplasm and many mitochondria flank the vessel and possessed many plasmodesmata (PD) to the surrounding mesophyll cells (MCs). Companion cells (CCs) and sieve elements (SEs) were grouped together in the middle of the vein. Scale bars: A, B, C = 25 μm , D = 5 μm .

Discussion

Functional characterization of QrSUT1 and FeSUT1

Sucrose transporters play an important role in phloem loading and carbon partitioning in vascular plants (Sauer 2007, Reinders et al. 2012). Most research on SUTs has been performed on herbaceous species thus data about enzymatic properties from heterologous expressions are only available for these transporters. Type I SUTs are of special interest because they are primarily associated with phloem loading (Reinders et al. 2012). Only few SUTs from trees are described so far and in contrast to herbs type I SUTs isolated from trees were sink-specific. For instance, the SUTs BpSUC1 (*Betula pendula*, Wright et al. 2000) and CsSUT1 (*Citrus sinensis*, Li et al. 2003) were root-specific whereas JrSUT1 (*Juglans regia*, Decourteix et al. 2006) was confined to the xylem and PtaSUT1 (*Populus tremula x alba*, Payyavula et al. 2011) was found to be expressed mostly in the stem. The SUTs described in this study were isolated by means of RT-PCR from source leaf RNAs of *Q. robur* and *F. excelsior* and phylogenetic analysis revealed that these SUTs were members of the type I subgroup (Öner-Sieben and Lohaus 2014). The results gave reason to assume that QrSUT1 and FeSUT1 might play a role in phloem loading.

For the first time actual functional characterization of SUTs from trees was conducted in this study. Sucrose uptake measurements revealed that QrSUT1 and FeSUT1 catalyzed the

uptake of sucrose over a plasma membrane with K_M values of $6,78 \pm 1,96$ mM and $2,08 \pm 0,24$ mM sucrose at pH 5.5, respectively. These values were well in the range of reported K_M values for other SUTs (Table 1).

Type I SUTs have a high substrate affinity with K_M values between 0,1 mM and 2 mM. Most type II and type III SUTs have considerable lower substrate affinities and a greater variability in regard of the measured K_M values (Table 1, Kühn 2003, Shiratake 2007). Besides the structural similarities to other type I SUTs FeSUT1 had typical K_M values to SUT of this type. FeSUT1 showed great similarities to AmSUT1 from *Alonsoa meridionalis* which had a K_M value of 1,8 mM. Both species are members of the order Lamiales and they are characterized as putative mixed apoplastic and symplastic phloem loaders (Knop et al. 2001, Öner-Sieben and Lohaus 2014).

The affinity of QrSUT1 with a K_M value of 6,78 was much lower than the reported affinities for other SUTs and hence unusual for type I SUTs (Table 1). There is only one type I SUT from *Phaseolus vulgaris* that was functionally characterized in yeast that had an even higher K_M value of $8,75 \pm 0,8$ mM sucrose (PvSUT1, Zhou et al. 2007). However, this transporter was expressed exclusively in the seed coats (Zhou et al. 2007) whereas QrSUT1 was isolated from source leaves. By using the transcriptom for the isolation of SUTs it is most likely to get the SUT subtype that is predominantly expressed in the given tissue. Several RT-PCR attempts showed that the same type I SUT sequence was obtained from source leaves of *Q. robur* and we therefore assumed that this was the dominantly expressed SUT (data not shown). QrSUT1 was also expressed in sink tissue but highest expression levels were measured in source leaves (data not shown). K_M values similar to the one of QrSUT1 were reported for some tonoplast localized type III SUT and for sink specific type II SUT (Table 1). In contrast to all other SUTs, type III SUTs have an amino acid motif of the sequence LXXLL at their C-terminus, which is probably a vacuolar signaling peptide (Reinders et al. 2012). The absence of this motif together with the phylogenetic analysis that confined QrSUT1 to type I SUTs and the strong expression in source tissue supports the hypothesis that QrSUT1 is a type I SUT that is probably involved in phloem loading.

Table 1 K_M values of QrSUT1 and FeSUT1 compared with values of known SUTs from the literature.

Species	Transporter	Type	K_M	Protein-ID	Reference
<i>Fraxinus excelsior</i>	FeSUT1	I	2,08 ± 0,24 mM	AHB33870	
<i>Quercus robur</i>	QrSUT1	I	6,78 ± 1,96 mM	AHB33871	
<i>Asarina barclaiana</i>	AbSUT1	I	0,5 mM	AAF04294	Knop et al. 2001a
<i>Alonsoa meridionalis</i>	AmSUT1	I	1,8 mM	AAF04295	Knop et al. 2004
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtSUC1	I	0,5 mM	CAA53147	Sauer und Stolz 1994
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtSUC2	I	0,77 mM	CAA53150	Sauer und Stolz 1994
<i>Daucus carota</i>	DcSUT2	I	0,5 mM	CAA76369	Shakya und Sturm 1998
<i>Medicago truncatula</i>	MtSUT1	I	1,7 mM	AFM28284	Doidy et al. 2012
<i>Plantago major</i>	PmSUC2	I	1 mM	CAA53390	Gahrtz et al. 1994
<i>Phaseolus vulgaris</i>	PvSUT1	I	8,5 ± 0,7 mM	ABB30164	Zhou et al. 2007
<i>Ricinus communis</i>	RcScr1	I	2 mM	CAA83436	Weig und Komor 1996
<i>Spinacia oleracea</i>	SoSUT1	I	1,5 mM	CAA47604	Riesmeier et al. 1992
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtSUT2	IIA	11,7 mM	CAB92307	Meyer et al., 2000, Schulze et al. 2000
<i>Plantago major</i>	PmSUC3	IIA	5,5 ± 1,1 mM	CAD58887	Barth et al. 2003
<i>Hordeum vulgare</i>	HvSUT1	IIB	7,5 mM	CAJ20123	Weschke et al. 2000
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtSUT4	III	11,6 ± 0,6 mM	AAL59915	Weise et al. 2000
<i>Daucus carota</i>	DcSUT1a	III	0,5 mM	CAA76367	Shakya und Sturm 1994
<i>Hordeum vulgare</i>	HvSUT2	III	5 mM	CAB75881	Weschke et al. 2000
<i>Lotus japonicus</i>	LjSUT4	III	12,9 mM	CAD61275	Flemetakis et al. 2003, Reinders et al. 2008
<i>Oryza sativa</i>	OsSUT2	III	1,86 ± 0,38 mM	BAC67163	Eom et al. 2011

Type I SUTs from herbaceous species typically possess low K_M values therefore QrSUT1 showed unusually high K_M values. Since data about functional type I SUTs are only available from herbaceous species one can only speculate about possible causes. Other than the possibility of insufficient expression of QrSUT1 in yeast there could be intrinsic factors specific for woody species. Trees have many physiological features that distinguish them from herbs. Besides growth form the sugar concentration in tree leaves are much higher (Fu et al. 2011, Öner-Sieben and Lohaus 2014) and the flow rates of the phloem in the sieve tube are up to five times slower compared to those in herbaceous plants (Jensen et al. 2012). Hence, it is conceivable to assume that SUTs involved in apoplastic phloem loading in trees dispose of lower substrate affinity because of higher sugar concentrations in mesophyll cells and slow phloem flow rates in comparison to herbaceous species. That could be a part of the regulatory system for SUTs in trees. The transporter FeSUT1 from *F. excelsior* however had typical biochemical features of a type I SUT that fit well into the postulated high affinities of SUTs involved in phloem loading (Table 1) (Kühn 2003). Based on the fact that *F. excelsior* is probably a mixed apoplastic and symplastic phloem loader with a strong bias

towards latter similar to *A. meridionalis*, it is imaginable that this transporter may have features comparable to type I SUTs from herbs. There could be differences between SUTs from apoplastic and symplastic phloem loading tree species. Unfortunately, there are no data available regarding type I SUTs for either symplastic phloem loaders besides *A. meridionalis* (Knop et al. 2004) or other trees.

Specificity of the raised antisera

To study the cell-specific localization of the characterized SUTs specific antibodies were raised in rabbits. The resulting antisera were tested on isolated plasma membranes from transgenic yeast expressing either QrSUT1 or FeSUT1. A single band of 43 kDa was recognized by the anti-FeSUT1-antiserum on FeSUT1 expressing yeast whereas no specific reaction was detectable for anti-QrSUT1-antiserum (Fig. 5). The functionality of peptide antibodies strongly depends on the selected peptide sequence. Based on topology predictions a peptide sequence for QrSUT1 was selected that was localized directly at a predicted TMD (Fig. 1). Hence prediction accuracy varies based on the used algorithms and databases between 54 % and 95 % (McGuffin et al. 2000, Jones 2007, Nugent and Jones 2009, Buchan et al. 2013). It is possible that an unsuitable peptide might have been selected to raise antibodies against QrSUT1. Additionally, the targeted extracellular loop region was relatively short (19 aa, predicted) which could have prevented binding of a possible functional antibody due to spatial problems. In result there was no functional anti-QrSUT1-antibody available. The observed cross reaction in figure 5 from anti-FeSUT1-antiserum with plasma membrane from yeast expressing QrSUT1 in sense direction could not be used to localize QrSUT1 on a cellular level (data not shown).

Localization of FeSUT1

As expected from the strong reaction of anti-FeSUT1-antiserum on plasma membranes from pNFeSUT1(+) transformed yeast cells (Fig. 5) the antiserum successfully marked cells of both the transport phloem and the minor veins of *F. excelsior* (Fig. 6 – Fig. 8). FeSUT1 expressing cells of the transport phloem were identified as companion cells based on the observation of a nucleus in green fluorescing cells in longitudinal sections (Fig. 7A). Sucrose transporters that were localized in the transport phloem were described in several other species like tomato, potato, tobacco, rice and plantain (Kühn et al. 1997, Weise et al. 2000, Barth et al. 2003, Scofield et al. 2007, Liesche et al. 2010). They are probably involved in the retrieval of sucrose that leaked out of the sieve tubes into the lateral tissue (van Bel 2003). While some parts of the leaked sucrose are designated for the supply of the surrounding tissue with carbohydrates, other parts of the sugars are transported back into the phloem to maintain a strong concentration gradient that drives the bulk flow (De Schepper et al. 2013).

The loss of sucrose is driven by the high phloem pressure that is build up by very high sucrose concentrations up to 1 M (Nadwodnik and Lohaus 2008, Öner-Sieben and Lohaus 2014). In the phloem sap of *F. excelsior* sucrose concentrations of about 400 mM were also very high, thus leakage of sucrose was very likely (Öner-Sieben and Lohaus 2014). In the mixed symplastic and apoplastic phloem loading Scrophulariaceae *A. meridionalis* the type I SUT AmSUT1 was also found to be expressed in the transport phloem (Knop et al. 2004). AmSUT1 was expressed in both CCs and SEs whereas FeSUT1 was expressed exclusively in the CCs. The retrieval mechanism and the role of the involved cell types remain to be fully understood.

Immunolocalization of sucrose transporters that were involved in phloem loading has been described in several species (Sauer and Stolz 1994, Stadler et al. 1995, Sauer and Stadler 1996, Schmitt et al. 2008). In the minor veins of *F. excelsior* FeSUT1 was expressed in cells of the phloem that could either be CCs or SEs (Fig. 8). A distinction through light microscopy was not possible. The phloem anatomy of the minor veins was typical for putative symplastic phloem loading species with two ICs flanking the vein that additionally contained one or two ordinary CCs (Turgeon et al. 1975, 1983, Fisher 1986, Hoffmann-Thoma et al. 2001, Turgeon and Medville 2004, Knop et al. 2004). The polymer trapping mechanism occurs in the ICs where sucrose gets metabolized to RFOs and transported into the phloem sap (Turgeon et al. 1993, Öner-Sieben and Lohaus 2014). In RNA *in situ* hybridization studies on *A. meridionalis* Voitsekhovskaja et al. (2009) showed that the gene for stachyose-synthase *AmSTS1* was exclusively expressed in the ICs whereas AmSUT1 was located at the plasmamembrane of the ordinary CCs. Each cell type provides an apoplastic or symplastic phloem loading pathway and that also seems to be true for *F. excelsior*. From comparison of the FITC labelled cells in the minor veins of *F. excelsior* with electron micrographs from veins of the same order it can be presumed that the expression of FeSUT1 was confined to CC/SEs rather than ICs (Fig. 8C, Fig. 8D). Furthermore, the presence of a nucleus and adjacent sieve elements in labelled cells of the transport phloem suggested that these cells were CCs. This result led to the conclusion that the FeSUT1 expressing cells in the minor veins were also CCs, similar to the findings in *A. meridionalis* (Knop et al. 2004, Voitsekhovskaja et al. 2009). Therefore *F. excelsior* possesses both active symplastic and active apoplastic phloem loading pathways like it was reported for other putative symplastic phloem loaders (Knop et al. 2004, Gil et al. 2011).

Conclusion

Heterologous expression of *QrSUT1* and *FeSUT1* in yeast showed that both sequences code for functional SUTs. The sequences were obtained from RNA isolates from source leaves suggesting that both type I SUTs were dominantly expressed. *QrSUT1* had high K_M

values which were unusual for type I SUTs whereas the K_M value of FeSUT1 was typical for type I SUTs. Immunolocalization of FeSUT1 revealed that this transporter was expressed in transport phloem and in the minor veins of *F. excelsior* where it was most likely located in the CCs. In the minor veins the transporter plays a role in apoplastic phloem loading whereas expression in the transport phloem indicates a role in the leakage-retrieval mechanism for sucrose.

The results presented here show that phloem loading of sucrose or sucrose retrieval in the putative symplastic phloem loader *F. excelsior*, could occur at least partially via the apoplast. It is not clear which environmental conditions have an influence on the extent of the two types of phloem loading but it is possible that this feature probably provides more flexibility in regard to environmental changes. To fully understand assimilate transport in putative symplastic phloem loaders more information is needed on the structure, function and regulation of plasmodesmata and sugar transporters.

References

- Barker L, Kühn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward J, Frommer W.** 2000. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* **12**, 1153–1164.
- Barth I, Meyer S, Sauer N.** 2003. PmSUC3: characterization of a SUT2/SUC3-type sucrose transporter from *Plantago major*. *Plant Cell* **15**, 1375–1385.
- Braun D, Slewinski T.** 2009. Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. *Plant Physiology* **149**, 71–81.
- Buchan D, Minneci F, Nugent T, Bryson K, Jones D.** 2013. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research* **41**, W349–W357.
- Chen L, Qu X, Hou B, Sosso D, Osorio S, Fernie A, Frommer W.** 2012. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* **335**, 207–211.
- Davidson A, Keller F, Turgeon R.** 2011. Phloem loading, plant growth form, and climate. *Protoplasma* **248**, 153–163.
- De Schepper V, De Swaef T, Bauweraerts I, Steppe K.** 2013. Phloem transport: a review of mechanisms and controls. *Journal of Experimental Botany* **64**, 4839–4850.
- Decourteix M, Alves G, Brunel N, Améglio T, Guillio A, Lemoine R, Pétel G, Sakr S.** 2006. JrSUT1, a putative xylem sucrose transporter, could mediate sucrose influx into xylem parenchyma cells and be up-regulated by freeze-thaw cycles over the autumn-winter period in walnut tree (*Juglans regia* L.). *Plant, Cell and Environment* **29**, 36–47.
- Doidy J, van Tuinen D, Lamotte O, Corneillat M, Alcaraz G, Wipf D.** 2012. The *Medicago truncatula* sucrose transporter family: characterization and implication of key members in carbon partitioning towards arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Plant* **5**, 1346–1358.
- Emr S, SCHEKMAN R, FLESSEL M, THORNER J.** 1983. An Mf Alpha-1-suc2 (alpha-factor-invertase) Gene Fusion For Study of Protein Localization and Gene-expression In Yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-biological Sciences* **80**, 7080–7084.
- Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters S, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmidt U.** 2006. Identification of a vacuolar sucrose transporter in

- barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiology* **141**, 196–207.
- Eom J, Cho J, Reinders A, Lee S, Yoo Y, Tuan P, Choi S, Bang G, Park Y et al.** 2011. Impaired function of the tonoplast-localized sucrose transporter in rice, OsSUT2, limits the transport of vacuolar reserve sucrose and affects plant growth. *Plant Physiology* **157**, 109–119.
- Flemetakis E, Dimou M, Cotzur D, Efrose R, Aivalakis G, Colebatch G, Udvardi M, Katinakis P.** 2003. A sucrose transporter, LjSUT4, is up-regulated during *Lotus japonicus* nodule development*. *Journal of experimental botany* **54**, 1789–1791.
- Frost C, Nyamdari B, Tsai C, Harding S.** 2012. The tonoplast-localized sucrose transporter in *Populus* (PtaSUT4) regulates whole-plant water relations, responses to water stress, and photosynthesis. *PLoS One* **7**, e44467.
- Fu Q, Cheng L, Guo Y, Turgeon R.** 2011. Phloem loading strategies and water relations in trees and herbaceous plants. *Plant Physiology* **157**, 1518–1527.
- Gahrtz M, Stolz J, Sauer N.** 1994. A phloem-specific sucrose-H⁺ symporter from *Plantago major* L. supports the model of apoplastic phloem loading. *The Plant Journal* **6**, 697–706.
- Gamalei Y.** 1991. Phloem Loading and Its Development Related To Plant Evolution From Trees To Herbs. *Trees - Structure and Function* **5**, 50–64.
- Gamalei Y.** 1989. Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs A taxonomic review. *Trees - Structure and Function* **3**, 96–110.
- Geiger D.** 2011. Plant sucrose transporters from a biophysical point of view. *Molecular Plant* **4**, 395–406.
- Giaquinta R.** 1977. Sucrose Hydrolysis in Relation to Phloem Translocation in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* **60**, 339–343.
- Giaquinta R.** 1979. Phloem loading of sucrose: involvement of membrane ATPase and proton transport. *Plant Physiology* **63**, 744–748.
- Gil L, Yaron I, Shalitin D, Sauer N, Turgeon R, Wolf S.** 2011. Sucrose transporter plays a role in phloem loading in CMV-infected melon plants that are defined as symplastic loaders. *The Plant Journal* **66**, 366–374.

- Goggin F, Medville R, Turgeon R.** 2001. Phloem loading in the tulip tree. Mechanisms and evolutionary implications. *Plant Physiology* **125**, 891–899.
- Hoffmann-Thoma G, van Bel A, Ehlers K.** 2001. Ultrastructure of minor-vein phloem and assimilate export in summer and winter leaves of the symplasmically loading evergreens *Ajuga reptans* L., *Aucuba japonica* Thunb., and *Hedera helix* L. *Planta* **212**, 231–242.
- Jensen K, Liesche J, Bohr T, Schulz A.** 2012. Universality of phloem transport in seed plants. *Plant, Cell and Environment* **35**, 1065–1076.
- Jones D.** 2007. Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information. *Methods Of Biochemical Analysis* **23**, 538–544.
- Knop C.** 2001. Zur Bedeutung von Saccharose-Transportern in Pflanzen mit offener Phloemanatomie. Dissertation, Universität Göttingen.
- Knop C, Stadler R, Sauer N, Lohaus G.** 2004. AmSUT1, a sucrose transporter in collection and transport phloem of the putative symplastic phloem loader *Alonsoa meridionalis*. *Plant Physiology* **134**, 204–214.
- Knop C, Voitsekhovskaja O, Lohaus G.** 2001. Sucrose transporters in two members of the Scrophulariaceae with different types of transport sugar. *Planta* **213**, 80–91.
- Kühn C.** 2003. A comparison of the sucrose transporter systems of different plant species. *Plant Biology* **5**, 215–232.
- Kühn C, Quick W, Schulz A, Riesmeier J, Sonnewald U, Frommer W.** 1996. Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. *Plant, Cell and Environment* **19**, 1115–1123.
- Laemmli U.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lauterbach C, Niedermeier M, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N.** 2007. Immunolocalization of the PmSUC1 Sucrose Transporter in *Plantago major* Flowers and Reporter-Gene Analyses of the PmSUC1 Promoter Suggest a Role in Sucrose Release from the Inner Integument. *Plant Biology* **9**, 357–365.
- Lemoine R, Kuehn C, Thiele N, Delrot S, Frommer W.** 1996. Antisense inhibition of the sucrose transporter in potato: effects on amount and activity. *Plant, Cell and Environment* **19**, 1124–1131.

- Li C, Weiss D, Goldschmidt E.** 2003. Effects of carbohydrate starvation on gene expression in citrus root. *Planta* **217**, 11–20.
- McGuffin L, Bryson K, Jones D.** 2000. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**, 404–405.
- Meyer S, Lauterbach C, Niedermeier M, Barth I, Sjolund R, Sauer N.** 2004. Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from *Arabidopsis* sieve elements and sink tissues. *Plant Physiology* **134**, 684–693.
- Meyer S, Melzer M, Truernit E, Hümmer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N.** 2000. AtSUC3, a gene encoding a new *Arabidopsis* sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *The Plant Journal* **24**, 869–882.
- Münch E.** 1930. Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Gustav Fischer, Jena.
- Nadwodnik J, Lohaus G.** 2008. Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta* **227**, 1079–1089.
- Nugent T, Jones D.** 2009. Transmembrane protein topology prediction using support vector machines. *BMC Bioinformatics* **10**, 159.
- Öner-Sieben S, Lohaus G.** 2014. Apoplastic and symplastic phloem loading in *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior*. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1905–1916.
- Payyavula R, Tay K, Tsai C, Harding S.** 2011. The sucrose transporter family in *Populus*: the importance of a tonoplast PtaSUT4 to biomass and carbon partitioning. *Plant Journal* **65**, 757–770.
- Reidel E, Rennie E, Amiard V, Cheng L, Turgeon R.** 2009. Phloem loading strategies in three plant species that transport sugar alcohols. *Plant Physiology* **149**, 1601–1608.
- Reinders A, Sivitz A, Starker C, Gantt J, Ward J.** 2008. Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar sucrose transporter from *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology* **68**, 289–299.
- Reinders A, Sivitz A, Ward J.** 2012. Evolution of plant sucrose uptake transporters. *Frontiers in Plant Science* **3**, 22.

- Rennie E, Turgeon R.** 2009. A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 14162–14167.
- Riesmeier J, Willmitzer L, Frommer W.** 1994. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO Journal* **13**, 1–7.
- Riesmeier J, Willmitzer L, Frommer W.** 1992. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO Journal* **11**, 4705–4713.
- Sauer N.** 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters* **581**, 2309–2317.
- Sauer N, Stadler R.** 1993. A sink-specific H⁺/monosaccharide co-transporter from *Nicotiana tabacum*: cloning and heterologous expression in baker's yeast. *Plant Journal* **4**, 601–610.
- Sauer N, Stolz J.** 2000. Membrane Transport: Practical Approach Series. 79-105.
- Sauer N, Stolz J.** 1994. SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *The Plant Journal* **6**, 67–77.
- Sauer N, Tanner W.** 1984. Partial Purification and Characterization of Inducible Transport Proteins of *Chlorella*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **114**, 367–375.
- Schmitt B, Stadler R, Sauer N.** 2008. Immunolocalization of solanaceous SUT1 proteins in companion cells and xylem parenchyma: new perspectives for phloem loading and transport. *Plant Physiology* **148**, 187–199.
- Schneider S, Hulpke S, Schulz A, Yaron I, Höll J, Imlau A, Schmitt B, Batz S, Wolf S et al.** 2012. Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters. *Plant Biology* **14**, 325–336.
- Schulze W, Weise A, Frommer W, Ward J.** 2000. Function of the cytosolic N-terminus of sucrose transporter AtSUT2 in substrate affinity. *FEBS Letters* **485**, 189–194.
- Scofield G, Hirose T, Aoki N, Furbank R.** 2007. Involvement of the sucrose transporter, OsSUT1, in the long-distance pathway for assimilate transport in rice. *Journal of Experimental Botany* **58**, 3155–3169.

- Shakya R, Sturm A.** 1998. Characterization of source- and sink-specific sucrose/H⁺ symporters from carrot. *Plant Physiology* **118**, 1473–1480.
- Shiratake K.** 2007. Genetics of Sucrose Transporter in Plants. *Genes, Genomes and Genomics* **1**, 73-80.
- Sivitz A, Reinders A, Ward J.** 2005. Analysis of the transport activity of barley sucrose transporter HvSUT1. *Plant and cell physiology* **46**, 1666–1673.
- Slewinski T, Zhang C, Turgeon R.** 2013. Structural and functional heterogeneity in phloem loading and transport. *Frontiers in Plant Science* **4**, 244.
- Stadler R, Brandner J, Schulz A, Gahrtz M, Sauer N.** 1995. Phloem Loading by the PmSUC2 Sucrose Carrier from *Plantago major* Occurs into Companion Cells. *The Plant Cell* **7**, 1545–1554.
- Truernit E.** 2001. Plant physiology: The importance of sucrose transporters. *Current Biology* **11**, R169–R171.
- Turgeon R, Beebe D, Gowan E.** 1993. The intermediary cell: Minor-vein anatomy and raffinose oligosaccharide synthesis in the Scrophulariaceae. *Planta* **191**, 446-456.
- Turgeon R, Gowan E.** 1990. Phloem Loading in *Coleus blumei* in the Absence of Carrier-Mediated Uptake of Export Sugar from the Apoplast. *Plant Physiology* **94**, 1244–1249.
- Turgeon R, Medville R.** 2004. Phloem loading. A reevaluation of the relationship between plasmodesmatal frequencies and loading strategies. *Plant Physiology* **136**, 3795–3803.
- Turgeon R, Medville R.** 1998. The absence of phloem loading in willow leaves. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America-physical Sciences* **95**, 12055–12060.
- Turgeon R, Webb J, Evert R.** 1975. Ultrastructure of minor veins in *Cucurbita pepo* leaves. *Protoplasma* **83**, 217-232.
- van Bel A.** 2003. Transport phloem: low profile, high impact. *Plant Physiology* **131**, 1509–1510.

- van Bel A, Ammerlaan A, van Dijk A.** 1994. A 3-step Screening-procedure To Identify the Mode of Phloem Loading In Intact Leaves - Evidence For Symplasmic and Apoplasmic Phloem Loading Associated With the Type of Companion Cell. *Planta* **192**, 31–39.
- Voitsekhovskaja O, Rudashevskaya E, Demchenko K, Pakhomova M, Batashev D, Gamalei Y, Lohaus G, Pawlowski K.** 2009. Evidence for functional heterogeneity of sieve element-companion cell complexes in minor vein phloem of *Alonsoa meridionalis*. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1873–1883.
- Weig A, Komor E.** 1995. An active sucrose carrier (Scr1) that is predominantly expressed in the seedling of *Ricinus communis* L. *Journal of plant physiology* **147**, 685–690.
- Weise A, Barker L, Kühn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer W, Ward J.** 2000. A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell* **12**, 1345–1355.
- Weschke W, Panitz R, Sauer N, Wang Q, Neubohn B, Weber H, Wobus U.** 2000. Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *The Plant Journal* **21**, 455–467.
- Wright D, Scholes J, Read D, Rolfe S.** 2000. Changes in carbon allocation and expression of carbon transporter genes in *Betula pendula* Roth. colonized by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. *Plant, Cell and Environment* **23**, 39–49.
- Zhou Y, Qu H, Dibley K, Offler C, Patrick J.** 2007. A suite of sucrose transporters expressed in coats of developing legume seeds includes novel pH-independent facilitators. *Plant Journal* **49**, 750–764.

4.4 Abschnitt IV: Expression und Regulation von *QrSUT1* und *FeSUT1*

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse zu dem Teilprojekt „Einfluss Umweltfaktoren und Pflanzeninternen Bedingungen auf den Zuckerstoffwechsel und die die SUT-Expression“ dargestellt. Untersucht wurden verschiedene Organe bzw. Gewebe von *Q. robur* und *F. excelsior*, saisonale Einflüsse und die Wirkung von Licht-/Dunkel-Bedingungen. Das Manuskript ist zur Einreichung bei einer Fachzeitschrift fertig gestellt.

Title page

Title: Influence of seasons and light conditions on carbon partitioning and expression of sucrose transporters *QrSUT1* and *FeSUT1* in *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior*

Authors: Soner Öner-Sieben email: oener@uni-wuppertal.de
Gertrud Lohaus* email: lohaus@uni-wuppertal.de

Phone: +49 202 439 2521

Adress: Molekulare Pflanzenforschung/Pflanzenbiochemie
Bergische Universität Wuppertal
Gaußstraße 20, D-42119 Wuppertal, Germany

Keywords: carbon partitioning, *Fraxinus excelsior*, *Quercus robur*, seasonal influence, sucrose transporters, sugars

*Author to whom correspondence should be addressed

Abstract

In temperate woody species, carbon transport from source to sink tissues is a striking physiological process, particularly considering seasonal changes. During season the functions of different tissues can alternate. In this regard, phloem loading and sugar distribution are important aspects of carbon partitioning. Therefore, the influence of seasons and different light dark regimes on sugar distribution and expression of sucrose uptake transporters in *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior* were analysed. Tissue specific sugar contents and distributions in leaves during growing season and under different light and dark regimes were determined by HPLC. The respective expression patterns of the sucrose transporters *QrSUT1* and *FeSUT1* were measured by qRT-PCR.

Raffinose family oligosaccharides were present in *F. excelsior* alongside with sucrose, hexoses and high amounts of mannitol, whereas in *Q. robur* mainly sucrose and hexoses were found. Sugar contents and distributions altered strongly in different tissues (bark, wood, roots, sink leaves, source leaves) of both species during seasons. High expression levels of *QrSUT1* in bark, wood and source leaves indicated its importance for phloem loading and sucrose retrieval. Expression patterns of *FeSUT1* also indicated its function in sucrose retrieval and a flexible expression in all tissues depending on physiological requirements and environmental conditions. In *F. excelsior* *FeSUT1* could be involved in a shift from symplastic to apoplastic phloem loading mechanisms.

During growing season, the composition of sugars in leaves of both tree species varied and the sugar content started to decrease towards senescence. Sucrose transporters, *QrSUT1* and *FeSUT1*, were expressed throughout the whole growing season and the expression pattern showed an increase when senescence started indicating elevated carbon export from leaves.

In regard to the expression of *QrSUT1* and *FeSUT1* during a light-dark period data indicated that both transporters were regulated by circadian rhythms rather than light.

Introduction

Deciduous trees are highly integrated systems of different source tissues and of competing carbohydrate sinks. Effective and reliable delivery of carbohydrates from photosynthetic active leaf tissues to heterotrophic sink tissue such as roots, flowers or seeds is of major importance for plant growth. Plants produce a variety of sugars in different compositions and while some of them are for storage purposes others mainly function as transport vehicles for energy and carbon (sucrose is the major transport form). Indeed, as much as 50-70 % of the CO₂ photoassimilated in a mature leaf of herbal plants is transported out of the leaf during the light period (Riens et al 1994). The bulk of the carbohydrate pool moves to sinks through the phloem. Zimmermann and Ziegler (1975) showed in a survey of leaf exudates that sugar composition characterises plants on a family level. The regulation of sugar production and delivery through the phloem is one option for plants to react to environmental and seasonal changes. This is especially true for woody species because of their long lifespan and exposure to potentially extreme climate changes during annual cycles in temperate forests. However, the regulation processes involved in carbon partitioning in trees are far from understood since most research regarding phloem loading as a regulatory step in carbohydrate delivery is performed on herbaceous species.

Phloem loading in trees

Three different phloem loading mechanisms have been described in plants: i) Active apoplastic phloem loading with sucrose being translocated from the apoplast into the sieve element-companion cell complex (SE-CCC) against a concentration gradient by sucrose uptake transporters (SUTs) (Riesmeier et al. 1994, Sauer 2007). These plant species have few plasmodesmata connecting the minor vein phloem to surrounding cells and they were referred to as closed minor vein type (type 2; Gamalei 1989). ii) Active symplastic loading where sucrose diffuses from mesophyll cells (MCs) through branched plasmodesmata into intermediary cells (ICs) of the minor vein phloem. In the ICs sucrose together with galactinol is the substrate for synthesis of raffinose family oligosaccharides (RFOs) (Turgeon and Gowan 1990). These oligosaccharides are larger than sucrose and are unable to diffuse back. iii) Phloem loading via passive diffusion of sucrose from MCs to the SE-CCC (Turgeon and Medville 1998). Due to higher plasmodesmatal connectivity between cells of minor vein phloem in several tree species it was assumed that trees are primarily passive phloem loaders (Davidson et al. 2011). Gamalei (1989) categorized these species to the open minor vein type (type 1). Minor veins that belong to the open type 1 group are heterogeneous in regard to the companion cells (CCs). Hence, the type 1 group was further divided into type 1 (IC) with intermediary cells with abundant, highly branched plasmodesmata that are typical for RFO loaders and type 1 (CC) with ordinary CCs, but with a higher frequency of

symmetrical plasmodesmata on the MC or BSC interface compared to CCs from type 2 minor veins (Davidson et al. 2011).

The genus *Quercus* is categorized as being a putative passive loader because it belongs to the open minor vein type 1 (CC) (Gamalei 1989; Fu et al. 2011). However, uphill sucrose gradients between the cytosol of mesophyll cells and the phloem indicated that phloem loading in *Q. robur* is probably active (Öner-Sieben and Lohaus 2014). Moreover, sucrose uptake transporters were also expressed in source leaves of *Q. robur* (Öner-Sieben and Lohaus 2014). *Liriodendron tulipifera* also indicated as a type 1 (CC) tree species that was initially thought to be a passive loader was, in fact, an active apoplastic phloem loading species (Goggin et al. 2001). Apparently, phloem loading strategies are not necessarily predictable based on minor vein structures.

The minor veins of Oleaceae family members show also abundant plasmodesmatal connections but instead of CCs they contain intermediary cells (type 1 (IC)), which are typical for RFO translocating species (Turgeon et al. 1993, Knop et al. 2001, Voitsekhovskaja 2006, Davidson et al. 2011). In *Fraxinus excelsior*, the phloem is loaded actively both symplastically with the production of RFOs and apoplastically by the activity of sucrose uptake transporters (Öner-Sieben and Lohaus 2014). A mixed phloem loading mechanism in one plant species seems to be a more general feature (Voitsekhovskaja et al. 2009, Slewinski et al. 2013).

Sucrose transporters are highly regulated and important in carbon partitioning

Sucrose transporters play an important role in apoplastic phloem loading in higher plants (Sauer 2007, Reinders et al. 2012). They are categorized into type I, II and III due to structural and relational homologies (Reinders et al. 2012). Type I and some of type II SUTs are being associated with apoplastic phloem loading. Experimental evidence shows that suppression of these SUTs in different species leads to several phenotypical abbreviations such as high accumulation of sugars in the leaves and decreased growth (Riesmeier et al. 1994, Gottwald et al. 2000). Besides SUTs that are localized at the plasma membrane of cells in the minor veins (Stadler and Sauer 1996) type III SUTs are mainly found at the tonoplast of mesophyll cells where they are believed to be involved in sucrose efflux out of the vacuole into the cytosol (Endler et al. 2006, Frost et al. 2012).

Due to their important role in carbon allocation, SUT expression in herbs is tightly regulated on several levels (Vaughn et al. 2002, Ainsworth and Bush 2011, Liesche et al. 2011). A brought variety of factors has an impact on SUT expression such as temperature, sugar concentrations, hormones or pathogens (Decourteix et al. 2006, Henry et al. 2011, Gil et al. 2011). Circadian as well as diurnal rhythms have also been shown to regulate SUT expression (Shakya and Sturm 1998, Chincinska et al. 2008).

Most of the information on SUT localization, functioning and regulation derived from studies on herbaceous plants. Only a few transporters have been described in trees so far, including *BpSUC1* from *Betula pendula* (Wright et al. 2000), *JrSUT1* from *Juglans regia* (Decourteix et al. 2006), *MdSUT1* from *Malus x domestica* (Fan et al. 2009) and several SUT genes from *Populus spec* (Payyavula et al. 2011). The only transgenic approach to investigate the role of abundantly expressed SUT in trees was carried out in poplar (Payyavula et al. 2011). The results of RNAi experiments indicated that intercellular sucrose partitioning and sucrose efflux from source tissue into the phloem are modulated by tonoplast located PtaSUT4, acting as a valve. This finding is in accordance with the postulated passive phloem loading strategy in Salicaceae such as willow (Turgeon and Medville 1998). However, based on previous studies phloem loading in both *Q. robur* and *F. excelsior* is probably active and phylogenetic analysis of the isolated sucrose transporters from source-leave RNAs classified them as putative plasmalemma localized type I SUTs (Öner-Sieben and Lohaus 2014).

Sugars in tree leaves

In tree leaves sucrose, fructose and glucose are the predominant sugars (Hoch et al. 2003, Fu et al. 2011; Öner-Sieben and Lohaus 2014). In some tree families RFOs or sugar alcohols can also be important carbohydrate compounds (Nadwodnik and Lohaus 2008). The phloem sap of most trees primarily contains sucrose but sugar alcohols and RFOs are additionally found in particular families (Zimmermann and Ziegler 1975, Nadwodnik and Lohaus 2008; Öner-Sieben and Lohaus 2014). Compared to herbs, the sugar content in leaves of trees is higher. Furthermore the overall osmolality of leaf sap of trees is higher, mostly due to lower water content and a higher concentration of organic acids (Fu et al. 2011, Öner-Sieben and Lohaus 2014). The sugar contents in the different organs or tissues of trees are regulated by different environmental factors, e.g. seasonal conditions (Barbaroux and Bréda 2002, Hoch et al. 2003), light conditions (Maunoury et al. 2007), temperature (Palonen et al. 2000, Rennenberg et al. 2006), drought (Guicherd et al. 1997, Leuzinger et al. 2005) or flooding (Jaeger et al. 2009, Ferner et al. 2012). Woody plants accumulate carbohydrates during periods of excess production and deplete carbohydrates when the rate of utilization exceeds the rate of assimilation. In temperate climates sugars may become depleted during the dormant season when photosynthetic tissues are shed (Hoch et al. 2003). Another period of sugar depletion could be the phase of growth in spring, when carbon demand may exceed carbon supply by photosynthesis.

Our study is focused on the tissue specific sugar distribution and SUT expression in *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior* during season. To investigate further environmental conditions, which influence sugar distribution and regulation of SUT expression, plants were monitored during growing season as well as under different light-dark regimes.

Material and Methods

Plant material and experimental design

For the experiments, trees from a small forest nearby the campus (51° 14' 42" N, 7° 9' 5" E) and 3-year old saplings that were held in 5 l pots in an open greenhouse were used. Pots were filled with soil that was dug out from a mixed forest (near Wuppertal, Germany). Plant material was obtained from a nursery (Baumschule Selders, Hilden, Germany). Sidewalls of the greenhouse were made of wire to allow free airflow. Roof windows were opened as far as possibly so that rain but also heating was avoided. Experiments were designed as follows: A) Tissue specific samples were taken from three 3-year old saplings that were held in 5 l pots. Samples were taken in winter on the 9th of January 2013 (T = -4 °C), in spring on the 25th of April 2013 (T = 18 °C) and in summer on the 25th of July 2013 (T = 29 °C), every time in the second half of the light period. Samples were stored at -80 °C until analysis. B) For the seasonal monitoring leaves of three 30-year old trees were sampled every month over a course of three years from 2009 to 2012. Leaves were taken at about 2-3 m height after 6-8 h of daylight and were stored at -80 °C until analysis. C) For the light and dark experiments leaves were taken from three 3-year old saplings. Experiments were conducted on the 18th to 20th of July in 2012 with plants in the greenhouse described above. The weather was warm and partly cloudy with about 25 °C air temperature and 56 % humidity. The first set of leaves was taken 8 h after illumination. After the normal light period of 14 h three plants of each species were translocated in a completely dark room with air temperature of about 21 °C and humidity of about 58%. Leaf samples were taken after 5 h, 17 h and 43 h of darkness.

Extraction of sugars from whole leaves

Leaves were ground to a fine powder with pestle and mortar in liquid nitrogen. Water-chloroform-methanol extracts were prepared according to Riens et al. (1991).

Sugar analysis

Sugars and sugar alcohols in tissue extracts were analyzed by HPLC. An ion exchange column (CarboPac10; Dionex Corp, Sunnyvale, CA, USA) was eluted isocratically with 100 mM NaOH buffer (Flow rate: 0.8 ml min⁻¹) for 35 min (Knop et al. 2001). Sugars were detected by a pulse amperometric detector with a gold electrode (ESA Model 5200 Coulochem II; Bedford, USA). Pulse setting was 50, 700 and -800 mV for 500, 540 and 540 ms, respectively. Sugar standards were measured at every run, and sugar extracts were diluted sufficiently to provide signals within the linear range of the detector response (50-500 µM). The metabolite amount was calculated from the peak area using the Peaknet software (Version 5.1; Dionex, Idstein, Germany).

Quantitative RT-PCR

RNA from different tissues was isolated using a modified protocol from Chang et al. (1993). Plant material was ground to a fine powder with mortar and pestle in liquid nitrogen. For RNA extraction about 200 mg of powder was used. To avoid any false positive signals from DNA contaminations during the PCR reactions, 2 µg of total RNA was treated with RNase free DNase I and 1 µg RNA was used for cDNA synthesis using the ReverdAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo; St. Leon-Rot, Germany) with Oligo(dT)₁₈ primer. The 20 µl cDNA mix was filled up to 100 µl with double distilled water and 4 µl were used for each 20 µl PCR reaction with SYBR green (Maxima SYBR Green qPCR Master Mix, Thermo; St. Leon-Rot, Germany) in a Mx3005P qPCR System (Agilent; Waldbronn, Germany) using the software MxPro Version 4.10. The slopes of standard curves of 2-fold dilutions were used to determine the efficiencies of PCR reactions. A two-step PCR program with a subsequent dissociation run was used: Initial denaturation for 10 min at 95 °C, followed by 45 cycles of a denaturation step at 95 °C for 10 s and a combined annealing and elongation step for 30 s at 60 °C. Following primer sets with corresponding amplicon length of 235 bp (*Actin*), 151 bp (*QrSUT1*) and 127 bp (*FeSUT1*) were used: *Actin for.* AGA GAT TCC GTT GCC CAG AA; *Actin rev.* GCC ACA ACC TTA ATC TTC ATG C; *QrSUT1 for.* CGC CGT AGA CCC TTT ATT; *QrSUT1 rev.* AAA ACC CAA CCA CAA ACA; *FeSUT1 for.* GCT CTC CTT GTT GAC TCC; *FeSUT1 rev.* ATT GTC ACT GTA GTA GCC A. Primersequences were designed with the software PerlPrimer Version 1.1.21 (<http://perlprimer.sourceforge.net/download.html>). Relative initial mRNA concentrations of both *QrSUT1* ([KF736982](#)) in *Q. robur* and *FeSUT1* ([KF736981](#)) in *F. excelsior* were estimated by normalizing expression levels to the housekeeping gene *Actin* ([AM063027](#)), which has been shown to be stable amongst different developmental stages and seasonal growth in *Quercus suber* (Marum et al. 2012). The first sample of each experiment was used as a calibrator, which was set to one, and further samples are given as relative expression levels to the calibrator.

Statistical analyses

To estimate the probability of the mean values of the sampled tissues a Student's t-Test with $P = 0.05$ was performed. Because values were obtained from samples of the same plants at different stages of a certain experiment or developmental stage a paired t-Test was conducted.

Results

Tissue specific sugar contents and expression of SUTs in winter, spring and summer

Sugars that were analyzed by HPLC include: Sugar alcohols (SuAlc: myo-inositol, galactinol, mannitol, sorbitol), hexoses (Hex: glucose, fructose), sucrose (Suc), raffinose family oligosaccharides (RFO: raffinose, stachyose, verbascose) and maltose (Mal). Sugar contents in different tissues and during different seasons showed a similar pattern for *Q. robur* and *F. excelsior* (Fig. 1A and B). The overall sugar contents were highest in bark (up to 500 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW) and wood (up to 200 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW) in winter (Fig. 1A and 1B). However, the sugar composition was very different in both species. Bark and wood tissue of *Q. robur* in winter contained mainly sucrose and hexoses and a lower portion of RFOs whereas in *F. excelsior* sucrose, hexoses, sugar alcohols (almost exclusively mannitol) and RFOs were found (Fig. 1A and 1B). In spring, sugar contents in all tissues (bark, wood, root, sink leaves and source leaves) of both species were much lower (below about 80 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW with the exception of *Q. robur* sink leaves with 111 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW). In summer the sugar contents were increased in bark, wood and roots in both species in relation to spring (Fig. 1A and 1B) whereas the contents in source leaves were similar or slightly lower. The sugar composition was also very different in particular tissues of both species. Tissue of *Q. robur* contained mainly sucrose and hexoses and traces of RFOs whereas in *F. excelsior* sucrose, hexoses, sugar alcohols (mainly mannitol) and smaller portions of RFOs were found. It should be noted that small amounts of RFOs and maltose in *Q. robur* were only present in winter and spring, respectively.

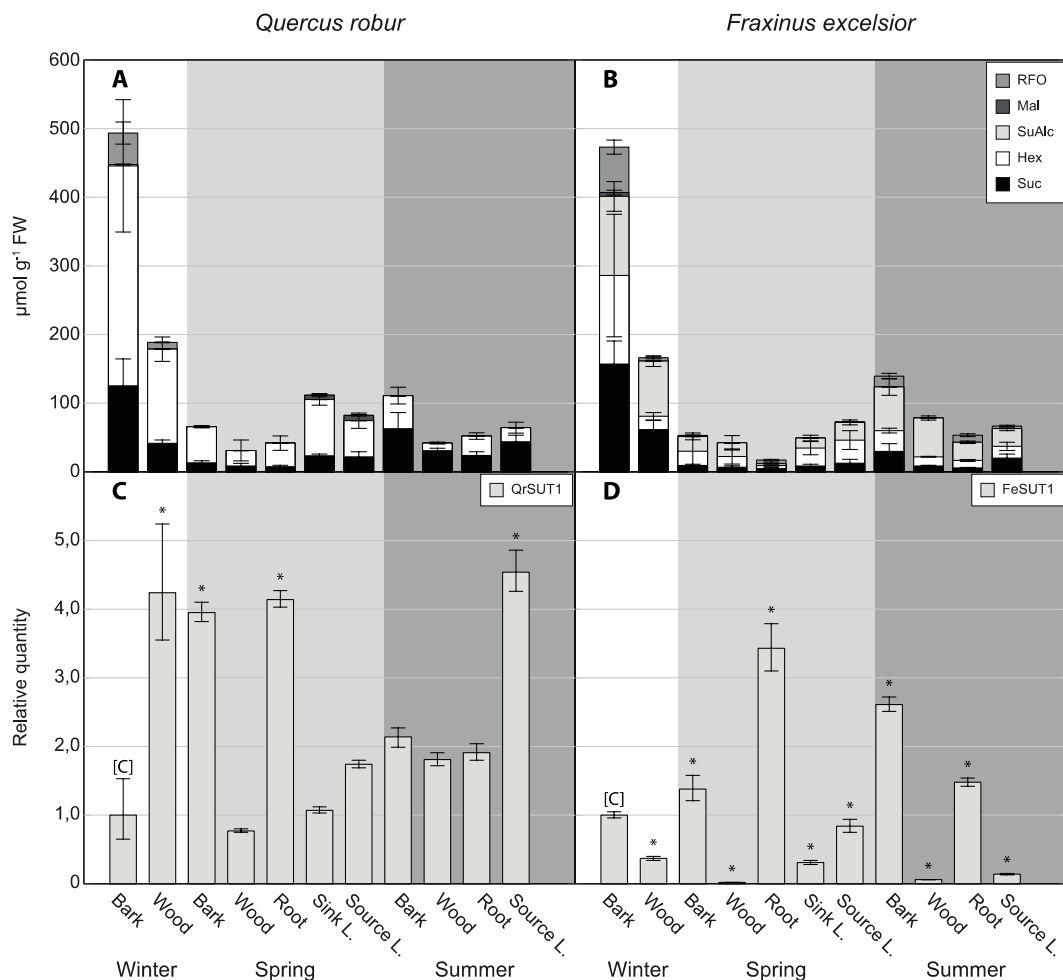


Fig. 1 Total sugar content, tissue specific sugar composition and expression of *QrSUT1* and *FeSUT1* in *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior*. Samples were taken from three 3-year old saplings per species in an open greenhouse. Expression levels were normalized to *Actin* and values are given as relative expression levels to the first sample of the measurement (calibrator [C]). Mal: Maltose; Hex: Hexoses; RFO: Raffinose-oligosaccharide family sugars; SuAlc: Sugar alcohols; Suc: Sucrose. A-B: Tissue specific sugar composition during winter, spring and summer in *Q. robur* (A) and *F. excelsior* (B). C-D: Tissue specific expression levels of *QrSUT1* (C) and *FeSUT1* (D) during winter, spring and summer. Expression levels of SUTs were normalized to *Actin* and values are given as relative expression levels to the first sample of the measurement (calibrator [C]). Student's t-Test was performed with $P \leq 0.05$ to test for significance of changes compared to calibrator [C].

Full length cDNA of SUTs were cloned from *Q. robur* (*QrSUT1*) and *F. excelsior* (*FeSUT1*) recently (Öner-Sieben and Lohaus 2014). These sequences were obtained with degenerated primers by RNA isolates from mature source leaves. This approach ensured that statistically the most abundantly expressed transcript of a SUT-homolog was isolated even if different homologs were present. The isolating procedure was conducted several times with different samples and the isolated sequence were always the same (data not shown). In the study of Payyavula et al. (2011) PtaSUT4 was by far the most abundantly expressed SUT in mature leaves of poplar whereas other SUT-homologs were weakly expressed. The SUT-sequences were derived from the genome sequence data of *Populus* and not from a transcriptome analysis. Therefore specific primers for each SUT have been designed. The goal in the current study was to determine the expression pattern of the abundantly expressed SUT in oak as well as in ash, which were both type-I SUTs and not like in poplar

type-III. Specific primers for these transporters were generated and used for the expression analyses (see Material and Methods). Expression values of SUTs are given relative to the expression of the first collected bark sample. Significant differences between the mean values of samples and the calibrator [C] of each experiment were calculated using Student's t-Test with $P = 0.05$ and were marked with asterisks in the diagrams. Even though the pattern of sugar contents in the different tissues during the seasons was similar in both species the expression pattern of the respective sucrose transporter was very different. The relative expression pattern of *QrSUT1* showed the highest levels in wood from winter, bark and root from spring and source leaves from summer with values about 4-fold higher than the calibrator level of bark from winter (Fig. 1C). In wood and sink leaves from spring samples, the expression levels were nearly the same as the calibrator (Fig. 1C). The expression in source leaves from spring was on a comparable level with expression levels found in bark, wood and root tissue from the samples taken in summer. In source leaves the expression level increased by about 2-fold from spring to summer (Fig. 1C).

FeSUT1 expression showed a strong tissue specific variation with highest expression levels in roots sampled in spring and bark tissue from summer (Fig. 1D). In bark tissue the expression level of *FeSUT1* increased from winter to spring and was highest in summer. Lowest expression levels were found in wood during the whole season, in sink leaves from spring and source leaves from summer (Fig. 1D). It should be emphasised that the expression level of *FeSUT1* in source leaves decreased to about one-tenth from spring to summer.

Sugar distribution and SUT expression in leaves during growing season

Leaves of about 30 years old *Q. robur* and *F. excelsior* contained similar contents of sugars (40 to 50 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW; Fig. 2 A and B). The sugar content decreased in autumn (October or November). The high values of standard deviation (SD) are due to the fact that samples were taken from three different individual plants in their natural environment over a course of three years (always at the same time of the day (14 o'clock) and the same date of the month without regard to outside temperature, humidity or hours of sunshine). Both species contained different sugars and sugar alcohols whose distribution varied during growing season. In *Q. robur* sucrose (30 % to 65 %) and hexoses (34 % to 63 %) were the main sugars (Fig. 2C). Sugar alcohols, almost exclusively mannitol, was the dominant carbohydrate in leaves of *F. excelsior* throughout the whole year with higher proportions in the second half of the growing season (38-65 %), followed by hexoses (hex) and sucrose (Fig. 2D). RFOs started with 1.5 % in May and were stable at about 6 % until November where the amount rose up to 10 % (Fig. 2D).

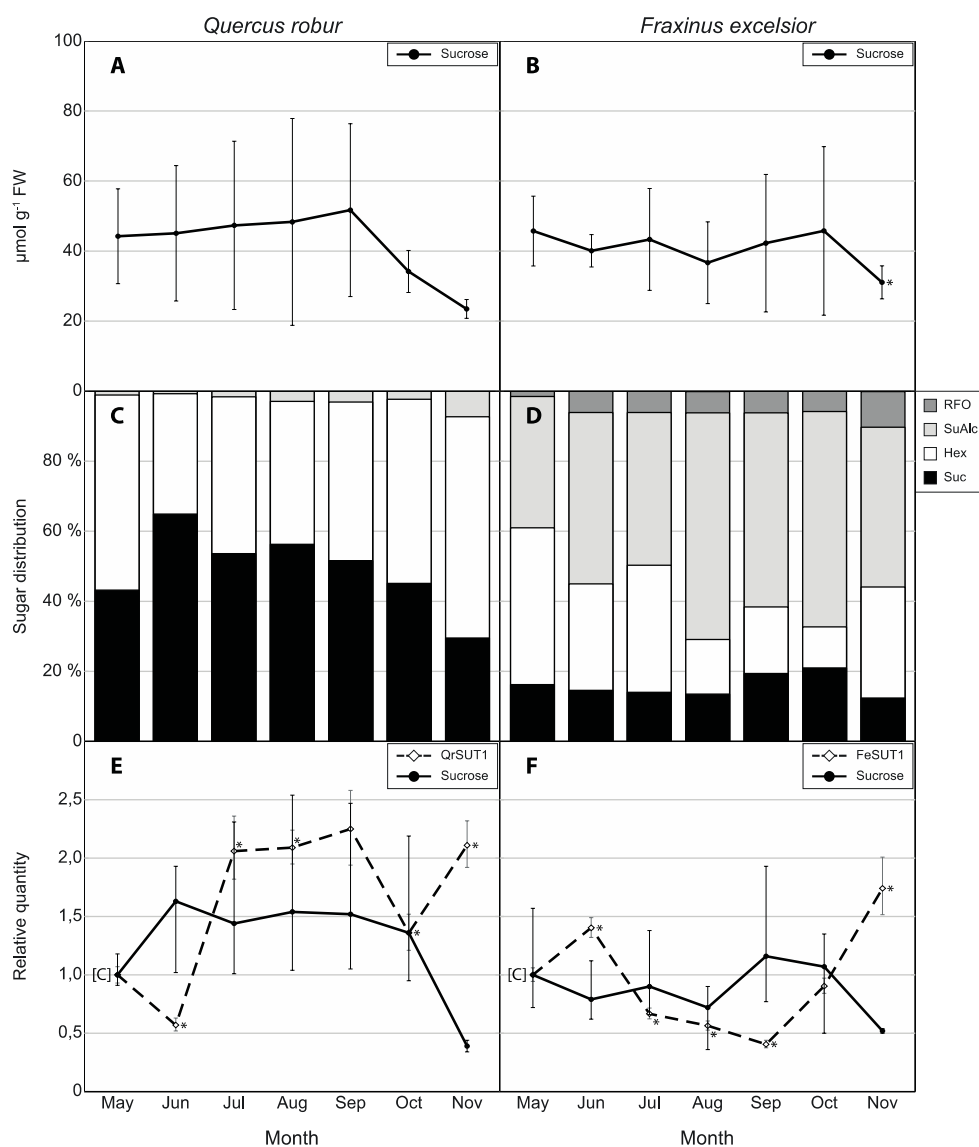


Fig. 2 Sugar composition in leaves of *Quercus robur* and *F. excelsior* and expression of *QrSUT1* and *FeSUT1* during growing season. Samples were taken over a period of 3 (2010-2012) years from three individual trees per species from a 25 to 30-year old forest. Expression levels of SUTs were normalized to *Actin* and values are given as relative expression levels to the first sample of the measurement (calibrator [C]). RFO: Raffinose-oligosaccharide family sugars; SuAlc: Sugar alcohols; Hex: Hexoses; Suc: Sucrose. A-B: Process of whole sugar content during growing until senescence in oak (A) and ash (B). C-D: Amount of sugars of whole sugar content in oak (C) and ash (D). E-F: Relative sucrose content compared to relative expressions of *QrSUT1* (E) and *FeSUT1* (F). Student's t-Test was performed with $P \leq 0.05$ to test for significance of changes compared to calibrator [C].

Both *QrSUT1* and *FeSUT1* were constantly expressed in the leaves during the whole growing season. Relative expressions of *QrSUT1* in leaves of 30 year old *Q. robur* trees were about double in summer than in spring (Fig. 2E). Similar results were also shown for leaves of 3-year old saplings (see Fig. 1B). In autumn, expression was reduced by one third and subsequently increased to previous expression levels (Fig. 2E). Sucrose content was also higher in summer in comparison to May and sank in November (Fig. 2E). At this time leaves, showed strong signs of senescence (the colour was green-brown). Expression of *FeSUT1* shows the opposite pattern to that of *QrSUT1*. *FeSUT1* expression was higher in spring and early summer (May, June) and lower in summer (July, August, September).

Similar results were also shown for leaves of 3-year old saplings (see Fig. 1D). In the second half of autumn, the expression level increased again (Fig. 2F). Sucrose content was similar in spring and summer (May, June, July, August) and increased in late summer and autumn (August, September) (Fig. 2F). In leaves from November (leaves had shown strong signs of senescence) sucrose content decreased whereas expression level of *FeSUT1* increased about 4-fold from September to November.

Influence of light and dark on SUT expression and sugar content

After transferring plants into continuous darkness sugar content started to decline in leaves of both species (Fig. 3A, 3B). Nevertheless, the sugar content in leaves of both species was still two-thirds of the values found in illuminated leaves after 43h of darkness. The composition of sugars in *Q. robur* changed slightly in darkness with increased portions of sucrose as well as sugar alcohols and decreased portions of hexoses (Fig. 3C). In *F. excelsior* the sugar composition also changed slightly during darkness. Both mannitol and hexoses increased whereas RFOs and sucrose had lower proportions of the total sugar content (Fig. 3D). A comparison of SUT expression in *Q. robur* with sucrose content showed that *QrSUT1* expression first decreased in darkness and then increased before it decreased again whilst sucrose content began to decrease after 5 h until 43 h of darkness (Fig. 3E). The expression of *FeSUT1* compared with sucrose content in *F. excelsior* is shown in Fig. 3F. Like the whole sugar content, sucrose content decreased after illumination stopped. In contrast, expression of *FeSUT1* increased after 17 h of darkness and was highest after 43 h in dark (Fig. 3F).

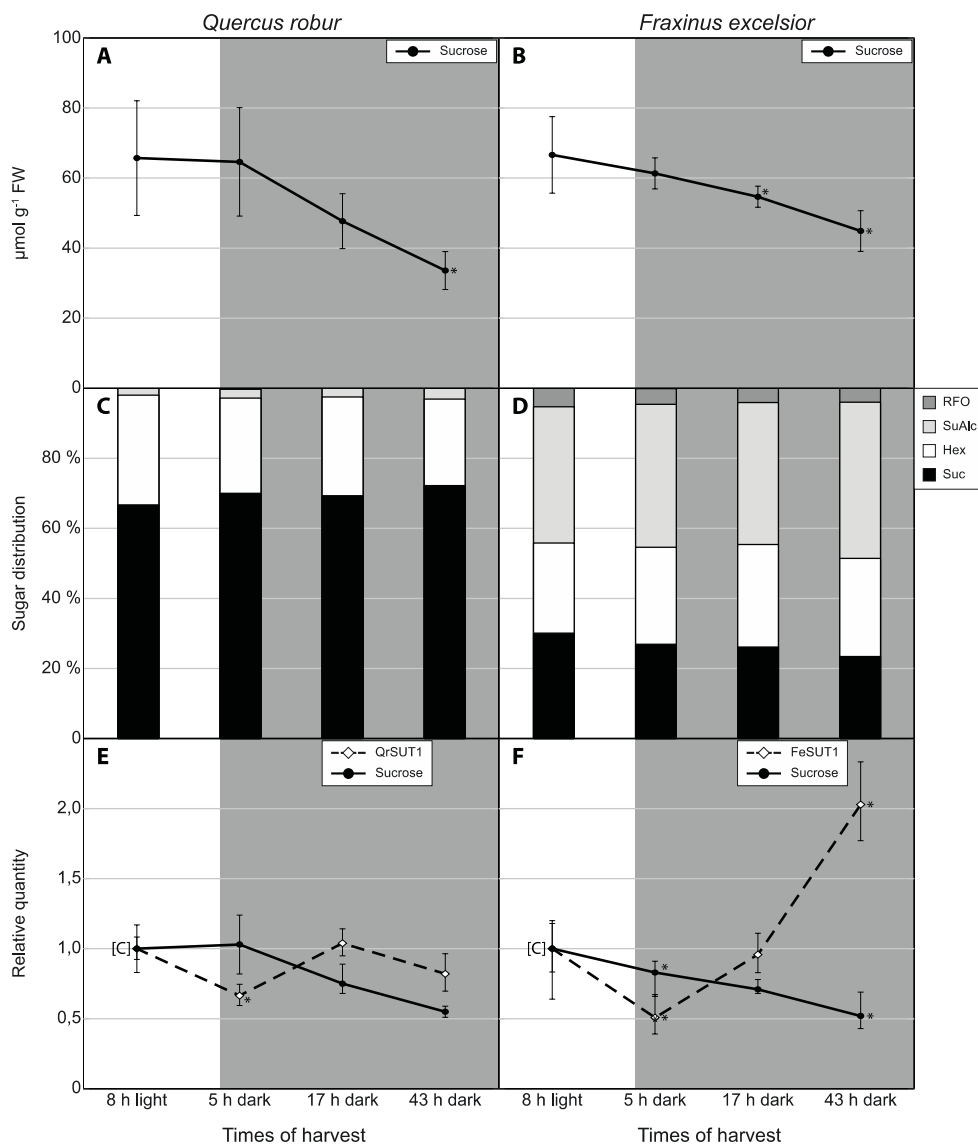


Fig. 3 Sugar composition and expression of *QrSUT1* and *FeSUT1* in *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior* in light period and permanent darkness. Samples were taken 8 h after illumination and 5, 17 and 43 h of darkness. Three 3-year old plants per species were held in an open greenhouse for 8 h at day light and then were taken into a completely dark room for 43 h. Expression levels of SUTs were normalized to *Actin* and values are given as relative expression levels to the first sample of the measurement (calibrator [C]). RFO: Raffinose-oligosaccharide family sugars; SuAlc: Sugar alcohols; Hex: Hexoses; Suc: Sucrose. A-B: Process of whole sugar content after 14 h of light exposure following by 43 h permanent darkness in *Q. robur* (A) and *F. excelsior* (B). C-D: Amount of sugars of whole sugar content in *Q. robur* (C) and *F. excelsior* (D). E-F: Relative sucrose content compared to relative expression levels of *QrSUT1* (E) and *FeSUT1* (F). Student's t-Test was performed with $P \leq 0.05$ to test for significance of changes compared to calibrator [C].

Discussion

Influence of season on tissue specific expression of SUTs and sugar content in Q. robur and F. excelsior

Very high sugar contents in winter tissues up to 500 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW in bark and up to 200 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW in wood (Fig. 1A, 1B) of both species were most likely correlated with the acquisition of cold tolerance (Siminovitch et al. 1953). Especially RFOs are important in this regard (Palonen et al. 2000). In fact, in winter RFOs were present in bark and in smaller amounts in wood of *Q. robur* whereas no RFOs were found in spring or summer (Fig. 1A). In *F. excelsior* RFO contents were also higher in winter bark and wood than in other samples which also accounts for the acquisition of cold resistance (Fig. 1B). In walnut trees the sugar concentrations of the xylem sap were negatively correlated with the air temperature (Améglio et al. 2004). This is probably also true for *Q. robur* and *F. excelsior* (Fig. 1A, 1B).

Measuring SUT-activity with *qRT-PCR* is a commonly used method to determine expression levels and possible regulatory and functional mechanisms (Chinchinska et al. 2008, 2013, Payyavula et al. 2011, Deol et al. 2013). The activity of *QrSUT1* in winter wood of *Q. robur* indicated that besides maintaining basal physiological functions, especially in wood, sucrose transport was probably enhanced (Fig. 1C). In *Populus*, expression of the type I SUT *PtaSUT3* was also strongest in wood, especially in xylem vessels and fibre cells (Payyavula et al. 2011). Decourteix et al. (2006) showed that the sucrose transporter *JrSUT1* was most strongly expressed in vessel-associated cells (VACs) in the winter xylem of *Juglans regia*. Data indicated that *JrSUT1* was involved in sucrose retrieval from xylem vessels after a freeze-thaw cycle. It is highly speculative from the available data to make conclusions about the possible role of *QrSUT1* in the wood tissue. However it should be noted that like in other species type-I SUTs seem to be an important factor in xylem physiology in *Q. robur*. There are several possible mechanisms that in theory make an active transport for sugars necessary (Sauter 1983, van Bel 1990).

The expression level of *QrSUT1* in the bark of *Q. robur* was high during the whole season but highest in spring (Fig. 1C). Phloem in bark tissue is probably more involved in long distance transport of metabolites than in phloem loading. According to Münch's theory (1930), the phloem transport is defined by the turgor pressure difference between sources and sinks and influenced by the resistance of the phloem pathway. In respect of this theory, the phloem pressure in trees should be higher than in herbs since the required pressure difference increases with the resistance of the sieve tubes and, hence, the plant's length (De Schepper et al. 2013). However, measured values of phloem pressure in trees were lower than in herbs (Wright and Fisher 1980). Based on these contradictions several alternative

hypotheses were discussed. It has been speculated that the proposed translocation pathway could be composed of series of shorter, overlapping sieve tubes with apoplastic loading steps. Or apoplastic loading steps could be present at the sieve plates of sieve tubes which are as long as the plant's axis (van Bel 2003; De Schepper 2013). Retrieval of sucrose by SUTs has also been discussed to be an important mechanism to compensate sucrose leakage from sieve elements in the whole transport phloem (Minchin and Thorpe 1987). The leakage-retrieval mechanism controls the pressure gradient between sources and sinks and therefore the flow between them. Thus, the higher expression level of *QrSUT1* in bark tissue in spring and summer indicated that this transporter might be involved in these processes (Fig. 1C).

In addition to wood and bark, *QrSUT1* was expressed throughout the whole plant (Fig. 1C). In potato, it has been shown that *StSUT1* was involved in phloem loading in minor veins of source leaves as well as in tuber development (Riesmeier et al. 1994, Kühn et al. 2003). Hence, *QrSUT1* played assumingly multiple roles in plant development. Regarding the potential role of *QrSUT1* in phloem loading the increased expression level from spring to summer in source leaves and the constant or decreased expression levels in other organs indicated the importance of *QrSUT1* for phloem loading and overall carbon partitioning (Fig. 1C).

While the overall sugar content in bark and wood of *F. excelsior* was similar to *Q. robur*, expression levels of *FeSUT1* were lowered in wood compared to bark indicating that sucrose translocation by the activity of *FeSUT1* played only a minor role in this tissue (Fig. 1A-1D). This finding was more distinct in wood tissue from spring and summer (Fig. 1D). Sucrose translocation via *FeSUT1* seemed to be by far more important in transport phloem where it was probably attributed to transporting leaked sucrose from the apoplast back into the sieve elements during long-distance transport as discussed above (Fig. 1D) (van Bel 2003). Interestingly, *FeSUT1* expression in bark increased successively from winter to spring and was highest in summer, which indicated that, with progress in development, the retrieval mechanism was constituted (Fig. 1D).

The expression of *FeSUT1* in source leaves of summer was very low which is in accordance with the hypothesis that *F. excelsior* is a mixed symplastic and apoplastic phloem loader (Öner-Sieben and Lohaus 2014). *F. excelsior* transported sucrose and high amounts of raffinose and stachyose in the phloem (Öner-Sieben and Lohaus 2014) which is one feature of symplastic phloem loaders. In addition, *F. excelsior* must load some proportions of sucrose apoplastically into the phloem because an uphill concentration gradient for sucrose between the cytosol of mesophyll cells and the phloem was shown (Öner-Sieben and Lohaus 2014). In view of the low expression level of *FeSUT1* in source leaves in summer the

symplastic phloem loading mechanism seems to be dominant during this season (Fig. 1D). In spring, the expression level of *FeSUT1* in source leaves was about 10-fold higher in relation to summer which suggests that apoplastic loading of sucrose played a greater role in spring than in summer (Fig. 1D). Probably during different growing stages or seasons the proportion of apoplastic and symplastic phloem loading varied depending on the physiological requirements or environmental conditions. A shift in symplastic to apoplastic loading strategies was reported for CMV infected melons (Gil et al. 2011). Hence environmental as well as developmental factors might have had similar effects. Similar to *QrSUT1* the expression of *FeSUT1* in the whole plant indicated that this transporter played multiple roles in plant physiology.

Sucrose transporters are expressed in leaves throughout the whole growing season in both tree species

In *Q. robur*, the overall sugar contents were about 40-50 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW and therefore similar to the contents found in *F. excelsior* (Fig. 2C, 2D). The high values of standard deviations (SD) displayed in Fig. 2A are mainly due to the fact that the environmental conditions varied greatly between the three years of sampling and that exposure to light and shade also varied between individual leaves which probably effected carbohydrate levels (Graham et al. 2003). However, data showed that the three main sugars were glucose and fructose (subsumed as hexoses) as well as sucrose (Fig. 2A), which is in accordance with previous findings (Hoch et al. 2003, Ferner et al. 2012). The rapid decline of sugars in October and November was most likely initiated by upcoming winter season and senescence. The expression of the sucrose transporter *QrSUT1* (that is probably involved in phloem loading) showed constant high expression levels during the whole season (Fig. 2E) with the highest levels in summer. Both findings support the assumption that *Q. robur* loads the phloem apoplastically. *QrSUT1* expression in source leaves was high until November (Fig. 2E). Afterwards the trees have shed their leaves. The expression of *QrSUT1* until the end of the growing season enables the trees to translocate carbohydrates from the source leaves to other parts of the plants before leaves were shed and therefore carbohydrate loss was prevented.

The seasonal monitoring of the overall sugar content in source leaves of *F. excelsior* showed that sugars were relatively stable with about 40-50 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FW (Fig. 2B) until the fall of leaves began towards winter. Sugar composition was similar to those reported in the literature (Jaeger et al. 2009). Previous studies showed that the amount of mannitol, which was the prevalent sugar, peaked in July (Oddo et al. 2002). This finding is in accordance with observations in this study, although the amount was overall higher in the summer and the peak occurred in August (Fig. 2D), which was likely due to a climatically different site. *FeSUT1* was expressed in leaves during the whole growing season with higher levels in

spring and in autumn as well as lower levels in summer (Fig. 2F). The overall share of sucrose was relatively homogenous over the year whereas RFOs started with lower amounts in May (Fig. 2D). Together with the relatively higher expression of *FeSUT1* in May and June this indicated that apoplastic loading might have played a greater role at the beginning of the season until symplastic phloem loading via polymer trapping was constituted. When senescence of the leaves was more pronounced in November the overall sugar content (Fig. 2B) declined. In contrast, the expression of *FeSUT1* reached its seasonal high (Fig. 2F). Deciduous species store high concentrations of soluble carbohydrates in the stem during winter in order to be protected from frost damage and to initiate bud break in spring (Barbaroux and Bréda 2002). In this case, the elevated expression levels of *FeSUT1* could have indicated an increased apoplastic carbon export activity from the leaves for storage purposes.

Influence of light and dark on sugar content and SUT expression

After plants were transferred into darkness sugar content started to decline (Fig. 3). This decrease in both *Q. robur* and *F. excelsior* was less distinct than in herbaceous plants (Riens et al. 1994). In barley and spinach, carbon and nitrate assimilates showed diurnal rhythms with highest contents of sugars and amino acids at the end of the light period and the lowest at the end of dark, e.g. sucrose content at the end of the dark period (10-15 h) amounted to 10% of the content at the end of the light period (Riens et al. 1994). In herbaceous plants, a large proportion of the carbon assimilated in leaves during the light period was deposited in the leaves for export during the night. Considerable phloem transport occurs in leaves at night, although at reduced rates (about 40% of the light rate; Riens et al. 1994). In *Q. robur* and *F. excelsior*, even after 43 h of permanent darkness 50 % and 68 % of the sugar content measured at the end of the light period were still present (Fig. 3A, 3B). Therefore, in both tree species probably much lower amounts of carbon assimilated at daylight are slated for export during dark periods.

Darkness had no bating effect on the expression levels of the sucrose transporters *QrSUT1* and *FeSUT1* (Fig. 3E, 3F). For *FeSUT1* expression was highest after 43 h of darkness which probably indicated a switch from symplastic to apoplastic phloem loading. Sucrose transporters of *Solanum tuberosum* showed a circadian regulation (Chincinska et al. 2008) whereas *DcSUT1* from *Daucus carota* was regulated in a diurnal manner (Shakya and Sturm 1998) illustrating that both light and an 'internal clock' can be regulatory factors. Analysis of leaves from *Q. robur* and *F. excelsior* that were observed during a normal light and dark period showed that expression levels of both SUTs were higher in light and lower in dark (data not shown). In constant darkness, the expression of *FeSUT1* and *QrSUT1* showed an ongoing oscillation and afterwards increased expression levels (Fig. 3E, 3F). These findings

indicate that expression levels of these transporters are regulated by circadian rhythms rather than by light.

Acknowledgements

The authors would like to thank Tim Kreutzer for technical assistance and Anna Sieben for critical reading of the manuscript.

References

- Ainsworth E, Bush D.** 2011. Carbohydrate export from the leaf: a highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiology* **155**, 64–69.
- Améglio T, Decourteix M, Alves G, Valentin V, Sakr S, Julien J, Petel G, Guilliot A, Lacoite A.** 2004. Temperature effects on xylem sap osmolarity in walnut trees: evidence for a vitalistic model of winter embolism repair. *Tree Physiology* **24**, 785–793.
- Barbaroux C, Bréda N.** 2002. Contrasting distribution and seasonal dynamics of carbohydrate reserves in stem wood of adult ring-porous sessile oak and diffuse-porous beech trees. *Tree Physiology* **22**, 1201–1210.
- Chang S, Puryear J, Cairney J.** 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**, 113–116.
- Chincinska I, Liesche J, Krügel U, Michalska J, Geigenberger P, Grimm B, Kühn C.** 2008. Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant Physiology* **146**, 515–528.
- Davidson A, Keller F, Turgeon R.** 2011. Phloem loading, plant growth form, and climate. *Protoplasma* **248**, 153–163.
- De Schepper V, De Swaef T, Bauweraerts I, Steppe K.** 2013. Phloem transport: a review of mechanisms and controls. *Journal of Experimental Botany* **64**, 4839–4850.
- Decourteix M, Alves G, Brunel N, Améglio T, Guillio A, Lemoine R, Pétel G, Sakr S.** 2006. JrSUT1, a putative xylem sucrose transporter, could mediate sucrose influx into xylem parenchyma cells and be up-regulated by freeze-thaw cycles over the autumn-winter period in walnut tree (*Juglans regia* L.). *Plant, Cell and Environment* **29**, 36–47.
- Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters S, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmidt U.** 2006. Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiology* **141**, 196–207.

- Fan R, Peng C, Xu Y, Wang X, Li Y, Shang Y, Du S, Zhao R, Zhang X et al.** 2009. Apple sucrose transporter SUT1 and sorbitol transporter SOT6 interact with cytochrome b5 to regulate their affinity for substrate sugars. *Plant Physiology* **150**, 1880–1901.
- Ferner E, Rennenberg H, Kreuzwieser J.** 2012. Effect of flooding on C metabolism of flood-tolerant (*Quercus robur*) and non-tolerant (*Fagus sylvatica*) tree species. *Tree Physiology* **32**, 135-145.
- Frost C, Nyamdari B, Tsai C, Harding S.** 2012. The tonoplast-localized sucrose transporter in *Populus* (PtaSUT4) regulates whole-plant water relations, responses to water stress, and photosynthesis. *PLoS One* **7**, e44467.
- Fu Q, Cheng L, Guo Y, Turgeon R.** 2011. Phloem loading strategies and water relations in trees and herbaceous plants. *Plant Physiology* **157**, 1518–1527.
- Gamalei Y.** 1989. Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs A taxonomic review. *Trees - Structure and Function* **3**, 96–110.
- Gil L, Yaron I, Shalitin D, Sauer N, Turgeon R, Wolf S.** 2011. Sucrose transporter plays a role in phloem loading in CMV-infected melon plants that are defined as symplastic loaders. *The Plant Journal* **66**, 366–374.
- Goggin F, Medville R, Turgeon R.** 2001. Phloem loading in the tulip tree. Mechanisms and evolutionary implications. *Plant Physiology* **125**, 891–899.
- Gottwald J, Krysan P, Young J, Evert R, Sussman M.** 2000. Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America-physical Sciences* **97**, 13979–13984.
- Graham E, Mulkey S, Kitajima K, Phillips N, Wright S.** 2003. Cloud cover limits net CO₂ uptake and growth of a rainforest tree during tropical rainy seasons. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America-physical Sciences* **100**, 572–576.
- Guicherd P, Peltier J, Gout E, Bligny R, Marigo G.** 1997. Osmotic adjustment in *Fraxinus excelsior* L: Malate and mannitol accumulation in leaves under drought conditions. *Trees - Structure and Function* **11**, 155–161.
- Henry C, Rabot A, Laloi M, Mortreau E, Sigogne M, Leduc N, Lemoine R, Sakr S, Vian A, Pelleschi-Travier S.** 2011. Regulation of RhSUC2, a sucrose transporter, is correlated with the light control of bud burst in *Rosa sp.* *Plant,*

- Cell and Environment* **34**, 1776–1789.
- Hoch G, Richter A, Korner C.** 2003. Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. *Plant, Cell and Environment* **26**, 1067–1081.
- Jaeger C, Gessler A, Biller S, Rennenberg H, Kreuzwieser J.** 2009. Differences in C metabolism of ash species and provenances as a consequence of root oxygen deprivation by waterlogging. *Journal of Experimental Botany* **60**, 4335–4345.
- Knop C, Voitsekhovskaja O, Lohaus G.** 2001. Sucrose transporters in two members of the Scrophulariaceae with different types of transport sugar. *Planta* **213**, 80–91.
- Kühn C.** 2003. A comparison of the sucrose transporter systems of different plant species. *Plant Biology* **5**, 215–232.
- Leuzinger S, Zotz G, Asshoff R, Körner C.** 2005. Responses of deciduous forest trees to severe drought in Central Europe. *Tree Physiology* **25**, 641–650.
- Liesche J, Krügel U, He H, Chincinska I, Hackel A, Kühn C.** 2011. Sucrose transporter regulation at the transcriptional, post-transcriptional and post-translational level. *Journal of Plant Physiology* **168**, 1426–1433.
- Maunoury F, Berveiller D, Lelarge C, Pontailier J, Vanbostal L, Damesin C.** 2007. Seasonal, daily and diurnal variations in the stable carbon isotope composition of carbon dioxide respired by tree trunks in a deciduous oak forest. *Oecologia* **151**, 268–279.
- Nadwodnik J, Lohaus G.** 2008. Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta* **227**, 1079–1089.
- Oddo E, SAIANO F, ALONZO G, BELLINI E.** 2002. An Investigation of the Seasonal Pattern of Mannitol Content in Deciduous and Evergreen Species of the Oleaceae Growing in Northern Sicily. *Annals of Botany* **90**, 239–243.
- Palonen P, Buszard D, Donnelly D.** 2000. Changes in carbohydrates and freezing tolerance during cold acclimation of red raspberry cultivars grown in vitro and in vivo. *Physiologia Plantarum* **110**, 393–401.
- Payyavula R, Tay K, Tsai C, Harding S.** 2011. The sucrose transporter family in *Populus*: the importance of a tonoplast PtaSUT4 to biomass and carbon partitioning. *Plant Journal* **65**, 757–770.

- Reinders A, Sivitz A, Ward J.** 2012. Evolution of plant sucrose uptake transporters. *Frontiers in Plant Science* **3**, 22.
- Rennenberg H, Loreto F, Polle A, Brillì F, Fares S, Beniwal R, Gessler A.** 2006. Physiological responses of forest trees to heat and drought. *Plant Biology* **8**, 556–571.
- Riens B, Lohaus G, Heineke D, Heldt H.** 1991. Amino Acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the Phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiology* **97**, 227–233.
- Riens B, Lohaus G, Winter H, Heldt H.** 1994. Production and diurnal utilization of assimilates in leaves of spinach (*Spinacia oleracea* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* **192**, 497-501.
- Riesmeier J, Willmitzer L, Frommer W.** 1994. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO Journal* **13**, 1–7.
- Sauer N.** 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters* **581**, 2309–2317.
- Sauter J.** 1983. Efflux and Reabsorption of Sugars In the Xylem .2. Seasonal-changes In Sucrose Uptake In *Salix*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **111**, 429–440.
- Shakya R, Sturm A.** 1998. Characterization of source- and sink-specific sucrose/H⁺ symporters from carrot. *Plant Physiology* **118**, 1473–1480.
- Siminovitch D, Wilson C, Briggs D.** 1953. Studies on the Chemistry of the Living Bark of the Black Locust in Relation to Its Frost Hardiness. V. Seasonal Transformations and Variations in the Carbohydrates: Starch-Sucrose Interconversions. *Plant Physiology* **28**, 383–400.
- Slewinski T, Zhang C, Turgeon R.** 2013. Structural and functional heterogeneity in phloem loading and transport. *Frontiers in Plant Science* **4**, 244.
- Stadler R, Sauer N.** 1996. The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Botanica Acta* **109**, 299–306.
- Turgeon R, Beebe D, Gowan E.** 1993. The intermediary cell: Minor-vein anatomy and raffinose oligosaccharide synthesis in the Scrophulariaceae. *Planta* **191**, 446-456.
- Turgeon R, Gowan E.** 1990. Phloem Loading in *Coleus blumei* in the Absence of

- Carrier-Mediated Uptake of Export Sugar from the Apoplast. *Plant Physiology* **94**, 1244–1249.
- Turgeon R, Medville R.** 1998. The absence of phloem loading in willow leaves. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America-physical Sciences* **95**, 12055–12060.
- van Bel A.** 2003. Transport phloem: low profile, high impact. *Plant Physiology* **131**, 1509–1510.
- van Bel A.** 1990. Xylem-Phloem Exchange Via the Rays: The Undervalued Route of Transport. *Journal of Experimental Botany* **41**, 631-644.
- Vaughn M, Harrington G, Bush D.** 2002. Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America-physical Sciences* **99**, 10876–10880.
- Voitsekhovskaja O, Koroleva O, Batashev D, Knop C, Tomos A, Gamalei Y, Heldt H, Lohaus G.** 2006. Phloem loading in two Scrophulariaceae species. What can drive symplastic flow via plasmodesmata?. *Plant Physiology* **140**, 383–395.
- Wright D, Scholes J, Read D, Rolfe S.** 2000. Changes in carbon allocation and expression of carbon transporter genes in *Betula pendula* Roth. colonized by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. *Plant, Cell and Environment* **23**, 39–49.
- Zimmermann M, Ziegler H.** 1975. List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. In: Zimmermann MH, Milburn JA, eds. *Encyclopedia of plant physiology*. 1975. New series, Vol. 1. *Transport in plants*. I. Berlin: Springer-Verlag, 480–503.

5 Gesamtdiskussion

Die Phloembeladung ist ein wichtiger Schritt bei der Translokation von Kohlenhydraten vom Ort der Fotosynthese zu den heterotrophen Geweben der Pflanze. Durch die Konzentrierung von Zuckern im Phloem der *source*-Gewebe ist die Phloembeladung ein essentieller Bestandteil für die Aufrechterhaltung des Druckstroms und somit des Stofftransportes (Münch 1930). Eine aktive Akkumulation von Kohlenhydraten wurde für krautige Pflanzen experimentell mehrfach nachgewiesen (Riesmeier et al. 1994, Lohaus et al. 1995, Lemoine et al. 1996, Knop et al. 2001, Hackel et al. 2006, Hannah et al. 2006, Chinchinska et al. 2008, Nadwodnik und Lohaus 2008, Cao et al. 2013). Ein ähnlich hoher Wissensstand in Bezug auf Gehölze fehlte bisher, da experimentelle Arbeiten aufgrund ihrer langen Ontogenese und dem hohen Gehalt an phenolischen Verbindungen etablierte Analyseverfahren erschweren.

5.1 Mögliche passive Phloembeladung bei Salicaceae

Aufgrund morphologischer Charakteristika des Phloems, des vergleichsweise geringeren Turgors in den Siebelementen und der im Vergleich zu krautigen Pflanzen relativ hohen Osmolarität in den Blättern wurde für Bäume ein passiver Diffusionsmechanismus von Saccharose in die Siebelemente postuliert (Gamalei 1989, Turgeon und Medville 1998, Rennie und Turgeon 2009, Turgeon 2010a, Turgeon 2010b, Turgeon und Medville 2010, Davidson et al. 2011, Fu et al. 2011, Slewinski et al. 2013). Die Voraussetzungen für passive Diffusion sind, eine höhere Konzentration an Saccharose im Cytosol der fotosynthetisch aktiven Mesophyllzellen verglichen zum Phloensaft, sowie symplastische Verbindungen zwischen Mesophyll- und Geleitzellen.

Die ersten Untersuchungen der osmotischen Verhältnisse im Mesophyll und Phloem von Bäumen im Bezug auf die Phloembeladung wurden an der Trauerweide (*Salix babylonica*) durchgeführt (Turgeon und Medville 1998). Dazu wurden unter anderem die Metabolitkonzentrationen in den einzelnen Zellen in Plasmolyseexperimenten analysiert (Beebe und Evert 1992). In TEM-Aufnahmen zeigte sich, dass die Zellen des Mesophylls und die des Phloems bei ungefähr derselben Konzentration des Osmotikums (~1 M) plasmolysierten. Ferner konnte bei Autoradiografie-Experimenten keine Akkumulation von radioaktiv markierten Zuckern in den Blattadern festgestellt werden, was zu der Annahme führte, dass es keinen aktiven Transport von Saccharose gegen einen Konzentrationsgradienten gebe (Turgeon und Medville 1998). Bereits 1985 hatten Russin und Evert in ähnlichen Plasmolyse-Experimenten an der Schwarz-Pappel (*Populus*

deltoides) gezeigt, dass auch hier die Zellen des Phloems bei ähnlichen Konzentrationen plasmolysierten wie die umliegenden Mesophyllzellen. Beide untersuchten Arten gehören zur Familie der Salicaceae. Weitere molekularbiologische Untersuchungen an Pappeln stützten die These der passiven Diffusion von Saccharose aus den Mesophyllzellen in das Phloem (Payyavula et al. 2011). Aus dem Genom von *Populus tremula x alba* konnten fünf SUT-Homologe isoliert werden, die auf ihre Expression in verschiedenen Geweben untersucht wurden. Das Gen für den Tonoplast-lokalisiereten Transporter *PtaSUT4* war in allen untersuchten Geweben, insbesondere in den *source*-Blättern, am stärksten exprimiert, während Transkripte der Typ I-SUT *PtaSUT1* und *PtaSUT3* in sehr geringen Mengen vorhanden waren (Payyavula et al. 2011). Die Reduktion von *PtaSUT4*-Transkripten durch RNAi-Experimente hatte eine erhöhte Saccharose-Konzentration in den *source*-Blättern zur Folge. Daraus schlossen die Autoren, dass der Transporter *PtaSUT4* als Ventil im Tonoplasten wirkte, welches die Konzentration von Saccharose im Cytosol der Mesophyllzellen und damit den Transport im Phloem regulierte. Eine aktive Beladung des Phloems entgegen eines Konzentrationsgradienten ist demnach nicht nötig. Unter den für die vorliegende Arbeit untersuchten Bäumen waren auch drei Salicaceae: *Salix caprea*, *Salix viminalis* und *Populus tremula* (Tabelle 3.1). Die phylogenetische Analyse der isolierten EST aus diesen Arten ergab, dass alle drei zum Typ III gehören (Abb. 4.2) was bedeutet, dass der am stärksten exprimierte SUT in diesen Arten wahrscheinlich im Tonoplasten lokalisiert ist. Die Sequenz aus *P. tremula* war identisch zu der von *PtaSUT4* (Payyavula et al. 2011). Diese Befunde unterstützen den postulierten passiven Beladungsmodus des Phloems in Salicaceae.

5.2 Passive Beladung des Phloems gilt nicht für alle Laubbaumarten

Für die Beantwortung der Frage, ob die in Weidengewächsen beschriebene passive Phloembeladung ein generelles Charakteristikum für Laubbäume ist, wurden die zwei für Mitteleuropa typischen Laubbaumarten *Quercus robur* (Stiel-Eiche) und *Fraxinus excelsior* (Esche) im Detail untersucht. Die Auswahl erfolgte unter Berücksichtigung der Datenlage in der Literatur sowie aufgrund erster Analysen der Zuckergehalte und dem Screening nach SUT in verschiedenen Laubbaumarten (Kap. 4.1, Abschnitt I).

Die Analyse der Zuckerkonzentrationen im Cytosol der Mesophyllzellen und im Phloem von *Q. robur* und *F. excelsior* zeigte, dass die Transportzucker im Phloensaft sehr viel stärker konzentriert waren als im Cytosol der Mesophyllzellen (Kap. 4.2, Abschnitt II). Im Falle von *Q. robur* war das Konzentrationsverhältnis für Saccharose 17:1 und bei *F. excelsior* 14:1. Somit war eine rein passive Diffusion aus dem Mesophyll in das Phloem ausgeschlossen. Im

Phloemsaft von *F. excelsior* wurden neben Saccharose hohe Konzentrationen an Raffinose-Oligosacchariden (RFO) und Mannitol gefunden. Während Mannitol ebenfalls im Cytosol nachgewiesen werden konnte, waren RFO nur im Phloemsaft vorhanden, was die Annahme stützt, dass die Synthese von RFO in den Intermediärzellen des Phloems von Arten stattfindet, die eine Typ 1(IC) Phloemanatomie aufweisen (Voitsekhovskaja et al. 2009).

Für die Diskrepanz zwischen den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen und denen in der Literatur kann es verschiedene Ursachen geben. Das für die Analyse der osmotischen Verhältnisse in Blättern oftmals angewandte Plasmolyseverfahren gibt keinen Aufschluss darüber, welcher Stoff für das osmotische Potential in einem Gewebe verantwortlich ist, weil keine Unterscheidung zwischen den einzelnen Osmotika vorgenommen werden kann. Da Bäume eine Vielzahl an osmotisch relevanten Stoffen in ihren Blättern enthalten (Fu et al. 2011), schließt die Plasmolyse des Mesophylls und des Phloemgewebes bei ähnlichen Konzentrationen nicht aus, dass es für Saccharose oder andere Zucker trotzdem einen Gradienten gibt.

Ein weiteres wichtiges Verfahren zur Einordnung der Phloembeladung ist die Autoradiografie (Fondy und Geiger 1977). Dabei werden Blätter bzw. Blattstücke mit $^{14}\text{CO}_2$ oder ^{14}C -markierten Zuckern inkubiert und anschließend die Verteilung in den einzelnen Geweben auf Fotopapier sichtbar gemacht. Erscheinen die Blattadern stärker markiert als die umliegenden Zellen, so ist von einer aktiven Beladung entgegen eines Konzentrationsgradienten auszugehen (van Bel 1994). Die Methode ist bei krautigen Pflanzen gut etabliert, führt bei Bäumen aber mitunter zu widersprüchlichen Ergebnissen. So zeigten Eschrich und Fromm (1994), dass die Blattadern in ausgestanzten Blattstücken von *Ginkgo biloba* nach Inkubation in ^{14}C -Saccarose-Lösung nicht markiert waren, während die Zellen der Epidermis Radioaktivität aufwiesen. In ähnlichen Experimenten mit $^{14}\text{CO}_2$ an intakten Blättern zeigte van Bel (1994) allerdings, dass die Blattadern von *G. biloba* deutlich stärker markiert waren, als das umliegende Gewebe. Daraus lässt sich schließen, dass die Konzentration von Zuckern in den Blattadern höher war als in den umliegenden Geweben. Das Bild blieb nach der Behandlung mit dem SUT-Inhibitor PCMBS dasselbe, was auf eine SUT-unabhängige Beladung hindeutet (van Bel 1994). Bisher ist kein Beladungsmechanismus bekannt, der ohne aktiven Transporter Saccharose entgegen eines Konzentrationsgefälles transportiert. Da in Exsudaten von *G. biloba* keine RFO gefunden wurden (Tabelle 4.1), ist die *polymer trap*-Methode ebenfalls unwahrscheinlich. Saccharose-Transporter reagieren unterschiedlich sensitiv auf die Behandlung mit PCMBS (Knop et al. 2004). Des Weiteren ist die Aufnahmerate von PCMBS in das Gewebe unterschiedlich hoch, weshalb es möglich ist, dass a) ein PCMBS-toleranter SUT in *G. biloba* bei der

Phloembeladung eine Rolle spielt und dass b) die PCMBS-Konzentration nicht hoch genug war. Diese spekulativen Annahmen müssten experimentell untersucht werden. Die aufgezeigten Befunde zeigen allerdings wie schwierig eine Einordnung der Phloembeladung in Bäumen anhand von Autoradiografien und PCMBS-Experimenten ist.

Bereits vorangegangene Arbeiten am Tulpenbaum (*Liriodendron tulipifera*) zeigten, dass eine offene Phloemanatomie mit plasmodesmatischen Verbindungen zwischen Geleit- und Mesophyllzellen (Typ 1(CC)) nicht kausal mit passiver Phloembeladung im Zusammenhang stehen muss (Goggin et al. 2001). Es zeigte sich nämlich, dass nach großzügiger Entfernung der Epidermis und des größten Teils des Schwammparenchyms der Blätter die Zuckerakkumulation in den Venen autoradiografisch nachgewiesen werden konnte, was ohne die Abrasion des Gewebes nicht gelang. Des Weiteren zeigte die Reduktion des Saccharosegehaltes in Exsudaten aus *source*-Blättern nach PCMBS-Behandlung, dass es sich wahrscheinlich um einen aktiven apoplastischen Beladungsmechanismus handelt (Goggin et al. 2001). Zu einem ähnlichen Resultat wie im Tulpenbaum kamen Turgeon und Medville (2004) bei Untersuchungen am amerikanischen Amberbaum (*Liquidambar styraciflua*). Die zahlreichen Plasmodesmen zwischen Mesophyll- und Geleitzellen haben offenbar keinen Einfluss auf die Phloembeladung. Wahrscheinlich verschließen sie sich aufgrund von Turgor-Unterschieden zwischen den benachbarten Zellen (Oparka und Prior 1992). Auch in dieser Arbeit wurde die Schwierigkeit deutlich, Aussagen über den Beladungsmodus anhand von Autoradiografien zu treffen. Blätter von Bäumen sind deutlich kräftiger als die krautiger Pflanzen, was die Darstellung der Blattadern mit radioaktiven Markierungen erheblich erschwert. Trotz dieser Ergebnisse wird nach wie vor angenommen, dass Bäume primär passive Belader sind (Reidel et al. 2009, Fu et al. 2011, Slewinski et al. 2013, De Schepper et al. 2013, Braun et al. 2014). Diese These wird im verstärktem Maße für Gymnospermen postuliert, da diese Art der Beladung als ursprünglich angesehen wird (Liesche et al. 2011b, De Schepper et al. 2013).

5.3 Aktive apoplastische Phloembeladung in *Q. robur*

Die erfolgreiche Isolierung und enzymatische Charakterisierung eines Typ I-SUT aus *source*-Blättern von *Q. robur* ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass dieser Transporter womöglich für den starken Konzentrationsgradienten für Saccharose im Phloem verantwortlich ist (Kap. 4.3, Abschnitt III). Der K_M -Wert für QrSUT1 lag mit 6,78 mM Saccharose in dem Bereich, der für bereits charakterisierte SUT beschrieben wurde (Kühn 2003). Abweichend von der bisherigen Annahme, dass Typ I-SUT einen K_M -Wert Bereich von 0,1 mM bis ca. 2 mM Saccharose aufweisen (Kühn 2003, Reinders et al. 2012), war die Substrataffinität von

QrSUT1 verhältnismäßig hoch. Ähnlich hohe K_M -Werte wie QrSUT1 weisen vor allem Typ II und Typ III-SUT auf, zu denen QrSUT1 allerdings aufgrund hoher Sequenzhomologien zu Typ I-SUT nicht zu zählen scheint (Abb. 4.2). Möglicherweise unterscheiden sich Typ I-SUT aus Bäumen grundsätzlich im Bezug auf ihre Substrataffinität von denen aus krautigen Pflanzen. Laubbäume weisen hohe Zuckerkonzentrationen in ihren Blättern auf und die Fließgeschwindigkeit des Phloensaftes ist generell deutlich niedriger als bei krautigen Pflanzen (Fu et al. 2011, Jensen et al. 2012, Öner-Sieben und Lohaus 2014). Dadurch ist es denkbar, dass SUT, die an der Phloembeladung beteiligt sind, über eine niedrigere Substrataffinität als Teil der Regulation des Stofftransportes verfügen. Aufgrund fehlender Vergleichswerte von SUT aus Bäumen können diese spekulativen Annahmen nicht überprüft werden.

Zusammenfassend lässt sich für *Q. robur* sagen, dass die Annahme der passiven Phloembeladung anhand der hier diskutierten Ergebnisse kaum möglich ist. Dies ist insbesondere deshalb von großer Bedeutung, weil Eichen aufgrund ihrer Phloemanatomie und ihres Zuckergehaltes in den Blättern als typische Vertreter für die passive Beladung gelten (Slewiniski et al. 2013). Die Tatsache eines starken Konzentrationsgradienten für Saccharose in Richtung Phloemsaft (Kap. 4.2, Abschnitt II), dem Vorhandensein eines funktionellen Typ I-SUT in den *source*-Blättern (Kap. 4.3, Abschnitt III) und die verstärkte Expression dieses Transporters während der Entwicklung in den *source*-Blättern (Kap. 4.4, Abschnitt IV) machen einen aktiven apoplastischen Beladungsmechanismus für *Q. robur* sehr wahrscheinlich. Ähnlich wie bei *L. tulipifera* und *L. styraciflua* (Goggin et al. 2001, Turgeon und Medville 2004) kann anhand einer offenen Phloemanatomie keine Aussage über den Modus der Phloembeladung getroffen werden, dafür sind vielmehr detaillierte molekularbiologische und biochemische Analysen notwendig.

5.4 Phloembeladung bei *F. excelsior* ist sowohl apoplastisch als auch symplastisch

Der aus *source*-Blättern von *F. excelsior* isolierte Transporter FeSUT1 hatte einen für Typ I-SUT typischen K_M -Wert von 2,08 mM Saccharose und zeigte große Ähnlichkeiten zu AmSUT1 aus *A. meridionalis*. Die Lokalisation auf zellulärer Ebene ist nur für diesen Transporter in Gewebeschnitten von *F. excelsior* gelungen, da das Antiserum gegen QrSUT1 kein Signal lieferte (Kap. 4.3, Abschnitt III). Es zeigte sich, dass FeSUT1 sowohl im Transportphloem als auch in den *minor veins* lokalisiert war und dass es sich bei den markierten Zellen wahrscheinlich um gewöhnliche Geleitzellen handelt. Dieses Ergebnis

korrespondiert mit vorangegangenen Arbeiten an *A. meridionalis*, in denen gezeigt werden konnte, dass der Transporter AmSUT1 spezifisch in den Geleitzellen im Phloem exprimiert wurde und nicht in den Intermediärzellen oder Siebelementen (Knop et al. 2004, Voitsekhovskaja et al. 2009). In anderen Arten wurden Typ 1-SUT ebenfalls in Geleitzellen nachgewiesen, was ihre wichtige Rolle bei der apoplastischen Phloembeladung unterstreicht (Stadler et al. 1995, Stadler und Sauer 1996, Srivastava et al. 2008). Die Expression von FeSUT1 im Transportphloem von *F. excelsior* dient wahrscheinlich dem *retrieval* Mechanismus. Aufgrund des sehr hohen Turgors in den Siebelementen (Nadwodnik und Lohaus 2008, Öner-Sieben und Lohaus 2014) diffundiert Saccharose in das umliegende Gewebe, von dem ein Teil der Versorgung der lateralen Zellen dient. Der Rest wird über SUT wieder zurück in die Siebelemente transportiert, um den Stofffluss aufrecht zu erhalten (Maynard und Lucas 1983, Knop et al. 2004, Eisenbarth und Weig 2005, Srivastava et al. 2008, De Schepper et al. 2013). Die Expression von FeSUT1 in den Geleitzellen des Phloems der *minor veins* deutet auf eine Rolle bei der apoplastischen Beladung des Phloems mit Saccharose hin. In aktiv symplastischen Phloembeladern wird das Phloem sowohl über die *polymer trap* Methode und der Synthese von RFO als auch apoplastisch über die Aktivität von Typ I-SUT beladen (Knop et al. 2004, Voitsekhovskaja et al. 2009, Gil et al. 2011). Der gemischte Beladungsmechanismus spiegelt sich in der Heterogenität im Bezug auf die Geleitzellen wider. In den Intermediärzellen findet die RFO-Synthese statt und über die gewöhnlichen Geleitzellen erfolgt die apoplastische Phloembeladung. Dies trifft mit großer Wahrscheinlichkeit auch auf *F. excelsior* zu.

Für *Fraxinus* wurde bereits vermutet, dass es sich um symplastische Belader mithilfe der *polymer trap*-Methode handelt (Fu et al. 2011). Wie alle Oleaceae enthält auch *F. excelsior* große Mengen an Mannitol in den Blättern, das auch als Transportzucker verwendet wird (Conde et al. 2007). Bisher herrschte die Annahme, dass Mannitol ebenfalls passiv vom Mesophyll in das Phloem entlang eines Konzentrationsgradienten diffundiert (Fu et al. 2011). Daten aus der subzellulären Metabolitverteilung und der Analyse des Phloemsaftes deuteten allerdings auf einen steilen Gradienten für Mannitol in Richtung Phloem hin, was eine aktive Beladung notwendig macht (Öner-Sieben und Lohaus 2014). Symporter, die ähnlich zu Saccharose-Transportern Mannitol transportieren, wurden in Sellerie (*Apium graveolens*) beschrieben (Noiraud et al. 2001). Für andere Arten, die Zuckeralkohole transportieren, wurden ebenfalls Transporter isoliert (*Malus domestica*, Watari et al. 2004, *Plantago major*, Ramsperger-Gleixner et al. 2004). Daten aus NWF-Analysen für einige dieser Arten, darunter Pfirsich, zeigten eine höhere Konzentration an Zuckeralkoholen im Phloem als im Cytosol der Mesophyllzellen (Nadwodnik und Lohaus 2008). In Autoradiografien von

Blattadern aus *M. domestica* wiederum wurde keine Akkumulation von Zuckern festgestellt. Ähnlich wie Turgeon und Medville (1998) für Saccharose, schlugen die Autoren dieser Studie (Reidel et al. 2009) eine passive Diffusion für Zuckeralkohole als Transportweg in Rosaceae vor, was angesichts der Befunde über Konzentrationsgradienten für Zuckeralkoholen in Frage gestellt werden muss (Nadwodnik und Lohaus 2008).

Neben der Synthese von RFO für den Transport von Kohlenhydraten wird in *F. excelsior* das Phloem apoplastisch beladen. Die Akkumulation von Saccharose im Phloem wird durch FeSUT1 katalysiert, da sich durch die Immunolokalisation zeigte, dass dieser Transporter in den Geleitzellen des Phloems exprimiert wurde. Vermutlich weisen alle symplastischen Belader einen doppelten aktiven Beladungsmechanismus auf (Voitsekhovskaja et al. 2009, Gil et al. 2011). Diese Eigenschaft erlaubt es den Pflanzen sich verändernden Umweltbedingungen flexibel anzupassen. So erhöhte sich der CmSUT1-vermittelte apoplastische Beladungsweg in *Cucurbita pepo* nach der Infektion mit dem Cucumber-Mosaic-Virus (CMV), wodurch wahrscheinlich die Ausbreitung der Infektion über das Phloem verhindert werden soll (Gil et al. 2011). Neben der Funktion der Phloembeladung erfüllt FeSUT1 vermutlich weitere Aufgaben, da der Transporter ähnlich wie QrSUT1 in allen untersuchten Geweben und zu jeder Jahreszeit exprimiert wurde, wobei die Expression in den *source*-Blättern am niedrigsten war. Dieser Befund unterstützt den postulierten gemischten symplastischen und apoplastischen Beladungsmodus in *F. excelsior*, bei dem der Symplastische stark überwiegt (Öner-Sieben und Lohaus 2014).

5.5 SUT Expression in allen Organen und während der gesamten Vegetationsperiode

Um die Regulation und den Einfluss von Umweltbedingungen auf die beiden isolierten SUT QrSUT1 und FeSUT1 zu untersuchen, wurden Bäume in ihrer natürlichen Umgebung über die komplette Vegetationsperiode hinweg beprobt und sowohl die Zuckergehalte als auch die relative Expression der Transporter mittels *qRT-PCR* bestimmt (Kap. 4.4, Abschnitt IV). Des Weiteren wurden Licht- und Dauerdunkel-Experimente mit drei Jahre alten Bäumen durchgeführt, sowie Proben unterschiedlicher Gewebe untersucht (Kap. 4.4, Abschnitt IV). Es zeigte sich, dass sowohl QrSUT1 als auch FeSUT1 in allen Geweben zu jeder Zeit exprimiert wurden. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Saccharosegehalt in den Geweben und der Expression der Transporter war nicht zu erkennen.

Während der Vegetationsperiode wurde QrSUT1 im Gegensatz zu allen bisher aus Bäumen isolierten Typ I-SUT sehr stark in *source*-Blättern exprimiert. Von den bisher aus Gehölzen

isolierten Typ I-SUT wurde keiner mit aktiver Phloembeladung in Zusammenhang gebracht. Der Transporter CsSUT1 beispielsweise konnte nur in *sink*-Organen von *Citrus sinensis* nachgewiesen werden und dort insbesondere in den Wurzeln (Li et al. 2003); ebenso der Transporter BpSUC1 aus *Betula pendula* (Wright et al. 2000). PtaSUT1 wurde fast ausschließlich im Stamm von *Populus tremula x alba* gefunden (Payyavula et al. 2011), während JrSUT1 aus *Juglans regia* im Xylem nachgewiesen wurde (Decourteix et al. 2006). In Geweben von *Q. robur* war im Verlauf der Jahreszeiten eine deutliche Zunahme der Expression in den sich entwickelnden *source*-Blättern zu erkennen, während die Expression in den anderen Geweben im Verhältnis abnahm. In den Sommermonaten war die Expression in den *source*-Blättern am stärksten. Daraus lässt sich schließen, dass QrSUT1 während der Vegetationsperiode für den Export von Saccharose aus den Blättern essentiell ist. Typ I-SUT spielen neben ihrer Funktion bei der Phloembeladung weitere wichtige Rollen in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien (Hirose et al. 1997, Aoki et al. 1999, Weschke et al. 2000, Kühn et al. 2003, Sivitz et al. 2005, Slewinski et al. 2009). So kann auch für QrSUT1 angenommen werden, dass er mehrere Funktionen in den verschiedenen Organen von *Q. robur* übernimmt. In *J. regia* zeigte der Typ I-SUT JrSUT1 eine sehr spezifische Expression im Xylem und in der Rinde, während in *source*-Blättern kein Transkript gefunden wurde (Decourteix et al. 2006). Möglicherweise übernehmen andere SUT-Homologe ähnliche Aufgaben in *source*-Blättern von *J. regia* wie QrSUT1 in *Q. robur*. Eine immunologische Lokalisierung von QrSUT1 hätte weiter Aufschluss über die mögliche Rolle von QrSUT1 bei der Phloembeladung gegeben, was allerdings aufgrund fehlender funktionaler Antikörper nicht möglich war. Das Expressionsmuster deutet jedoch darauf hin, dass dieser Transporter für die Phloembeladung von Bedeutung ist.

Die Expression von FeSUT1 war in *sink*-Organen deutlich höher als in *source*-Blättern. Dieses Ergebnis deckt sich gut mit der Beobachtung, dass das Phloem von *F. excelsior* primär durch die *polymer trap* Methode beladen wird und nur etwa 34 % des transportierten Zuckers aus Saccharose besteht (Öner-Sieben und Lohaus 2014). Die Expression von FeSUT1 nimmt in den sich entwickelnden *source*-Blättern ab, was ein Hinweis darauf sein kann, dass der apoplastische Beladungsweg zu Beginn stärker ausgeprägt ist und mit der Etablierung des symplastischen Beladungsmechanismus reduziert wird (Kap. 4.4, Abschnitt IV). Die relative hohe Expression von FeSUT1 in *sink*-Gewebe zeigt auch hier, dass dieser Transporter für die Zuckerverteilung in der gesamten Pflanze eine wichtige Rolle einnimmt.

Die Analyse der Expressionsmuster der beiden Transporter im Verlauf einer Vegetationsperiode zeigte, dass deren Aktivität auch noch zu Beginn der Seneszenz sehr hoch war

während gleichzeitig der Gehalt an Saccharose zu sinken begann (Kap. 4.4, Abschnitt IV). Dies deutet darauf hin, dass der verstärkte Export von Zuckern aus den Blättern in den Stamm der Bäume kurz vor dem Blattfall für die erhöhte Transporteraktivität verantwortlich ist. Insbesondere FeSUT1 zeigte die höchste Expression in den *source*-Blättern im Spätherbst (Kap. 4.4, Abschnitt IV).

5.6 Zusammenfassung und offene Fragen

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass für die Einordnung der Phloembeladung einer Pflanze verschiedene Kriterien berücksichtigt werden müssen. Die Analysen von Autoradiografien, PCMBs-Hemmversuche sowie *minor vein*-Konfigurationen reichen nicht aus, um die Frage der Beladung eindeutig zu klären (van Bel et al. 1994, Goggin et al. 2001). Wie sich zeigte, ist die biochemische Charakterisierung der Zuckerkonzentrationen in den einzelnen bei der Beladung relevanten Kompartimenten von entscheidender Bedeutung. Vor allem die Gewinnung von reinem Phloemsaft ist wichtig, da nur so die molaren Verhältnisse im Phloem eindeutig bestimmt werden können, um Aussagen über mögliche Konzentrationsgradienten zu treffen (Riens et al. 1991). Für die Beurteilung der Rolle von SUT bei der Phloembeladung ist es wichtig, die Transporter auf Zellebene zu lokalisieren, da verschiedene SUT unterschiedliche Aufgaben in der Pflanze übernehmen können (Decourteix et al. 2006, Payyavula et al. 2011, Reinders et al. 2012). Die Isolierung von potentiellen SUT aus mRNA hat den großen Vorteil statistisch den Transporter zu isolieren, der in einem gegebenen Gewebe am stärksten exprimiert wird. Da die isolierten SUT aus beiden Arten Typ I-SUT sind und für FeSUT1 die Lokalisierung in Geleitzellen gelang, sowie QrSUT1 eine starke spezifische Expression in *source*-Blättern aufwies, kann angenommen werden, dass diese Transporter an der Phloembeladung bei *Q. robur* und *F. excelsior* beteiligt sind. Zumindest ein Teil der Phloembeladung erfolgt bei beiden Laubbaumarten über einen aktiven apoplastischen Mechanismus, womit die Annahme der generellen passiven Phloembeladung in Bäumen widerlegt wird. Insbesondere *Q. robur* zeigte die für putativ passiv beladende Arten typischen physiologischen Eigenschaften, die aber nicht im Widerspruch zur apoplastischen Phloembeladung zu stehen scheinen. In beiden Arten spielen SUT eine wichtige Rolle. Aus den vorgenommenen Analysen und Ergebnissen ergeben sich folgende Aspekte und Fragestellungen:

1. In welchen Zellen wird QrSUT1 in *source*-Blättern von *Q. robur* exprimiert?
2. Tritt ein Phänotyp bei Inhibierung/Knockout von *FeSUT1* bzw. *QrSUT1* auf?
3. Spielen weitere SUT-Homologe eine Rolle und in welchen Geweben werden diese exprimiert?

Für den Nachweis von QrSUT1 auf Zellebene könnten mit geeigneteren Peptidsequenzen generierte Antiseren bessere Resultate erzielt werden. Neben der Lokalisation mit Antikörpern bietet sich ein gentechnischer Ansatz zur Herstellung transgener Pflanzen an (Vieitez et al. 2012, Mallón et al. 2013). Dieser würde sowohl die Analyse der Auswirkungen einer Reduktion von QrSUT1 erlauben als auch die GUS bzw. GFP-vermittelte Lokalisation. Ein Screening der genomischen DNA auf SUT-Homologe wäre ein guter Ansatz, weitere Transporter zu isolieren und deren Expressionsmuster zu bestimmen.

6 Appendix

Tabelle 6.1 Liste der für die phylogenetischen Analysen verwendeten Saccharose-Transporter.

Spezies	Familie	Transporter	Typ	Protein ID	Referenz
<i>Alonsoa meridionalis</i>	Scrophulariaceae	AmSUT1	I	AAF04295	Knop et al. 2001
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	AtSUC1	I	CAA53147	Sauer und Stolz 1994
		AtSUC2	I	CAA53150	Sauer und Stolz 1994
		AtSUC5	I	AAG52226	Theologis et al. 2000
		AtSUC8	I	AAC69375	Lin et al. 1999
		AtSUC9	I	BAB09682	Tabata et al. 2000
		AtSUT2	IIA	CAB92307	Meyer et al. 2000, Schulze et al. 2000
		AtSUT4	III	AAL59915	Weise et al. 2000
<i>Asarina barclaiana</i>	Scrophulariaceae	AbSUT1	I	AAF04294	Knop 2001
<i>Bambusa oldhamii</i>	Poaceae	BooSUT1	IIB	AAY43226	
<i>Beta vulgaris</i>	Amaranthaceae	BvSUT1	I	CAA58730	Vaughn et al. 2002
<i>Betula pendula</i>	Betulaceae	BpSUC1	I	AAD45932	Wright et al. 2000
<i>Brassica oleracea</i>	Brassicaceae	BoSUC1	I	AAL58071	Gapper et al. 2005
<i>Citrus sinensis</i>	Rutaceae	CsSUT1	I	AAM29150	Li et al. 2003
<i>Datisca glomerata</i>	Datisceae	DgSUT4	III	CAG70682	Schubert et al. 2010
<i>Daucus carota</i>	Apiaceae	DcSUT1	I	CAA76369	Shakya und Sturm 1998
		DcSUT1a	III	CAA76367	Shakya und Sturm 1998
<i>Eucommia ulmoides</i>	Eucommiaceae	EuSUT2	IIA	AAX49396	Pang et al. 2008
<i>Euphorbia esula</i>	Euphorbiaceae	EeSUT1	I	AAF65765	
<i>Hevea brasiliensis</i>	Euphorbiaceae	HbSUT2C	IIA	CAM33449	Dusotoit-Coucaud et al. 2009
		HbSUT3	I	ABK60190	Tang et al. 2010
		HbSUT4	III	ABK60191	Tang et al. 2010
<i>Hordeum vulgare</i>	Poaceae	HvSUT1	IIB	CAB75882	Weschke et al. 2000, Sivitz et al. 2005
		HvSUT2	III	CAB75881	Weschke et al. 2000
<i>Juglans regia</i>	Juglandaceae	JrSUT1	I	AAU11810	Decourteix et al. 2006
<i>Lotus japonicus</i>	Fabaceae	LjSUT4	III	CAD61275	Flemetakis et al. 2003
<i>Malus x domestica</i>	Rosaceae	MdSUT1	III	AAR17700	Fan et al. 2009
<i>Medicago truncatula</i>	Fabaceae	MtSUT1	I	AFM28284	Doidy et al. 2012
<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanaceae	NtSUT3	I	AAD34610	Lemoine et al. 1999
<i>Oryza sativa</i>	Poaceae	OsSUT1	IIB	BAA24071	Hirose et al. 1997
		OsSUT2	III	BAC67163	Aoki et al. 2003
		OsSUT3	IIB	BAB68368	Aoki et al. 2003
		OsSUT4	IIA	BAC67164	Aoki et al. 2003
		OsSUT5	IIB	BAC67165	Aoki et al. 2003
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	PvSUF1	I	ABB30165	Zhou et al. 2007
		PvSUF4	III	ABB30162	Zhou et al. 2007
<i>Physcomitrella patens</i>	Funariaceae	PpSUT2	IIA	XP_001752965	Rensing et al. 2008

Fortsetzung Tabelle 6.1

<i>Picea sitchensis</i>	Pinaceae	PsiSUT1	IIA	ADE77095	
<i>Pinus taeda</i>	Pinaceae	PitaAUT1	IIA	BI077135	
<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	PsSUF1	I	ABB30163	Zhou et al. 2007
		PsSUT1	I	AAD41024	Tegeder et al. 1999
		PsSUT1	I	AAD41024	Tegeder et al. 1999
<i>Plantago major</i>	Plantaginaceae	PmSUC1	I	CAA59113	Gahrtz et al. 1996
		PmSUC2	I	CAA53390	Gahrtz et al. 1996
		PmSUC3	IIA	CAD58887	Barth et al. 2003
<i>Populus tremula x alba</i>	Salicaceae	PtaSUT4	III	ADW94617	Payyavula et al. 2011
<i>Populus trichocarpa</i>	Salicaceae	PtaSUT1	I	XP_006376318	Tuskan et al. 2006
			IIA	XP_002315798	Tuskan et al. 2006
<i>Ricinus communis</i>	Euphorbiaceae	RcSCR1	I	CAA83436	Weig und Komor 1995
<i>Ricinus communis</i>	Euphorbiaceae	RcSUC4	III	AAU21439	
<i>Selaginella moellendorffii</i>	Selaginellaceae	SmSUT2	IIA	XP_002965535	Banks et al. 2011
<i>Solanum lycopersicum</i>	Solanaceae	LeSUT1	I	CAA57726	Barker et al. 2000
		LeSUT2	IIA	AAG12987	Barker et al. 2000
		LeSUT4	III	AAG09270	Weise et al. 2000
<i>Spinacia oleracea</i>	Amaranthaceae	SoSUT1	I	CAA47604	Riesmeier et al. 1992
<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	VvSUC11	IIA	AAF08330	Davies et al. 1999
		VvSUC27	I	AAF08331	Davies et al. 1999
		VvSUC27	III	AAF08329	Davies et al. 1999
<i>Zea mays</i>	Poaceae	ZmSUT1	IIB	BAA83501	Aoki et al. 1999
		ZmSUT4	III	AAT35810	

7 Referenzen

- Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D.** 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403–410.
- Aoki N, Hirose T, Scofield G, Whitfeld P, Furbank R.** 2003. The sucrose transporter gene family in rice. *Plant and Cell Physiology* **44**, 223–232.
- Aoki N, Hirose T, Takahashi S, Ono K, Ishimaru K, Ohsugi R.** 1999. Molecular cloning and expression analysis of a gene for a sucrose transporter in maize (*Zea mays* L.). *Plant and Cell Physiology* **40**, 1072–1078.
- Atkins C, Smith P, Rodriguez-Medina C.** 2011. Macromolecules in phloem exudates—a review. *Protoplasma* **248**, 165–172.
- Bai X, Rivera-Vega L, Mamidala P, Bonello P, Herms D, Mittapalli O.** 2011. Transcriptomic signatures of ash (*Fraxinus spp.*) phloem. *PLoS One* **6**, e16368.
- Baker R, Leach K, Braun D.** 2012. SWEET as sugar: new sucrose effluxers in plants. *Molecular Plant* **5**, 766–768.
- Banks J, Nishiyama T, Hasebe M, Bowman J, Gribskov M, dePamphilis null C, Albert V, Aono N, Aoyama T et al.** 2011. The *Selaginella* Genome Identifies Genetic Changes Associated with the Evolution of Vascular Plants. *Science* **332**, 960-963.
- Barker L, Kühn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward J, Frommer W.** 2000. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* **12**, 1153–1164.
- Barlow C, McCully M.** 1972. The ruby laser as an instrument for cutting the stylets of feeding aphids. *Canadian Journal of Zoology* **50**, 1497-1498.
- Barth I, Meyer S, Sauer N.** 2003. PmSUC3: characterization of a SUT2/SUC3-type sucrose transporter from *Plantago major*. *Plant Cell* **15**, 1375–1385.
- Beebe D, Turgeon R.** 1992. Localization of galactinol, raffinose, and stachyose synthesis in *Cucurbita pepo* leaves. *Planta* **188**, 354-361.
- Beebe D, Evert R.** 1992. Photoassimilate pathway (s) and phloem loading in the leaf of *Moricandia arvensis* (L.) DC.(Brassicaceae). *International Journal of Plant Sciences* 61–77.
- Bradford M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Braun D, Slewinski T.** 2009. Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. *Plant Physiology* **149**, 71–81.

- Braun D, Wang L, Ruan Y.** 2014. Understanding and manipulating sucrose phloem loading, unloading, metabolism, and signalling to enhance crop yield and food security. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1713-1735.
- Buchan D, Minneci F, Nugent T, Bryson K, Jones D.** 2013. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research* **41**, W349–W357.
- Bürkle L, Hibberd J, Quick W, Kühn C, Hirner B, Frommer W.** 1998. The H⁺-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiology* **118**, 59–68.
- Byrne D, Miller W.** 1990. Carbohydrate and Amino-acid-composition of Phloem Sap and Honeydew Produced By *Bemisia-tabaci*. *Journal of Insect Physiology* **36**, 433–439.
- Cao T, Lahiri I, Singh V, Louis J, Shah J, Ayre B.** 2013. Metabolic engineering of raffinose-family oligosaccharides in the phloem reveals alterations in carbon partitioning and enhances resistance to green peach aphid. *Frontiers in Plant Science* **4**, 263.
- Chang S, Puryear J, Cairney J.** 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* **11**, 113-116.
- Chen L, Qu X, Hou B, Sosso D, Osorio S, Fernie A, Frommer W.** 2012. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* **335**, 207–211.
- Chiang P, Song W, Wu K, Korenberg J, Fogel E, Van Keuren M, Lashkari D, Kurnit D.** 1996. Use of a fluorescent-PCR reaction to detect genomic sequence copy number and transcriptional abundance. *Genome Research* **6**, 1013–1026.
- Chincinska I, Liesche J, Krügel U, Michalska J, Geigenberger P, Grimm B, Kühn C.** 2008. Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant Physiology* **146**, 515–528.
- Chomczynski P, Sacchi N.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**, 156–159.
- Conde C, Silva P, Agasse A, Lemoine R, Delrot S, Tavares R, Gerós H.** 2007. Utilization and transport of mannitol in *Olea europaea* and implications for salt stress tolerance. *Plant and Cell Physiology* **48**, 42–53.
- Davidson A, Keller F, Turgeon R.** 2011. Phloem loading, plant growth form, and climate. *Protoplasma* **248**, 153–163.
- Davies C, Wolf T, Robinson S.** 1999. Three putative sucrose transporters are differentially expressed in grapevine tissues. *Plant Science* **147**, 93–100.
- De Schepper V, De Swaef T, Bauweraerts I, Steppe K.** 2013. Phloem transport: a review of mechanisms and controls. *Journal of Experimental Botany* **64**, 4839–4850.

- Decourteix M, Alves G, Bonhomme M, Peuch M, Ben Baaziz K, Brunel N, Guilliot A, Rageau R, Améglio T et al.** 2008. Sucrose (JrSUT1) and hexose (JrHT1 and JrHT2) transporters in walnut xylem parenchyma cells: their potential role in early events of growth resumption. *Tree Physiology* **28**, 215–224.
- Decourteix M, Alves G, Brunel N, Améglio T, Guillio A, Lemoine R, Pétel G, Sakr S.** 2006. JrSUT1, a putative xylem sucrose transporter, could mediate sucrose influx into xylem parenchyma cells and be up-regulated by freeze-thaw cycles over the autumn-winter period in walnut tree (*Juglans regia* L.). *Plant, Cell and Environment* **29**, 36–47.
- Delrot S, Bonnemain J.** 1981. Involvement of Protons as a Substrate for the Sucrose Carrier during Phloem Loading in *Vicia faba* Leaves. *Plant Physiology* **67**, 560–564.
- DeWitt N, Harper J, Sussman M.** 1991. Evidence for a plasma membrane proton pump in phloem cells of higher plants. *The Plant Journal* **1**, 121–128.
- Doidy J, van Tuinen D, Lamotte O, Corneillat M, Alcaraz G, Wipf D.** 2012. The *Medicago truncatula* sucrose transporter family: characterization and implication of key members in carbon partitioning towards arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Plant* **5**, 1346–1358.
- Dusotoit-Coucaud A, Brunel N, Kongsawadworakul P, Viboonjun U, Lacoite A, Julien J, Chrestin H, Sakr S.** 2009. Sucrose importation into laticifers of *Hevea brasiliensis*, in relation to ethylene stimulation of latex production. *Annals of Botany* **104**, 635–647.
- Eisenbarth D, Weig A.** 2005. Sucrose carrier RcSCR1 is involved in sucrose retrieval, but not in sucrose unloading in growing hypocotyls of *Ricinus communis* L. *Plant Biology* **7**, 98–103.
- Emr S, Schekman R, Flessel M, Thorner J.** 1983. An Mf Alpha-1-suc2 (alpha-factor-invertase) Gene Fusion For Study of Protein Localization and Gene-expression In Yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-biological Sciences* **80**, 7080–7084.
- Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters S, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmidt U.** 2006. Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiology* **141**, 196–207.
- Eom J, Cho J, Reinders A, Lee S, Yoo Y, Tuan P, Choi S, Bang G, Park Y et al.** 2011. Impaired function of the tonoplast-localized sucrose transporter in rice, OsSUT2, limits the transport of vacuolar reserve sucrose and affects plant growth. *Plant Physiology* **157**, 109–119.
- Eschrich W, Fromm J.** 1994. Evidence for two pathways of phloem loading. *Physiologia Plantarum* **90**, 699–707.

- Fan R, Peng C, Xu Y, Wang X, Li Y, Shang Y, Du S, Zhao R, Zhang X et al.** 2009. Apple sucrose transporter SUT1 and sorbitol transporter SOT6 interact with cytochrome b5 to regulate their affinity for substrate sugars. *Plant Physiology* **150**, 1880–1901.
- Fisher D, Frame J.** 1984. A guide to the use of the exuding-stylect technique in phloem physiology. *Planta* **161**, 385-393.
- Flemetakis E, Dimou M, Cotzur D, Efrose R, Aivalakis G, Colebatch G, Udvardi M, Katinakis P.** 2003. A sucrose transporter, LjSUT4, is up-regulated during *Lotus japonicus* nodule development. *Journal of experimental botany* **54**, 1789–1791.
- Flora L, Madore M.** 1996. Significance of minor-vein anatomy to carbohydrate transport. *Planta* **198**, 171-178.
- Fondy B, Geiger D.** 1977. Sugar Selectivity and Other Characteristics of Phloem Loading in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiology* **59**, 953–960.
- Frost C, Nyamdari B, Tsai C, Harding S.** 2012. The tonoplast-localized sucrose transporter in *Populus* (PtaSUT4) regulates whole-plant water relations, responses to water stress, and photosynthesis. *PLoS One* **7**, e44467.
- Fu Q, Cheng L, Guo Y, Turgeon R.** 2011. Phloem loading strategies and water relations in trees and herbaceous plants. *Plant Physiology* **157**, 1518–1527.
- Gahrtz M, Schmelzer E, Stolz J, Sauer N.** 1996. Expression of the PmSUC1 sucrose carrier gene from *Plantago major* L. is induced during seed development. *The Plant Journal* **9**, 93–100.
- Gahrtz M, Stolz J, Sauer N.** 1994. A phloem-specific sucrose-H⁺ symporter from *Plantago major* L. supports the model of apoplastic phloem loading. *The Plant Journal* **6**, 697–706.
- Gamalei Y.** 1991. Phloem Loading and Its Development Related To Plant Evolution From Trees To Herbs. *Trees - Structure and Function* **5**, 50–64.
- Gamalei Y.** 1989. Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs. A taxonomic review. *Trees - Structure and Function* **3**, 96–110.
- Gapper N, Coupe S, McKenzie M, Sinclair B, Lill R, Jameson P.** 2005. Regulation of harvest-induced senescence in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) by cytokinin, ethylene, and sucrose. *Journal of Plant Growth Regulation* **24**, 153–165.
- Geiger D.** 2011. Plant sucrose transporters from a biophysical point of view. *Molecular Plant* **4**, 395–406.
- Geiger D, Giaquinta R, Sovonick S, Fellows R.** 1973. Solute distribution in sugar beet leaves in relation to Phloem loading and translocation. *Plant Physiology* **52**, 585–589.
- Gerhardt R, Heldt H.** 1984. Measurement of subcellular metabolite levels in leaves by fractionation of freeze-stopped material in nonaqueous media. *Plant Physiology* **75**, 542–547.

- Gessler A, Rennenberg H, Keitel C.** 2004. Stable isotope composition of organic compounds transported in the phloem of European beech—evaluation of different methods of phloem sap collection and assessment of gradients in carbon isotope composition during leaf-to-stem transport. *Plant Biology* **6**, 721–729.
- Giaquinta R.** 1977. Phloem Loading of Sucrose: pH Dependence and Selectivity. *Plant Physiology* **59**, 750–755.
- Giaquinta R.** 1979. Phloem loading of sucrose: involvement of membrane ATPase and proton transport. *Plant Physiology* **63**, 744–748.
- Gibson U, Heid C, Williams P.** 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research* **6**, 995–1001.
- Gil L, Yaron I, Shalitin D, Sauer N, Turgeon R, Wolf S.** 2011. Sucrose transporter plays a role in phloem loading in CMV-infected melon plants that are defined as symplastic loaders. *The Plant Journal* **66**, 366–374.
- Goggin F, Medville R, Turgeon R.** 2001. Phloem loading in the tulip tree. Mechanisms and evolutionary implications. *Plant Physiology* **125**, 891–899.
- Gottwald J, Krysan P, Young J, Evert R, Sussman M.** 2000. Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America-physical Sciences* **97**, 13979–13984.
- Hackel A, Schauer N, Carrari F, Fernie A, Grimm B, Kühn C.** 2006. Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *The Plant Journal* **45**, 180–192.
- Hall S, Baker D.** 1972. The chemical composition of *Ricinus* phloem exudate. *Planta* **106**, 131-140.
- Hall T.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95–98.
- Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557–580.
- Hannah M, Zuther E, Buchel K, Heyer A.** 2006. Transport and metabolism of raffinose family oligosaccharides in transgenic potato. *Journal of Experimental Botany* **57**, 3801–3811.
- Haritatos E, Keller F, Turgeon R.** 1996. Raffinose oligosaccharide concentrations measured in individual cell and tissue types in *Cucumis melo* L. leaves: implications for phloem loading. *Planta* **198**, 614-622.
- Hayashi H, Chino M.** 1986. Collection of Pure Phloem Sap from Wheat and its Chemical Composition. *Plant Cell Physiology* **27**, 1387-1393.

- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R.** 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**, 1026–1030.
- Hirose T, Imaizumi N, Scofield G, Furbank R, Ohsugi R.** 1997. cDNA cloning and tissue specific expression of a gene for sucrose transporter from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology* **38**, 1389–1396.
- Jensen K, Liesche J, Bohr T, Schulz A.** 2012. Universality of phloem transport in seed plants. *Plant, Cell and Environment* **35**, 1065–1076.
- Jones D.** 2007. Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information. *Methods of Biochemical Analysis* **23**, 538–544.
- Jones D.** 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology* **292**, 195–202.
- Jones D, Taylor W, Thornton J.** 1994. A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry* **33**, 3038–3049.
- Kawabe S, Fukumorita T, Chino M.** 1980. Collection of rice phloem sap from stylets of homopterous insects severed by YAG laser. *Plant and Cell Physiology* **21**, 1319–1327.
- Kehr J.** 2006. Phloem sap proteins: their identities and potential roles in the interaction between plants and phloem-feeding insects. *Journal of Experimental Botany* **57**, 767–774.
- Kelley L, Sternberg M.** 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* **4**, 363–371.
- Knop C.** 2001. Zur Bedeutung von Saccharose-Transportern in Pflanzen mit offener Phloemanatomie. Dissertation, Universität Göttingen.
- Knop C, Stadler R, Sauer N, Lohaus G.** 2004. AmSUT1, a sucrose transporter in collection and transport phloem of the putative symplastic phloem loader *Alonsoa meridionalis*. *Plant Physiology* **134**, 204–214.
- Knop C, Voitsekhovskaja O, Lohaus G.** 2001. Sucrose transporters in two members of the Scrophulariaceae with different types of transport sugar. *Planta* **213**, 80–91.
- Krügel U, Wiederhold E, Pustogowa J, Hackel A, Grimm B, Kühn C.** 2013. Site directed mutagenesis of StSUT1 reveals target amino acids of regulation and stability. *Biochimie* **95**, 2132–2144.
- Kubista M, Andrade J, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B et al.** 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* **27**, 95–125.
- Kühn C.** 2003. A comparison of the sucrose transporter systems of different plant species. *Plant Biology* **5**, 215–232.

- Kühn C, Grof C.** 2010. Sucrose transporters of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 288–298.
- Kühn C, Hajirezaei M, Fernie A, Rössner-Tunali U, Czechowski T, Hirner B, Frommer W.** 2003. The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiology* **131**, 102–113.
- Kühn C, Quick W, Schulz A, Riesmeier J, Sonnewald U, Frommer W.** 1996. Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. *Plant, Cell and Environment* **19**, 1115–1123.
- Laemmli U.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lalonde S, Frommer W.** 2012. SUT Sucrose and MST Monosaccharide Transporter Inventory of the Selaginella Genome. *Frontiers in Plant Science* **3**, 24.
- Lalonde S, Tegeder M, Throne-Holst M, Frommer W, Patrick J.** 2003. Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant, Cell and Environment* **26**, 37–56.
- Lalonde S, Wipf D, Frommer W.** 2004. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 341–372.
- Lemoine R.** 2000. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1465**, 246–262.
- Lemoine R, Bürkle L, Barker L, Sakr S, Kuehn C, Regnacq M, Gaillard C, Delrot S, Frommer W.** 1999. Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS Letters* **454**, 325–330.
- Lemoine R, Kuehn C, Thiele N, Delrot S, Frommer W.** 1996. Antisense inhibition of the sucrose transporter in potato: effects on amount and activity. *Plant, Cell and Environment* **19**, 1124–1131.
- Li C, Weiss D, Goldschmidt E.** 2003. Effects of carbohydrate starvation on gene expression in citrus root. *Planta* **217**, 11–20.
- Liesche J, Krügel U, He H, Chincinska I, Hackel A, Kühn C.** 2011a. Sucrose transporter regulation at the transcriptional, post-transcriptional and post-translational level. *Journal of Plant Physiology* **168**, 1426–1433.
- Liesche J, Martens H, Schulz A.** 2011b. Symplasmic transport and phloem loading in gymnosperm leaves. *Protoplasma* **248**, 181–190.
- Lin X, Kaul S, Rounsley S, Shea T, Benito M, Town C, Fujii C, Mason T, Bowman C et al.** 1999. Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **402**, 761–+.
- Liu D, Chao W, Turgeon R.** 2012. Transport of sucrose, not hexose, in the phloem. *Journal of Experimental Botany* **63**, 4315–4320.

- Lohaus G, Buker M, Hussmann M, Soave C, Heldt H.** 1998. Transport of amino acids with special emphasis on the synthesis and transport of asparagine in the Illinois low protein and Illinois high protein strains of maize. *Planta* **205**, 181–188.
- Lohaus G, Burba M, Heldt H.** 1994. Comparison of the Contents of Sucrose and Amino-acids In the Leaves, Phloem Sap and Taproots of High and Low Sugar-producing Hybrids of Sugar-beet (*Beta vulgaris* L). *Journal of Experimental Botany* **45**, 1097–1101.
- Lohaus G, Moellers C.** 2000. Phloem transport of amino acids in two *Brassica napus* L. genotypes and one *B. carinata* genotype in relation to their seed protein content. *Planta* **211**, 833–840.
- Lohaus G, Pennewiss K, Sattelmacher B, Hussmann M, Hermann Muehling K.** 2001. Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiologia Plantarum* **111**, 457–465.
- Lohaus G, Winter H, Riens B, Heldt H.** 1995. Further-studies of the Phloem Loading Process In Leaves of Barley and Spinach - the Comparison of Metabolite Concentrations In the Apoplastic Compartment With Those In the Cytosolic Compartment and In the Sieve Tubes. *Botanica Acta* **108**, 270–275.
- Ludewig F, Flügge U.** 2013. Role of metabolite transporters in source-sink carbon allocation. *Frontiers in Plant Science* **4**, 231.
- Mahboubi A, Ratke C, Gorzsas A, Kumar M, Mellerowicz E, Niittyla T.** 2013. Aspen SUCROSE TRANSPORTER3 Allocates Carbon into Wood Fibers. *Plant Physiology* **163**, 1729–1740.
- Mallón R, Vieitez A, Vidal N.** 2013. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation in *Quercus robur*: selection by use of a temporary immersion system and assessment by quantitative PCR. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **114**, 171–185.
- Marger M, Saier M.** 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends in Biochemical Sciences* **18**, 13–20.
- Maynard J, Lucas W.** 1982. Sucrose and Glucose Uptake into *Beta vulgaris* Leaf Tissues : A Case for General (Apoplastic) Retrieval Systems. *Plant Physiology* **70**, 1436–1443.
- McCaskill A, Turgeon R.** 2007. Phloem loading in *Verbascum phoeniceum* L. depends on the synthesis of raffinose-family oligosaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 19619–19624.
- Meyer S, Lauterbach C, Niedermeier M, Barth I, Sjolund R, Sauer N.** 2004. Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from *Arabidopsis* sieve elements and sink tissues. *Plant Physiology* **134**, 684–693.

- Meyer S, Melzer M, Truernit E, Hümmer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N.** 2000. AtSUC3, a gene encoding a new *Arabidopsis* sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *The Plant Journal* **24**, 869–882.
- Mullis K, Faloona F.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**, 335.
- Münch E.** 1930. Die Stoffbewegungen in der Pflanze.
- Nadwodnik J, Lohaus G.** 2008. Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta* **227**, 1079–1089.
- Noiraud N, Maurousset L, Lemoine R.** 2001. Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem. *Plant Cell* **13**, 695–705.
- Nugent T, Jones D.** 2009. Transmembrane protein topology prediction using support vector machines. *BMC Bioinformatics* **10**, 159.
- Ohshima T, Hayashi H, Chino M.** 1990. Collection and Chemical Composition of Pure Phloem Sap from *Zea mays* L. *Plant Cell Physiology* **31**, 735–737.
- Olbrich M, Gerstner E, Welzl G, Fleischmann F, Osswald W, Bahnweg G, Ernst D.** 2008. Quantification of mRNAs and housekeeping gene selection for quantitative real-time RT-PCR normalization in European beech (*Fagus sylvatica* L.) during abiotic and biotic stress. *Zeitschrift für Naturforschung Section C - A Journal Of Biosciences* **63**, 574–582.
- Öner-Sieben S, Lohaus G.** 2014. Apoplastic and symplastic phloem loading in *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior*. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1905–1916.
- Oparka K, Prior D.** 1992. Direct Evidence For Pressure-generated Closure of Plasmodesmata. *The Plant Journal* **2**, 741–750.
- Palmer L, Palmer L, Pritchard J, Graham R, Stangoulis J.** 2013. Improved techniques for measurement of nanolitre volumes of phloem exudate from aphid stylectomy. *Plant Methods* **9**, 18.
- Pang Y, Zhang J, Cao J, Yin S, He X, Cui K.** 2008. Phloem transdifferentiation from immature xylem cells during bark regeneration after girdling in *Eucommia ulmoides* Oliv. *Journal of Experimental Botany* **59**, 1341–1351.
- Pate J, Gunning B.** 1969. Vascular transfer cells in Angiosperm leaves A taxonomic and morphological survey. *Protoplasma* **68**, 135–156.
- Payyavula R, Tay K, Tsai C, Harding S.** 2011. The sucrose transporter family in *Populus*: the importance of a tonoplast PtaSUT4 to biomass and carbon partitioning. *Plant Journal* **65**, 757–770.

- Pfaffl M.** 2004b. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* **10**, 92-95.
- Pfaffl M.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, e45.
- Pfaffl M, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians T.** 2004a. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* **26**, 509–515.
- Ramsperger-Gleixner M, Geiger D, Hedrich R, Sauer N.** 2004. Differential expression of sucrose transporter and polyol transporter genes during maturation of common plantain companion cells. *Plant Physiology* **134**, 147–160.
- Regier N, Frey B.** 2010. Experimental comparison of relative RT-qPCR quantification approaches for gene expression studies in poplar. *BMC Molecular Biology* **11**, 57.
- Regier N, Streb S, Zeeman S, Frey B.** 2010. Seasonal changes in starch and sugar content of poplar (*Populus deltoides* x *nigra* cv. Dorskamp) and the impact of stem girdling on carbohydrate allocation to roots. *Tree Physiology* **30**, 979–987.
- Reidel E, Rennie E, Amiard V, Cheng L, Turgeon R.** 2009. Phloem loading strategies in three plant species that transport sugar alcohols. *Plant Physiology* **149**, 1601–1608.
- Reinders A, Sivitz A, Starker C, Gantt J, Ward J.** 2008. Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar sucrose transporter from *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology* **68**, 289–299.
- Reinders A, Sivitz A, Ward J.** 2012. Evolution of plant sucrose uptake transporters. *Frontiers in Plant Science* **3**, 22.
- Rennie E, Turgeon R.** 2009. A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 14162–14167.
- Rensing S, Lang D, Zimmer A, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud P, Lindquist E et al.** 2008. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* **319**, 64–69.
- Rentsch D, Boorer K, Frommer W.** 1998. Structure and function of plasma membrane amino acid, oligopeptide and sucrose transporters from higher plants. *Journal of Membrane Biology* **162**, 177–190.
- Riens B, Lohaus G, Heineke D, Heldt H.** 1991. Amino Acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the Phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiology* **97**, 227–233.
- Riesmeier J, Hirner B, Frommer W.** 1993. Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. *The Plant Cell* **5**, 1591–1598.

- Riesmeier J, Willmitzer L, Frommer W.** 1994. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO Journal* **13**, 1–7.
- Riesmeier J, Willmitzer L, Frommer W.** 1992. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO Journal* **11**, 4705–4713.
- Ririe K, Rasmussen R, Wittwer C.** 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **245**, 154–160.
- Roitsch T, González M.** 2004. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* **9**, 606–613.
- Russin W, Evert R.** 1985. Studies On the Leaf of *Populus Deltoides* (Salicaceae) - Ultrastructure, Plasmodesmatal Frequency, and Solute Concentrations. *American Journal of Botany* **72**, 1232–1247.
- Saier Jr M, Tran C, Barabote R.** 2006. TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Research* **34**, D181–D186.
- Sauer N.** 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters* **581**, 2309–2317.
- Sauer N, Baier K, Gahrtz M, Stadler R, Stolz J, Truernit E.** 1994. Sugar transport across the plasma membranes of higher plants. *Plant Molecular Biology* **26**, 1671–1679.
- Sauer N, Stadler R.** 1993. A sink-specific H⁺/monosaccharide co-transporter from *Nicotiana tabacum*: cloning and heterologous expression in baker's yeast. *Plant Journal* **4**, 601–610.
- Sauer N, Stolz J.** 1994. SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *The Plant Journal* **6**, 67–77.
- Schneeberger C, Speiser P, Kury F, Zeillinger R.** 1995. Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods and Applications* **4**, 234–238.
- Schneider S, Hulpke S, Schulz A, Yaron I, Höll J, Imlau A, Schmitt B, Batz S, Wolf S et al.** 2012. Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters. *Plant Biology* **14**, 325–336.
- Schubert M, Melnikova A, Mesecke N, Zubkova E, Fortte R, Batashev D, Barth I, Sauer N, Gamalei Y et al.** 2010. Two novel disaccharides, rutinose and methylrutinose, are involved in carbon metabolism in *Datisca glomerata*. *Planta* **231**, 507–521.
- Schulze W, Weise A, Frommer W, Ward J.** 2000. Function of the cytosolic N-terminus of sucrose transporter AtSUT2 in substrate affinity. *FEBS Letters* **485**, 189–194.

- Scofield G, Hirose T, Aoki N, Furbank R.** 2007. Involvement of the sucrose transporter, OsSUT1, in the long-distance pathway for assimilate transport in rice. *Journal of Experimental Botany* **58**, 3155–3169.
- Shakya R, Sturm A.** 1998. Characterization of source- and sink-specific sucrose/H⁺ symporters from carrot. *Plant Physiology* **118**, 1473–1480.
- Shiratake K.** 2007. Genetics of Sucrose Transporter in Plants. *Genes, Genomes and Genomics* **1**, 73-80.
- Sivitz A, Reinders A, Ward J.** 2005. Analysis of the transport activity of barley sucrose transporter HvSUT1. *Plant and cell physiology* **46**, 1666–1673.
- Slewinski T, Meeley R, Braun D.** 2009. Sucrose transporter1 functions in phloem loading in maize leaves. *Journal of Experimental Botany* **60**, 881–892.
- Slewinski T, Zhang C, Turgeon R.** 2013. Structural and functional heterogeneity in phloem loading and transport. *Frontiers in Plant Science* **4**, 244.
- Soni R, Carmichael J, Murray J.** 1993. Parameters affecting lithium acetate-mediated transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and development of a rapid and simplified procedure. *Current Genetics* **24**, 455–459.
- Sovonick S, Geiger D, Fellows R.** 1974. Evidence for active Phloem loading in the minor veins of sugar beet. *Plant Physiology* **54**, 886–891.
- Spurr A.** 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* **26**, 31–43.
- Srivastava A, Ganesan S, Ismail I, Ayre B.** 2008. Functional characterization of the *Arabidopsis* AtSUC2 Sucrose/H⁺ symporter by tissue-specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long-distance transport. *Plant Physiology* **148**, 200–211.
- Stadler R, Brandner J, Schulz A, Gahrtz M, Sauer N.** 1995. Phloem Loading by the PmSUC2 Sucrose Carrier from *Plantago major* Occurs into Companion Cells. *The Plant Cell* **7**, 1545–1554.
- Stadler R, Sauer N.** 1996. The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Botanica Acta* **109**, 299–306.
- Stitt M, Wirtz W, Heldt H.** 1983. Regulation of Sucrose Synthesis by Cytoplasmic Fructosebisphosphatase and Sucrose Phosphate Synthase during Photosynthesis in Varying Light and Carbon Dioxide. *Plant Physiology* **72**, 767–774.
- Tabata S, Kaneko T, Nakamura Y, Kotani H, Kato T, Asamizu E, Miyajima N, Sasamoto S, Kimura T et al.** 2000. Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 823–826.

- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S.** 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725–2729.
- Tang C, Huang D, Yang J, Liu S, Sakr S, Li H, Zhou Y, Qin Y.** 2010. The sucrose transporter HbSUT3 plays an active role in sucrose loading to laticifer and rubber productivity in exploited trees of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant, Cell and Environment* **33**, 1708–1720.
- Tegeder M, Wang X, Frommer W, Offler C, Patrick J.** 1999. Sucrose transport into developing seeds of *Pisum sativum* L. *The Plant Journal* **18**, 151–161.
- Theologis A, Ecker J, Palm C, Federspiel N, Kaul S, White O, Alonso J, Altafi H, Araujo R et al.** 2000. Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 816–820.
- Truernit E.** 2001. Plant physiology: The importance of sucrose transporters. *Current Biology* **11**, R169–R171.
- Turgeon R.** 2010a. The puzzle of phloem pressure. *Plant Physiology* **154**, 578–581.
- Turgeon R.** 2010b. The role of phloem loading reconsidered. *Plant Physiology* **152**, 1817–1823.
- Turgeon R.** 1996. Phloem loading and plasmodesmata. *Trends in Plant Science* **1**, 418–423.
- Turgeon R, Beebe D, Gowan E.** 1993. The intermediary cell: Minor-vein anatomy and raffinose oligosaccharide synthesis in the Scrophulariaceae. *Planta* **191**, 446–456.
- Turgeon R, Beebe D.** 1991. The Evidence for Symplastic Phloem Loading. *Plant Physiology* **96**, 349–354.
- Turgeon R, Gowan E.** 1990. Phloem Loading in *Coleus blumei* in the Absence of Carrier-Mediated Uptake of Export Sugar from the Apoplast. *Plant Physiology* **94**, 1244–1249.
- Turgeon R, Medville R.** 2010. *Amborella trichopoda*, plasmodesmata, and the evolution of phloem loading. *Protoplasma*
- Turgeon R, Medville R.** 2004. Phloem loading. A reevaluation of the relationship between plasmodesmatal frequencies and loading strategies. *Plant Physiology* **136**, 3795–3803.
- Turgeon R, Medville R.** 1998. The absence of phloem loading in willow leaves. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America-physical Sciences* **95**, 12055–12060.
- Tuskan G, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S et al.** 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**, 1596–1604.
- van Bel A.** 2003. The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell and Environment* **26**, 125–

- 149.
- van Bel A.** 1993. Strategies of Phloem Loading. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**, 253–281.
- van Bel A.** 1990. Xylem-Phloem Exchange Via the Rays: The Undervalued Route of Transport. *Journal of Experimental Botany* **41**, 631–644.
- van Bel A, Ammerlaan A, van Dijk A.** 1994. A 3-step Screening-procedure To Identify the Mode of Phloem Loading In Intact Leaves - Evidence For Symplasmic and Apoplasmic Phloem Loading Associated With the Type of Companion Cell. *Planta* **192**, 31–39.
- van Bel A, Hess P.** 2008. Hexoses as phloem transport sugars: the end of a dogma?. *Journal of Experimental Botany* **59**, 261–272.
- VanGuilder H, Vrana K, Freeman W.** 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* **44**, 619–626.
- Vaughn M, Harrington G, Bush D.** 2002. Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America-physical Sciences* **99**, 10876–10880.
- Vieitez A, Corredoira E, Martinez M, San-José M, Sánchez C, Valladares S, Vidal N, Ballester A.** 2012. Application of biotechnological tools to *Quercus* improvement. *European Journal of Forest Research* **131**, 519–539.
- Voitsekhovskaja O, Koroleva O, Batashev D, Knop C, Tomos A, Gamalei Y, Heldt H, Lohaus G.** 2006. Phloem loading in two Scrophulariaceae species. What can drive symplastic flow via plasmodesmata? *Plant Physiology* **140**, 383–395.
- Voitsekhovskaja O, Rudashevskaya E, Demchenko K, Pakhomova M, Batashev D, Gamalei Y, Lohaus G, Pawlowski K.** 2009. Evidence for functional heterogeneity of sieve element-companion cell complexes in minor vein phloem of *Alonsoa meridionalis*. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1873–1883.
- Watari J, Kobae Y, Yamaki S, Yamada K, Toyofuku K, Tabuchi T, Shiratake K.** 2004. Identification of sorbitol transporters expressed in the phloem of apple source leaves. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1032–1041.
- Weibull J, Ronquist F, Brishammar S.** 1990. Free amino Acid composition of leaf exudates and Phloem sap : a comparative study in oats and barley. *Plant Physiology* **92**, 222–226.
- Weig A, Komor E.** 1995. An active sucrose carrier (Scr1) that is predominantly expressed in the seedling of *Ricinus communis* L. *Journal of Plant Physiology* **147**, 685–690.
- Weise A, Barker L, Kühn C, Lalonde S, Buschmann H, Frommer W, Ward J.** 2000. A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants. *Plant Cell* **12**, 1345–1355.

- Weschke W, Panitz R, Sauer N, Wang Q, Neubohn B, Weber H, Wobus U.** 2000. Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *The Plant Journal* **21**, 455–467.
- Williams L, Lemoine R, Sauer N.** 2000. Sugar transporters in higher plants—a diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science* **5**, 283–290.
- Winter H, Lohaus G, Heldt H.** 1992. Phloem Transport of Amino Acids in Relation to their Cytosolic Levels in Barley Leaves. *Plant Physiology* **99**, 996–1004.
- Wittwer C, Herrmann M, Moss A, Rasmussen R, others.** 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* **22**, 130–139.
- Wong M, Medrano J.** 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* **39**, 75–85.
- Woodcock D, Crowther P, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith S, Michael M, Graham M.** 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research* **17**, 3469–3478.
- Wright D, Scholes J, Read D, Rolfe S.** 2000. Changes in carbon allocation and expression of carbon transporter genes in *Betula pendula* Roth. colonized by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. *Plant, Cell and Environment* **23**, 39–49.
- Wright J, Fisher D.** 1980. Direct measurement of sieve tube turgor pressure using severed aphid stylets. *Plant Physiology* **65**, 1133–1135.
- Zhou Y, Qu H, Dibley K, Offler C, Patrick J.** 2007. A suite of sucrose transporters expressed in coats of developing legume seeds includes novel pH-independent facilitators. *Plant Journal* **49**, 750–764.
- Zimmermann MH, Ziegler H** 1975. List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. In: Zimmermann MH, Milburn JA, eds. *Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 1, Transport in Plants: Phloem transport*. New York: Springer, 479-503.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde durch ein Promotionsabschlussstipendium der Graduiertenförderung der Bergischen Universität Wuppertal gefördert.

Ganz herzlich möchte ich Prof'in Dr. Gertrud Lohaus für die Überlassung des Themas sowie die sehr gute und motivierende wissenschaftliche und persönliche Unterstützung danken. Ich möchte hier die Gelegenheit ergreifen, ihr auch für die Flexibilität zu danken, die sie mir gewährt hat und die mir ermöglicht hat, Arbeit und Familienleben zu vereinbaren. Der Arbeitsgruppe molekulare Pflanzenforschung/Pflanzenbiochemie danke ich ebenfalls für das sehr kollegiale und angenehme Arbeitsklima und den persönlichen und fachlichen Austausch, insbesondere Horst Fuhrmann für die Instandhaltung der HPLC und Tim Kreutzer für die technische Unterstützung sowie Daniel Fink für das Lesen des Materialien- und Methodenteils.

Des Weiteren möchte ich Prof'in Dr. Gela Preisfeld und Sabine Stratmann für die Möglichkeit danken, dass ich während der Aufbauphase unseres Institutes und darüber hinaus das Labor der Zoologie nutzen durfte.

Bei Dr. Ruth Stadler und Christine Rappl von der Universität Erlangen-Nürnberg möchte ich mich für die sehr freundliche und hilfreiche Unterstützung bei den Antikörper- und Expressionsversuchen bedanken.

Für die Übernahme der Gutachten danke ich Prof'in Gela Preisfeld von der BUW sowie Prof'in Dr. Andrea Polle von der Georg-August-Universität Göttingen.

Mein besonderer Dank gilt Anna Sieben. Vielen Dank für die vielen Stunden, an denen Du meine Texte korrigiert und mir den Raum zum Arbeiten geschaffen hast.

Mein Dank geht auch an Francis Kasten für das Korrekturlesen dieses nicht-juristischen Textes.

Zum Abschluss möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, deren Engagement mir die Möglichkeit gegeben hat den Weg zu gehen, der für mich am besten war.

Çok teşekkür ederim!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, diese Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet zu haben.

Ich erkläre ebenso, dass diese Dissertation keiner anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt worden ist, einen akademischen Titel zu erwerben.

Soner Öner-Sieben

(Wuppertal, im Juni 2014)