

# Regulation der Nektarzusammensetzung bei tag- und nachtblühenden Arten der Gattung *Nicotiana*

**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

**Kira Juliane Tiedge**

Wuppertal, im Februar 2018

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

Co-Referentin: Prof'in Dr. Angelika Preisfeld, Bergische Universität Wuppertal

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20180416-110816-7

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20180416-110816-7>]

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>i</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>iv</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>vi</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Nektar .....	1
1.2. Nektarien.....	2
1.3. Pflanzliche Invertasen .....	5
1.4. Die Gattung <i>Nicotiana</i> .....	7
1.5. Bestäubungssyndrome.....	8
1.6. Fragestellung .....	11
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
2.1. Pflanzenmaterial und Anzucht .....	12
2.2. Gewinnung von Nektar .....	13
2.3. Gewinnung von Nektariengewebe .....	13
2.4. Sammeln von Blattmaterial.....	14
2.5. Gewinnung von Phloemsaft mit der Laser-Aphiden-Technik .....	14
2.6. Biochemische Analyse der Komponenten in Blättern, Nektarien und im Nektar .....	15
2.6.1. <i>Chloroform-Methanol-Extraktion</i> .....	15
2.6.2. <i>Bestimmung von Stärke</i> .....	15
2.6.3. <i>Bestimmung von Protein</i> .....	16
2.6.4. <i>High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)</i> .....	17
2.6.5. <i>Proteinauftrennung mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i> .....	20
2.7. Bestimmung der Invertase-Aktivität .....	23
2.8. Molekularbiologische Arbeiten.....	24
2.8.1. <i>RNA-Isolierung</i> .....	24
2.8.2. <i>Isolierung von Plasmid DNA (Mini-Prep)</i> .....	25
2.8.3. <i>Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen</i> .....	26
2.8.4. <i>Hydrolyse von DNA</i> .....	26
2.8.5. <i>cDNA-Synthese</i> .....	27
2.8.6. <i>Amplifikation von DNA-Fragmenten</i> .....	27

2.8.7. DNA-Sequenzierung.....	28
2.8.8. Qualitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) .....	29
2.8.9. Klonierung .....	30
2.8.10. RNA- und DNA-Größenauftrennung mit Agarosegelen.....	33
2.8.11. Screening des Nektars auf mikrobiellen Befall.....	34
2.9. Verwendete Oligosaccharide.....	35
2.10. Statistik .....	37
2.11. Bioinformatik .....	38
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
3.1. Abschnitt I: Mikrobieller Befall im Nektar .....	40
3.2. Abschnitt II: Nektarinhaltsstoffe bei Tabakpflanzen: Welche gibt es und wodurch werden sie beeinflusst? .....	42
3.3. Abschnitt III: Proteine in Nektar und Nektarien von <i>Nicotiana</i> .....	84
3.4. Abschnitt IV: Regulation der Zuckerzusammensetzung in Nektar und Nektarien bei <i>Nicotiana</i> .....	90
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>124</b>
4.1. Nektarinhaltsstoffe und ihre Anpassung an die Bestäuber.....	124
4.2. Proteine im Nektar.....	128
4.3. Mechanismen der Nektarzuckerproduktion bei tag- und nachtblühenden Tabakarten	129
<b>Literatur.....</b>	<b>133</b>
<b>Appendix.....</b>	<b>146</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>152</b>
<b>Erklärung .....</b>	<b>153</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Liste der untersuchten Pflanzen.....	12
Tabelle 2.2: Reaktionsmedium für einen Reaktionsansatz zur Stärkebestimmung .....	15
Tabelle 2.3: Mastermix pro Reaktionsansatz zur Glucosebestimmung .....	16
Tabelle 2.4: Einstellungen für die Pulsmessungen am Amperometer .....	17
Tabelle 2.5: Lösungen für die Aminosäure-HPLC.....	18
Tabelle 2.6: Pipettierschema für 2 SDS-Gele .....	21
Tabelle 2.7: Puffer für die SDS-PAGE .....	21
Tabelle 2.8: Lösungen für die Coomassie-Färbung .....	22
Tabelle 2.9: Lösungen für die Silberfärbung .....	22
Tabelle 2.10: Puffer und Lösungen für das Invertase-Assay.....	23
Tabelle 2.11: Puffer für die RNA-Isolierung .....	25
Tabelle 2.12: STEL-Puffer .....	26
Tabelle 2.13 Zusammensetzung einer Standard-PCR.....	28
Tabelle 2.14 Standard PCR-Programm .....	28
Tabelle 2.15 Zusammensetzung einer qRT-PCR-Reaktion .....	29
Tabelle 2.16 Programm für die qRT-PCR.....	30
Tabelle 2.17: Puffer und Medien für die Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> .....	32
Tabelle 2.18: Ansatz für 1 l LB-Medium.....	33
Tabelle 2.19: Ansatz für 50x TAE Puffer.....	34
Tabelle 2.20: Ansatz für 1 l Malzextrakt-Agar .....	34
Tabelle 2.21: PCR Ansatz für Hefescreening .....	35
Tabelle 2.22: Verwendete Oligosaccharide für die PCR und qRT-PCR.....	36
Tabelle 2.23: Verwendete bioinformatische Software und Server .....	38
Tabelle 3.1: Häufig vorkommende Mikroben in floralem Nektar .....	40
Tabelle 3.2: Größe und Konzentration der Markerproteine .....	86
Tabelle 3.3: Proteingehalte in Nektarien und Blättern.....	89

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Blütenaufbau bei <i>Nicotiana</i> .....	3
Abbildung 1.2: Modell der ekkrinen Nektarsekretion .....	5
Abbildung 1.3: Florale Nektarien bei <i>N. tabacum</i> .....	7
Abbildung 3.1: Mikroskopische Aufnahmen der Nektarausstriche .....	41
Abbildung 3.2: Mit Coomassie angefärbte Proteine nach der SDS-PAGE .....	85
Abbildung 3.3: Angefärbte Proteine aus <i>N. alata</i> und <i>N. sylvestris</i> nach der SDS-PAGE .....	86
Abbildung 3.4: Mit Silber angefärbte Proteine nach der SDS-PAGE.....	87
Abbildung 3.5: Vergleich der mit Silber angefärbten Proteine innerhalb einer Art .....	88

## Abstract

To attract pollinators, tobacco plants produce nectar. Nectar is an aqueous solution with a high sugar content and also contains amino acids, proteins, anions and cations, organic acids and secondary metabolites. The composition of the nectar varies from species to species, but the concentration of the components and their proportionate ratio is similar intra-specifically. Therefore, the question arises on which factors the nectar composition depends, for example, on the adaptation to certain pollinator groups or on the phylogeny of the respective species. In order to test this, the nectar of 20 tobacco species was analysed for the different components. The protein content in the nectar was similar for many species, but the protein profile differed according to species. Statistical analyses have shown that mainly sugar and amino acids are dependent on the pollinators, whereas for ions and the most important organic acid malate, the influence of pollinators and phylogeny is equally high. This gave rise to the question of how *Nicotiana* can regulate the nectar composition. Since only sucrose reaches the nectar-producing tissue through phloem, the hexoses present in the nectar have to be produced by saccharose-cleaving enzymes. The expression and activity of cell wall invertases in day- and night-flowering tobacco was examined at different time points simultaneously to the sugar composition in nectaries and nectar. The sugar composition of the nectar was already predetermined before and during its secretion, as there was a high correlation between the percentages of fructose and sucrose in nectaries and nectar and additionally no post-secretory modification of the sugars in the nectar could be found. In case of the night-flowering species, the sugar concentration in the nectar was even higher in relation to the nectaries than in day-flowering species. Considering this and the sub-cellular concentrations of sugars in the nectaries, other transport mechanisms must be involved in the secretion in night-flowering *Nicotiana* species than in day-flowering species. Further results suggest that additional enzymes besides cell wall invertases must be involved in the production of nectar.

## Zusammenfassung

Tabakpflanzen produzieren Nektar, um Bestäuber anzulocken. Der Nektar ist eine wässrige Lösung mit einem hohen Zuckeranteil und enthält außerdem Aminosäuren, Proteine, Anionen und Kationen, organische Säuren und sekundäre Metabolite. Die Zusammensetzung des Nektars variiert dabei von Art zu Art, die Konzentration der Inhaltsstoffe und ihr anteiliges Verhältnis ist aber intra-spezifisch ähnlich. Daher stellt sich die Frage, von welchen Faktoren die Nektarzusammensetzung abhängig ist, zum Beispiel von der Anpassung an bestimmte Bestäubergruppen oder von der Phylogenese der jeweiligen Art. Um dies zu untersuchen, wurde der Nektar von 20 verschiedenen Tabakarten auf verschiedene Komponenten hin analysiert. Der Proteingehalt im Nektar war ähnlich bei vielen Arten, aber das Proteinprofil unterschied sich ebenfalls je nach Art. Statistische Analysen zeigten, dass vor allem Zucker und Aminosäuren von den Bestäuber abhängig sind, bei Ionen und der wichtigsten organischen Säure Malat ist der Einfluss von Bestäubern und Phylogenie gleich hoch. Daraus ergab sich die Frage, wie *Nicotiana* die Nektarzusammensetzung regulieren kann. Da über das Phloem nur Saccharose zu den Nektarien, dem Nektar-produzierenden Gewebe, gelangt, müssen die im Nektar vorhandenen Hexosen durch Saccharose-spaltende Enzyme in den Nektarien gebildet werden. Die Expression und Aktivität von Zellwandinvertasen wurde bei tag- und nachtblühendem Tabak zu unterschiedlichen Zeitpunkten parallel zur Zuckerzusammensetzung in Nektar und Nektarien untersucht. Die Zuckerzusammensetzung des Nektars war hauptsächlich schon vor und während der Nektarsekretion vorgegeben, da eine hohe Korrelation der prozentualen Anteile von Fructose als auch von Saccharose zwischen Nektar und Nektarien vorhanden war und keine post-sekretionale Modifikation der Zucker im Nektar stattfand. Bei den nachtblühenden Arten war die Zuckerkonzentration im Nektar im Verhältnis zu den Nektarien noch stärker als bei den tagblühenden Arten erhöht. In Anbetracht dessen und der subzellulären Konzentrationen der Zucker in den Nektarien müssen bei nachtblühenden *Nicotiana*-Arten andere Transportmechanismen als bei tagblühenden Arten an der Sekretion beteiligt sein. Weitere Ergebnisse lassen vermuten, dass noch zusätzliche Enzyme außer Zellwandinvertasen an der Nektarproduktion beteiligt sein müssen.



## 1. Einleitung

Der evolutive Erfolg der angiospermen Blütenpflanzen (Bedecktsamer) kann vor allem durch die Symbiose mit tierischen Bestäubern erklärt werden. Die Bestäubung durch Tiere ist weitaus zielgerichteter und somit effektiver als andere Formen der Bestäubung, weil die Pflanze insgesamt weniger Pollen produzieren muss als beispielsweise bei der Anemophilie (Windbestäubung), welche hauptsächlich bei Gymnospermen (Bedecktsamern) vorkommt. Um potentielle Bestäuber anzulocken, produzieren einige Pflanzen Nektar, welcher den Bestäubern als Nahrungsquelle dient. Die Nektarproduktion ist mit hohen Kosten für die Pflanzen verbunden, und zwar bis zu 37% der verfügbaren Energie, ohne das Wachstum oder die Reproduktionsfähigkeit einzuschränken (Pyke, 1991). Auf die Zusammensetzung des Nektars und dessen Produktion in den Nektarien wird im Folgenden näher eingegangen.

### 1.1. Nektar

Nektar ist eine stark zuckerhaltige Lösung. Neben Zuckern enthalten Nektare auch verschiedenen Aminosäuren, Lipide, Alkaloide und flüchtige organische Verbindungen (Baker und Baker, 1982; La Barrera und Nobel, 2004; González-Teuber und Heil, 2009; Lohaus und Schwerdtfeger, 2014). Durch die Produktion des süßen Nektars werden Tiere angelockt, welche den Pollen von einer Pflanze zur nächsten transportieren können. Eine spezielle Zusammensetzung der Inhaltsstoffe soll dabei das Spektrum der potentiellen Bestäuber verringern. Dies geschieht beispielsweise dadurch, dass manchen Nektarkonsumenten ein Enzym zur Saccharosespaltung fehlt und diese deshalb nur Blüten besuchen können, deren Nektar frei von Saccharose ist (González-Teuber und Heil, 2009). Durch die Anpassung von Nektar an den Bestäuber kann die Pflanze Nektarraub von Tieren vermeiden, welche nicht ihrer Bestäubung dienen. Mit Hilfe der im Nektar enthaltenen sekundären Pflanzenstoffe und der antimikrobiellen Proteine kann die Pflanze sich zusätzlich vor Fressfeinden und Mikroorganismen schützen (Heil, 2011).

Die Zuckerkonzentration im Nektar liegt normalerweise zwischen 10% und 60% (Baker und Baker, 1982). Abhängig ist diese Konzentration von den jeweiligen Blütenbesuchern (Baker und Baker, 1983; Abrahamczyk *et al.*, 2017). So ist die Zuckerkonzentration im Nektar von Bienenblumen durchschnittlich höher als beispielsweise bei Vogelblumen, weil die Bienen den Zucker für die Aufzucht ihrer Larven benötigen (Hess, 1987).

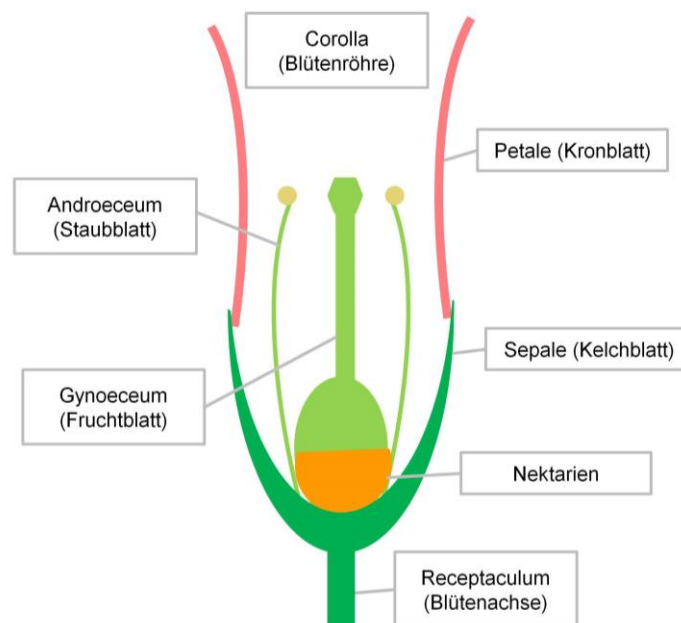
Mit seinem hohen Zuckergehalt und einer Wasserverfügbarkeit bietet Nektar einen optimalen Nährboden für Mikroorganismen. Diese können durch ihre Stoffwechselprozesse die Nektarzusammensetzung verändern (Herrera *et al.*, 2008; Lenaerts *et al.*, 2017). Um einem Befall vorzubeugen, haben die Pflanzen unterschiedliche Schutzmechanismen entwickelt. So wird beispielsweise im sogenannten Nectar-Redox-Cycle Wasserstoffperoxid gebildet, welches einen mikrobiellen Befall verhindern kann (Carter und Thornburg, 2004a). Für diesen Nectar-Redox-Cycle werden unterschiedliche Proteine benötigt (u.a. Nectarin I-V). Insgesamt ist der Proteinanteil im Nektar aber verhältnismäßig gering (bei einigen *Nicotiana*-Arten: 21–265 µg/ml; Kerchner *et al.*, 2015). Womöglich machen die anorganischen Ionen einen weiteren Teil des Nectar-Redox-Cycles aus, allerdings ist die genaue Funktionsweise noch nicht geklärt (Carter und Thornburg, 2004a). Außerdem sind die Ionen wichtig für den Elektrolythaushalt der Bestäuber (Calder, 1979). Von den diversen Ionen die im Nektar vorkommen können, ist  $K^+$  das häufigste Kation und  $Cl^-$  das häufigste Anion (Nicolson *et al.*, 2007).

Freie Aminosäuren sind im Nektar hauptsächlich als Stickstoffquelle für die Bestäuber oder als Phagostimulantien vorhanden (Baker und Baker, 1973; Blüthgen und Fiedler, 2004). Einzelne Aminosäuren können weitere Funktionen für die Bestäuber erfüllen: Honigbienen (*Apis mellifera*) präferieren beispielsweise Prolin-reiche Nektare (Carter *et al.*, 2006). Dies könnte einerseits daran liegen, dass Bienen Prolin schmecken können und andererseits auch daran, dass diese Aminosäure für die Insekten eine wichtige Rolle bei der Fortbewegung spielt (Carter *et al.*, 2006). Besonders für die Energieproduktion der Flugmuskeln bei Bienen und Wespen ist Prolin essentiell (Teulier *et al.*, 2016). Ebenfalls essentiell für Bienen ist Phenylalanin. Bei Pflanzen der Mittelmeerregion, welche von langzüngigen Bienen bestäubt werden, wurde diese Aminosäure in relativ großen Mengen gefunden und wirkt stimulierend auf die Zuckerrezeptoren von Insekten (Petanidou *et al.*, 2006). Nicht nur die Konzentration der Aminosäuren an sich, sondern auch das Verhältnis von Aminosäuren zu Zuckern im Nektar ist ausschlaggebend für die Anlockung bestimmter Bestäuber. So zeigen Bienen eine Vorliebe für essentielle Aminosäuren und verzichten für diese auf eine gewisse Menge Zucker im Nektar (Hendriksma *et al.*, 2014).

## 1.2. Nektarien

Nektardrüsen werden als Nektarien bezeichnet, welche aus einem mehrschichtigen Drüsengewebe bestehen und vom Phloem versorgt werden. Man unterscheidet Nektarien, die sich innerhalb der Blüte befinden (florale Nektarien) von solchen, welche außerhalb der

Blüte sitzen (extraflorale Nektarien). Florale Nektarien können an unterschiedlichen Stellen der Blüte auftreten: im Perianth an der Oberseite der Petalen, an den Sepalen sowie an der Innenseite der Corolla, im Androeceum an der Außenseite der Filamentbasis oder an den Filamentanhängseln (Lauraceae), an den Septen in coenokarp-septierten Fruchtknoten (bei vielen *Liliidae* und *Zingiberidae*), an der Innenwand eines perigynen Hypanthiums (*Fuchsia*, aber auch Rosaceae und Cactaceae), am Receptaculum (Fahn, 1979a; Leins und Erbar, 2000) und ringförmig am Gynoeceum an der basalen Außenseite des Fruchtknotens (bei *Nicotiana*; Kessler und Baldwin, 2007).



**Abbildung 1.1: Blütenaufbau bei *Nicotiana***

Extraflorale Nektarien dienen im Allgemeinen nicht der Bestäubung, sondern der Anlockung von Insekten bei carnivoren Pflanzen oder dem Schutz vor Fressfeinden durch Sekretion bestimmter Stoffe (Pate *et al.*, 1985; Paiva *et al.*, 2007). Tabakpflanzen weisen keine extrafloralen Nektarien auf, weshalb im weiteren Verlauf der Arbeit ausschließlich von floralen Nektarien die Rede ist.

Nektarien sind häufig deutlich von ihrem umgebenden Gewebe zu unterscheiden und gliedern sich in drei unterschiedliche Zelltypen: epidermale, vaskuläre und parenchymatöse Zellen (Pacini *et al.*, 2003). Die Epidermis solcher Nektarien kann sekretorische Trichome enthalten, aber häufiger ist diese Zellschicht durchsetzt mit modifizierten Spaltöffnungen, sogenannten „nectarostomata“ (Smets, 1988). Bei Spezies aus der Gattung *Nicotiana* sowie

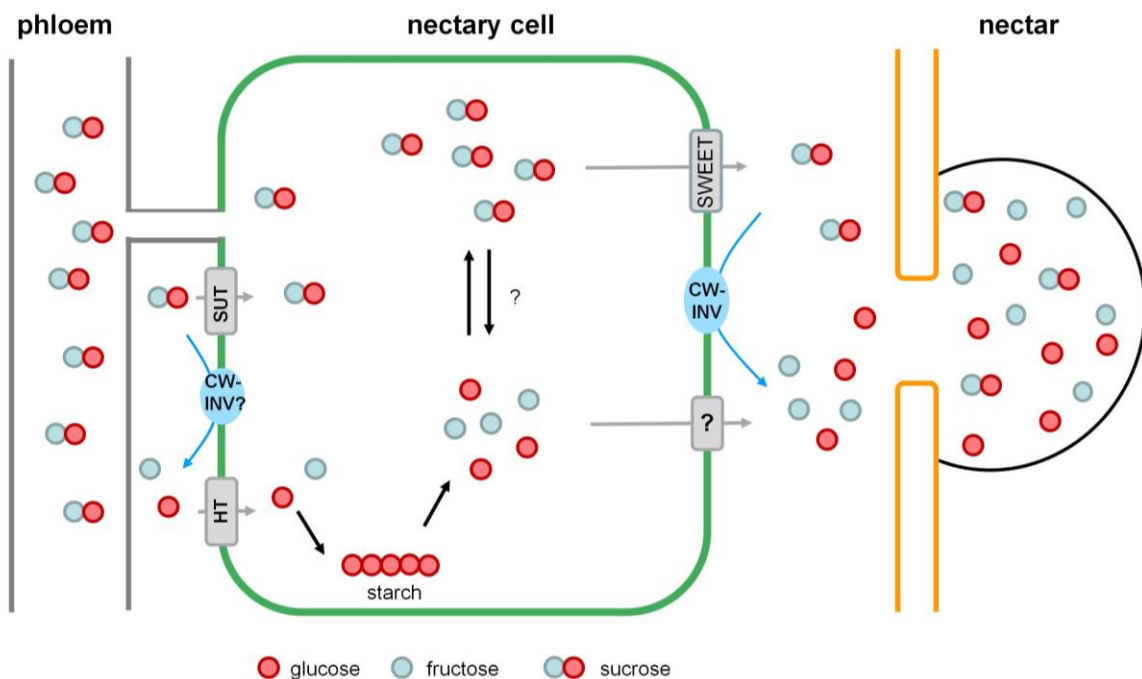
bei den meisten anderen Arten ist die Epidermis von einer Cuticula überzogen (Durkee, 1983; Nepi *et al.*, 1996; Cardoso-Gustavson und Davis, 2015). Unter der Epidermis befindet sich das Nektarienparenchym, in welchem der sogenannte „Prä-Nektar“ modifiziert wird. Das Parenchym ist durchsetzt von einem Gefäßsystem, welches überwiegend aus Phloem oder seltener auch aus Xylem und Phloem bestehen kann (Frey-Wyssling, 1955; Fahn, 1979a).

Bislang ist noch nicht vollständig geklärt, wie die Inhaltsstoffe in den Nektar gelangen. Hierzu gibt es verschiedene Theorien, welche sich auf Beobachtungen bei unterschiedlichen Pflanzenarten stützen. Gemeinsam haben diese Modelle, dass die benötigten Metaboliten vom Phloem zu den Nektarien geliefert werden. Da der Phloemsaft sich in seiner Zusammensetzung sehr vom ausgeschiedenen Nektar unterscheidet (Lohaus und Schwerdtfeger, 2014; Tiedge und Lohaus, 2017), muss eine Modifikation des Prä-Nektars im Nektariengewebe stattfinden. Dadurch wird die Möglichkeit einer apoplastischen Sekretion ausgeschlossen, bei welcher die vom Phloem angelieferten Metaboliten um die Nektarienzellen herum bis an die Oberfläche der Epidermis wandern. Dieses Modell wird zwar beschrieben (Vassilyev, 2010), kann aber nicht die Unterschiede zwischen Phloemsaft und Nektar erklären (Kram und Carter, 2009).

Bei der merokrinen oder auch granulokrinen Sekretion werden die Metabolite des Prä-Nektars symplastisch, also via Plasmodesmata durch die Zellen hindurch, bis zur Nektarienoberfläche transportiert. Dort werden die Metaboliten dann in Vesikel verpackt, welche mit der Plasmamembran verschmelzen und ihren Inhalt nach außen entleeren (Fahn, 1979b; Fahn, 1979a; Nicolson *et al.*, 2007). Diese Theorie wird bislang lediglich von Ultrastrukturaufnahmen gestützt. Diese zeigen beträchtliche Ansammlungen von endoplasmatischen Retikula (ER) und Golgi-Apparaten, welche zur Bildung von Vesikeln benötigt werden. Experimentell konnte diese Art der Sekretion bislang aber nicht bewiesen werden.

Die ekkrine Sekretion ist das wahrscheinlichste Modell für viele Pflanzenarten (Abbildung 1.2). Dabei wird in den Nektarien gespeicherte Stärke bei der Blütenöffnung (Anthese) abgebaut und anschließend Saccharose durch Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS) und andere Enzyme aus den gebildeten Zuckern resynthetisiert. Die Saccharose wird dann vom Uniporter SWEET9, welcher in der Plasmamembran lokalisiert ist, in den Apoplasten exportiert (Lin *et al.*, 2014). Im extrazellulären Raum spaltet eine Zellwand-Invertase (CWINV4) die Saccharose in die Hexose-Monomere Fructose und Glucose. Diese Spaltung hat zwei Effekte zur Folge: Zum einen erzeugt sie einen Gradienten für den Saccharoseexport und zum anderen erzeugt sie ein negatives Wasserpotential, sodass das

Wasser sich in Richtung der Zucker bewegt und Nektartröpfchen bildet (Ruhlmann *et al.*, 2010). Mutanten, bei denen SPS, SWEET9 oder CWINV4 fehlen, produzieren keinen Nektar, während eine Überexpressionen von SWEET9 zu einer deutlichen Erhöhung des Nektarvolumens führt (Lin *et al.*, 2014).



**Abbildung 1.2: Modell der ekrinen Nektarsekretion**

Das Modell zeigt den möglichen Transport von Zuckermolekülen vom Phloem zum Nektar; CW-INV= cell wall invertase; SUT = sucrose transporter, HT = hexose transporter,

### 1.3. Pflanzliche Invertasen

Von den im Nektar vorkommenden Zuckern sind Saccharose und die Hexosen Glucose und Fructose am weitesten verbreitet (Percival, 1961; Baker und Baker, 1983). Da Hexosen typischerweise nicht Bestandteil des Phloemsaftes sind (Lohaus und Schwerdtfeger, 2014), hängt der Anteil der Hexosen im Nektar von der Anwesenheit und Aktivität von Saccharose spaltenden Enzymen ab. Die Saccharose-Spaltung in Pflanzen kann durch mindestens zwei Arten von Enzymen katalysiert werden: entweder reversibel durch Saccharose-Synthase (SuS; EC 2.4.1.13), eine Glycosyltransferase, oder irreversibel durch Invertasen, die die

Hydrolyse von Saccharose katalysieren ( $\beta$ -Fructofuranosidasen; EC 3.2.1.26). Invertasen existieren in zahlreichen Isoformen mit unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen und biochemischen Eigenschaften (Roitsch und González, 2004). Sie lassen sich in drei Gruppen einteilen: Vakuoläre Invertasen (V-INVs), extrazelluläre oder auch Zellwand-Invertasen (CW-INVs) und neutrale Invertasen (N-INVs). Während N-INVs ein leicht alkalisches pH-Optimum haben, sind V-INVs und CW-INVs sogenannte saure Invertasen, da sie am effizientesten bei pH 4,5 bis pH 5,0 arbeiten. Die neutralen Invertasen sind im Cytosol lokalisiert, während sich die vakuolären Invertasen in der Vakuole und die Zellwandinvertasen im Apoplasten befinden (Roitsch und González, 2004). Extrazelluläre Invertasen sind ionisch an die Zellwand gebunden (Sturm, 1999).

Es gibt verschiedene Isoformen der CW-INV, welche gemeinsame Merkmale aufweisen, wie zum Beispiel die Aminosäuresequenzen NDPNG ( $\beta$ F-Motiv) nahe dem N-Terminus des reifen Proteins und WECXDF, ein Hexapeptid näher am C-Terminus (Sturm und Chrispeels, 1990). Für einige Pflanzenarten, z.B. Karotte (*Daucus carota*) und Tomate (*Solanum lycopersicum*), wurden verschiedene organ- und entwicklungsstadienspezifische Expressionsmuster der sauren Invertase gezeigt (Sturm *et al.*, 1995; Godt und Roitsch, 1997). In der Regel ist die Expressionsrate von Invertase in schnell wachsenden Geweben mit einem hohem Bedarf an Hexosen erhöht (Weschke *et al.*, 2003). Interessanterweise wurde sowohl für Karotten als auch für Tomaten eine Blüten- oder Blütenknospenspezifische mRNA-Expression einer sauren Invertase gefunden (Lorenz *et al.*, 1995; Godt und Roitsch, 1997). Es wurde vermutet, dass die blütenspezifische extrazelluläre Invertase für die männliche und weibliche Organentwicklung essentiell ist, z.B. zur Versorgung der Antheren mit Kohlenhydraten (Dorion *et al.*, 1996; Godt und Roitsch, 1997). In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass Zellwandinvertasen auch für die Nektarsekretion bei *Arabidopsis thaliana* entscheidend sind (Ruhmann *et al.*, 2010). Die AtCWINV4-Expression war in Nektarien von *A. thaliana* im Vergleich zu anderen Geweben stark erhöht (Kram *et al.*, 2009). Darüber hinaus sezernierten zwei unabhängige *cwinv4*-Mutantenlinien mit stark reduzierter Zellwandinvertase-Aktivität keinen Nektar, obwohl die Ultrastruktur der Nektarien dem Wildtyp sehr ähnlich war (Ruhmann *et al.*, 2010).

## 1.4. Die Gattung *Nicotiana*

Die Gattung *Nicotiana* gehört zur Familie der Nachtschattengewächse (Solanaceae). Anhand von Plastid-DNA-Vergleichen wurden die bislang 75 bekannten Arten der Gattung *Nicotiana* in 13 Sektionen aufgeteilt (Knapp *et al.*, 2004; Clarkson *et al.*, 2004). Viele Arten haben durch ihr erzeugtes Nikotin einen effektiven Schutz gegen Fressfeinde entwickelt (Goodspeed, 1954; Ippolito, 2000). Auf Grund ihres Nikotingehaltes haben sie außerdem eine große wirtschaftliche Bedeutung für die Tabakindustrie, besonders die beiden Arten *Nicotiana sylvestris* und *N. tabacum* (Müller-Jahncke *et al.*, 2005). Ihre Verbreitung erstreckt sich über Nord- und Südamerika, Australien und Afrika, wobei der Schwerpunkt mit 75% der vorkommenden Arten deutlich auf den amerikanischen Kontinenten liegt (Goodspeed, 1954). In Afrika wurde bislang nur eine einzige Tabakart (*N. africana*) entdeckt (Merxmüller und Buttler, 1975). Viele *Nicotiana*-Arten sind annuell (einjährige), manche Arten sind aber auch biennal (zweijährig) oder perennial (mehrjährig; Goodspeed, 1954). Ihre Ausprägung kann sehr divers sein. Einige Tabakpflanzen erreichen eine Höhe von bis zu zwei Metern, und die ovalen, lanzettlichen oder herzförmigen Blätter können eine Länge von wenigen Zentimetern bis zu einem Meter erreichen (Goodspeed, 1954; Stehmann *et al.*, 2002). Blüten haben oft eine weiße, rosa oder gelb-grünliche Färbung, enthalten am Blütenboden Nektar und können tagsüber, nachts oder in der Dämmerung erblühen (Kaczorowski, 2007). Die Blütenmorphologie spielt eine wichtige Rolle bei der Anlockung von Bestäubern und wird zusammen mit weiteren Merkmalen als Bestäubungssyndrom zusammengefasst.



**Abbildung 1.3: Florale Nektarien bei *N. tabacum***

links: Eine geöffnete Blüte von *N. tabacum*; mittig: Das Gynoeceum befindet sich bei allen *Nicotiana* Arten im unteren Bereich der Blütenröhre; rechts: Das Nektariengewebe bildet sich ringförmig um den basalen Teil des Gynoeceums und kann mit dem Skalpell entfernt werden.

## 1.5. Bestäubungssyndrome

Eine Gruppe von floralen Merkmalen wie z.B. Farbe, Morphologie, Geruch und Nektarzusammensetzung wird als Bestäubungssyndrom (pollination syndrome) bezeichnet, welches auf einen bestimmten Bestäubertypen hinweist. Diese Syndrome beschreiben die evolutionäre Konvergenz zwischen Blütenmerkmalen in verschiedenen Verwandtschaftslinien als Reaktion auf die Selektion durch ähnliche Bestäubergruppen (Baker, 1961; van der Pijl, 1961; Stebbins, 1970). Über die oben genannten Merkmale hinaus erfolgt die Einschätzung des Bestäubungssyndroms über die Zuckerzusammensetzung des Nektars (Abrahamczyk *et al.*, 2017). So produzieren beispielsweise über Kolibris und Bienen bestäubte Pflanzen oftmals saccharosereiche Nektare, während fledermausbestäubte Nektare überwiegend hexosedominant sind (Baker und Baker, 1975). Allerdings konnte die tatsächliche Aussagefähigkeit der Bestäubungssyndrome nicht endgültig belegt werden (Ollerton und Watts, 2000; Ollerton *et al.*, 2009) und die Festlegung auf ein Bestäubungssyndrom sollte nicht die Bestäubung durch andere Gruppen vollständig ausschließen (Fleming *et al.*, 2001; Mayfield *et al.*, 2001). Im Weiteren werden einige der für Tabakpflanzen besonders wichtigen Bestäubergruppen sowie die entsprechenden Bestäubungssyndrome vorgestellt.

### *Lepidopterophilie*

Das Merkmalssyndrom, welches mit der Bestäubung durch Schmetterlinge einhergeht, wird als Lepidopterophilie bezeichnet. Generell dienen die Blumenbesuche den Schmetterlingen zur Befriedigung des eigenen Nahrungsbedürfnisses (Hilje *et al.*, 2015). Die Lepidopterophilie kann weiter unterteilt werden in die Bestäubung durch Tagfalter (Psychophilie) oder durch nachtaktive Schwärmer (Sphingophilie). Tagfalter ernähren sich erst als erwachsene Tiere von Blütennahrung. Bei der Bestäubung durch Tagfalter wird der Pollen beiläufig mit den Flügeln, dem Kopf oder dem Rüssel zu den nächsten Blüten transportiert, je nachdem wo er bei der Nahrungsaufnahme hängen geblieben ist. Die Blüten der Tagfalterblumen sind zart gebaut und stehen aufrecht. Dabei werden Stieltellerblumen (z.B. Nelken) bevorzugt besucht. Der Aufbau dieser Blüten zeichnet sich durch eine kurze, senkrechte Corolla (Blütenröhre) mit einer darauf sitzenden waagerechten Scheibe aus Petalen (Kronblättern) aus, auf der die Bestäuber landen können. Der Nektar befindet sich am Grund der maximal 40 mm tiefen Corolla. Viele dieser Blüten haben eine bunte, oft rötliche Färbung, da Tagfalter im Gegensatz zu Bienen in der Lage sind, die Farbe Rot wahrzunehmen. Weitere auftretende Farben sind Blau, Gelb und Weiß. Der Geruch der



Tagfalterblüten ist blumig und angenehm. Sie erblühen bzw. öffnen sich tagsüber und duften vor allem während der Tageszeit (Kugler, 1970; Fenster *et al.*, 2004; Hilje *et al.*, 2015).

Nachtaktive Schmetterlinge werden als Schwärmer (*Sphingidae*) bezeichnet und das entsprechende Bestäubungssyndrom als Sphingophilie. Der Rollrüssel der einheimischen Sphingiden kann eine Länge von bis zu 80 mm erreichen. Anders als die Tagfalter saugen die Schwärmer meistens frei schwebend. So berühren sie die Blüten nur mit dem Rüssel und vollziehen so die Bestäubung. Angepasst an den langen Rüssel ihrer Bestäuber besitzen die Schwärmerblumen meistens sehr schmale und längliche Kronröhren. Viele dieser Blumen gehören dem Stieltellertyp oder auch seltener dem Pinseltyp an. Farblich überwiegen die weißlichen, gelblichen und blass-purpurnen Töne, teilweise auch mit starker UV-Reflexion. Nachts erblühen die Pflanzen und welken oftmals morgens bereits wieder. Die Duftemission erfolgt primär während der Nacht (Kugler, 1970; Fenster *et al.*, 2004; Hilje *et al.*, 2015).

### *Melittophilie*

Bienen und Hummeln sind zwar in Mitteleuropa mit Abstand die wichtigsten Bestäuber (Müller *et al.*, 2006), allerdings nicht für die überwiegend in Südamerika vorkommenden Tabakpflanzen. Die Mundwerkzeuge der Apiden bestehen aus den Mandibeln, welche zur Pollenzerkleinerung dienen und dem ca. 4-15 mm lange Rüssel, welcher aus den leckend-saugenden Mundwerkzeugen gebildet wird (Haydak, 1970). Dabei unterscheidet man die verschiedenen Bienenfamilien vor allem anhand ihrer Mundwerkzeuge. Ein wichtiges Kriterium ist zum Beispiel die Einteilung in kurz- und langzüngige Bienen (Michener, 2000). Der Nektar ist bei Bienenblumen in der verhältnismäßig kurzen Corolla verborgen. Nach dem Besuch von kurzrüsseligen Hummeln finden sich oft kleine Löcher im Pflanzengewebe, welche die Hummeln zur Nektarentnahme dort hinein gebissen haben (Leins und Erbar, 2000).

Weitere Syndrome aus der Übergruppe der Insektenbestäubung (Entomophilie) bildeten sich aus der Bestäubung durch Käfer (Cantharophilie), Fliegen (Myiophilie), Wespen (Sphecophilie) und Ameisen (Myrmekophilie). An dieser Stelle werden jene Syndrome nur der Vollständigkeit halber erwähnt. Bei keiner der untersuchten Arten ist bislang eine Bestäubung durch diese Insekten bekannt.

### *Ornithophilie*

Vogel-bestäubte Pflanzen besitzen als gemeinsames Charakteristikum große, auffällige und robuste Blüten oder Blütenstände mit roten, orangefarbenen oder leuchtend-gelben Farben, ohne starken Duft und große Mengen an dünnflüssigem Nektar, welcher häufig nur eine

geringe Zuckerkonzentration vorweist. Häufig sind Blütenbecher oder Kronröhren vorhanden, in denen der Nektar sich sammelt. Röhren-, Rachen-, Glocken-, Pinsel- und Fahnenblumen sind typische Ausbildungsformen dieses ornithophilen Syndroms. Vermutlich haben sich die sogenannten Vogelblumen aus Bienen- und Schmetterlingsblumen entwickelt, indem sich die Vorfahren der heutzutage vorkommenden Blütenvögel bei der Suche nach Flüssigkeiten und Insekten den Blüten zugewandt haben (Kugler, 1970). Ornithophilie ist in vielen Regionen Amerikas und den gemäßigten Zonen Asiens verbreitet. Eine wichtige Bestäubergruppe für Tabakpflanzen stellen Kolibris (*Trochilidae*) dar (Raguso *et al.*, 2003; Schueller, 2004; Kessler und Baldwin, 2007). Kolibri-bestäubte Blüten unterscheiden sich morphologisch nicht von anderen ornithophilen Blüten. Der Nektar dieser Blüten ist häufig Saccharose-reich, ähnlich dem anderer Bestäubergruppen mit langen Mundwerkzeugen, zum Beispiel von Schwärmern oder langzüngigen Bienen (Baker und Baker, 1983, 1990). Nektarvögel (*Nectariniidae*) können als Altwelt-Gegenstück zu den in der Neuwelt beheimateten Kolibris angesehen werden, da sie große Ähnlichkeiten sowohl in der Morphologie als auch in der Nahrungsaufnahme aufweisen (Prinzinger *et al.*, 1989). Deshalb wäre zu erwarten, dass auch der konsumierte Nektar eine vergleichbare Zuckerszusammensetzung aufweist. Dies ist aber nicht der Fall, da den Nectariniidae ein Enzym zur Saccharosespaltung fehlt und sie deshalb auf Hexose-dominante Nektare angewiesen sind (Marlin *et al.*, 2016).

### *Chiropterophilie*

Fledermausbestäubung wird als Chiropterophilie bezeichnet. Vor allem Fledermäuse der Unterfamilie der Glossophaginae ernähren sich von Nektar. Arten dieser Unterfamilie sind in den südlichen Vereinigten Staaten bis Brasilien beheimatet. Ihre lange Zunge ist auf die Nektaraufnahme abgestimmt (Eisenberg und Redford, 1989). Neotropische Blüten, welche von Fledermäusen bestäubt werden, blühen überwiegend nachts, haben eine matte Farbgebung, einen Hexose-dominanten Nektar und einen markanten Geruch (Helvesen, 1993; Muchhala, 2003). Fledermäuse können sich nicht ausschließlich von Nektar ernähren; sie benötigen weitere Kohlenhydratquellen (Howell, 1974). Da die Chiropterophilie eine relativ seltene Form der Bestäubung darstellt, ist sie auch weniger untersucht als viele andere Formen.

### *Autogamie*

Autogame Pflanzen sind selbstbestäubend. Autogamie kommt verhältnismäßig selten unter natürlichen Umständen vor, da oft weniger keimfähige Samen gebildet werden und die

Pflanzen Schutzmechanismen (z.B. Dichogamie) gegen die Selbstbefruchtung entwickelt haben (Routley *et al.*, 2004). Deshalb tritt sie häufiger bei Pflanzen in Gebieten mit niedriger Bestäuberdichte auf oder wird alternativ zur Fremdbestäubung genutzt. Autogame Blüten sind oftmals klein, unauffällig und produzieren weniger Nektar als allogame Blüten, da sie nicht auf die Anlockung von Bestäubern angewiesen sind (Jersáková und Johnson, 2006).

## 1.6. Fragestellung

Bislang ist wenig über die biochemischen und molekularen Mechanismen der Nektarproduktion bekannt. Tabakpflanzen eignen sich besonders gut für diese Fragestellung, da sie zum einen in den Pflanzenwissenschaften als Modellorganismen gelten und es bereits Studien zu Nektar und Nektarien bei Tabakpflanzen gibt. Zum anderen ist die Gattung *Nicotiana* sehr divers in Bezug auf ihre Bestäuber und ihre Blütenöffnungszeit. Außerdem enthalten viele Arten verhältnismäßig große Mengen Nektar, welche für die Analyse benötigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wird zunächst untersucht, welche Inhaltsstoffe im Nektar von Tabakpflanzen neben den Hauptzuckern Glucose, Fructose und Saccharose noch enthalten sind und ob sich die Nektarzusammensetzung bei verschiedenen *Nicotiana*-Arten unterscheidet. In diesem Zusammenhang werden auch Proteine untersucht, die im Nektar vorhanden sind, und ein artenübergreifender Vergleich der Proteinmuster und Konzentrationen angestellt. Desweiteren geht es um die Frage, ob die Nektarzusammensetzung primär durch taxonomischen Verhältnisse oder die Anpassung an die Bedürfnisse ihrer Bestäuber beeinflusst wird.

Darüber hinaus werden die Regulationsmechanismen, welche an der Nektarsekretion beteiligt sind, untersucht. Dabei geht es vor allem um die Regulation der Nektarzuckerzusammensetzung und im Speziellen um die Funktion der Zellwandinvertasen bei diesem Prozess. Deshalb werden bei tag- und bei nachtblühenden *Nicotiana*-Arten unter anderem Zuckerkonzentrationen im Nektar und den Nektarien analysiert und die enzymatische Aktivität sowie die Expression der Zellwandinvertasen im Tagesverlauf gemessen. Aus den Daten wird ein Modell der Nektarzuckerregulation erstellt, welches die Regulationsmechanismen vor, während und nach der Nektarsekretion umfasst.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Pflanzenmaterial und Anzucht

Die Samen zur Anzucht der Tabakpflanzen wurden von verschiedenen Instituten zur Verfügung gestellt (Tabelle 2.1).

**Tabelle 2.1: Liste der untersuchten Pflanzen.**

Art	Sektion	Samen von
tagblühend		
<i>N. africana</i> Merxm.	Suaveolentes	Ruhr-Universität Bochum
<i>N. attenuata</i> Torr. ex Wat.	Petunoides	Max-Planck-Institut, Jena
<i>N. glauca</i> Graham	Noctiflorae	Ruhr-Universität Bochum
<i>N. knightiana</i> Goodsp.	Paniculatae	NiCoTa, Rheinstetten
<i>N. langsdorffii</i> Weinm.	Alatae	Universität Rostock
<i>N. nudicaulis</i> Watson	Repandae	Universität Rostock
<i>N. palmeri</i> Gray	Trigonophyllae	Universität Rostock
<i>N. paniculata</i> L.	Paniculatae	Ruhr-Universität Bochum
<i>N. rustica</i> L.	Rustica	Ruhr-Universität Bochum
<i>N. tabacum</i> L.	Nicotiana	NiCoTa, Rheinstetten
nachtblühend		
<i>N. acuminata</i> Hook.	Petunoides	Universität Rostock
<i>N. alata</i> Link & Otto	Alatae	Ruhr-Universität Bochum
<i>N. benthamiana</i> Domin	Suaveolentes	Universität Rostock
<i>N. longiflora</i> Cav.	Alatae	NiCoTa, Rheinstetten
<i>N. nesophila</i> Johnston	Repandae	NiCoTa, Rheinstetten
<i>N. otophora</i> Griseb.	Tomentosae	NiCoTa, Rheinstetten
<i>N. plumbaginifolia</i> Viv.	Alatae	Universität Rostock
<i>N. stocktonii</i> Brandegees	Repandae	NiCoTa, Rheinstetten
<i>N. suaveolens</i> Lehm.	Suaveolentes	Ruhr-Universität Bochum
<i>N. sylvestris</i> Speg. & Com.	Sylvestres	Ruhr-Universität Bochum

Alle Pflanzen wurden in den Gewächshäusern der Bergischen Universität Wuppertal angezogen. Dazu wurden die Samen auf feuchter Anzuchterde ausgesät und keimen gelassen. Die Samen von *N. attenuata* mussten zuvor mit Gibberellinsäure (GA<sub>3</sub>, 1mM) und Flüssigrauch (1:50 verdünnt; The Original Australian Liquid Smoke) behandelt werden, damit sie keimen. Sobald die Pflanzen eine Höhe von 2–3 cm erreicht hatten, wurden die Sprösslinge pikiert und je nach Größe in passende Töpfe umgepflanzt. Die ausgewachsenen Pflanzen wurden in 5l Töpfen gehalten und unterliegen im Gewächshaus einem automatisierten Beleuchtungs- und Bewässerungsregime (14 Stunden Licht / 10 Stunden Dunkel; tägliche Bewässerung). Die Temperatur betrug ganzjährig ca. 25°C am Tag und 18°C in der Nacht und die Lichtintensität lag bei ca. 300  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

## 2.2. Gewinnung von Nektar

Die Gewinnung des Nektars erfolgte auf verschiedene Arten. Für eine qualitative Analyse des Nektars reichte es aus, den Nektar mit Filterpapierspitzen aufzusaugen und in Wasser rückzulösen. Um für quantitative Analysen das Volumen des gewonnenen Nektars abzuschätzen, wurde dieser entweder mit 0,5  $\mu\text{l}$  Glaskapillaren oder mit der Mikropipette direkt aus den Blütenkelchen gesammelt. Bis zur Verwendung wurde der Nektar bei -20°C gelagert.

## 2.3. Gewinnung von Nektariengewebe

Um reines Nektariengewebe zu erhalten, wurden die Blüten von der Pflanze entfernt, das Gynoeceum aus der Blüte mittels Skalpell isoliert und die Nektarien, welche deutlich an ihrer orangen Färbung zu erkennen sind, seziert. Wenn die Nektarien später zur Isolation von RNA verwendet werden sollten, wurden der Arbeitsplatz und die Materialien zuvor mit Ethanol und RNase AWAY<sup>®</sup> (Carl Roth, Karlsruhe) gereinigt. Anschließend erfolgte eine sofortige Kühlung in flüssigem Stickstoff bis zur Lagerung bei -80°C. Für weitere Analysen wurde das Nektariengewebe unter dauerhafter Kühlung mit flüssigem Stickstoff fein gemörsert.

## 2.4. Sammeln von Blattmaterial

Die Tabakblätter wurden parallel zum Nektariengewebe gesammelt. Es wurde darauf geachtet, dass sich alle Blätter in einem guten Zustand befanden und dass sie ähnlichen Lichtverhältnissen ausgesetzt waren (ca. 100  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

## 2.5. 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.*, 2004; 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 Tabakpflanzen gefunden wurden. Als Pflanzenmaterial wurden ca. 30 cm hohe Pflanzen verwendet. Mit einem angefeuchteten Pinsel wurden 15–20 Läuse in einem kleinen Käfig gefangen und auf der Blattunterseite der zu untersuchenden Pflanze fixiert. Nach einer Inkubationsphase von 2–4 h (je nach Tabakart) hatten die meisten Läuse ihre Stechrüssel in die Siebröhren eingestochen. Der Käfig wurde entfernt und das Blatt mit den Läusen vorsichtig in die Laser-Apparatur eingespannt. Mit einem 10x Objektiv wurde der Stechrüssel einer Laus im Okularstrichkreuz positioniert. Für die Abtrennung des Stechrüssels wurde ein 40x Objektiv verwendet, durch dessen Strahlengang ein Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 1,06  $\mu\text{m}$  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 Aphide entfernt und eine 0,5  $\mu\text{l}$  Mikrokapillare auf dem restlichen Stechrüssel positioniert. 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 durch einen Luftbefeuchter kontinuierlich Wasserdampf zugeführt, sodass die Luftfeuchte etwa 90%–95% betrug. Mithilfe eines Lineals wurde die Menge an gesammeltem Phloemsaft in der Kapillare bestimmt, anschließend in 50  $\mu\text{l}$  Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.6. Biochemische Analyse der Komponenten in Blättern, Nektarien und im Nektar

### 2.6.1. Chloroform-Methanol-Extraktion

Für die Analyse der Zucker im Pflanzengewebe wurden etwa 50 mg gemörserte Nektarien oder 100 mg gemörserte Blätter in ein Schraubröhrchen überführt, mit 5 ml Chloroform/Methanol-Puffer (1,5:3,5, v/v) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die genau abgewogene Menge wurde notiert, um später auf die per HPLC ermittelten Konzentrationen in pro Gramm Frischgewicht (FW) umrechnen zu können. Nach der Inkubation wurden der Lösung 3 ml H<sub>2</sub>O zugesetzt, gevortext und kurz zentrifugiert (4500 rpm). Die wässrige Phase wurde in ein 100 ml Rundkolben überführt und die Extraktion mit 2 ml H<sub>2</sub>O wiederholt. Die den Rest enthaltenden Zentrifugenröhrchen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Nachdem die wässrigen Phasen im Rundkolben vereint wurden, folgte die Trocknung in einem Rotationsverdampfer. Die Zucker wurden anschließend in 1 ml bei Blättern und in 0,5 ml bei Nektarien H<sub>2</sub>O gelöst, mit einer 1 ml Spritze aufgenommen und durch einen Spitzenfilter (Nylonmembran mit 0,2 µm Porengröße) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (RG) filtriert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung.

### 2.6.2. Bestimmung von Stärke

Für die Stärkebestimmung wurde das Pellet aus der Chloroform-Methanol-Extraktion mit 5 ml 96% Ethanol gewaschen, zentrifugiert (5 min | 4500 rpm) und der Überstand vorsichtig abgegossen. Dann wurde das Pellet in 2 ml 0.2 N KOH resuspendiert und im Schüttelwasserbad inkubiert (3 h | 80°C). Anschließend wurde der pH-Wert auf 4.5–5.0 eingestellt und 10 min im Ultraschallbad homogenisiert. Zur enzymatischen Aufspaltung der Stärke wurden je zweimal pro Probe 100 µl Probe mit 400 µl Reaktionsmedium (Tabelle 2.2) versetzt und im Schüttelwasserbad inkubiert (4 h | 55°C).

**Tabelle 2.2: Reaktionsmedium für einen Reaktionsansatz zur Stärkebestimmung**

Substanz	Konzentration
H <sub>2</sub> O Millipore	400 µl
Natriumacetat pH 4.8	50 mM
α-Amylase	1,98 U
Amyloglukosidase	1,38 U

Nun wurden die Proben zentrifugiert (2 min | 13000 rpm) und der klare Überstand zur Bestimmung des Glucosegehalts verwendet. Die Glucosebestimmung erfolgte optisch-enzymatisch. In Doppelbestimmung wurden hierzu je 10 µl Probe in einer Messküvette mit 690 µl Mastermix mit Hilfe eines kleinen Plastikspatels verrührt (Tabelle 2.3).

**Tabelle 2.3: Mastermix pro Reaktionsansatz zur Glucosebestimmung**

Substanz	Konzentration
Tris-HCl pH 8,0	660 µl
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
ATP	1,5 mM
NADP <sup>+</sup>	0,5 mM

Der Anfangsextinktionswert wurde photometrisch gemessen (bei 334 nm; Blindwert gegen Luft). Dann wurde die Reaktion mit 5 µl Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (1:10 verdünnt) gestartet und für mindestens 10 min inkubiert. Abschließend wurde die Endextinktion erneut photometrisch gemessen.

### 2.6.3. Bestimmung von Protein

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry *et al.* (1951), die auf einer Farbreaktion der Peptidbindungen und anschließender photometrischer Messung beruht, wobei die Peptidbindungen mit Kupfer(II) im Alkalischen einen blau-violetten Komplex bilden (Biuret-Reaktion) und das Folin-Ciocalteus Phenolreagenz durch das behandelte Protein zu Molybdänblau reduziert wird. Da lediglich der Proteingehalt vergleichend als Bezugsgröße im Vordergrund stand, wurden 20–25 mg gemörsertes Nektariengewebe lediglich in 500 µL 80 mM Natriumacetatpuffer (pH 4,8) suspendiert und keine Proteinextraktion durchgeführt.

Zunächst wurde eine Arbeitslösung mit Kupfer (II) und Puffer frisch hergestellt, in dem Stammlösungen A, B und C (siehe 3.1.9.) in einem Verhältnis von 99:0,5:0,5 gemischt wurden. 750 µL Arbeitslösung wurden mit 135 µL VE-Wasser und 15 µL Probe (1:10-Verdünnung) vermischt und 15 min inkubiert. Danach wurde 100 µL Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (1:3 verdünnt) hinzugegeben und bis zur Messung der Extinktion bei 578 nm gegen Luft 18 min inkubiert. Gleichzeitig wurde ein Ansatz zur Messung des Hintergrunds („Stop vor Start“) hergestellt, in dem 750 µL Arbeitslösung direkt mit 100 µL Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (1:3 verdünnt) ebenfalls 15 min inkubiert wurden. Nach Zugabe von 135 µL VE-Wasser und 15 µL Probe (1:10-Verdünnung) wurde 18 min inkubiert und wie bereits



beschrieben die Extinktion ( $E_{\text{Stop vor Start}}$ ) gemessen, die von der Extinktion der reagierten Probe abgezogen werden konnte.

Zur Auswertung wurde eine externe Kalibrierung mit Rinderserumalbum (BSA) durchgeführt, wobei statt den 135  $\mu\text{L}$  VE-Wasser mit 15  $\mu\text{L}$  Probe jeweils 150  $\mu\text{L}$  Kalibrierlösung nach 3.1.9. zur Messung eingesetzt wurden. Mithilfe der Steigung der Kalibriergeraden konnte der Proteingehalt berechnet werden.

$$\text{Proteingehalt} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{g Frischgewicht}} \right] = \frac{\Delta E}{m \left[ \frac{\text{ml}}{\text{mg}} \right]} \times \frac{0,5 \text{ ml}}{\text{Einwaage [g]}} \times \frac{150 \mu\text{l}}{15 \mu\text{l}}$$

$$\Delta E = E - E_{\text{Stop vor Start}}$$

$$m = \text{Steigungsfaktor}$$

## 2.6.4. High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)

### 2.6.4.1. Analyse der Zucker

Die Bestimmung der Zucker aus Nektar, Gewebeextrakten und Phloemsaft erfolgte mithilfe einer High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) nach Nadwodnik und Lohaus (2008). Dafür wurden die Extrakte mit Spritzenfilter (0,2  $\mu\text{m}$  Porengröße, Fa. Roth) gereinigt und mit  $\text{H}_2\text{O}$  soweit verdünnt, dass die Konzentration der Zucker im linearen Detektionsbereich (50-500 $\mu\text{M}$ ) des Puls-Amperometrischen Detektors lag (Zelle: #5040, Amperometer: Coulochem II, Model 5200, Fa. ESA). Die Pulseinstellungen sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

**Tabelle 2.4: Einstellungen für die Pulsmessungen am Amperometer**

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

Die Beladung 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  $\mu\text{M}$  erstellt. Die gesammelten chromatografischen Daten wurden an einem Computer mit der Software PeakNet (Version 5.1, Fa. Dionex) analysiert.

#### 2.6.4.2. Analyse der freien Aminosäuren

Die Analyse der freien Aminosäuren erfolgte mittels HPLC nach Riens *et al.* (1991) und Lohaus *et al.* (2014). Für die Analyse von Aminosäuren, die eine primäre Aminogruppe enthalten, wurde eine Vorsäulenderivatisierung mit *o*-Phtaldialdehyd (OPA) gefolgt von einer Auftrennung der Derivate mittels einer Umkehrphasenchromatographie-Säule (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit einem Acetonitril-Gradienten durchgeführt. Mit dieser Methode konnte Prolin, eine Aminosäure, die eine sekundäre Aminogruppe enthält, nicht nachgewiesen werden. Daher wurde für die Analyse von Prolin eine Vorsäulenderivatisierung mit Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid (FMOC-Cl; Sigma-Aldrich, Deutschland) anstelle von *o*-Phtaldialdehyd verwendet.

Die Derivate wurden mittels Fluoreszenz (bei OPA: Anregung 330 nm und Emission 408 nm; bei FMOC-Cl: Anregung 265 nm und Emission 305 nm) detektiert. Für die externe Kalibrierung wurden parallel dazu Aminosäure-Standards (Sigma-Aldrich, Deutschland) gemessen. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit einem Integrationsprogramm (Peaknet Version 5.1, Dionex).

**Tabelle 2.5: Lösungen für die Aminosäure-HPLC**

Lösung	Substanz	Konzentration
OPA-Stocklösung	<i>o</i> -Phtaldialdehyd	5–8 mg
	Methanol	1 ml
	Kaliumborat (1m; pH 10,4)	125 $\mu\text{l}$
	$\beta$ -Mercaptoethanol	12,5 $\mu\text{l}$
OPA-Arbeitslösung	Kaliumborat (1 M; pH 10,4)	1 ml
	OPA-Stocklösung	0,5 ml
FMOC-Arbeitslösung	FMOC-Cl	3,8 mg
	Aceton	5 ml

HPLC-Puffer	H <sub>2</sub> O (Millipore)	2,5 l
	Phosphorsäure	3 ml
	EDTA	1,25 g
	pH 7,06- 7,1 (mit NaOH 25% einstellen)	
Eluent A	HPLC-Puffer	95 %
	Acetonitril	5 %
Eluent B	HPLC-Puffer	50 %
	Acetonitril	50 %
Eluent C	Acetonitril	70 %
	H <sub>2</sub> O (Millipore)	30 %

### 2.6.4.3. Analyse der Anionen und organischen Säuren

Die Analyse der negativ geladenen Anionen mittels HPLC wurde nach Lohaus *et al.* durchgeführt (2001). Eine Ionenaustauschersäule (IonPac<sup>TM</sup> AS11 4x250mm; Dionex Corp, Sunnyvale, CA, USA) wurde mit einem Natriumhydroxid-Gradienten (4 bis 77 mM in 30 min) zur Trennung der organischen Säuren eluiert. Ein Suppressor wurde verwendet, um die Empfindlichkeit zu erhöhen, indem die Spitzensensitivität erhöht und das Rauschen der Basislinie reduziert wurden (ASRS Ultra II 4mm, Dionex USA). Die Ionen wurden mit ihrer elektronischen Leitfähigkeit (CP20 Conductivity Detector; Dionex USA) detektiert. Für die externe Kalibrierung wurden Standards parallel gemessen. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit einem Integrationsprogramm (Peaknet Version 5.1, Dionex).

Lösung	Substanz	Konzentration
Laufmittel	Natriumcarbonat	1,8 mM
	Natriumhydrogencarbonat	1,7 mM

## 2.6.5. Proteinauftrennung mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Menge an Protein im Nektar ist im Verhältnis zum Zuckeranteil viel geringer. Deshalb ist es sinnvoll, vor der SDS-PAGE eine Proteinfällung durchzuführen. Hierzu wird eine modifizierte Fällung mit einer Chloroform-Methanol-Wasser-Mischung nach Wessel und Flügge (1984) durchgeführt. Dabei wurden 200  $\mu\text{l}$  Methanol zu 50  $\mu\text{l}$  Nektar gegeben, gevortext und zentrifugiert (10 sec | 9000 x g). Dann wurden 50  $\mu\text{l}$  Chloroform zugegeben, gevortext und wieder zentrifugiert (10 sec | 9000 x g). Nun wurden 150  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  zugegeben, gevortext und zentrifugiert (1 min | 9000 x g). Die gebildete Oberphase wurde sorgfältig abgenommen und verworfen. Anschließend wurden 150  $\mu\text{l}$  Methanol zugegeben, gevortext und zentrifugiert (2 min | 9000 x g). Der Überstand wurde komplett verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend konnte das Pellet in 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  gelöst und bis zur Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden. Zur Trennung und Analyse der gefällten Proteine wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Hierbei wird eine Auftrennung der Proteine anhand ihrer jeweiligen Molekülmasse durch Anlegen eines elektrischen Feldes erreicht. Die Trennleistung eines Gels ist von seiner Porengröße abhängig und kann durch die Totalacrylamidkonzentration  $T$  (Konzentration von Acrylamid- und Bisacrylamid-Monomeren) und den Vernetzungsgrad  $C$  (Anteil von Bisacrylamid an der Totalacrylamidkonzentration) bestimmt werden. Zur Anfärbung der aufgetrennten Proteine wurden verschiedene Färbetechniken verwendet.

### 2.6.5.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE nach Laemmli (1970) wurde für die standardmäßige Auftrennung von Proteinen verwendet. Da es sich bei der Methode nach Laemmli um ein diskontinuierliches Gelsystem handelt, bestanden die Gele aus einem feinporigen Trenn- und einem großporigen Sammelgel mit einer Schichtdicke von 0,75 mm (Tabelle 2.6: Pipettierschema für 2 SDS-Gele). Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol überschichtet, um eine plane Oberfläche zu schaffen und den Luftsauerstoff abzuschirmen. Nach dem Polymerisieren des Trenngels musste der verbleibende Isopropanol, vor dem Gießen des Sammelgels, restlos entfernt werden. Die Proben wurden vor dem Auftragen 1:3 mit SDS-Probenpuffer (Tabelle 2.7) versetzt und anschließend bei einer konstanten Spannung von 130 V aufgetrennt.

**Tabelle 2.6: Pipettierschema für 2 SDS-Gele**

	Trenngel	Sammelgel
T [% w/v]	14	5
C [%]	3,3	3,3
Acrylamid/Bisacrylamid (40 %, A/B 29:1)	6,50 mL	1,60 mL
SDS-Gelpuffer (4x)	3,50 mL	2,50 mL
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	5,40 mL	6,10 mL
SDS ( 20 % (w/v))	70,0 µL	50,0 µL
TEMED	10,0 µL	12,80 µL
APS (10 % (w/v))	100,0 µL	84,0 µL

**Tabelle 2.7: Puffer für die SDS-PAGE**

Puffer	Substanz	Konzentration
SDS-Probenpuffer	SDS	2,50 % (w/v)
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	23,60 mM
	Bromphenolblau	0,04 % (w/v)
	DTT	25,0 mM
	Saccharose	15,0 % (w/v)
SDS-Trenngelpuffer (4x)	Tris	1,5 M
	pH 8,8 (mit HCl einstellen) filtrieren	-
SDS-Sammelgelpuffer (4x)	Tris	1 M
	pH 6,8 (mit HCl einstellen) filtrieren	-
SDS-Elektrophoresepuffer	Glycin	383,60 mM
	Tris	50,0 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	pH 8,5 (stellt sich ein)	-

### 2.6.5.2. Coomassie-Färbung nach Görg *et al.*

Bei der Coomassie-Färbung nach Görg *et al.* (1978) modifiziert nach Rexroth *et al.* (2003) wurden die Proteine mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau R-250 angefärbt. Diese Methode, mit einer Nachweisgrenze von 0,3–1 µg Protein (Wilson, 1983), bietet eine schnelle und einfache Möglichkeit, Proteine im Gel sichtbar zu machen. Das Gel wurde nach der Elektrophorese für 15 min in der Färbelösung inkubiert und anschließend in Entfärbelösung A überführt. Diese Lösung wurde bei Bedarf gewechselt und das Gel daraufhin zur endgültigen Entfärbung des Hintergrunds in Entfärbelösung B inkubiert.

**Tabelle 2.8: Lösungen für die Coomassie-Färbung**

Lösung	Substanz	Konzentration
Färbelösung	Essigsäure	10,0 % (v/v)
	Methanol	45,0 % (v/v)
	Coomassie Brilliant Blau R-250	0,10 % (w/v)
Entfärber A	Essigsäure	10,0 % (v/v)
	Methanol	45,0 % (v/v)
Entfärber B	Essigsäure	10,0 % (v/v)
	Methanol	10,0 % (v/v)

### 2.6.5.3. Silberfärbung nach Blum *et al.*

Die Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987) stellt mit seiner Nachweisgrenze von 5–30 ng pro Proteinbande eine wesentlich sensitivere Methode als die Coomassie-Färbung dar. Zunächst wurde das Gel nach der Elektrophorese zwei Mal 30 min in Fixierlösung I und dann drei Mal 20 min in Fixierlösung II inkubiert. Das Gel färbte sich milchig-weiß und schrumpfte infolge des Wasserentzugs. Im Anschluss erfolgte eine 1-minütige Inkubation in einer Thiosulfat-Lösung gefolgt von zwei 1-minütigen Waschschrritten mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ . Danach wurde das Gel für 20 min in der Silberlösung inkubiert, mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  gespült und in eine Schale mit Entwickler überführt. Das Gel wurde im Entwickler belassen, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Daraufhin wurde die Färbung durch Zugabe von 10 % Essigsäure (v/v) abgestoppt und das Gel nach 10 min in der Stopplösung in eine Schale mit Lagerlösung überführt.

**Tabelle 2.9: Lösungen für die Silberfärbung**

Lösung	Substanz	Konzentration
Fixierer I	Essigsäure	12,0 % (v/v)
	Methanol	50,0 % (v/v)
Fixierer II	Ethanol	50,0 % (v/v)
Thiosulfat-Lösung	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,80 mM
Silberlösung	$\text{AgNO}_3$	12,0 mM
	Formaldehyd 35 % (v/v)	8,80 mM
Entwickler	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	566,0 mM
	Thiosulfat-Lösung	0,02 mM
	Formaldehyd 35 % (v/v)	4,80 mM
Stopplösung	Essigsäure	10,0 % (v/v)
Lagerlösung	Essigsäure	1,0 % (v/v)

## 2.7. Bestimmung der Invertase-Aktivität

Zunächst wurde eine Extraktion der Proteine nach Ruhlmann *et al.* (2010) durchgeführt. Hierzu wurden 25 mg Nektariengewebe in einem 1,5 ml RG mit flüssigem Stickstoff und einem Plastikpistill möglichst fein gemörsernt. Dann wurden die Proben mit 400 µl Extraktionspuffer versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert (10 min | 13000 g | 4°C). Der Überstand, welcher die cytoplasmatischen und vakuolären Invertasen enthielt, wurde in ein neues RG überführt und bei -20°C gelagert. Das Pellet wurde in 400 µl 80 mM Natriumacetat pH 4,8 resuspendiert und auf vier Aliquote aufgeteilt. Zwei dieser Aliquote wurden durch Erhitzen im Thermoschüttler (5 min | 100°C) gestoppt und als Nullwert verwendet.

Das Assay zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde nach Heineke *et al.* (1992) durchgeführt. Dazu wurden zu allen Aliquoten der Proteinextraktion je 500 µl Saccharoselösung (Tabelle 2.10) hinzugegeben. Die Proben wurden im Thermoschüttler inkubiert (10 min | 25°C) und durch Erhitzen gestoppt (5 min | 100°C). Abschließend wurden die Proben zentrifugiert (2 min | 5000g) und die gebildete Glucose im klaren Überstand bestimmt. Der Glucosenachweis erfolgte optisch-enzymatisch (siehe 2.6.2 Bestimmung von Stärke). Anhand der gemessenen Glucosekonzentration ließ sich die Aktivität der Invertase in U/mg FG berechnen.

**Tabelle 2.10: Puffer und Lösungen für das Invertase-Assay**

Puffer/ Lösung	Substanz	Konzentration
Extraktionspuffer	HEPES-NaOH pH 8.0	50 mM
	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	5 mM
	EDTA	2 mM
	MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1 mM
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1 mM
	DTT	1 mM
Natriumacetatpuffer	Natriumacetat pH 4.8	80 mM
Saccharoselösung	Natriumacetat pH 5.0	125 mM
	Saccharose	600 mM

## 2.8. Molekularbiologische Arbeiten

### 2.8.1. RNA-Isolierung

RNA-Analysen geben Auskunft über den Transkriptionsstatus eines Gewebes zu einem gegebenen Zeitpunkt und erlauben damit die Untersuchung von Expressionsmustern bestimmter Gene. Das verwendete Protokoll ist eine Abwandlung der Vorgehensweise von Chang *et al.* (1993) zur Isolierung von RNA aus Pflanzen. Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden doppelt autoklaviert und die Arbeitsflächen wurden vor jeder Isolierung mit RNase AWAY® abgewischt um Kontaminationen mit RNase zu vermeiden. Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff in einer Reibschale und mit einer Pistille zu einem feinen Pulver verrieben, wovon ca. 50 mg in ein 1,5 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 inkubiert (15 min | 1400 rpm). Anschließend wurden 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) hinzugegeben, die Proben 30 sec gevortext und zentrifugiert (2 min | 13000 g). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml RG überführt, ohne die Interphase zu berühren. Es wurden wieder 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) zugefügt und wie oben beschrieben extrahiert. Die Extraktion wurde solange wiederholt, bis keine Interphase mehr vorhanden war, mindestens jedoch zwei 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 zentrifugiert (20 min | 15000 g) 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 Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) versetzt und wie oben beschrieben gevortext und zentrifugiert. Die Extraktion wurde so lange wiederholt, bis keine Interphase mehr sichtbar war. Die wässrige Phase der letzten Extraktion wurde mit 2-fachem Volumen Ethanol versetzt, geschüttelt und für 1 h bei -80°C inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 4°C (20 min | 15000 g) 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 Entfernung des Ethanols wurde das Pellet bei 45°C getrocknet und anschließend mit 10 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.

**Tabelle 2.11: Puffer für die RNA-Isolierung**

Puffer	Substanz	Konzentration
CTAB-Puffer	CTAB (w/v)	2 %
	Tris-HCl pH 8,0	100 mM
	EDTA	25 mM
	NaCl	2 M
	PVP (v/v)	2 %
	Mercaptoethanol (frisch zugesetzt)	2 %
SSTE-Puffer	SDS (w/v)	0,5 %
	Tris pH 8,0	10 mM
	EDTA	1 mM
	NaCl	1 M

### 2.8.2. 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), 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 | 13000 g), in 150 µl STEL-Puffer resuspendiert und bei 100°C für 30 s erhitzt. Nach anschließender Zentrifugation (20 min | 13000 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 | 13000 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 für 10 min in 50 µl RNase-H<sub>2</sub>O auf dem Thermoschüttler gelöst (45°C | 1400 rpm).

**Tabelle 2.12: STEL-Puffer**

Substanz	Menge
Saccharose (w/v)	8 %
Triton-X-100 (v/v)	5 %
Tris/HCl pH 8,0	50 mM
EDTA	50 mM
Lysozym (frisch eingewogen)	0,5 mg/ml

Zur Kontrolle des richtigen Inserts 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) 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%) aufgetragen und analysiert.

### 2.8.3. Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentrationen wurden entweder ein NanoDrop oder eine spezielle Mikroliterküvette verwendet. Für die Küvette wurden 3 µl und für den NanoDrop 1 µl der Nukleinsäurelösung verwendet und bei 260 nm gemessen. Die Konzentration wurde nach folgender Formel bestimmt:

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

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

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 hochrein.

### 2.8.4. 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 (1 U/µl) vorgenommen. Dazu wurden 2 µg RNA mit 2 µl DNase I und 2 µl Puffer (10x Reaction Buffer with  $\text{MgCl}_2$ ) 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.

## 2.8.5. cDNA-Synthese

1 µg RNA wurde mit 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub> (100 µM) auf 12 µl mit H<sub>2</sub>O 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 1<sup>st</sup> strand cDNA Synthesis Kit. Die reverse Transkriptase wurde durch Erhitzen für 5 min bei 70°C inaktiviert.

## 2.8.6. Amplifikation von DNA-Fragmenten

### 2.8.6.1. Primerdesign

Für das Screening auf Zellwandinvertasen im Transkriptom von Tabakarten, von denen noch keine Sequenzen vorliegen, wurden degenerierte Primer verwendet. 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 Zellwandinvertasen bei möglichst eng verwandten Arten abgeleitet. Dazu wurden die Programme PerlPrimer (Version 1.1.21) und Geneious (Version R9) verwendet.

### 2.8.6.2. 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.

**Tabelle 2.13 Zusammensetzung einer Standard-PCR**

Komponente	Menge
10x Puffer	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> 25mM	2 µl
dNTPs 10 mM	0,5 µl
Forward Primer 10 µM	0,5 µl
Reverse Primer 10 µM	0,5 µl
Taq-Polymerase 5U/µl	0,3 µl
Template	1 µl
H <sub>2</sub> 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 der TAE-Agarosegelelektrophorese überprüft.

**Tabelle 2.14 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

### 2.8.7. DNA-Sequenzierung

DNA-Fragmente wurden zur Sequenzierung in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T easy kloniert und anschließend zur Firma Eurofins Genomics geschickt. Der Vektor pGEM<sup>®</sup>-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.

### 2.8.8. Qualitative 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, 2006). 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. 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 (Schmidt und Delaney, 2010).

Zunächst wurde aus einer RNA-Isolierung mit anschließendem gDNA-Verdau cDNA synthetisiert. 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.

**Tabelle 2.15 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 (10 µM)	1,2 µl
cDNA	4 µl
H <sub>2</sub> 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). 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. Berücksichtigt bei der Wahl der Primer wurde auch, dass die Dissoziationskurve nur ein spezifisches Produkt anzeigte, da sonst unspezifische Bindungen und Primerdimere vorhanden sein können (Ririe *et al.*, 1997).

**Tabelle 2.16 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 Annealingtemperatur ist abhängig von den Primereigenschaften

### 2.8.9. Klonierung

Die Klonierung von DNA-Fragmenten wurde für Sequenzierungen und zur Herstellung von Dauerkulturen durchgeführt. Für erfolgreiche Klonierungen ist es notwendig, dass möglichst saubere DNA verwendet wird. 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).

Damit eine Ligation zwischen einem Plasmidvektor und dem Insert effektiv stattfinden konnte, wurden nach der Linearisierung die entstanden 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<sup>®</sup>-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 und 1 µl Phosphatase (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase) 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.

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<sup>®</sup>-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 MgCl<sub>2</sub> (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.

Für die Konstruktion von Plasmiden mit einem mittels PCR hergestelltem und durch Silica-Membranen aufgereinigtem Insert, musste eine Ligation vorgenommen werden. Durch die Verwendung des Vektors pGEM<sup>®</sup>-T easy konnten entweder aufgereinigte Produkte einer *Taq*-PCR direkt verwendet werden oder durch *Pfu*-PCR erzeugte Produkte nach dem Anhängen von Adenosinbasen und ein vorheriger Restriktionsverdau und Desphosphorylierung des Vektors waren nicht nötig. 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 Ligationspuffer, 1 µl Ligase (5 U/µl), 0,5 µl Vektor (0,5 ng/µl) versetzt und mit H<sub>2</sub>O 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.

### 2.8.9.1. 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 OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 wachsen gelassen. Nachdem die Zelldichte hoch genug war, wurde die Suspension auf zwei sterile 50 ml Falcon-Tubes aufgeteilt und pelletiert (5 min | 2200 g | 4°C). Die geernteten Zellen wurden anschließend in 25 ml kaltem Transformationspuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min | 2200 g | 4°C) wurden die Zellen in 5 ml Transformationspuffer und 20% Glycerin (v/v) gelöst. 200 µl Aliquote wurden auf 1,5 ml RG verteilt und bei -80°C eingelagert.

**Tabelle 2.17: Puffer und Medien für die Herstellung kompetenter *E. coli***

Puffer/Medien	Substanz	Konzentration
Transformationspuffer (steril filtrieren)	CaCl <sub>2</sub>	100 mM
	RbCl	50 mM
	MnCl <sub>2</sub>	40 mM
SOC-Medium (für 1 l)	Trypton	20 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	NaCl	0,5 g
	KCl	0,19 g
	mit NaOH auf pH 7.0 einstellen und autoklavieren	
	2 M MgCl <sub>2</sub> (steril filtriert)	5 µl/ml
	1 M Glucose (steril filtriert)	20 µl/ml

### 2.8.9.2. Transformation von *E. coli*

Zur Klonierung von Invertase-Fragmenten wurde der Stamm *Escherichia coli* DH5α (Woodcock *et al.*, 1989) verwendet (Genotyp: F<sup>-</sup> ( $\Phi$ dlacZΔM15) *recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17* (r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *supE44 relA1 deoR Δ (lacZYA-arf)* U169). Die bei -80°C eingelagerten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Zu einem 200 µl Aliquot wurden 5–20 µl des Ligationsansatzes 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 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<sup>®</sup>-T verwendet, so war die Überprüfung des Transformationserfolges mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion möglich (Koenen *et al.*, 1982). Von geeigneten Bakterienkolonien wurden Übernacht-Flüssigkulturen angefertigt. Dazu wurden die Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen, auf einer Sicherungsplatte ausgestrichen und anschließend wurden die Zahnstocher in Reagenzgläser mit 3–5 ml LB-Amp Medium gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 400 rpm in einer Schütteltruhe.

**Tabelle 2.18: Ansatz für 1 l LB-Medium**

Substanz	Menge
NaCl	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
Trypton	10 g

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 Ampicillin (100 mg/ml) und X-Gal (50 mg/ml). Für das LB-Amp Medium wurde nur Ampicillin (100 mg/ml) nach dem Autoklavieren hinzugegeben.

### 2.8.9.3. Herstellung von Dauerkulturen

Von Hefe- bzw. Bakterien-Übernachtulturen 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.

### 2.8.10. RNA- und DNA-Größenauftrennung mit Agarosegelen

Zur Erfolgskontrolle, Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen (Kap. 2.8.6.2), Plasmidisolierungen und Restriktionshydrolysen (Kap. 2.8.2) sowie zur Qualitätskontrolle von RNA-Isolierungen (Kap. 2.8.1) 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 Kämme eingesetzt. Nach dem Erkalten wurden die Taschen mit 5 µl Probe gefüllt, die zuvor mit Gelladepuffer versetzt wurde und das Gel wurde in 1x TAE-Puffer mit bis zu 150 mA unter Strom gesetzt. Als Größenstandard diente der O'GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad (1 µl/ml) für 20 min inkubiert und anschließend auf einem UV-Tisch fotografiert.

**Tabelle 2.19: Ansatz für 50x TAE Puffer**

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

### 2.8.11. Screening des Nektars auf mikrobiellen Befall

Um zu testen, ob die Nektarzusammensetzung durch Hefen oder Bakterien beeinflusst wird, wurde stichprobenartig Nektar von allen untersuchten Pflanzenarten getestet. Hierzu wurden 10–50 µl Nektar auf Malzextraktplatten ausgestrichen und bis zu 7 Tage bei 25°C in den Brutschrank gelegt.

**Tabelle 2.20: Ansatz für 1 l Malzextrakt-Agar**

Substanz	Menge
Malzextrakt	20 g
Pepton aus Casein	3 g
Agar	22 g
pH 5,5	

Wenn auf einer Malzextraktplatte ein mikrobieller Befall zu sehen war, wurde die DNA nach einem Protokoll von Liang und Richardson (1992) isoliert. Die getrocknete DNA wurde statt in 10 µl 0.1x TE in 10 µl Tris-HCl Puffer aufgenommen, weil dieser besser für das Gelingen der anschließenden PCR ist.

**Tabelle 2.21: PCR Ansatz für Hefescreening**

Substanz	Menge
H <sub>2</sub> O dest.	33,5 µl
10x Puffer	5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	6 µl
Primer ITS1	0,5 µl
Primer ITS4	0,5 µl
DNA	3 µl
dNTPs (20 mM)	1 µl
Taq	0,5 µl (2 units)

PCR-Programm:

- 0: 94°C 1min
- 1: 52°C 1 min
- 2: 72°C 1 min
- Schritte 0 bis 2: 40 mal wiederholen
- 3: 72°C 5 min
- 4: 4°C

Die Proben wurden dann zur Sequenzierung geschickt und mit bekannten Sequenzen aus Datenbanken abgeglichen (NCBI).

## 2.9. Verwendete Oligosaccharide

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

**Tabelle 2.22: Verwendete Oligosaccharide für die PCR und qRT-PCR**

Protein/Funktion	Name	Sequenz 5'-3'
degenerierte Invertaseprimer	Inv_for	CCGGAATTCTTYTAYCARTRBAAYCC
	Inv_rev	CTAGTCTAGARTCRWARAANGGYTTNGAYGCRTA
degenerierte Invertaseprimer	InvTab_for	ATCCTCTACACYGGWATY
	InvTab_rev	YACYGGRAARAAATCRAAACATTCCCA
Invertase von <i>N. africana</i>	NafrInv_f	GTCCAAAACACTACGCGATACC
	NafrInv_r	GATTTCTCACACTCCCAACC
Invertase von <i>N. attenuata</i>	NatulInv3_f	GAACTCCTTCCCTTCAGC
	NatulInv3_r	GTTTGACACATTCCCGAC
Invertase von <i>N. benthamiana</i>	NbenInv2_f	GGCAATGATGAAGCACGATG
	NbenInv2_r	ACTCCGGGATTGAATCAGG
Invertase von <i>N. sylvestris</i>	NsylvInv_for	CACAAGTCCAAAACACTACGCGA
	NsylvInv_rev	TGATTCTTCACACTCCCAACCA
Invertase von <i>N. tabacum</i>	NtabInvSpec_f	CTGCTATGTGCTGATGGATG
	NtabInvSpec_r	CAGGCGCTTCACTATTCTC
Aktin	HKG_Act1f	GACTATGAGCAGGAACTTGAGA
	HKG_Act1r	TGAACCACCACTAAGAACAATG
Aktin	NtActqPCR1f	TGTCCTGAGGTCCTTTTCC
	NtActqPCR1r	ATTCTATCAGCGATACCCGG
Aktin	NtActqPCR2f	CCCTCCCACATGCTATTCT
	NtActqPCR2r	TCCTGTTCATAGTCGAGAGC
Elongation factor 1 $\alpha$	NtEF1af	GGCCCAACACTTCTTGATGCTC
	NtEF1ar	CCAACATTGTCACCAGGAAGT
Elongation factor 1 $\alpha$	NtEf1qPCR1f	CTGCTTATTGACTCCACCAC
	NtEf1qPCR1r	CACCTTCCAAACCAGAGATG
Ubiquitin- conjugating enzyme E2	NtubiE2f	CTGACTTCAATCCAGTCTTTGCTC
	NtubiE2r	GTAACAGATTAAGAGTGCGGG
Bestimmung von Mikroben	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

## 2.10. Statistik

Um auf signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen zu testen wurde ein  $t$ -Test für unabhängige Stichproben (Student's  $t$ -test) durchgeführt. Die Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft und die Homoskedastizität (Homogenität der Varianzen) mit dem Levene-Test. Wenn diese Voraussetzungen gegeben waren wurde gegebenenfalls eine ANOVA durchgeführt, um zu testen, ob der Mittelwert einer Gruppe signifikant vom Gesamtmittelwert abweicht. Wenn dies zutraf, wurde der Tukey-Test verwendet, um zu ermittelt, welcher Gruppenmittelwert von den anderen abweicht. Für nicht-parametrische Daten wurde stattdessen der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

Um die Frage zu untersuchen, ob die Nektarzusammensetzung mehr von den Bestäubern oder phylogenetischen Verhältnissen abhängig ist, wurde eine Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) durchgeführt. Hierfür wurden alle Daten zunächst z-transformiert, um ihren Mittelwert auf 0 und ihre Standardabweichung (standard deviation, SD) auf 1 zu setzen. Dann wurden zwei Hauptkomponenten (Principal Components, PCs) aus 33 unabhängigen Variablen, welche gemessene Konzentrationen an Zuckern, Aminosäuren, anorganischen Anionen, Kationen und organischen Säuren repräsentieren, extrahiert. Die daraus resultierenden Daten und die Ladungen auf die neuen Hauptkomponenten wurden schließlich geplottet und graphische ausgewertet.

Um die graphische Auswertung mit Zahlen zu untermauern wurde eine permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) durchgeführt. Dadurch konnte der relative Einfluss der Variablen „Bestäuber“ und „Sektionszugehörigkeit“ auf die Nektarzusammensetzung berechnet werden. Das ‚vegan‘ Paket in R bietet hierzu eine multivariate Analyse der Varianzen (MANOVA) unter permutierender Verwendung von Distanzmatrizen (Anderson, 2001; Oksanen *et al.*, 2008). Zur Berechnung wurden die euklidische Distanz und eine Wiederholung von 999 Permutationen gewählt.

Alle statistischen Analysen wurden mit IBM SPSS Statistics 22 durchgeführt, außer die PCA und die PERMANOVA, welche in R durchgeführt wurden.

## 2.11. Bioinformatik

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

**Tabelle 2.23: Verwendete bioinformatische Software und Server**

Name	Ver.	Funktion	Urheber
Bioedit	7.2.2	Sequenzalignment und Analyse	<a href="http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html">www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html</a>
BLAST		Sequenzvergleich	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi">blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi</a>
ChromasPro	1.5	DNA-Sequenzierung	<a href="http://technelysium.com.au">technelysium.com.au</a>
Geneious	R9	Molekularbiologisches Analyse Tool	<a href="http://www.geneious.com">www.geneious.com</a>
MEGA	6.06	Phylogenetische Analysen	<a href="http://www.megasoftware.net">www.megasoftware.net</a>
NaDH		<i>N. attenuata</i> Datenbank	<a href="http://nadh.ice.mpg.de">nadh.ice.mpg.de</a>
NCBI		Sequenz Datenbank	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Peaknet	5.1	Chromatografie Daten Software	Dionex
PerlPrimer	1.1.2	Primerdesign	<a href="http://perlprimer.sourceforge.net">perlprimer.sourceforge.net</a>
R	3.4.3	Statistiktool	<a href="http://www.r-project.org">www.r-project.org</a>
SPSS	22	Statistiktool	IBM SPSS Statistics

### 3. Ergebnisse

Die Ergebnisse werden in der folgenden Struktur dargestellt:

Abschnitt I: Mikrobieller Befall in floralem Nektar

Abschnitt II: Nektarinhaltsstoffe bei Tabakpflanzen: Welche gibt es und wodurch werden sie beeinflusst?

Diese Ergebnisse sind in dem Artikel „Nectar sugars and amino acids in day- and night-flowering *Nicotiana* species are more strongly shaped by pollinators' preferences than organic acids and inorganic ions“ (PLoS One, 2017, Vol. 5, doi: 10.1371/journal.pone.0176865) veröffentlicht.

Abschnitt III: Proteine im Nektar von *Nicotiana*

Hier werden die untersuchten Arten miteinander verglichen und mögliche Proteine identifiziert.

Abschnitt IV: Regulation der Zuckerzusammensetzung in Nektar und Nektarien bei *Nicotiana*

Die Ergebnisse sind in dem Manuskript „Nectar Sugar Modulation and Cell Wall Invertases in Nectaries of Tobacco Plants (*Nicotiana*)“ dargestellt und zur Veröffentlichung bei Frontiers in Plant Science eingereicht.

### 3.1. Abschnitt I: Mikrobieller Befall im Nektar

Nektar ist eine stark zuckerhaltige, wässrige Lösung und kann daher von vielen Mikroorganismen als Nährboden genutzt werden (0,99–0,93  $a_w$ ; (Nicolson *et al.*, 2007). Durch ihre Aktivität können sie die Zusammensetzung des Nektars maßgeblich beeinflussen. Eine umfangreiche Studie zu mikrobiellem Befall floralen Nektars in Spanien und Mexiko konnte bei einigen Arten regelmäßigen Hefebefall feststellen, welcher in den betroffenen Pflanzen teilweise so dicht war, dass er Auswirkungen auf die Nektarzusammensetzung haben kann (Herrera *et al.*, 2009). Dabei kommt es allerdings nur selten vor, dass eine Pflanze von mehreren Arten gleichzeitig besiedelt wird (Pozo *et al.*, 2011; Alvarez-Perez und Herrera, 2013). Besonders häufig wurden Hefen der Gattungen *Metschnikowia* und *Rhodotorula* gefunden (siehe Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1: Häufig vorkommende Mikroben in floralem Nektar**

Art	Wirtspflanze	Quelle
<i>Aureobasidium pullulans</i>	diverse, z.B. <i>Erinacea anthyllis</i>	Pozo <i>et al.</i> , 2011
<i>Bullera pyricola</i>	<i>Hibiscus rosa sinensis</i>	Mushtaq <i>et al.</i> , 2007
<i>Metschnikowia gruessii</i>	diverse, z.B. <i>Antirrhinum australe</i>	Pozo <i>et al.</i> , 2011
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	diverse, z.B. <i>Digitalis obscura</i>	Pozo <i>et al.</i> , 2012
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	Orchidaceae	Jacquemyn <i>et al.</i> , 2013
<i>Rhodotorula colostri</i>	<i>Atropa baetica</i>	Pozo <i>et al.</i> , 2011
<i>Rhodotorula mucilaginos</i>	<i>Digitalis obscura</i>	Pozo <i>et al.</i> , 2011
<i>Rhodotorula nothofagi</i>	<i>Gladiolus illyricus</i>	Alvarez-Perez und Herrera, 2013

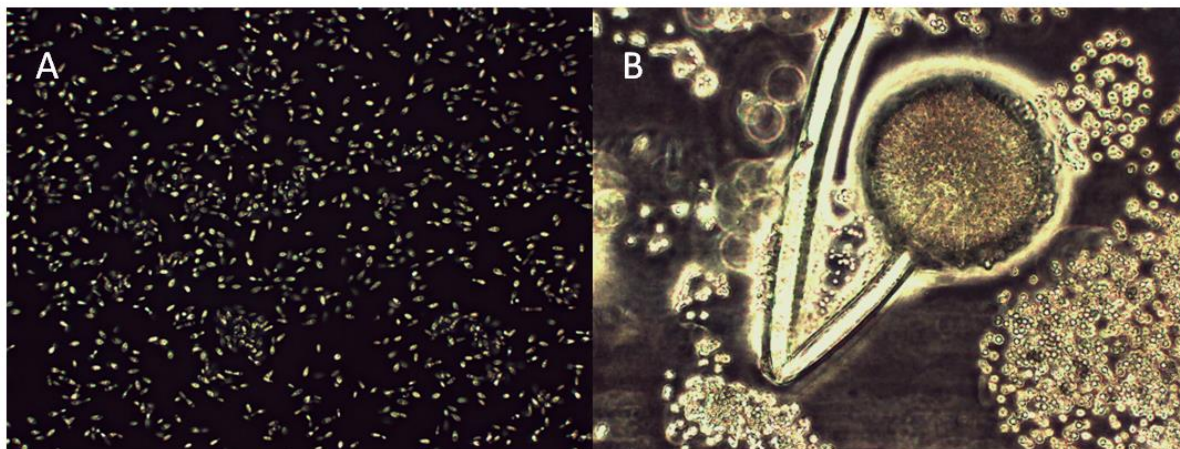
Nektar der Gattung *Nicotiana* wurde bislang nicht in großem Umfang auf mikrobiellen Befall getestet. Für diese Arbeit wurde von verschiedenen Pflanzen stichprobenartig Nektar auf Malzextrakt-Platten ausgestrichen und untersucht Dazu wurde von jeder der 20 untersuchten Tabakarten in zwei aufeinanderfolgenden Jahren jeweils von drei Pflanzen der Nektar beprobt.

Nur in 1 von 120 Proben wurde eine Hefekolonie gefunden (Abbildung 3.1 A). Diese konnte anhand der Sequenzierung eindeutig als *Rhodotorula laryngis* identifiziert werden. Die Nektarprobe wurde der Art *N. africana* entnommen, welche ursprünglich aus Afrika kommt.

Des weiteren ist bei einer Nektarprobe der Art *N. langsdorffii* ein Schimmelpilz gewachsen, welcher wahrscheinlich durch eine Kontamination entstanden ist. Auf Grund seiner Schwarzfärbung und der mikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 3.1 B) handelt es sich



möglicherweise um *Aspergillus niger*. Eine nähere Identifizierung fand nicht statt, da diese einmalige Kontamination nicht relevant für die Fragestellung war.



**Abbildung 3.1: Mikroskopische Aufnahmen der Nektarausstriche**

**A:** *Rhodotorula laryngis* aus *N. africana*; bei entsprechender Vergrößerung waren Sprossungen erkennbar; **B:** Schimmelpilz aus *N. langsdorffii*

In allen anderen Nektarproben konnte keine Kontamination festgestellt werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der für diese Arbeit gesammelte Nektar nicht durch mikrobiellen Befall verändert war.

### **3.2. Abschnitt II: Nektarinhaltsstoffe bei Tabakpflanzen: Welche gibt es und wodurch werden sie beeinflusst?**

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse zu den Analysen der Nektarinhaltsstoffe und ihrem Bezug zu den jeweiligen Bestäubern einer Art zusammengefasst.

Diese Ergebnisse sind in dem Artikel „Nectar sugars and amino acids in day- and night-flowering *Nicotiana* species are more strongly shaped by pollinators' preferences than organic acids and inorganic ions“ (PLoS One, 2017, Vol. 5, doi: 10.1371/journal.pone.0176865) veröffentlicht.



## **Nectar Sugars and Amino Acids in Day- and Night-Flowering *Nicotiana* Species are More Strongly Shaped by Pollinators' Preferences than Organic Acids and Inorganic Ions**

Authors: Kira Tiedge<sup>1</sup>, Gertrud Lohaus<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Molecular Plant Science/ Plant Biochemistry, University of Wuppertal, Wuppertal, Germany

Short Title: Influential Factors on Nectar in Day- and Night-Flowering Tobacco

\* Corresponding author

E-mail: lohaus@uni-wuppertal.de

## Abstract

Floral nectar contains mainly sugars but also amino acids, organic acids, inorganic ions and secondary compounds to attract pollinators. The genus *Nicotiana* exhibits great diversity among species in floral morphology, flowering time, nectar compositions, and predominant pollinators. We studied nectar samples of 20 *Nicotiana* species, composed equally of day- and night-flowering plants and attracting different groups of pollinators (e.g. hummingbirds, moths or bats) to investigate whether sugars, amino acids, organic acids and inorganic ions are influenced by pollinator preferences. Glucose, fructose and sucrose were the only sugars found in the nectar of all examined species. Sugar concentration of the nectar of day-flowering species was 20 % higher and amino acid concentration was 2-3-fold higher compared to the nectar of night-flowering species. The sucrose-to-hexose ratio was significantly higher in night-flowering species and the relative share of sucrose based on the total sugar correlated with the flower tube length in the nocturnal species. Flowers of different tobacco species contained varying volumes of nectar which led to about 150-fold higher amounts of total sugar per flower in bat- or sunbird-pollinated species than in bee-pollinated or autogamous species. This difference was even higher for total amino acids per flower (up to 1000-fold). As a consequence, some *Nicotiana* species invest large amounts of organic nitrogen for certain pollinators. Higher concentrations of inorganic ions, predominantly anions, were found in nectar of night-flowering species. Therefore, higher anion concentrations were also associated with pollinator types active at night. Malate, the main organic acid, was present in all nectar samples but the concentration was not correlated with pollinator type. In conclusion, statistical analyses revealed that pollinator types have a stronger effect on nectar composition than phylogenetic relations. In this context, nectar sugars and amino acids are more strongly correlated with the preferences of predominant pollinators than organic acids and inorganic ions.

## Introduction

Floral nectars are aqueous, carbohydrate-rich solutions that are secreted by nectaries of flowering plants. To a lower extent amino acids, organic acids, lipids, proteins, inorganic ions, scents and other secondary compounds are found in nectar [1–3], too. As an interface between the plant and its visitors, the nectar has at least two important functions: first, the attraction of specific pollinators that facilitate sexual reproduction and second, defense against nectar robbers, herbivores and pathogens [4–7].

Sugars dominate total nectar solutes and constitute the major energy source for visitors. The hexoses glucose and fructose as well as the disaccharide sucrose are highly abundant in nectar, although the ratio of sugars can differ interspecifically [1,8]. In some species there are also smaller amounts of other sugars present [9]. Nectar sugar concentration is higher in bee-pollinated flowers (35 % (w/v)) than in flowers pollinated by butterflies or hummingbirds (20-25 % (w/v)) [10], because the optimal nectar concentration is higher for viscous dippers than for suction feeders [11].

Besides sugars, nectar contains a wide range of different amino acids, which may primarily serve as a nitrogen source for the flowers' visitors or as a phagostimulant [12]. More recent findings show highly variable concentrations of amino acids between different species and smaller variations in the composition of amino acids [13]. Pollinators' preferences have the strongest influence on nectar composition, shown in a study about amino acid composition in Mediterranean floral nectars [14]. This impact is even more pronounced than environmental and taxonomical constraints. Among the measured amino acids, phenylalanine was most strongly correlated with pollinator preferences by having a phagostimulatory effect on several insects, especially on honey bees [14,15].

Organic acids like malic acid or citric acid play an important role in plant primary metabolism. Under physiological pH most of the organic acids are present in the anion form. Malate is the main soluble organic anion in several plant species and is, among others, a storage form for fixed carbon in leaves or other plant organs. Organic acids in nectars have not been studied in detail, despite the fact that they may play a role in nectar quality and pollinator attraction, e.g. by adding flavours to the nectar [16]. Apart from early studies demonstrating the presence of organic acids in various nectars [8,17], a more recent publication reported concentrations of organic acids in two *Aquilegia* species [16].

In addition to organic ions nectar contains several inorganic ions, whereby  $K^+$  is the dominant cation and  $Cl^-$  the dominant anion [18]. Ion concentration in nectar has a profound influence

on the electrolyte balance of pollinators [19]. Furthermore, the ions could be part of the nectar redox cycle, a floral defense mechanism against microbial growth [7].

Several secondary compounds, which may mediate the specialization of plant-pollinator interaction, protect nectar from robbery or microbial activity and regulate the duration of pollinator visits, have also been identified in the nectar of some species [6,20,21]. For example, Kessler *et al.* [22] demonstrated that the occurrence of nicotine in *Nicotiana attenuata* significantly decreased both frequency and length of pollinator visits. The biological effects of secondary compounds are concentration dependent [6,20,21].

The pollination syndrome of a plant includes the floral morphology, the scent, and even the nectar composition, which are influenced by the preferences and needs of the pollinating animal [12]. Furthermore, shifts between pollinators has been one of the key explanations for the radiation of angiosperms [23,24]. Flowers pollinated by hummingbirds, Old World fruit bats, butterflies, moths, and long-tongued bees tend to secrete sucrose-rich nectar, whereas those pollinated by perching birds, New World bats, short-tongued bees, and flies tend to secrete hexose-rich nectar which may represent putative adaptations to dietary preferences of the respective pollinators [8]. But in other cases it appears that this model oversimplifies the complexity of floral evolution [25,26] and the influence of phylogenetic patterns was also shown [27]. Nevertheless, floral traits like the corolla tube length or flower opening time can limit the accessibility of nectar for a specific pollinator, e.g. if their mouthparts do not fit the requirements for the nectar intake [28].

So far there exist only a few studies that investigate differences of nectar compositions in day- and night-flowering plants. Jürgens (2004) analysed the sugar composition in nectar of diurnal and nocturnal *Conophytum* species (Aizoaceae) [29]. However, in some studies nectar sugar and/or amino acid compositions have been related to diurnal and nocturnal pollinators [30,31]. Since these pollinators visit either day- or night-flowering species those studies have also indirectly investigated the influence of flowering time on nectar composition. These investigations are usually limited to sugars and in some cases to amino acids.

The genus *Nicotiana* (Solanaceae) comprises 76 naturally occurring species including the important crop plant *N. tabacum* [32]. Goodspeed [33] classified the taxonomy, biogeography, and morphology present in this genus. Phylogenetic studies of the genus *Nicotiana* classified 13 sections: *Alatae*, *Nicotiana*, *Noctiflorae*, *Paniculatae*, *Petunoides*, *Polydichiae*, *Repandae*, *Rusticae*, *Suaveolentes*, *Sylvestres*, *Tomentosae*, *Trigonophyllae* and *Undulatae* [32,34]. Approximately 75 % of *Nicotiana* species occur in South- and North-America and 25 % in Australia; only one species has been found in Africa so far (*N. africana*)

[33,35,36]. The greatest diversity of species can be found in the eastern Andes (South America), which led to the hypothesis that the genus evolved there and spread in a series of short and long distance moves to reach its current distribution [34].

As a first step towards investigating the role of pollinators in the evolution of nectar traits, Kaczorowski *et al.* [31] studied the specific *Nicotiana* section *Alatae*. In the present study the spectrum of species was expanded to 20 species from 11 sections. Species in the genus *Nicotiana* vary greatly in the time they flower (day versus night), floral morphology and in pollinator type with six different groups of pollinators visiting members of the genus. All different types of pollinators for tobacco plants (even the only bat-pollinated and the only sunbird-pollinated species) are covered. Therefore, the present study questions if nectar composition is influenced by pollinator types. Other constraints such as phylogenetic relations or ecological conditions could also have an impact on nectar composition. For this purpose, we investigated primary metabolites, which are involved in fundamental plant biochemistry processes (sugars, amino acids, organic acids), and inorganic ions in the nectar of related species with different pollinators. Such comprehensive studies about the occurrence of amino acids and organic acids among closely related species with different pollination types are rare, but they are necessary for a better understanding of the ecological role of these metabolites in nectar.

## Materials and methods

### Plant material

20 different species of the genus *Nicotiana* were examined. The seeds were provided by the University of Rostock (Germany), the Botanical Garden of the University of Bochum (Germany), and NiCoTa (Rheinstetten, Germany). Two sets (2014 and 2015) of at least three plants of every species were grown in a greenhouse. Each plant was potted in a single 5 L pot with compost soil. Cultivation was carried out with a 16-h-light/8-h-dark cycle, an irradiance of about 300  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and a temperature regime of 25°C day/18°C night. Corolla tube length and diameter were measured from six different, fully opened flowers per plant species and compared with already existing databases [31,33].

### Collection of nectar

All samples were collected on the first day of anthesis to minimize effects of flower aging on the nectar. Nectar samples were taken either with scaled micro-capillaries or with

micropipettes for higher amounts. For longer flowers the corolla tubes had to be cut carefully to obtain access to the bottom of the calyx where the floral nectaries (nectar secreting glands) of *Nicotiana* species are located at the basal side of the gynoecium [18,37]. All samples were stored at -80°C until analysis. From each species 10 nectar samples (with the exception of *N. nudicaulis* with 8 samples) of different flowers from different plants were taken.

### **Assay for microbial contamination**

Yeasts or bacterial infections could alter the metabolite composition of nectar considerably by enzyme activity. To exclude microbial contamination, nectar samples of all plants were plated on malt extract and incubated for one week at 28° C.

### **Collection of leaf samples and water:chloroform:methanol extraction**

To verify that differences in nectar sugars were not due to differences in overall sugar content of the plants, sugar contents from leaf samples were analysed. From each species, 3 independent leaf samples from different individuals were collected. After shock freezing in liquid nitrogen, leaf tissue was extracted according to Nadwodnik and Lohaus [38].

### **Analysis of sugars**

The analysis of the nectar sugars via HPLC was performed according to Lohaus *et al.* [39]. An ion exchange column (Carbopac™ PA10 4x250mm; Dionex Corp, Sunnyvale, CA, USA) was eluted isocratically with 80 mM NaOH (JT Baker Chemicals). The sugars were detected by a pulse amperometric detector with gold electrode (ESA Model 5200, Coulochem II, Bedford MA, USA). Pulse setting was at 50, 700 and -800 mV for 400, 540 and 540 ms accordingly. For external calibration sugar standards (Sigma-Aldrich, Germany) were measured in parallel. The evaluation of the chromatograms was performed with an integration program (Peaknet version 5.1, Dionex).

### **Analysis of free amino acids**

The analysis of free amino acids was performed via HPLC according to Riens *et al.* [40] and Lohaus *et al.* [39]. For analysis of amino acids containing a primary amine group, precolumn derivatization with o-phthaldialdehyde was followed by the separation of the derivates on the reversed-phase column (Merck, Darmstadt, Germany) with an acetonitrile gradient. The derivates were detected by fluorescence. With this method, proline, an amino acid containing a secondary amine group, could not be detected. Therefore, for analysis of proline a precolumn derivatization with fluorenylmethoxycarbonyl chloride (Sigma-Aldrich, Germany)



instead of o-phthalaldehyde was used. The derivatives were detected by fluorescence (excitation 265 nm and emission 305 nm). For external calibration amino acid standards (Sigma-Aldrich, Germany) were measured in parallel. The evaluation of the chromatograms was performed with an integration program (Peaknet version 5.1, Dionex).

### **Analysis of inorganic anions and organic acids**

The analysis of anions and cations via HPLC was performed according to Lohaus *et al.* [41]. An anion exchange column (IonPac™ AS11 4x250mm; Dionex Corp, Sunnyvale, CA, USA) was eluted with a sodiumhydroxid gradient (4 to 77 mM in 30 min) for separation of the inorganic anions and organic acids. A suppressor was used to enhance the sensitivity by increasing the peak response and reducing background levels (ASRS Ultra II 4mm, Dionex USA). A cation exchange column (CS 12A, 4x250mm; Dionex Corp, Sunnyvale, CA, USA) with isocratic elution (20 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) was used for the separation of the cations. The ions were detected by their electronic conductivity (CP20 Conductivity Detector; Dionex USA). For external calibration standards were measured in parallel. The evaluation of the chromatograms was performed with an integration program (Peaknet version 5.1, Dionex).

### **Statistical analysis**

To determine if there is a significant difference between the groups of day- or night-flowering *Nicotiana* species a t-Test for independent samples (Student's *t*-test) was applied. The normal distribution of the residuals was tested with Kolmogorov-Smirnov's and the homoscedasticity (homogeneity of variances) was tested with Levene's test. For samples that fit these requirements ANOVA was performed to analyse if the mean of one of the groups significantly deviates from the total mean of all samples. If this was the case, Tukey's HSD was performed to analyse which group mean deviates from the others. For non-parametric data Independent-Samples Kruskal-Wallis test was performed for comparison of means between the groups. To examine whether nectar composition and floral traits were influenced by pollinator group or common ancestry, at first a Principal Component Analysis (PCA) was performed. All data were z-transformed before conducting the PCA to set their mean to 0 and the standard deviation (SD) to 1. Two principal components (PCs) were extracted from 33 independent initial variables, which represent the measurements of concentrations of all sugars, amino acids, inorganic anions, inorganic cations, and organic acids. Rotation Method was Varimax with Kaiser Normalization. Secondly a permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) was conducted to identify the relative importance of the variables 'Section' and 'Pollinator' on the nectar composition. The *adonis* routine of the 'vegan' package in R was used for this purpose,

which offers a multivariate analysis of variance using distance matrices based on permutation tests [42,43]. The Euclidean distance measure and 999 permutations were chosen to perform the PERMANOVA. All statistical analysis was performed by the use of IBM SPSS Statistics 22, except for the PCA and the PERMANOVA, which were performed using R (version 3.3.2, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

## Results

### **Nicotiana classification, pollinators and floral morphology**

The classification of the *Nicotiana* species as day- or night-flowering was mainly based on information from the literature as well as on own observations (Table 1). The characteristics of night-flowering species were as follows: (i) flowers opening at night, (ii) corolla white to cream coloured and (iii) scent emission increase in the evening. The characteristics of day-flowering species were as follows: (i) flowers stay open at day and often also at night, (ii) corolla white, yellow, green or pink coloured and (iii) low scent intensity and no increase during nighttime. Ten species were classified as primarily day-flowering and ten species as night-flowering (Table 1). Corolla tube lengths of all examined tobacco species varied between 15 mm (*N. paniculata*) and 97 mm (*N. longiflora*) (Table 1).

**Table 1. Overview of all examined *Nicotiana* species showing some of their main features.**

Species	Section [32]	Origin [33]	Pollinator group	Flower colour	Corolla tube [mm]		Corolla length/diameter	Corresponding picture in Fig 1
					length	diameter		
<b>day-flowering</b>								
<i>N. africana</i> Merxm.	Suaveolentes	AF	Nectariniidae [50]	yellow	32 ± 1	5.0 ± 0.1	6.4	i)
<i>N. attenuata</i> Torr. ex Wat.	Petunoides	NA	Trochilidae [54]	white	27 ± 1	3.2 ± 0.1	9.0	g)
<i>N. glauca</i> Graham	Noctiflorae	SA	Trochilidae [47]	yellow	33 ± 3	4.5 ± 0.2	7.3	k)
<i>N. knightiana</i> Goodsp.	Paniculatae	SA	Trochilidae <sup>a</sup>	yellow	24 ± 1	4.0 ± 0.1	6.0	f)
<i>N. langsdorffii</i> Weinm.	Alatae	SA	Trochilidae [25]	yellow	21 ± 2	4.7 ± 0.2	4.3	e)
<i>N. nudicaulis</i> Watson	Repandae	SA	Apidae [52]	white	17 ± 0	3.2 ± 0.1	5.7	b)
<i>N. palmeri</i> Gray	Trigonophyllae	NA	Trochilidae [48]	white	21 ± 1	3.8 ± 0.2	5.5	d)
<i>N. paniculata</i> L.	Paniculatae	SA	Trochilidae [26]	white	15 ± 1	4.6 ± 0.2	3.3	a)
<i>N. rustica</i> L.	Rustica	NA	Apidae [25]	yellow	18 ± 0	6.9 ± 0.9	2.6	c)
<i>N. tabacum</i> L.	Nicotiana	SA	Trochilidae <sup>a</sup>	pink	43 ± 2	7.0 ± 0.2	6.1	m)
<b>night-flowering</b>								
<i>N. acuminata</i> Hook.	Petunoides	SA	Sphingidae [32]	white	75 ± 1	3.0 ± 0.5	25.0	p)
<i>N. alata</i> Link & Otto	Alatae	SA	Sphingidae [45]	white	87 ± 5	3.5 ± 0.5	24.9	s)
<i>N. benthamiana</i> Domin	Suaveolentes	OC	self pollination [55]	white	31 ± 1	2.0 ± 0.3	15.5	h)
<i>N. longiflora</i> Cav.	Alatae	SA	Sphingidae [49]	white	97 ± 4	2.6 ± 0.1	38.8	t)
<i>N. nesophila</i> Johnston	Repandae	SA	Sphingidae [52]	white	43 ± 2	1.5 ± 0.1	28.7	o)
<i>N. otophora</i> Griseb.	Tomentosae	SA	Glossophaginae [44]	yellow	33 ± 1	5.0 ± 0.3	6.6	j)
<i>N. plumbaginifolia</i> Viv.	Alatae	SA	self pollination [31]	white	40 ± 2	2.0 ± 0.1	20.0	l)
<i>N. stocktonii</i> Brandegees	Repandae	NA	Sphingidae [52]	white	61 ± 2	2.5 ± 0.1	24.4	q)
<i>N. suaveolens</i> Lehm.	Suaveolentes	OC	Sphingidae [25]	white	42 ± 1	3.1 ± 0.2	14.0	n)
<i>N. sylvestris</i> Speg. & Com.	Sylvestres	SA	Sphingidae [52]	white	75 ± 8	3.0 ± 0.1	25.0	r)

<sup>a</sup>classified via flower morphology/ pollination syndrome

Abbreviation: AF = Africa, OC = Australia, NA = North America, SA = South America

The colour (white, greenish or rosy pink) and the flower morphology of the species are shown in Fig 1. All of the *Nicotiana* flowers in the upper row of Fig 1 have comparatively short corolla tubes (< 40 mm) and belong to day-flowering species with the exception of h) *N. benthamiana* and j) *N. otophora* (night-flowering species). The lower row represents species with longer corolla tube length (> 40 mm) exhibiting nocturnal anthesis with the exception of k) *N. glauca* and m) *N. tabacum*.



**Fig 1. Flowers of the examined *Nicotiana* species.** a) *N. paniculata* b) *N. nudicaulis* c) *N. rustica* d) *N. palmeri* e) *N. langsdorffii* f) *N. knightiana* g) *N. attenuata* h) *N. benthamiana* i) *N. africana* j) *N. otophora* k) *N. glauca* l) *N. plumbaginifolia* m) *N. tabacum* n) *N. suaveolens* o) *N. nesophila* p) *N. acuminata* q) *N. stocktonii* r) *N. sylvestris* s) *N. alata* t) *N. longiflora*

The classification of *Nicotiana* species in pollination types and information on flower visitors are shown in Table 1. In their natural environment species with longer, more slender floral tubes and white flowers are pollinated by hawk moths (Sphingidae) as their main nocturnal visitors, and short-tubed, coloured flowers are mainly pollinated by hummingbirds (Trochilidae) [26,31,44–49]. The nocturnal species *N. otophora* is pollinated by nectar feeding bats (Glossophaginae) [44]. In the case of *N. africana* sunbirds (Nectariniidae) are the predominant pollinators and *N. nudicaulis* and *N. rustica* are basically visited by bees (Apidae) [25,50,51,52]. *N. attenuata* is pollinated by both nocturnal hawk moths and diurnal hummingbirds [53,54]. Because *N. attenuata* shows several floral characters which are more attractive to hummingbirds [22,54], this species is grouped with the day-flowering species (Table 1). *N. plumbaginifolia* and *N. benthamiana* are both described as autogamous [31,55]

whereas no flower opening was observed at all for *N. plumbaginifolia*. Still *N. plumbaginifolia* may be classified as nocturnal due to its increased nectar secretion at night.

### Concentrations of sugars in nectar

Nectar of all 20 *Nicotiana* species contained the three main sugars glucose, fructose and sucrose (Table 2). No other mono-, di- or oligosaccharides were detected in appreciable quantities. The total sugar concentrations ranged from 417 mM (10.9 % (w/v)) in *N. nesophila* to 1984 mM (42.7 % (w/v)) in *N. nudicaulis*. The highest sucrose-to-hexose ratio of 2.0 was found in the night-flowering *N. nesophila*, the lowest ratios (0.1) were found in the day-flowering species *N. africana* and *N. attenuata*.

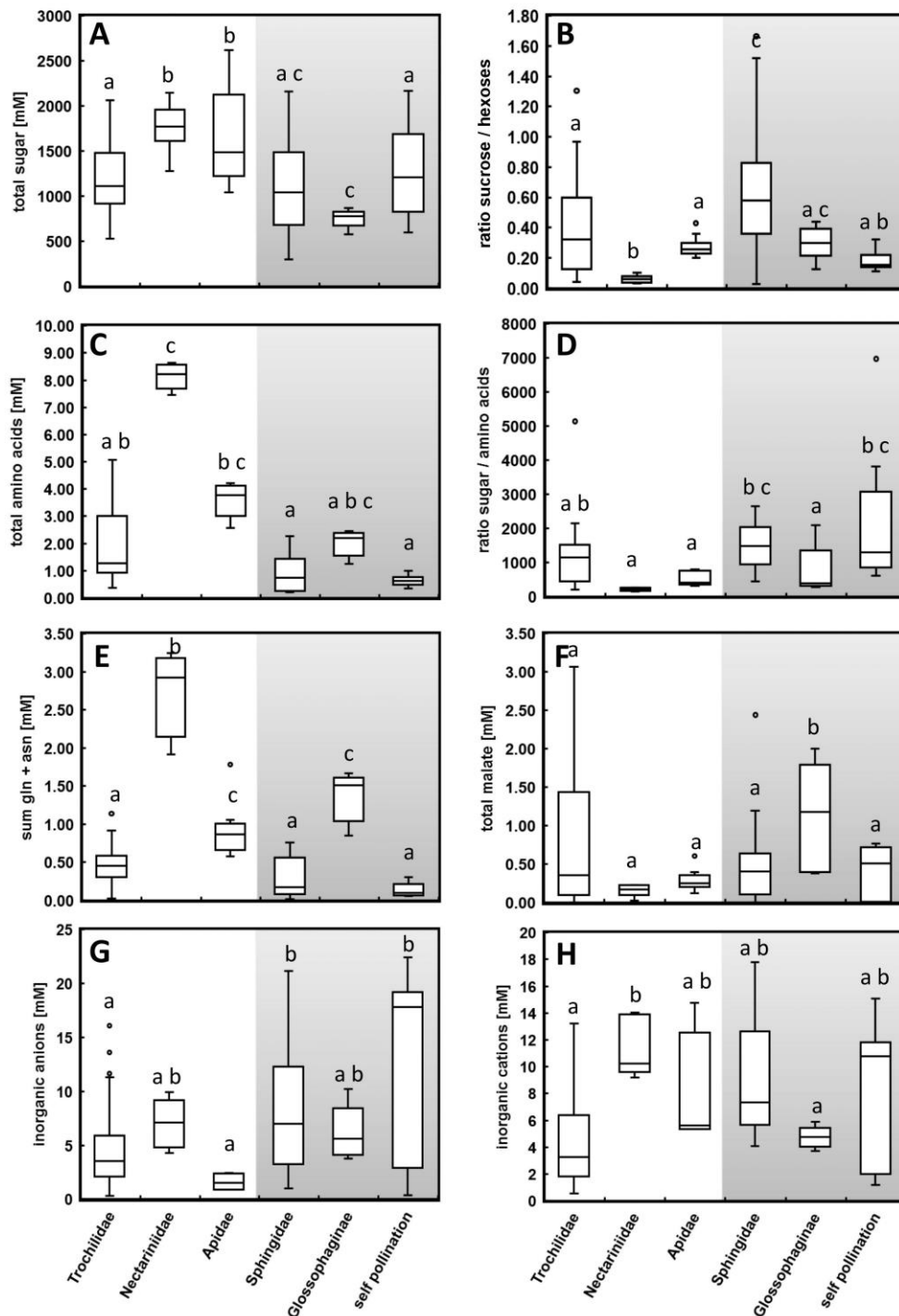
In general, the sucrose-to-hexose ratio was significantly higher in night-flowering species ( $p < 0.001$ ,  $df = 196$ ,  $n = 198$ ). Glucose's fraction of total sugar content was similar for day- and night-flowering species (Table 2), whereas the percentage of fructose was significantly higher in day-flowering species ( $p < 0.001$ ,  $df = 188$ ;  $n = 198$ ). At the same time the percentage of sucrose was increased in night-flowering species; this difference was on a significant level as well ( $p = 0.001$ ,  $df = 195$ ,  $n = 198$ ).

When including all *Nicotiana* species, the percentage of total sugar content that was sucrose positively correlated with flower tube lengths ( $r_s = 0.451$ ,  $p < 0.001$ ). High percentages of sucrose were found in long-tubed species, e.g. *N. alata* or *N. longiflora*. Furthermore, the highest percentage of sucrose was found in *N. nesophila* with a medium-tubed flower but the smallest diameter of the tube in relation to other species (Table 1). Most of the long-tubed flowers belong to the night-flowering species which are pollinated by hawk moths. The correlation between the percentage of sucrose and the flower tube length is much stronger in night-flowering ( $r = 0.586$ ,  $p < 0.001$ ) than in day-flowering species, where no correlation exists at all ( $r = 0.090$ ,  $p < 0.001$ ).

**Table 2. Concentrations and proportions of the main three sugars in nectar of different *Nicotiana* species.**

Species	Concentration of sugars [mM]				Percentages of sugars (calc. from g/l) [%]			Sugar content in nectar (w/v)[%]	Ratio fru/ glu	Suc/ (glu+fru)
	Glucose	Fructose	Sucrose	Total	Glucose	Fructose	Sucrose			
<b>day-flowering</b>										
<i>N. africana</i>	842 ± 107	820 ± 136	101 ± 41	1763 ± 260	46 ± 2	44 ± 2	10 ± 3	33 ± 5	1.0	0.12
<i>N. attenuata</i>	531 ± 93	644 ± 110	71 ± 27	1246 ± 212	41 ± 2	49 ± 2	10 ± 3	24 ± 4	1.2	0.11
<i>N. glauca</i>	49 ± 25	615 ± 155	386 ± 74	1049 ± 180	3 ± 1	44 ± 8	53 ± 8	25 ± 4	12.6	1.10
<i>N. knightiana</i>	165 ± 65	733 ± 116	572 ± 97	1471 ± 248	8 ± 2	37 ± 3	55 ± 2	36 ± 6	4.4	1.21
<i>N. langsdorffii</i>	277 ± 104	358 ± 158	405 ± 185	1039 ± 436	20 ± 2	26 ± 3	54 ± 4	25 ± 11	1.3	1.21
<i>N. nudicaulis</i>	667 ± 201	887 ± 205	430 ± 171	1984 ± 554	28 ± 1	39 ± 5	33 ± 4	43 ± 13	1.3	0.53
<i>N. palmeri</i>	456 ± 145	646 ± 294	253 ± 86	1355 ± 485	29 ± 3	40 ± 6	31 ± 6	29 ± 10	1.4	0.44
<i>N. paniculata</i>	409 ± 196	653 ± 204	113 ± 62	1176 ± 446	31 ± 5	53 ± 7	16 ± 4	23 ± 9	1.6	0.20
<i>N. rustica</i>	237 ± 115	870 ± 162	304 ± 95	1411 ± 323	13 ± 4	53 ± 7	34 ± 5	30 ± 7	3.7	0.52
<i>N. tabacum</i>	402 ± 29	362 ± 29	247 ± 34	1011 ± 80	33 ± 2	29 ± 1	38 ± 3	22 ± 2	0.9	0.61
<b>mean</b>	<b>398 ± 106</b>	<b>654 ± 156</b>	<b>285 ± 86</b>	<b>1338 ± 318</b>	<b>25 ± 2</b>	<b>41 ± 4</b>	<b>33 ± 4</b>	<b>29 ± 7</b>	<b>2.9</b>	<b>0.61</b>
<b>night-flowering</b>										
<i>N. acuminata</i>	485 ± 202	539 ± 226	270 ± 82	1294 ± 564	31 ± 6	34 ± 6	35 ± 11	28 ± 8	1.1	0.50
<i>N. alata</i>	226 ± 73	656 ± 194	699 ± 108	1581 ± 300	10 ± 3	29 ± 4	61 ± 6	40 ± 7	2.9	1.51
<i>N. benthamiana</i>	585 ± 170	721 ± 185	181 ± 63	1487 ± 395	35 ± 1	44 ± 3	21 ± 4	30 ± 8	1.2	0.26
<i>N. longiflora</i>	311 ± 85	466 ± 91	503 ± 112	1281 ± 178	18 ± 5	27 ± 4	55 ± 7	31 ± 5	1.5	1.23
<i>N. nesophila</i>	44 ± 18	159 ± 45	214 ± 89	417 ± 138	7 ± 2	27 ± 4	66 ± 6	11 ± 4	3.6	2.00
<i>N. otophora</i>	316 ± 48	270 ± 44	169 ± 47	756 ± 88	35 ± 3	30 ± 5	35 ± 8	16 ± 2	0.9	0.55
<i>N. plumbaginifolia</i>	372 ± 128	421 ± 127	178 ± 103	971 ± 340	33 ± 3	38 ± 6	28 ± 6	20 ± 8	1.1	0.43
<i>N. stocktonii</i>	106 ± 29	300 ± 56	178 ± 36	585 ± 110	14 ± 3	40 ± 1	45 ± 4	13 ± 2	2.8	0.83
<i>N. suaveolens</i>	648 ± 217	677 ± 250	113 ± 53	1437 ± 496	42 ± 3	44 ± 3	14 ± 5	28 ± 9	1.0	0.16
<i>N. sylvestris</i>	294 ± 77	328 ± 74	455 ± 110	1077 ± 244	20 ± 3	22 ± 2	58 ± 4	27 ± 6	1.1	1.39
<b>mean</b>	<b>339 ± 105</b>	<b>454 ± 129</b>	<b>296 ± 80</b>	<b>1089 ± 285</b>	<b>25 ± 3</b>	<b>34 ± 4</b>	<b>42 ± 6</b>	<b>24 ± 6</b>	<b>1.7</b>	<b>0.89</b>

Significantly higher sugar concentrations of about 1720 mM (Fig 2A; Table 2) were found in nectar of sunbird- and bee-pollinated species, which corresponds to a share of 35 % sugars within nectar (w/v). Nectar of hummingbird-pollinated species generally has a medium concentration with an average of about 1150 mM sugars (26 % (w/v)), similar to hawk moth-pollinated and the autogamous species. The nectar of the bat-pollinated species *N. otophora* was most diluted with about 750 mM (16 % (w/v)).



**Fig 2. Boxplots of different nectar traits grouped into day- (left, white background) and night-flowering (right, grey background) species.** The data are arranged according to their main pollinators Trochilidae, Nectariniidae, Apidae, Sphingidae, Glossophaginae and self-pollinating species. (A) Boxplot diagram illustrating concentration of total sugars [mM]. (B) Sucrose-hexose-ratio is calculated by dividing sucrose concentration [ $\text{g L}^{-1}$ ] by the sum of glucose and fructose [ $\text{g L}^{-1}$ ]. (C) Boxplots illustrating the concentration of total amino acids [mM]. (D) Ratio sum of sugars-to-sum of amino acids. (E) Concentration of the amides glutamine and asparagine [mM]. (F) Total malate concentrations [mM]. (G) Concentration of the sum of inorganic anions (chloride, nitrate, phosphate, sulphate) [mM]. (H) Concentration of the sum of inorganic cations (potassium, sodium, ammonium, magnesium, calcium) [mM]. Different letters designate significantly different groups determined via ANOVA, post hoc Tukey's HSD test and Kruskal-Wallis test for non-parametrical data ( $p \leq 0.05$ ).

The highest proportion of hexoses, particularly glucose, was found in the nectar of the sunbird-pollinated species *N. africana* (Table 2). Within the hummingbird-pollinated species the proportion of hexoses differed between 45-90 %. For hawk moth-pollinated species the proportion of hexoses was, on average, lower than in hummingbird-pollinated species, but also varying between 33-90 %. Therefore, the sucrose-to-hexose ratio was lowest in *N. africana* (sunbird-pollinated), followed by autogamous species. A medium ratio was found in species pollinated by hummingbirds, bees and bats, and the highest ratio was found in species pollinated by hawk moths (Fig 2B).

To exclude the possibility that the measured differences in sugar composition are a result of microbial activity, the samples were tested for presence of yeast. However, no contaminations with yeast in the nectar samples from the different *Nicotiana* species were found.

The overall sugar content of the leaves was analysed as well in order to disprove that the nectar sugars are not correlated with sugar compositions in leaves. The leaves of all tobacco species also contained glucose, fructose, and sucrose, but the composition of these sugars in the nectar did not correlate with the composition in leaves from the same species (S1 Fig).

### **Concentrations of amino acids in nectar**

The amino acid concentrations were much lower than the sugar concentrations and also different between the *Nicotiana* species. Table 3 shows percentages of the most abundant amino acids, the essential amino acids, and total concentrations of the 19 proteinogenic



amino acids that were detectable (alanine (*ala*), arginine (*arg*), aspartate (*asp*), asparagine (*asn*), glycerine (*gly*), glutamate (*glu*), glutamine (*gln*), histidine (*his*), isoleucine (*ile*), leucine (*leu*), lysine (*lys*), methionine (*met*), phenylalanine (*phe*), proline (*pro*), serine (*ser*), threonine (*thr*), tryptophane (*trp*), tyrosine (*tyr*), valine (*val*)), and the non-proteinogenic amino acid  $\gamma$ -aminobutyric acid (*gaba*).

The nectar of *N. alata* (night-flowering) contained the lowest concentration, whereas the concentration in *N. africana* (day-flowering) was more than 30-fold higher (Table 3). Overall, the total amino acid concentration was significantly higher in nectar of day-flowering species than in night-flowering species ( $p = 0.011$ ,  $df = 48$ ;  $n = 98$ ). Therefore, the ratio between sum of sugars and sum of amino acids was about 3-fold higher in night-flowering species, mainly due to the lower amino acid concentrations in the nectar of night-flowering species (Table 3).

The percentage of each amino acid was also different between the species (Table 3). Glutamine, proline, and aspartate were the most abundant amino acids in nectar of *Nicotiana* species. Glutamine was found in all species and contributed a substantial proportion of all amino acids in nectar, except for the day-flowering species *N. africana*, *N. glauca*, *N. langsdorffii*, *N. palmeri* and the night-flowering species *N. suaveolens*, where proline was the dominant amino acid. The amino acid composition in the nectar did not correlate with the composition in the leaves from the same species (S2 Fig).

**Table 3. Amino acid concentrations, proportions of the most abundant amino acids in nectar and the ratio of sugars to amino acids.**

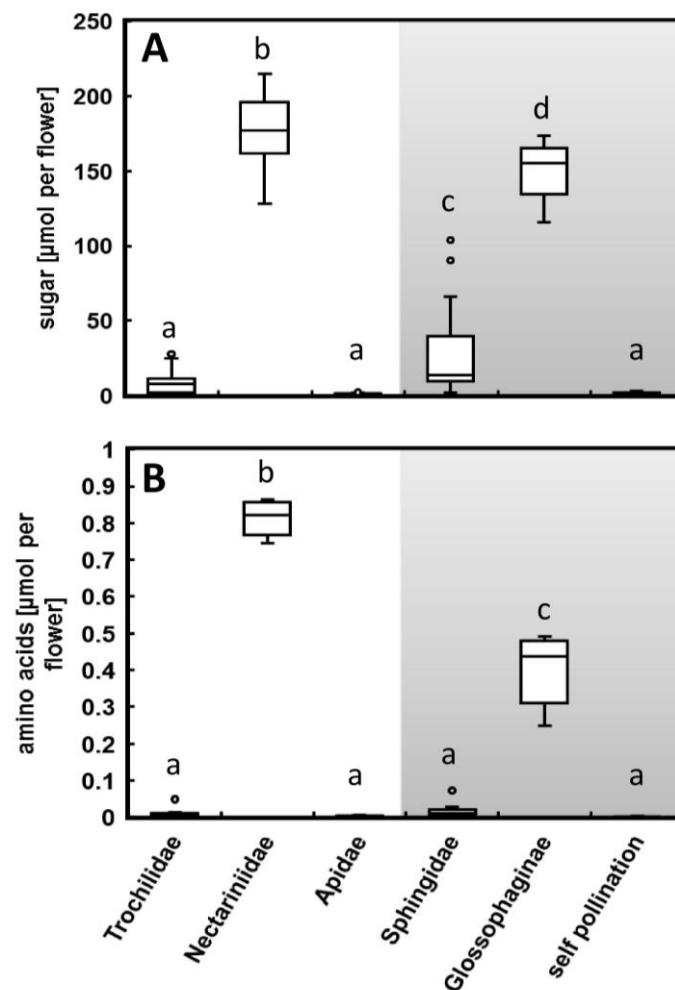
Species	Total amino acids [ $\mu\text{M}$ ]	Percentages of most abundant amino acids in nectar [%]						Percentage of essential amino acids [%]	Sum sugar [mM]/ sum amino acids [mM]
		Glu	Gln	Asp	Asn	Pro	Ser		
<b>day-flowering</b>									
<i>N. africana</i>	8148 $\pm$ 423	1 $\pm$ 0	31 $\pm$ 4	1 $\pm$ 0	2 $\pm$ 1	36 $\pm$ 5	6 $\pm$ 1	17 $\pm$ 3	216
<i>N. attenuata</i>	900 $\pm$ 288	9 $\pm$ 2	49 $\pm$ 4	8 $\pm$ 1	7 $\pm$ 2	5 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0	14 $\pm$ 2	1385
<i>N. glauca</i>	2724 $\pm$ 234	4 $\pm$ 2	23 $\pm$ 4	3 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0	28 $\pm$ 3	14 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1	385
<i>N. knightiana</i>	1157 $\pm$ 141	8 $\pm$ 1	23 $\pm$ 8	7 $\pm$ 1	7 $\pm$ 4	21 $\pm$ 7	10 $\pm$ 1	20 $\pm$ 5	1271
<i>N. langsdorffii</i>	3537 $\pm$ 538	4 $\pm$ 1	11 $\pm$ 4	6 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1	34 $\pm$ 5	8 $\pm$ 1	30 $\pm$ 6	294
<i>N. nudicaulis</i>	3394 $\pm$ 667	2 $\pm$ 1	25 $\pm$ 5	6 $\pm$ 3	10 $\pm$ 5	18 $\pm$ 4	8 $\pm$ 4	24 $\pm$ 8	585
<i>N. palmeri</i>	3929 $\pm$ 891	2 $\pm$ 1	15 $\pm$ 5	4 $\pm$ 0	3 $\pm$ 1	17 $\pm$ 5	14 $\pm$ 2	39 $\pm$ 7	345
<i>N. paniculata</i>	1199 $\pm$ 244	8 $\pm$ 2	27 $\pm$ 9	10 $\pm$ 3	12 $\pm$ 8	12 $\pm$ 3	7 $\pm$ 3	18 $\pm$ 6	980
<i>N. rustica</i>	3700 $\pm$ 448	5 $\pm$ 1	17 $\pm$ 4	53 $\pm$ 9	3 $\pm$ 2	8 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	9 $\pm$ 4	381
<i>N. tabacum</i>	600 $\pm$ 261	10 $\pm$ 5	12 $\pm$ 9	23 $\pm$ 19	12 $\pm$ 7	7 $\pm$ 4	7 $\pm$ 3	17 $\pm$ 5	1685
<b>mean</b>	<b>2919 <math>\pm</math> 408</b>	<b>5 <math>\pm</math> 2</b>	<b>23 <math>\pm</math> 6</b>	<b>12 <math>\pm</math> 4</b>	<b>6 <math>\pm</math> 3</b>	<b>19 <math>\pm</math> 4</b>	<b>8 <math>\pm</math> 2</b>	<b>20 <math>\pm</math> 4</b>	<b>753</b>
<b>night-flowering</b>									
<i>N. acuminata</i>	1428 $\pm$ 157	3 $\pm$ 1	32 $\pm$ 5	2 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	10 $\pm$ 2	2 $\pm$ 0	48 $\pm$ 7	906
<i>N. alata</i>	262 $\pm$ 44	4 $\pm$ 1	28 $\pm$ 9	20 $\pm$ 9	6 $\pm$ 4	6 $\pm$ 1	5 $\pm$ 2	24 $\pm$ 4	6045
<i>N. benthamiana</i>	707 $\pm$ 150	7 $\pm$ 1	10 $\pm$ 5	42 $\pm$ 10	5 $\pm$ 3	3 $\pm$ 1	5 $\pm$ 2	20 $\pm$ 3	2103
<i>N. longiflora</i>	1912 $\pm$ 219	5 $\pm$ 2	32 $\pm$ 5	6 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0	19 $\pm$ 4	0 $\pm$ 0	34 $\pm$ 5	670
<i>N. nesophila</i>	297 $\pm$ 131	9 $\pm$ 3	18 $\pm$ 8	12 $\pm$ 2	1 $\pm$ 0	7 $\pm$ 3	4 $\pm$ 1	44 $\pm$ 5	1403
<i>N. otophora</i>	2019 $\pm$ 433	4 $\pm$ 1	42 $\pm$ 4	4 $\pm$ 1	26 $\pm$ 4	10 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	374
<i>N. plumbaginifolia</i>	577 $\pm$ 205	11 $\pm$ 5	23 $\pm$ 3	8 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2	8 $\pm$ 3	8 $\pm$ 2	26 $\pm$ 4	1683
<i>N. stocktonii</i>	961 $\pm$ 283	7 $\pm$ 1	36 $\pm$ 8	16 $\pm$ 7	8 $\pm$ 4	6 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	20 $\pm$ 4	609
<i>N. suaveolens</i>	1002 $\pm$ 400	7 $\pm$ 3	20 $\pm$ 9	16 $\pm$ 6	4 $\pm$ 2	26 $\pm$ 9	4 $\pm$ 1	21 $\pm$ 6	1434
<i>N. sylvestris</i>	271 $\pm$ 53	7 $\pm$ 4	20 $\pm$ 4	9 $\pm$ 2	9 $\pm$ 4	5 $\pm$ 1	9 $\pm$ 2	22 $\pm$ 9	3972
<b>mean</b>	<b>944 <math>\pm</math> 208</b>	<b>6 <math>\pm</math> 2</b>	<b>26 <math>\pm</math> 6</b>	<b>14 <math>\pm</math> 4</b>	<b>6 <math>\pm</math> 2</b>	<b>10 <math>\pm</math> 3</b>	<b>5 <math>\pm</math> 1</b>	<b>26 <math>\pm</math> 4</b>	<b>1920</b>

The essential amino acids for most pollinators are arginine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptophane, and valine [18]. The percentage of essential amino acids was between 6 % and 48 % (Table 3) and similar in day- and night flowering species. However, the concentration of essential amino acids was significantly higher in nectar of day-flowering species than in nectar of night-flowering species ( $p < .001$ ,  $df = 48$ ;  $n = 98$ ), which was also shown for the total amino acid concentration. The main amino acids in the group of the essential amino acids were valine (in seven species), phenylalanine and lysine (each in four species), histidine (in two species) and arginine as well as isoleucine (each in one species). The relative share of phenylalanine was highly variable in nectar (between less than 1 % of the total amino acid concentration in *N. glauca* and up to 33 % in *N. acuminata*). Phenylalanine was only a minor amino acid in leaves of all *Nicotiana* species (about 1-2 %; data not shown). In addition to the amino acids normally found in proteins also some non-proteinogenic amino acids were detected in the nectar of *Nicotiana* species, mainly  $\gamma$ -aminobutyric acid (*gaba*). The relative share of *gaba* was low (1-2 %) with two exceptions (12 % of the total amino acid concentration in *N. sylvestris* and 4 % in *N. tabacum*).

The amino acid concentrations in the nectar of the *Nicotiana* species differentiated by pollinators are shown in Fig 2C. Nectar of the sunbird-pollinated species *N. africana* contained the highest amino acid concentration (8.2 mM) of all day-flowering species, followed by the bee-pollinated species (3.6 mM). For the night-flowering species the highest concentration was measured in the bat-pollinated species *N. otophora* (2.0 mM). Therefore, the ratio of total sugars to total amino acids was lower in these pollination types than in hummingbird- and hawk moth-pollinated species, as well as in autogamous species (Fig 2D). Amides (glutamine and asparagine) have a higher nitrogen-to-carbon ratio compared with several other amino acids. The concentrations of amides were very high in the sunbird-pollinated species (mainly glutamine) as well as in the bat-pollinated species (asparagine and glutamine) and in bee-pollinated species (Fig 2E). For the essential amino acids no significant differences between pollinator groups could be shown with the exception of the sunbird-pollinated species *N. africana*, which has the highest concentration of essential amino acids in nectar (data not shown). This also applies for the proline concentration (data not shown).

Flowers of the different tobacco species contained unequal volumes of nectar, from very small volumes in bee- or self-pollinated species (0.5-1  $\mu$ L), small volumes in hummingbird-pollinated species (1-10  $\mu$ L), to high volumes in hawk moth-pollinated species (5-50  $\mu$ L) and abundant nectar volumes in species pollinated by sunbirds or bats (100-200  $\mu$ L and more). Therefore, the amount of sugars and amino acids per flower between different *Nicotiana*

species was also diverse. Sunbird- and bat-pollinated species provided about 150-170  $\mu\text{mol}$  sugars and 0.4-0.8  $\mu\text{mol}$  amino acids per flower (Fig 3). In comparison, the amount of sugar in the nectar per flower of autogamous species was about 100-fold lower (1-1.5  $\mu\text{mol}$ ) and the amount of amino acids was even about 1000-fold lower (0.0005  $\mu\text{mol}$ ). On the basis of higher nectar volumes of sphingophilous species compared to those of hummingbird-pollinated species, the amounts of sugars and amino acids per flower were higher in hawk moth-pollinated species (Fig 3), although the amino acid concentrations were higher in hummingbird-pollinated species (Fig 2C).



**Fig 3. Boxplots of sugar (A) and amino acid (B) amount in  $\mu\text{mol}$  per flower.** Data were calculated by multiplication of the sugar or amino acid concentrations (Table 2 and Table 3) with the approximate nectar volume of each species. Results are grouped by their main pollinators Trochilidae, Nectariniidae, Apidae, Sphingidae, Glossophaginae and self-pollinating species. Different letters designate significantly different groups determined via ANOVA, post hoc Tukey's HSD test and Kruskal-Wallis test for non-parametrical data ( $p \leq 0.05$ ).

### Concentrations of organic acids in nectar

For the measurement of organic acids and inorganic ions by the method mentioned above, volumes of at least 5  $\mu\text{L}$  per sample are necessary. For some of the less nectar producing species it was not possible to fulfil this requirement, so that *N. nudicaulis* and *N. stocktonii* are excluded from the analyses. From all other species, at least three and up to five samples could be analysed.

In nectar of *Nicotiana* malate was present in all analysed species, but in different amounts (Table 4). Other organic anions like oxalate and citrate could only be detected in a few samples and in very low concentrations. The lowest concentration of malate was found in hummingbird-pollinated *N. palmeri* (0.05 mM) and the highest in *N. langsdorffii* (2 mM), which is pollinated by hummingbirds as well. No significant difference between the averaged malate concentrations in day-flowering ( $0.7 \pm 0.2$  mM) compared to night-flowering tobacco ( $0.6 \pm 0.2$  mM) was obtained.

Malate concentrations in the nectar of the *Nicotiana* species differentiated by pollinators are shown in Fig 2F. With the exception of the bat-pollinated species *N. otophora* no significant differences in malate concentrations were found between the pollinator groups.

Almost no correlation was found between the malate content in leaves and nectar of all tobacco species ( $R^2 = 0.149$ ,  $p = 0.004$ ) (S3 Fig).

### Concentrations of inorganic ions in nectar

There were large differences in the total concentration of inorganic anions, that ranged from a minimum of  $0.5 \pm 0.2$  mM in *N. glauca* to a maximum of  $19.2 \pm 1.8$  mM in *N. benthamiana* (Table 4). Chloride was the most abundant anion in all analysed species and represented a minimum share of  $45 \pm 7$  % of the total inorganic anions in *N. acuminata* and a maximum share of  $98 \pm 2$  % in *N. longiflora*. Nitrate, phosphate, and sulphate were present in all species but on a lower level. Overall, the total inorganic anion concentration was about 2-fold higher in nectar of night-flowering species than in day-flowering species ( $p = 0.05$ ,  $df = 9$ ;  $n = 99$ ). The total concentrations of inorganic anions differentiated by pollinators are shown in Fig 2G. Due to the higher concentration of anions in nocturnal species in general, the nocturnal pollinator groups can also be distinguished from the pollinator groups active during daytime.

*N. otophora*, the only bat-pollinated plant, produces the most nitrate containing nectar. The percentage of nitrate made up 38 % of the total anion content, whereas for the other species

the percentage of nitrate ranged from less than 1 % in sphingophilous *N. nesophila* to 32 % in ornitophilous *N. attenuata*. Several hummingbird-pollinated species contained sulphate- and phosphate-rich nectar. Sulphate accounts for 33 % of the measured anions in *N. knightiana* and phosphate accounts for one quarter of the anions in *N. palmeri*. As mentioned before the inorganic anion concentration was measured for the tobacco leaves in parallel (S4 Fig). Hardly any correlation was found between the total concentration of anions or the single anions in nectar and leaf samples ( $R^2 = 0.006$ ,  $p < 0.001$ ).

The total concentration of inorganic cations was similar to the concentration of inorganic anions (Table 4). The concentration ranged from a minimum of 1 mM in *N. glauca* to a maximum of 14 mM in *N. suaveolens*. Based on total inorganic cation concentration, the relative amounts of potassium varied between  $78 \pm 1$  % in *N. langsdorffii* and  $99 \pm 2$  % in *N. sylvestris*. The next most frequent cation was sodium. Its relative proportion was highly variable in nectar (between less than 1 % of the total cation concentration in *N. sylvestris* and up to 10 % in *N. knightiana* and *N. langsdorffii*). Ammonium, magnesium, and calcium were present in all species but on a lower level. It was not possible to statistically differentiate between day- and night-flowering tobacco plants on the basis of inorganic cation concentrations, even though the mean concentration of all cations was slightly higher in night-flowering compared to day-flowering species. The inorganic cation concentrations differentiated by pollinators are shown in Fig 2H. Nectar of the sunbird-pollinated species *N. africana* contained the highest cation concentration whereas the lowest concentration was measured in hummingbird-pollinated species and in the bat-pollinated species *N. otophora*.

Overall, the concentration of both inorganic anions and cations was about 10-fold higher than the concentration of organic acids or amino acids, whereas sugars were by far the most dominant compounds in the nectar of all *Nicotiana* species (about 100-fold higher concentrated than inorganic ions).

**Table 4. Concentrations of malate, inorganic anions and cations as well as the proportions of single ions in nectar.**

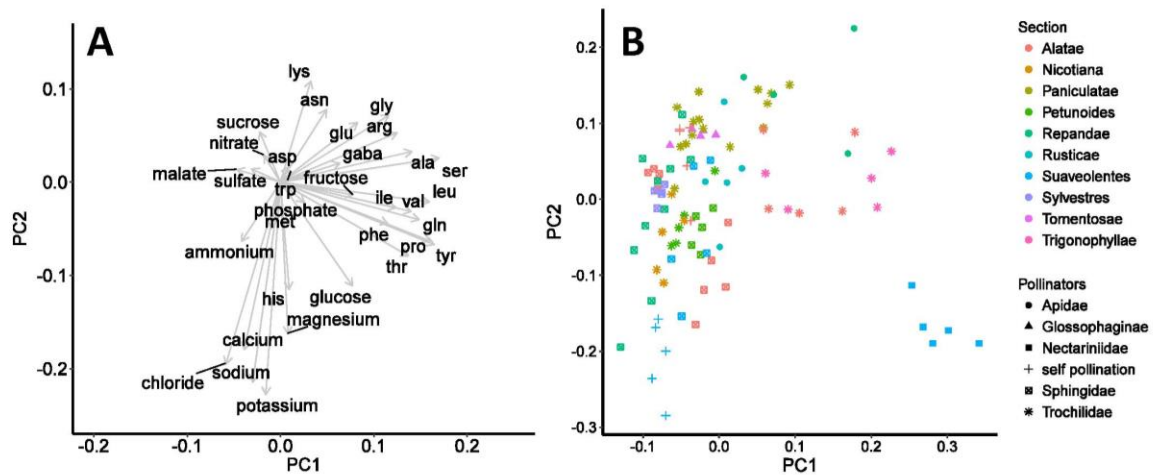
Species	Total malate [mM]	Total anions [mM]	Percentages of anions [%]				Total cations [mM]	Percentages of cations [%]				
			Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>		K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
<b>day-flowering</b>												
<i>N. africana</i>	0.1 ± 0.1	3.5 ± 1.4	96 ± 3	2 ± 2	1 ± 1	1 ± 1	11.5 ± 2.0	95 ± 1	3 ± 1	0 ± 0	1 ± 0	0 ± 0
<i>N. attenuata</i>	1.5 ± 0.6	3.6 ± 1.3	58 ± 13	29 ± 12	5 ± 2	9 ± 3	4.3 ± 1.1	85 ± 4	7 ± 2	0 ± 0	3 ± 0	5 ± 2
<i>N. glauca</i>	0.2 ± 0.0	0.5 ± 0.1	71 ± 4	4 ± 5	15 ± 5	10 ± 4	1.0 ± 0.5	91 ± 2	4 ± 1	3 ± 2	4 ± 1	2 ± 0
<i>N. knightiana</i>	1.8 ± 0.4	3.7 ± 0.7	54 ± 17	4 ± 2	9 ± 3	33 ± 16	1.5 ± 0.6	86 ± 3	10 ± 2	0 ± 0	2 ± 2	2 ± 2
<i>N. langsdorffii</i>	2.0 ± 0.9	3.4 ± 0.3	82 ± 7	3 ± 1	12 ± 5	3 ± 1	2.5 ± 0.2	78 ± 1	10 ± 2	0 ± 0	7 ± 2	5 ± 2
<i>N. palmeri</i>	0.1 ± 0.1	6.0 ± 3.2	57 ± 5	5 ± 5	22 ± 4	17 ± 7	6.7 ± 1.5	97 ± 0	2 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0
<i>N. paniculata</i>	0.1 ± 0.1	1.7 ± 1.5	49 ± 2	12 ± 12	21 ± 10	18 ± 3	4.4 ± 2.0	95 ± 2	4 ± 1	4 ± 1	0 ± 0	0 ± 0
<i>N. rustica</i>	0.2 ± 0.0	1.7 ± 0.6	59 ± 8	24 ± 5	5 ± 2	12 ± 6	7.8 ± 4.0	94 ± 1	4 ± 1	4 ± 2	1 ± 0	1 ± 0
<i>N. tabacum</i>	0.4 ± 0.1	12.7 ± 1.9	96 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	9.3 ± 2.9	93 ± 4	5 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1
<b>mean</b>	<b>0.7 ± 0.2</b>	<b>4.9 ± 1</b>	<b>69 ± 7</b>	<b>9 ± 5</b>	<b>10 ± 4</b>	<b>12 ± 5</b>	<b>5.6 ± 1.7</b>	<b>91 ± 2</b>	<b>5 ± 1</b>	<b>2 ± 1</b>	<b>2 ± 1</b>	<b>2 ± 1</b>
<b>night-flowering</b>												
<i>N. acuminata</i>	0.4 ± 0.2	1.6 ± 0.4	46 ± 6	35 ± 5	7 ± 2	11 ± 3	6.1 ± 1.4	92 ± 1	6 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
<i>N. alata</i>	0.4 ± 0.1	7.9 ± 1.1	91 ± 5	1 ± 0	1 ± 1	4 ± 2	4.7 ± 0.8	95 ± 1	3 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
<i>N. benthamiana</i>	0.5 ± 0.2	19.2 ± 1.8	97 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	12.0 ± 1.6	91 ± 1	4 ± 1	0 ± 0	1 ± 0	4 ± 1
<i>N. longiflora</i>	0.1 ± 0.0	14.3 ± 2.5	98 ± 2	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	12.4 ± 4.7	95 ± 2	2 ± 1	1 ± 0	2 ± 2	0 ± 0
<i>N. nesophila</i>	1.1 ± 0.1	17.1 ± 2.6	97 ± 0	0 ± 0	1 ± 0	2 ± 1	10.3 ± 4.4	90 ± 2	9 ± 2	3 ± 1	1 ± 0	0 ± 0
<i>N. otophora</i>	1.6 ± 0.6	6.1 ± 2.3	59 ± 5	39 ± 5	0 ± 0	1 ± 1	4.7 ± 0.7	97 ± 1	1 ± 0	0 ± 0	2 ± 0	0 ± 0
<i>N. plumbaginifolia</i>	0.2 ± 0.3	3.5 ± 4.2	93 ± 5	1 ± 1	3 ± 1	4 ± 4	1.9 ± 0.6	89 ± 2	8 ± 2	0 ± 0	1 ± 0	1 ± 1
<i>N. suaveolens</i>	0.3 ± 0.2	6.0 ± 1.2	84 ± 9	1 ± 1	10 ± 6	5 ± 3	14.0 ± 2.3	97 ± 0	2 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
<i>N. sylvestris</i>	0.4 ± 0.2	10.4 ± 1.8	94 ± 1	2 ± 1	1 ± 0	3 ± 1	9.1 ± 2.1	99 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0	0 ± 0
<b>mean</b>	<b>0.6 ± 0.2</b>	<b>10.2 ± 1.9</b>	<b>84 ± 4</b>	<b>9 ± 2</b>	<b>3 ± 1</b>	<b>4 ± 2</b>	<b>8.4 ± 2.2</b>	<b>94 ± 1</b>	<b>3 ± 1</b>	<b>1 ± 0</b>	<b>1 ± 0</b>	<b>1 ± 0</b>

## Pollinators' preferences

To reduce the complexity of the data, a PCA was performed with independently measured nectar features as described in the methods section. Fig 4A shows the loadings of all measured nectar constituents on the extracted principal components. Most of the cations load strongly negative on the first component ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ). The majority of amino acids loads positively on the second component. The first principal component explains 24.4 % and both principal components together explain 34.7 % of the total variance. Fig 4B shows a scatterplot of the PCA scores with focus on the distribution by pollinator groups and sections, which are representing the phylogenetic constraints of the species. Some groups (especially pollination types) are more distinguishable than others, for example sunbird-pollinated plants (filled box), which cluster in the lower right quadrant and bee-pollinated plants (filled circles), which accumulate in the upper right quadrant.

To complement the graphical evaluation, a PERMANOVA was performed on the nectar data with pollinators and sections as categorical variables (Table 5). If all chemical classes (sugars, amino acids, inorganic anions, inorganic cations, and malate) were taken into account, there is a highly significant ( $p < 0.001$ ) difference between the individual pollinator groups and between the individual sections. In this model, 27 % of the data variation can be explained by pollinators, 24 % by sections, 21 % by a combination of both variables, and 27 % by other factors. If only sugars and amino acids are taken into account, the distribution was more different: grouping by pollinators is responsible for 66% of the variation whereas section grouping makes up 19 % of the variation ( $p < 0.001$  each). When the PERMANOVA was performed solely on the measurements of inorganic anions, inorganic cations, and malate, 26 % of the data variation could be explained by pollinators and 24 % by sections ( $p < 0.001$  each; 21 % pollinators  $\times$  sections, 28 % residuals).





**Fig 4. Loadings and scatterplot of PCA scores in rotated space.** (A) Loadings of the original variables are shown as vectors in PCA space (B) The first principal component (PC 1) accounts for 24.4 % and the second principal component (PC 2) accounts for 10.3 % of the variation in the dataset. Eigenvalues are 2.837 for PC 1 and 1.846 for PC 2. Data ( $n = 99$ ) are grouped both by main pollinators (colours) and sections (markings).

**Table 5. Results of the PERMANOVA: Degrees of freedom (df), pseudo-F (F),  $R^2$ , and  $p$ -value (P).**

PERMANOVA	Df	F	$R^2$	$p$
a) All components				
Pollinator	5	16.12	0.27	0.001***
Section	8	8.94	0.24	0.001***
Pollinator x Section	2	31.31	0.21	0.001***
Residuals	83		0.28	
Total	98		1.00	
b) Sugars and amino acids				
Pollinator	5	85.55	0.66	0.001***
Section	8	15.56	0.19	0.001***
Pollinator x Section	2	8.70	0.03	0.001***
Residuals	83		0.13	
Total	98		1.00	
c) Anions, cations, and malate				
Pollinators	5	15.05	0.26	0.001***
Section	8	8.83	0.24	0.001***
Pollinator x Section	2	31.66	0.22	0.001***
Residuals	83		0.28	
Total	98		1.00	

## Discussion

We are presenting here the first comprehensive study about the content of sugars, amino acids, organic acids, and inorganic ions in nectars of a large set of species from one genus comprising a wide variety of pollinators. A simplified phylogenetic tree demonstrates that the selection of pollinators is independent from the sectional grouping of the *Nicotiana* plants tested here (S5 Fig). Key factors exhibiting a significant influence on visitation of pollinators to plants include nectar production and the composition of nectar with respect to sugars, amino acids, organic acids, inorganic ions, and other metabolites. Correlations between nectar sugar compositions and pollinator preferences have been demonstrated in several previous studies [8,45,56,57]. However fewer studies investigated a relationship between nectar amino acids and pollinators [13,14] and studies focused on organic acids or inorganic ions and pollinator preferences are scarce.

### *Sucrose rich nectar correlates with corolla tube length in night-flowering species*

Nectar sugar composition differed among all 20 analysed *Nicotiana*. Reasons for differences in nectar composition have not been fully determined so far. Some studies proved that long-tubed flowers with concealed nectaries tend to be associated with sucrose-dominated nectar [1,9,27,58]. This correlation is strongly supported by our findings in night-flowering species ( $r = 0.586$ ), in contrast to day-flowering species, for which no correlation was found ( $r = 0.090$ ).

The majority of the night-flowering species are long-tubed tobacco species and therefore they are mainly pollinated by moths. They typically have a very long proboscis supporting the hypothesis that flower shapes have co-evolved with the morphology of the mouth parts of their pollinators [23,24]. Particularly within the group of sphingophilous tobacco plants there exists a very high correlation between the corolla tube lengths and the proportions of sucrose ( $r = 0.857$ ). *N. nesophila* was however excluded due to the fact of exhibiting extreme slender bottle-neck flowers compared to other hawk moth-pollinated flowers (Fig 1). If *N. nesophila* was included, the correlation was much lower ( $r = 0.397$ ). Therefore, sucrose-rich nectar in long-tubed flowers could be an adaptation to the preference of long-tongued pollinators, along with the fact that sucrose-rich nectar is better protected against evaporation in these flowers [9]. Sucrose-dominated sugar solutions tend to evaporate faster than hexose-dominated sugar solutions due to their lower osmotic potential. In addition to the longer tube, higher humidity and lower temperatures at nights may partially prevent evaporation. One benefit of an increased sucrose proportion is the lower viscosity of the nectar. If the viscosity is too high, it will prevent pollinators from extracting nectar and avoid these flowers eventually [29]. Possibly nectar viscosity is aligned with the length of the corolla tube so that

effective nectar drinking by hawk moths is possible. Moths are active suction feeders and therefore effective drinking is ensured by nectar with lower sugar concentrations [11].

*Nectar of several Nicotiana species contains more fructose than glucose*

Hexose-rich nectar occurs in several *Nicotiana* species (*N. africana*, *N. attenuata*, *N. benthamiana*, *N. paniculata*, *N. suaveolens*). Hexoses are typically not part of the phloem sap of plants [39] and therefore the proportion of hexoses in nectar depends on the presence and activity of cleaving enzymes in nectaries, including invertases [59].

The proportions of glucose and fructose in nectar of the different *Nicotiana* species were either similar or fructose dominated (Table 2). In eight out of twenty species the fructose-to-glucose ratio was higher than 1.5. The diurnal species *N. glauca* exhibited an extremely high ratio of 12.6 followed by *N. rustica* with a ratio of 3.7 (Table 2). Also, higher percentages of fructose in comparison to glucose were found in nectars of other plant families, e.g. in some Acanthaceae [60] and Scrophulariaceae [61]. In *Conophytum* species (Aizoaceae) nectar of diurnal species had significantly higher fructose-to-glucose ratios than nectar from nocturnal species [29]. Increased sweetness of fructose rich nectars may be more rewarding for pollinators and therefore provide a natural advantage for plants with higher fructose-to-glucose ratios. Honey bees preferred fructose rather than glucose in artificial nectar as demonstrated by Waller [62], which corresponds to our observation that bee-pollinated *Nicotiana* species (*N. nudicaulis*, *N. rustica*) contained more fructose as glucose in their nectar (Table 2).

Another explanation for the non-stoichiometric hexose ratio in some tobacco plants could be the result of a yeast contamination caused by nectar probing flower visitors [63]. However, we found no contamination with yeast in the nectar samples of the tested *Nicotiana* species, which confirms the fructose-to-glucose ratio to be genuine.

*Nectar amino acid composition is highly specific for pollinator groups*

The presence of amino acids in nectar has been known for several decades, but their role in nectar is still a matter of debate [14,64]. At least two possible explanations for the species-specific differences in nectar amino acid concentration exist: (1) amino acids are leaching from the nectaries and the nectar composition reflects the amino acid composition of the phloem and nectaries or (2) the amino acid composition in nectar is correlated to the preferences of different pollinators. In the latter case amino acids in nectars could present either a potential source of amino acids in the nutrition of the pollinators or the presence of amino acids in nectar potentially contributes to its taste [18,65].

Maximum concentrations in tobacco nectar were about 1500 mM sugars and 8 mM free amino acids (Table 2 and 3), whereas in the phloem sap about 500 sugar (exclusively sucrose) and 80 mM [66] are transported into the nectaries. Therefore, the carbon-to-nitrogen ratio is clearly higher in the nectar compared to the supplying phloem sap. A discrepancy of amino acids concentration and their composition between phloem sap and nectar was also shown in other plants [39]. This may indicate an active regulation mechanism in the nectaries in order to accumulate sugars and retain amino acids as well as the selective secretion of specific amino acids into the nectar.

All ten essential amino acids for nectarivorous pollinators were present in the nectar of *Nicotiana* species, but glutamine was the predominant amino acid, followed by proline, aspartate, and serine (Table 3). Proline and glutamine were also the dominant amino acids in the nectar of the section *Alatae* [31] and in most of 30 species from different plant families [13] reported.

Studies with insect preference tests could show a preference of honey bees (*Apis mellifera*) for proline-enriched artificial nectar as well as a negative response to serine [67]. The percentage of proline in the bee-pollinated species *N. rustica* and *N. nudicaulis* was in the middle range (8 % and 17 %, respectively, Table 3) whereas the highest percentage of proline was found in the sunbird-pollinated species *N. africana* (36 %). In floral nectar of 73 Mediterranean plant species, the proportion of phenylalanine was highly variable [14]. This corresponds to the findings in the genus *Nicotiana*. Nectar of *N. acuminata*, *N. palmeri* and *N. longiflora* contained a high proportion of phenylalanine (up to 33 % of the total amino acid concentration), whereas the proportion was very low for other species. We found no correlation between phenylalanine concentration in nectar and flowering time, pollination time, section or phenylalanine content in leaves. Further studies are therefore needed to investigate the role of phenylalanine in nectar of certain species.

The amount of amino acids per flower in sunbird- and bat-pollinated species was about 1000-fold higher than in autogamous species and about 220-fold higher than in bee-pollinated species (Fig 3). The concentration of amides (amino acids with a higher nitrogen-to-carbon ratio in comparison to several other amino acids) was particularly high for sunbird- and bat-pollinated species (Fig 2E). As a conclusion, sunbird- and bat-pollinated species either have a large loss of organic nitrogen, or invest large amounts of organic nitrogen for specific pollination by sunbirds or bats. In addition, pollinators could dislodge pollen into the nectar while collecting it, which would again increase the amino acid amount [2]. Generally, Nectariniidae are bigger than hummingbirds [68,69] and therefore might need a higher intake of amino acids, which could provide an explanation for the lower amino acid concentration in

hummingbird-pollinated species. This dichotomy in amino acid concentrations in ornithophilous species with lower concentrations in hummingbird-pollinated species and higher concentrations in species pollinated by passerine birds has already been shown by Baker and Baker [2]. In comparison, sunbird-pollinated species have nectar which is the richest in amino acids when compared to all other day-flowering species, whereas bat-pollinated species have the highest amino acid concentrations of all night-flowering species. This leads to the simplified conclusion, that the bigger the pollinators are in size, the more a plant has to invest in their amino acid nutrition.

Hawk moths lack an alternative protein source [2], which is why the low amino acid concentration in nectar of flowers usually pollinated by these moths is surprising. A conceivable explanation is that the collection of relatively large amounts of nectar per night may compensate the low amino acid concentration in the nectar. This would correspond to the higher amount of amino acids per flower in hawk moth-pollinated species in contrast to hummingbird- or bee-pollinated species (Fig 3) as a consequence of larger nectar volumes in hawk moth-pollinated species. All amino acids that are essential for the growth of adult honey bees [70] were detected in nectar of melittophilous *Nicotiana* species except methionine which was under the detection limit. However, bees appear to not solely rely on nectar for their intake of nitrogen and essential amino acids. Pollen seems to represent an additional source. As a consequence bees are not as dependent on free amino acids from nectar as expected [70].

#### *The function of organic acids in nectar*

Organic acids in nectars have not been studied in detail, despite the fact that they may play an important role in nectar quality and pollinator attraction, e.g. by adding flavours and aromas to the nectar [16]. The main organic acid in nectars of all analysed *Nicotiana* species was malic acid and malate respectively, followed by citrate. This result corresponds to the composition of organic acids in the nectar of *Aquilegia* [16]. The concentration of malate in nectars of *Nicotiana* species was between 0.1 and 2.0 mM, similar to levels found in apoplastic fluids [41], but considerably lower than concentrations in leaves (approx. 10  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}^{-1}$  and 200  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}^{-1}$  which corresponds to about 12 to 235 mM considering the aqueous space of the leaves of about 85 %). An explanation for this concentration gradient may be the fact that malate has no apparent benefit for the pollinators like sugars or amino acids and therefore the plants may limit the output of this organic acid. This could also explain why the concentration of malate in the nectar did not change significantly along with the type of pollinator (Fig 2F), except for the bat-pollinated species *N. otophora*. However, it

cannot be excluded that organic acids may play a role in pollinator attraction, e.g. by adding flavours to the nectar [16].

*Inorganic ions are higher concentrated in the nectar of night-flowering species and organic metabolites are higher concentrated in the nectar of day-flowering species*

Nectar of night-flowering species is generally more dominated by inorganic ions than nectar of day-flowering species (inorganic anions are 2-fold higher and inorganic cations are 1.5-fold higher, Table 4). On the other hand, nectar of day-flowering species contained about 20 % more sugar (Table 2) and the total amino acid concentration was about 3-fold higher in nectar of day-flowering species (Table 3). The reason of the lower sugar and amino acid concentration in nectar of night-flowering species could be the lower assimilation rate of carbon and nitrogen in the whole plant and the lower phloem translocation rate of assimilates during the night phase [71]. The processes leading to higher concentrations of inorganic ions in nectar of night-flowering species are still poorly explored and further analyses are required.

The detected spectrum of inorganic ions is comparable to levels found in apoplastic fluid, while inorganic ion concentration is usually higher in the symplast [41]. In each case chloride and potassium were the main anion and cation, respectively. Nitrate is far less concentrated in the nectar than in the apoplastic fluid. This might be due to a regulatory mechanism preventing ions from being secreted into the sugary solution. Much higher potassium than sodium concentrations in nectar are according to concentrations of these cations in the phloem sap [72].

Ion concentration in nectar influences the electrolyte balance of nectar-feeding birds [19]. The Broad-tailed Hummingbird (*Selasphorus platycercus*) for example needs to replace 14 % of its body electrolytes each day [73]. So far, no data on electrolyte balance are available for other pollinator groups. Hiebert and Calder found average chloride concentrations of 9.9 mM in 19 hummingbird-pollinated species, which is close to our findings in *Nicotiana* (5.8 mM) [74].

*Nectar volumes and concentrations are adapted to the requirements of the pollinators*

The species of *Nicotiana* showed variation in their phenology over the course of the day, thus regulating the availability of nectar to pollinators. Furthermore, nectar volume and composition of nectar are likely to be adapted to the nutritional and energetic requirements of the pollinators [8]. We found that several nectar characteristics in tobacco corresponded to their pollination type when pollinators are specialized to visit specific plants. Several hummingbird-pollinated *Nicotiana* species secreted sucrose-rich nectar, whereas the nectar

of the sunbird-pollinated *N. africana* was hexose-rich (Fig 2B, Table 2). This dichotomy in bird-pollinated species was shown by Baker and Baker [8] and it may reflect differences in bird physiologies, e.g. different levels of sucrase activity in several nectarivorous perching birds [75,76], and a pattern of nectar secretion, e.g. invertase activity of the nectaries [77]. These data are in agreement with findings of Martinez del Rio [75], who demonstrated an experimental behavioural preference for sucrose over hexoses for some hummingbird species. Napier *et al.* have shown that the preference is depending on the sugar concentration and nectar feeding birds only preferred hexose solutions with low sugar concentrations [76]. The question why nectars of hummingbird-pollinated species are often sucrose dominated and those of sunbird-pollinated species are often hexose dominated is still unresolved, and perhaps a combination of both bird and plant physiologies is involved [77]. Furthermore, in other plant families the sugar composition in nectar was more linked to the phylogeny of the species than to pollinator preferences, e.g. in 35 Asteraceae species which were most visited by numerous insects [27].

Nectar volume is expected to correlate with the body size of the pollinators [18]. The abundant nectar volumes of sunbird- (*N. africana*) and bat-pollinated species (*N. otophora*) constitute a significant investment of the plants. The amount of sugars per flower was about 150-fold higher in these species than in bee-pollinated species or autogamous species. This difference is even more pronounced for amino acids per flower (up to 1000-fold higher). Conversely, autogamy may facilitate the evolution of reduced nectar volumes as well as nectar concentrations, particularly that of amino acids, due to the decreased need for pollinator attraction. Sugar and amino acid amounts were estimated for individual flowers, rather than for the entire plant. It is possible that differences in sugar and amino acid amounts per flower could be balanced across species by differences in the number of flowers produced along the flowering season [31].

The PCA resulting in a dimensionality reduction allowed us to visualize the distribution of the data. By means of different markings a pattern of the data distribution became partially visible, which led to the conclusion, that phylogenetic constrains and particularly pollination types are suitable to make predictions on nectars' chemistry. These observations correlate to findings of Petanidou *et al.* [78]. They demonstrated that phylogenetic affinity plays a secondary role, if a PCA is run on the basis of nectar characteristics (nectar volume, sugar and amino acids content) similar to those used by our group. Additionally it was shown for the section *Alatae* that nectar volume and concentration tend to be more similar among species with the same predominant pollinator compared to species with different predominant pollinators [31].

The PERMANOVA confirmed a significant difference between both the pollination groups and the sections (Table 5). If all measured nectar components are included, the influence of pollinators and sections on the data variance is similar. If only sugars and amino acids are taken into account, the influence of the pollinators becomes dominant. However, the importance of pollinators over sections vanishes if only organic acids and inorganic ions are considered.

It may be concluded that the composition of sugars and amino acids in nectar of *Nicotiana* species is highly influenced by the main pollinator of a plant and that there is a fewer but still significant influence on inorganic ions and malate. Nevertheless, a considerable part of the variance cannot be explained by either of the grouping options, which raises the question if there are further models to predict the nectar composition.

Within the genus *Nicotiana* highly specialized plant species have evolved, the flower morphology and several nectar features of which are aligned to the needs of its pollinators like the sunbird-pollinated species *N. africana* and the bat-pollinated species *N. otophora*. This evolutionary process did not apply to all examined *Nicotiana* species, resulting in generalists which are accessible to a more diverse group of pollinators. Summarizing all data, it appears that sugar and amino acid concentrations in nectar of *Nicotiana* are primarily influenced by the pollinators of the plant. Other factors such as phylogenetic relationships are less important determinants.

## Acknowledgements

We would like to thank Prof. B. Piechulla (Rostock, Germany), the Botanical Garden of Bochum (Germany) and the Max Planck Institute for Chemical Ecology (Jena, Germany) for the provision of seeds and R. Ritter and U. Dreses-Werringloer for critical reading of the manuscript. Comments from the anonymous reviewers have greatly helped to improve the previous version of the present manuscript.



## References

1. **Percival MS.** Types of Nectar in Angiosperms. *New Phytologist*. 1961; 235–281.
2. **Baker HG, Baker I.** Chemical constituents of nectar in relation to pollination mechanisms and phylogeny. *Biochemical aspects of evolutionary biology*. 1982; 131: 171.
3. **Adler LS.** The ecological significance of toxic nectar. *Oikos*. 2000; 91: 409–420.
4. **Proctor M, Yeo P, Lack A.** The natural history of pollination. Portland, Ohio, USA: Timber Press; 1996.
5. **Stuurman J.** Dissection of Floral Pollination Syndromes in *Petunia*. *Genetics*. 2004; 168: 1585–1599.
6. **Heil M.** Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science*. 2011; 16: 191–200.
7. **Carter CJ, Thornburg RW.** Is the nectar redox cycle a floral defense against microbial attack? *Trends in Plant Science*. 2004; 9: 320–324.
8. **Baker HG, Baker I.** Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. *Handbook of experimental pollination biology*. 1983; 117: 141.
9. **Witt T, Jürgens A, Gottsberger G.** Nectar sugar composition of European Caryophylloideae (Caryophyllaceae) in relation to flower length, pollination biology and phylogeny. *J. Evol. Biol.* 2013; 26: 2244–2259.
10. **Pyke GH, Waser NM.** The Production of Dilute Nectars by Hummingbird and Honeyeater Flowers. *Biotropica*. 1981: 260–270.
11. **Kim W, Gilet T, Bush JW.** Optimal concentrations in nectar feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011; 108: 16618–16621.
12. **Baker HG, Baker I.** Amino-acids in Nectar and their Evolutionary Significance. *Nature*. 1973; 241: 543–545.
13. **Gardener MC, Gillmann MP.** Analyzing Variability in Nectar Amino Acids: Composition Is Less Variable Than Concentration. 2001: 2545–2558.
14. **Petanidou T, van Laere A, Ellis WN, Smets E.** What shapes amino acid and sugar composition in Mediterranean floral nectars. 2006: 155–169.
15. **Inouye DW, Waller GD.** Responses of Honey Bees (*Apis Mellifera*) to Amino Acid Solutions Mimicking Floral Nectars. *Ecology*. 1984; 65: 618.
16. **Noutsos C, Perera AM, Nikolau BJ, Seaver SMD, Ware DH.** Metabolomic Profiling of the Nectars of *Aquilegia pubescens* and *A. canadensis*. *PLoS ONE*. 2015; 10: e0124501.
17. **Baker HG, Baker I.** Studies of nectar-constitution and pollinator-plant coevolution. *Coevolution of animals and plants*. 1975; 100: 591–600.
18. **Nicolson SW, Nepi M, Pacini E, editors.** Nectaries and Nectar. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2007.

19. **Calder WA.** On the temperature-dependency of optimal nectar concentrations for birds. *Journal of Theoretical Biology.* 1979; 78: 185–196.
20. **González-Teuber M, Heil M.** Nectar chemistry is tailored for both attraction of mutualists and protection from exploiters. *psb.* 2014; 4: 809–813.
21. **Stevenson PC, Nicolson SW, Wright GA.** Plant secondary metabolites in nectar: impacts on pollinators and ecological functions. *Funct Ecol.* 2017; 31: 65–75.
22. **Kessler D, Bhattacharya S, Diezel C, Rothe E, Gase K, Schöttner M, et al.** Unpredictability of nectar nicotine promotes outcrossing by hummingbirds in *Nicotiana attenuata*. *The Plant Journal.* 2012; 71: 529–538.
23. **Soltis DE.** Angiosperm phylogeny & evolution. New York, Basingstoke: W.H. Freeman; 2005.
24. **Peter CI, Johnson SD.** A pollinator shift explains floral divergence in an orchid species complex in South Africa. *Annals of Botany.* 2014; 113: 277–288.
25. **Raguso RA, Levin RA, Foose SE, Holmberg MW, McDade LA.** Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination “syndromes” in *Nicotiana*. *Phytochemistry.* 2003; 63: 265–284.
26. **Ollerton J, Alarcón R, Waser NM, Price MV, Watts S, Cranmer L, et al.** A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of Botany.* 2009; 103: 1471–1480.
27. **Torres C, Galetto L.** Are Nectar Sugar Composition and Corolla Tube Length Related to the Diversity of Insects that Visit Asteraceae Flowers. *Plant Biol (Stuttg).* 2002; 4: 360–366.
28. **Goulson D.** Foraging strategies of insects for gathering nectar and pollen, and implications for plant ecology and evolution. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics.* 1999; 2: 185–209.
29. **Jürgens A.** Nectar sugar composition and floral scent compounds of diurnal and nocturnal *Conophytum* species (Aizoaceae). *South African Journal of Botany.* 2004; 70: 191–205.
30. **Krömer T, Kessler M, Lohaus G, Schmidt-Lebuhn AN.** Nectar sugar composition and concentration in relation to pollination syndromes in Bromeliaceae. *Plant Biol (Stuttg).* 2008; 10: 502–511.
31. **Kaczorowski RL, Gardener MC, Holtsford TP.** Nectar Traits in *Nicotiana* Section *Alatae* (Solanaceae) in Relation to Floral Traits, Pollinators, and Mating System. *American Journal of Botany.* 2005: 1270–1283.
32. **Knapp S, Chase MW, Clarkson JJ.** Nomenclatural changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (Solanaceae). *Taxon.* 2004: 73–82.

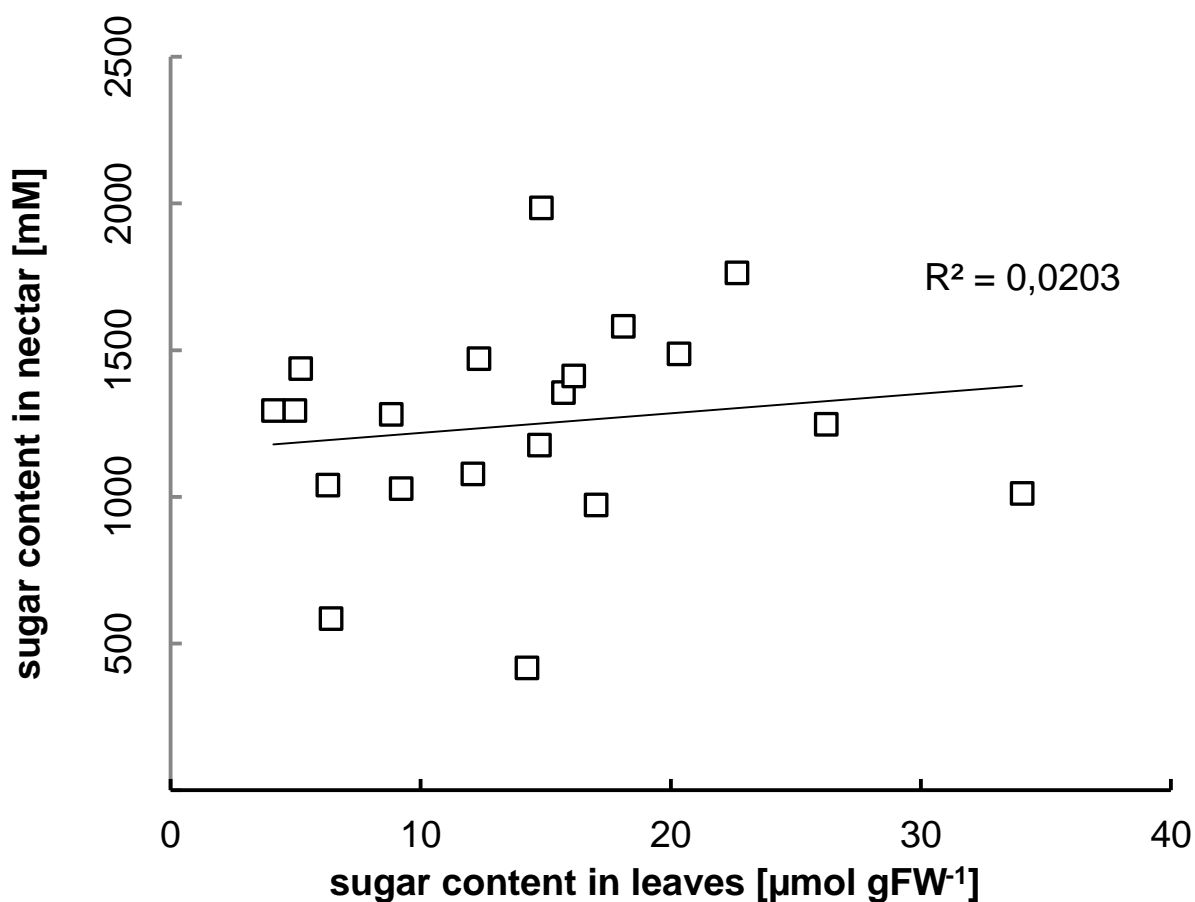
33. **Goodspeed TH.** The Genus *Nicotiana*. Origins, Relationships and Evolution of its Species in the light of their Distribution, Morphology and Cytogenetics. Waltham, Massachusetts, USA: Chronica Botanica; 1954.
34. **Clarkson JJ, Knapp S, Garcia VF, Olmstead RG, Leitch AR, Chase MW.** Phylogenetic relationships in *Nicotiana* (Solanaceae) inferred from multiple plastid DNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2004; 33: 75–90.
35. **Merxmüller H, Buttler KP.** *Nicotiana* in der afrikanischen Namib - ein pflanzengeografisches und phylogenetisches Rätsel. *Mitteilungen der botanischen Staatssammlung München*. 1975: 91–104.
36. **Kelly LJ, Leitch AR, Clarkson JJ, Knapp S, Chase MW.** Reconstructing the complex evolutionary origin of wild allopolyploid Tobaccos (*Nicotiana* Section *Suaveolentes*). *Evolution*. 2013; 67: 80–94.
37. **Carter CJ, Healy RA, O'Tool NM, Naqvi, S M Saqlan, Ren G, et al.** Tobacco nectaries express a novel NADPH oxidase implicated in the defense of floral reproductive tissues against microorganisms. *Plant Physiology*. 2007; 143: 389–399.
38. **Nadwodnik J, Lohaus G.** Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta*. 2008; 227: 1079–1089.
39. **Lohaus G, Schwerdtfeger M.** Comparison of sugars, iridoid glycosides and amino acids in nectar and phloem sap of *Maurandya barclayana*, *Lophospermum erubescens*, and *Brassica napus*. *PLoS ONE*. 2014; 9: e87689.
40. **Riens B, Lohaus G, Heineke D, Heldt H.** Amino Acid and Sucrose Content Determined in the Cytosolic, Chloroplastic, and Vacuolar Compartments and in the Phloem Sap of Spinach Leaves. *Plant Physiology*. 1991: 227–233.
41. **Lohaus G, Pennewiss K, Sattelmacher B, Hussmann M, Muehling KH.** Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiol Plant*. 2001; 111: 457–465.
42. **Anderson MJ.** A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*. 2001; 26: 32–46.
43. **Oksanen J, Kindt R, Legendre P, O'Hara B, Stevens, M Henry H, et al.** The vegan package. *Community ecology package*. 2007; 10: 631–637.
44. **Nattero J, Moré M, Sérsic AN, Cocucci AA.** Possible tobacco progenitors share long-tongued hawkmoths as pollen vectors. *Plant Systematics and Evolution*. 2003; 241: 47–54.
45. **Ippolito A, Fernandes GW, Holtsford TP.** Pollinator Preferences for *Nicotiana alata*, *N. forgetiana*, and their F 1 Hybrids. *Evolution*. 2004; 58: 2634–2644.

- 46. Nattero J, Cocucci AA.** Geographical variation in floral traits of the tree tobacco in relation to its hummingbird pollinator fauna. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2007; 90: 657–667.
- 47. Schueller SK.** Self-pollination in island and mainland populations of the introduced hummingbird-pollinated plant, *Nicotiana glauca* (Solanaceae). *American Journal of Botany*. 2004; 91: 672–681.
- 48. Nabhan GP.** *Conserving Migratory Pollinators and Nectar Corridors in Western North America*: University of Arizona Press; 2004.
- 49. Galetto L, Bernardello L.** Nectar secretion pattern and removal effects in three species of Solanaceae. *Can. J. Bot.* 1993; 71: 1394–1398.
- 50. Marlin D, Nicolson SW, Yusuf AA, Stevenson PC, Heyman HM, Krüger K.** The only African wild tobacco, *Nicotiana africana*: alkaloid content and the effect of herbivory. *PLoS ONE*. 2014; 9: e102661.
- 51. Lotz CN, Schondube JE.** Sugar Preferences in Nectar- and Fruit-Eating Birds: Behavioral Patterns and Physiological Causes. *Biotropica*. 2005: 3–15.
- 52. Chase MW, Paun O, Fay MF.** Hybridization and speciation in angiosperms: a role for pollinator shifts. *BMC Biol.* 2010; 8: 45.
- 53. Aigner PA, Scott PE.** Use and Pollination of a Hawkmoth Plant, *Nicotiana attenuata*, by Migrant Hummingbirds. *The Southwestern Naturalist*. 2002; 47: 1.
- 54. Kessler D, Baldwin IT.** Making sense of nectar scents: the effects of nectar secondary metabolites on floral visitors of *Nicotiana attenuata*. *The Plant Journal*. 2007; 49: 840–854.
- 55. Adler LS, Seifert MG, Wink M, Morse GE, Turlings T.** Reliance on pollinators predicts defensive chemistry across tobacco species. *Ecol Lett.* 2012; 15: 1140–1148.
- 56. Pender RJ, Morden CW, Paull RE.** Investigating the pollination syndrome of the Hawaiian lobeliad genus *Clermontia* (Campanulaceae) using floral nectar traits. *American Journal of Botany*. 2014; 101: 201–205.
- 57. Torres C, Galetto L.** Nectar Sugar Composition and Flower Visitors for the Naturalized Exotic *Lantana camara* (Verbenaceae) at Central Argentina. *The International Journal of Plant Reproductive Biology*. 2014: 174–180.
- 58. Southwick EE, Loper GM, Sadwick SE.** Nectar Production, Composition, Energetics and Pollinator Attractiveness in Spring Flowers of Western New York. *American Journal of Botany*. 1981; 68: 994.
- 59. Ruhlmann JM, Kram BW, Carter CJ.** CELL WALL INVERTASE 4 is required for nectar production in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 2010; 61: 395–404.

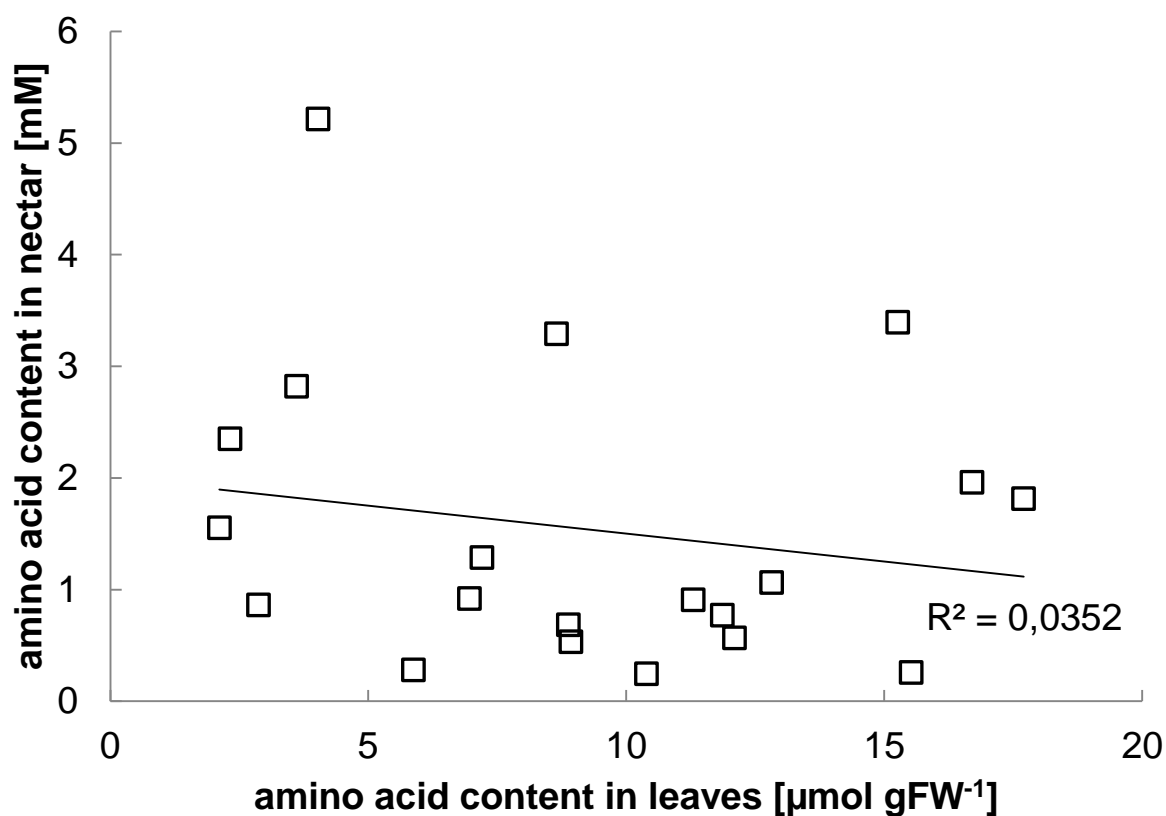
60. **Schmidt-Lebuhn AN, Schwerdtfeger M, Kessler M, Lohaus G.** Phylogenetic constraints vs. ecology in the nectar composition of Acanthaceae. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants.* 2007; 202: 62–69.
61. **Rodríguez-Riaño T, Ortega-Olivencia A, López J, Pérez-Bote JL, Navarro-Pérez ML, Dafni A.** Main sugar composition of floral nectar in three species groups of *Scrophularia* (Scrophulariaceae) with different principal pollinators. *Plant Biol (Stuttg).* 2014: 1075–1086.
62. **Waller GD.** Evaluating Responses of Honey Bees to Sugar Solutions Using an Artificial-Flower Feeder. *Annals of the Entomological Society of America.* 1972; 65: 857–862.
63. **Herrera CM, Vega C de, Canto A, Pozo MI.** Yeasts in floral nectar: a quantitative survey. *Annals of Botany.* 2009; 103: 1415–1423.
64. **Baker HG, Baker I.** Intraspecific constancy of floral nectar amino acid complements. *Botanical Gazette.* 1977: 183–191.
65. **Gardener MC, Gillman MP.** The taste of nectar - a neglected area of pollination ecology. *Oikos.* 2002; 98: 552–557.
66. **Hocking PJ.** The composition of phloem exudate and xylem sap from tree tobacco (*Nicotiana glauca* Grah.). *Annals of Botany.* 1980; 45: 633–643.
67. **Bertazzini M, Medrzycki P, Bortolotti L, Maistrello L, Forlani G.** Amino acid content and nectar choice by forager honeybees (*Apis mellifera* L.). *Amino Acids.* 2010; 39: 315–318.
68. **Krüger K, Prinzinger R, Schuchmann K.** Torpor and metabolism in hummingbirds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology.* 1982; 73: 679–689.
69. **Prinzinger R, Lübben I, Schuchmann K.** Energy metabolism and body temperature in 13 sunbird species (Nectariniidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology.* 1989; 92: 393–402.
70. **Haydak MH.** Honey bee nutrition. *Annual review of Entomology.* 1970; 15: 143–156.
71. **Riens B, Lohaus G, Winter H, Heldt H.** Production and diurnal utilization of assimilates in leaves of spinach (*Spinacia oleracea* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta.* 1994; 192.
72. **Lohaus G, Hussmann M, Pennewiss K, Schneider H, Zhu JJ, Sattelmacher B.** Solute balance of a maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching. *Journal of Experimental Botany.* 2000; 51: 1721–1732.
73. **Calder III WA, Hiebert SM.** Nectar feeding, diuresis, and electrolyte replacement of hummingbirds. *Physiological Zoology.* 1983: 325–334.
74. **Hiebert SM, Calder WA.** Sodium, potassium, and chloride in floral nectars: energy-free contributions to refractive index and salt balance. *Ecology.* 1983; 64: 399–402.

- 75. Martínez del Rio C.** Dietary, Phylogenetic, and Ecological Correlates of Intestinal Sucrase and Maltase Activity in Birds. *Physiological Zoology*. 1990; 63: 987–1011.
- 76. Napier KR, McWhorter TJ, Nicolson SW, Fleming PA.** Sugar preferences of avian nectarivores are correlated with intestinal sucrase activity. *Physiological and Biochemical Zoology*. 2013; 86: 499–514.
- 77. Nicolson SW, Fleming PA.** Nectar as food for birds: the physiological consequences of drinking dilute sugar solutions. *Plant Systematics and Evolution*. 2003; 238: 139-153.
- 78. Petanidou T, Goethals V, Smets E.** Nectary structure of Labiatae in relation to their nectar secretion and characteristics in a Mediterranean shrub community - Does flowering time matter. *Plant Systematics and Evolution*. 2000; 225: 103–118.

## Supporting information

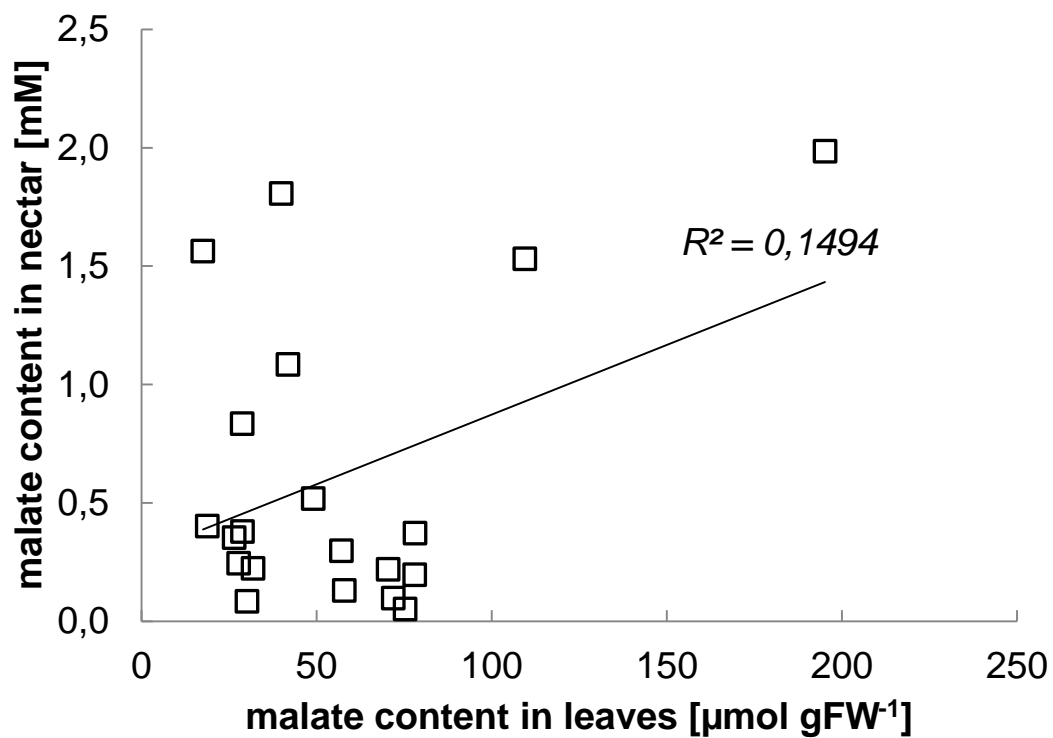


**Fig S1: Total sugar contents in leaves [mmol gFW<sup>-1</sup>] and in nectar [mM] of the same *Nicotiana* species.** Neither does a noteworthy correlation exist between the total concentrations in nectar and leaves ( $R^2 = 0.02$ ,  $p = 0.108$ ) nor between the percentages of the main sugars in leaves and in nectar, e.g. glucose ( $R^2 = 0.005$ ,  $p = 0.020$ ), fructose ( $R^2 = 0.001$ ,  $p = 0.130$ ), and sucrose ( $R^2 = 0.073$ ,  $p < 0.001$ ).

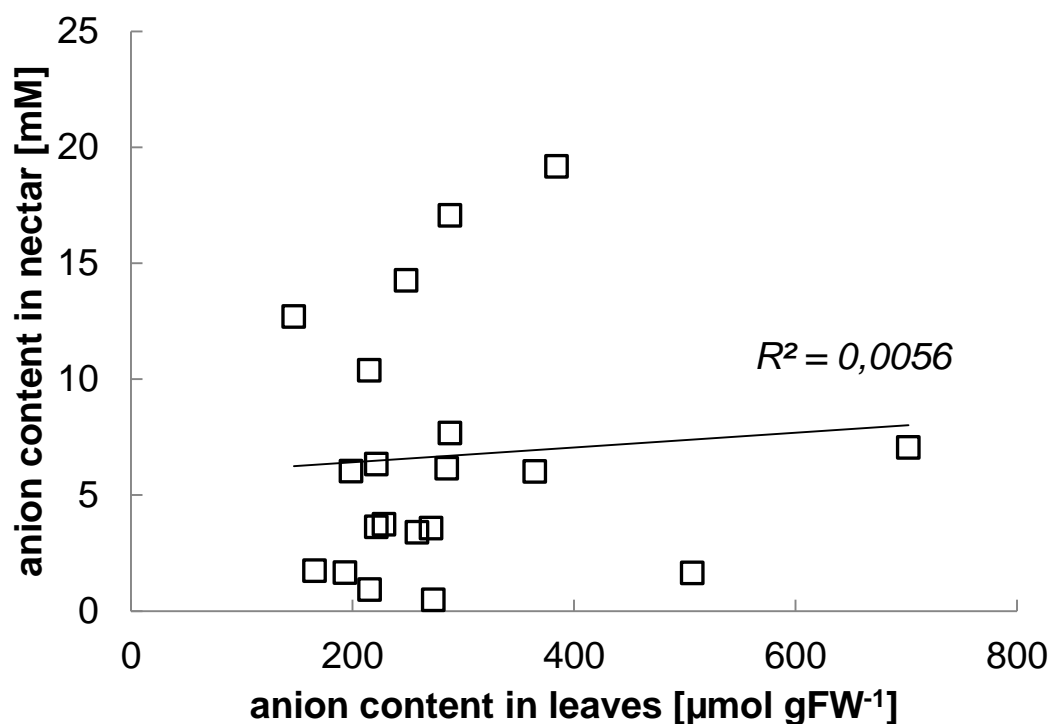


**Fig S2: Total amino acid contents in leaves [µmol gFW<sup>-1</sup>] and nectar [mM] of the same *Nicotiana* species.** Neither does a noteworthy correlation exist between the total concentrations in nectar and leaves ( $R^2 = 0.035$ ,  $p < 0.001$ ) nor between the percentages of single amino acids in leaves and nectar, e.g. glutamate ( $R^2 = 0.011$ ,  $p < 0.001$ ), glutamine ( $R^2 = 0.053$ ,  $p < 0.001$ ), aspartate ( $R^2 = 0.015$ ,  $p < 0.001$ ) and asparagine ( $R^2 = 0.075$ ,  $p = 0.211$ ).

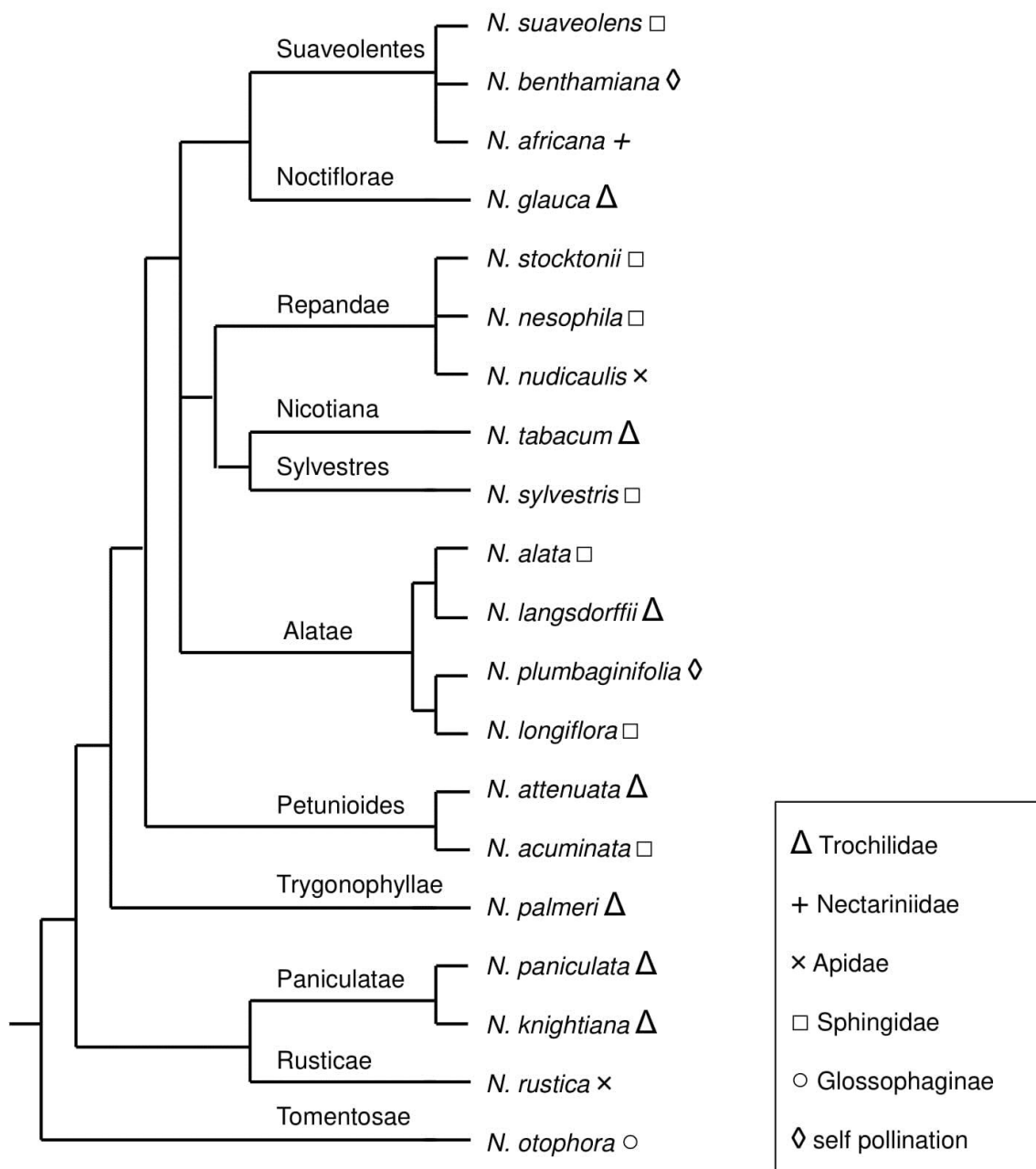




**Fig S3: Total concentration of malate in leaves [µmol gFW<sup>-1</sup>] and nectar [µmol L<sup>-1</sup>] of the same *Nicotiana* species.** There is almost no correlation between the total concentrations in nectar and leaves ( $R^2 = 0.149$ ,  $p = 0.001$ ).



**Fig S4: Total concentration of anions in leaves [mmol gFW<sup>-1</sup>] and nectar [mM] of the same *Nicotiana* species.** Neither does a noteworthy correlation exist between the total concentrations in nectar and leaves ( $R^2 = 0.006$ ,  $p < 0.001$ ) nor between the percentages of single anions in leaves and nectar, e.g. chloride ( $R^2 = 0.221$ ,  $p = 0.010$ ), nitrate ( $R^2 = 0.208$ ,  $p = 0.023$ ), phosphate ( $R^2 = -0.170$ ,  $p < 0.001$ ) and sulfate ( $R^2 = 0.040$ ,  $p = 0.003$ ).



**Fig S5: Simplified phylogenetic tree of all examined *Nicotiana* species and their main pollinators** The symbols visualize the independence of pollinators from the sectional grouping (Goodspeed 1954, Knapp *et al.* 2004).

### 3.3. Abschnitt III: Proteine in Nektar und Nektarien von *Nicotiana*

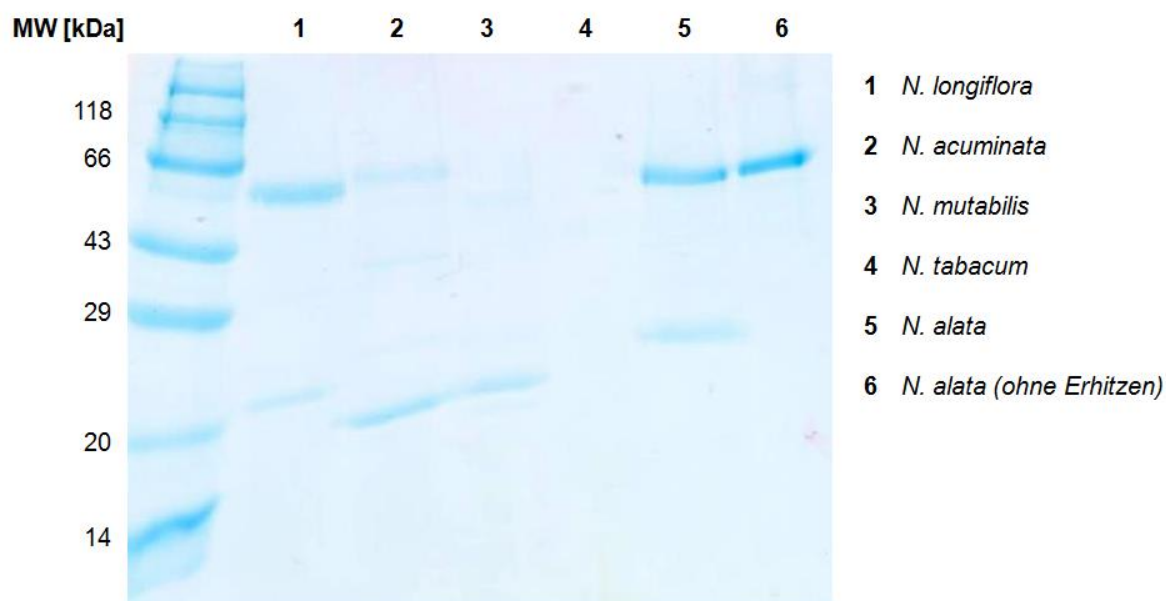
In floralem Nektar sind neben den immer vorhandenen Bestandteilen wie Zuckern und freien Aminosäuren nur kleinere Mengen an Proteinen vorhanden. Deshalb musste vor der eigentlichen SDS-PAGE eine Proteinfällung durchgeführt werden. Bei der SDS-PAGE werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend im Gel fixiert und angefärbt. Zur Anfärbung wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet: die Coomassiefärbung und die Silberfärbung. Die Sensitivität liegt bei Coomassie bei 0,3–1 µg (Wilson, 1983) und bei Silber bei 5–30 ng (Blum *et al.*, 1987) pro Proteinbande. Nachteile der Silberfärbung sind ihre höhere Umweltbelastung und dass eine weitere Analyse der angefärbten Proteine schwieriger ist. Das hier verwendete Protokoll ist allerdings auch mit massenspektrometrischen Analysen verträglich, deswegen wurden die Gele zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

#### *Ergebnisse der Coomassiefärbung:*

Nicht von allen Tabakarten konnte eine SDS-PAGE durchgeführt werden, da mindestens 10 µl Nektar pro Probe verwendet werden müssen und viele Arten weniger als 1 µl Nektar produzieren. Durch die Coomassiefärbung wurden bei vielen Proben Proteinbanden in unterschiedlicher Höhe sichtbar. Die aufgetrennten Proteine hatten eine Molekülmasse von ca. 20–70 kDa (Abbildung 3.2). Da die durchschnittliche molekulare Masse einer Aminosäure 0,11 kDa beträgt, lässt sich anhand der folgenden Formel aus der Molekülmasse die Länge des Proteins abschätzen:

$$\text{Größe des Proteins} = \text{Anzahl der Aminosäuren} \times 0,11 \text{ kDa}$$

Es handelt sich also um vergleichsweise kleine Proteine mit einer geschätzten Länge von 182 – 636 Aminosäuren, welche durch DNA-Sequenzen der Länge 546 – 1908 bp codiert werden. Bei *N. tabacum* konnten allerdings gar keine Proteine im Nektar gefunden werden. Durch das kurze Erhitzen der Proben mit dem Probenpuffer konnte eine höhere Sensitivität erreicht werden (Abbildung 3.2)



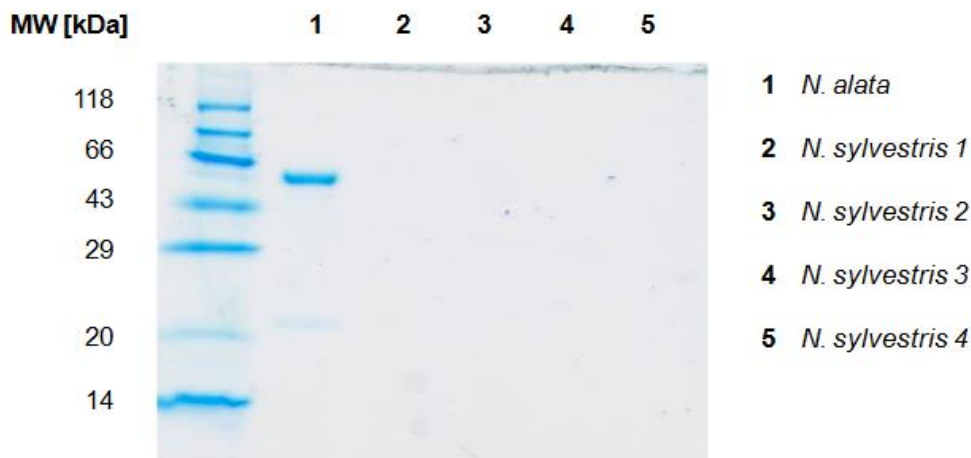
**Abbildung 3.2: Mit Coomassie angefärbte Proteine nach der SDS-PAGE**

Durch das kurze Erhitzen der Proben mit dem Probenpuffer konnten bessere Ergebnisse erzielt werden und teilweise waren sogar mehr Banden bei der gleichen Probe auf dem Gel zu sehen (vgl. 5 und 6).

Neben *N. tabacum* konnten auch bei *N. sylvestris* bei keiner Probe Proteine im Nektar nachgewiesen werden (Abbildung 3.3). Als Positivkontrolle wurde der Nektar von *N. alata* verwendet. Die Blüten von *N. sylvestris* enthielten ähnlich wie bei *N. tabacum* relativ große Mengen an Nektar, sodass durch das hohe Volumen die Konzentration an Proteinen eventuell geringer war und damit unter der Detektionsgrenze lag. Allerdings hatte *N. africana* von allen untersuchten Arten das größte Nektarvolumen und enthielt dennoch sehr viel Protein (Abbildung 3.4). Die Gesamtmenge an Protein kann mit Hilfe des Protein-Molekulargewichtsmarkers anhand der Bandenintensität ungefähr abgeschätzt werden (Tabelle 3.2). In *N. acuminata*, *N. mutabilis* und *N. longiflora* sind jeweils ca. 200 µg/ml Protein insgesamt im Nektar vorhanden, während die Konzentration bei *N. alata* über 200 µg/ml beträgt.

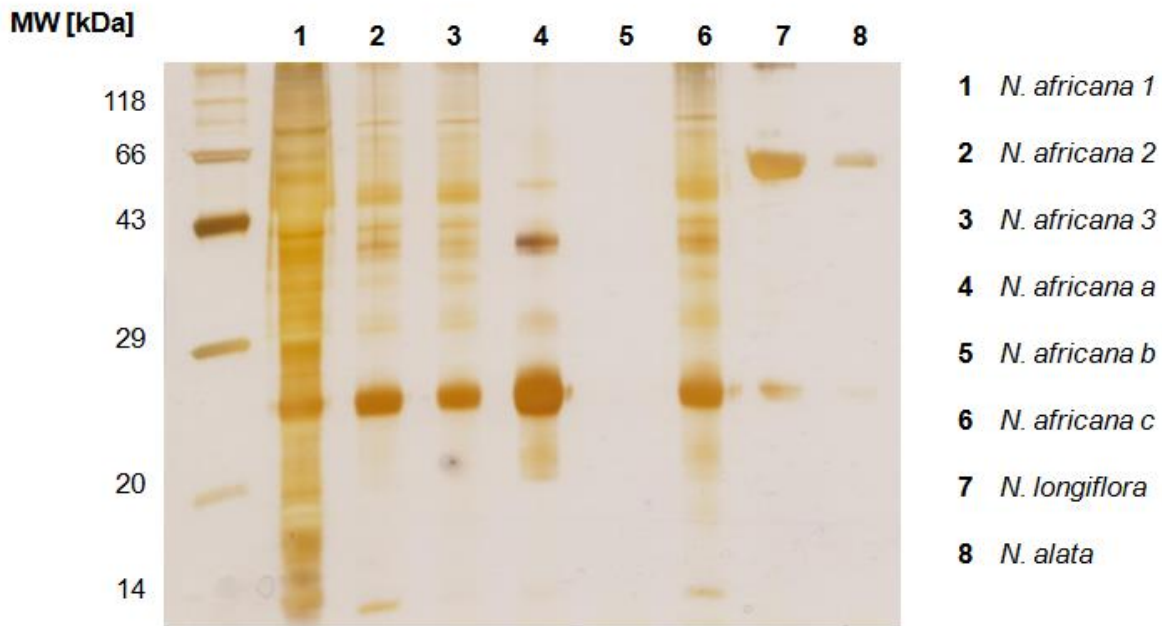
**Tabelle 3.2: Größe und Konzentration der Markerproteine**

Protein	MW (kDa)	Konzentration (mg/ml)
Myosin	212	0,2
$\beta$ -Galactosidase	118	0,2
Serumalbumin	66	0,2
Ovalbumin	43	0,25
Carboanhydrase	29	0,15
Trypsin Inhibitor	20	0,2
Lysozym	14	0,2

**Abbildung 3.3: Angefärbte Proteine aus *N. alata* und *N. sylvestris* nach der SDS-PAGE**

### Ergebnisse der Silberfärbung

Durch die Silberfärbung wurden deutlich mehr Banden pro Probe sichtbar. Während bei der Coomassiefärbung maximal 4 Banden (davon nur 2 deutlich) zu erkennen waren, traten bei der Silberfärbung bis zu 10 distinkte Banden pro Probe hervor. Ein Vergleich mehrerer Proben aus unterschiedlichen Blüten der gleichen Pflanze sowie unterschiedlicher Pflanzen der gleichen Art zeigte, dass diese Proben ein ähnliches Bandenmuster aufwiesen (Abbildung 3.4). Demnach scheint jede Art ein spezifisches Proteinprofil im Nektar zu entwickeln. Einige Banden waren bei unterschiedlichen Arten zu finden. So sieht man sowohl bei *N. alata* als auch bei *N. longiflora* eine deutliche Bande bei ca. 60 kDa (Abbildung 3.2 und Abbildung 3.4). Bei *N. africana*, *N. alata* und *N. longiflora* bei ca. 25 kDa (Abbildung 3.4). Bei *N. africana* fiel diese Bande besonders intensiv aus. Bei *N. acuminata* und *N. mutabilis* gibt es eine gemeinsame Bande bei ca. 20 kDa (Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.4: Mit Silber angefärbte Proteine nach der SDS-PAGE**

[1-3] Nektar aus verschiedenen Pflanzen der Art *N. africana*; [4-6] Nektar aus verschiedenen Blüten einer Pflanze der Art *N. africana*, [5] ist leer wegen eines Fehlers bei der Proteinfällung [7] Nektar aus *N. longiflora* [8] Nektar aus *N. alata*

Für Ziertabak (*Nicotiana langsdorffii* X *N. sanderae*) wurden bereits einige Proteine im Nektar beschrieben und anhand ihrer molekularen Masse aufsteigend als Nectarin I (*NEC1*) bis Nectarin V (*NEC5*) benannt. Nectarin I (*NEC1*) hat eine Größe von 29 kDa (Carter und Thornburg, 2004a) und kommt im Nektar von Ziertabak in Konzentrationen von bis zu 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$  vor (Carter *et al.*, 1999). Nectarin II (*NEC2*) hat eine Größe von 35 kDa und Nectarin III (*NEC3*) ist 40 kDa groß (Carter und Thornburg, 2004a). Die Banden von Nectarin IV (*NEC4*) und Nectarin V (*NEC5*) sind auf dem Gel kaum voneinander zu trennen. Auf einer Höhe von 61 bis 65 kDa ist eine breite Bande zu erkennen, die bei genauer Analyse ergab, dass es sich um zwei Isoformen von *NEC4* und drei Isoformen von *NEC5* handelt, welche alle eine ähnliche Größe besitzen (Carter und Thornburg, 2004c). Demnach könnte es sich bei der gemeinsamen Bande von *N. africana*, *N. alata* und *N. longiflora* bei ca. 25 kDa um *NEC1* und der gemeinsamen Bande von *N. alata* und *N. longiflora* bei ca. 60 kDa um *NEC4* oder *NEC5* handeln. Diese Nektarproteine spielen größtenteils eine Rolle im Nektar Redox Cycle bei der Produktion von Wasserstoffperoxid zur Pathogenabwehr (Carter *et al.*, 1999; Carter und Thornburg, 2004a, 2004b; Naqvi *et al.*, 2005).

In einer neueren Studie an mehreren Arten aus verschiedenen Gattungen der Familie Solanaceae wurde gezeigt, dass die Arten innerhalb der Gattung *Nicotiana* die höchste Anzahl an Identities (Gleichheiten) in ihrem Muster an Proteinbanden aufwiesen und sich deutlich von anderen Arten aus der gleichen Familie unterschieden (Kerchner *et al.*, 2015). Außerdem wurden in dieser Studie alle Proteine, welche im Nektar mittels SDS-PAGE sichtbar wurden, der Gruppe der Nectarins zugeschrieben (Kerchner *et al.*, 2015).

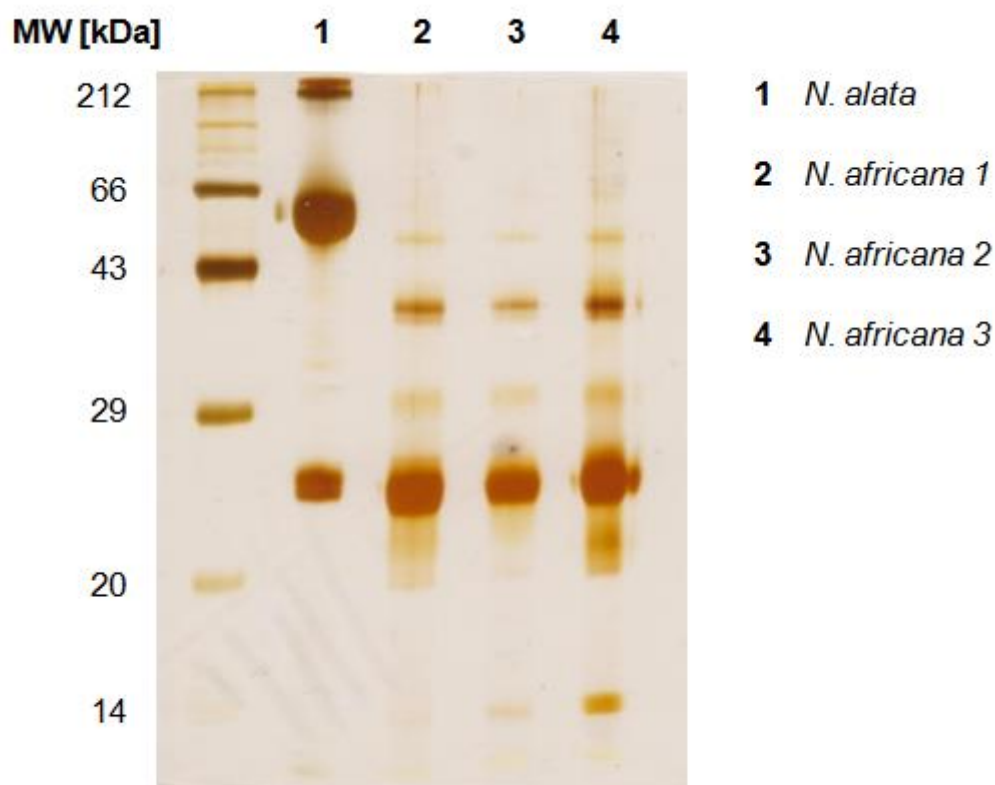


Abbildung 3.5: Vergleich der mit Silber angefärbten Proteine innerhalb einer Art



Es wurde der Gesamtproteingehalt der Nektarien bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry *et al.* (1951) und beruht auf einer Farbreaktion der Peptidbindungen mit anschließender photometrischer Messung. Dabei wurden Werte von  $4 \pm 0.12$  mg/g FW bis zu  $36 \pm 6,5$  mg/g FW in den Nektarien gemessen. Die Proteingehalte unterschieden sich dabei eher nach Art und weniger nach Sammelzeitpunkten der Proben. Zum Vergleich wurden auch Proteingehalte in den Blättern der Pflanzen gemessen. Diese lagen zwischen  $1 \pm 0,2$  mg/g FW und  $3,5 \pm 0,9$  mg/g FW.

**Tabelle 3.3: Proteingehalte in Nektarien und Blättern**

Protein [mg/g FW]	<i>N. africana</i>	<i>N. attenuata</i>	<i>N. benthamiana</i>	<i>N. sylvestris</i>	<i>N. tabacum</i>
<b>Nektarien</b>					
2 p.m.	$3.9 \pm 0.2$	$30.1 \pm 2.6$	$34.4 \pm 1.9$	$13.1 \pm 2.4$	$9.7 \pm 0.7$
8 p.m.	$4.1 \pm 0.1$	$11.1 \pm 1.2$	$37 \pm 6.5$	$8 \pm 2$	$6.2 \pm 0.6$
2 a.m.	$4.1 \pm 0.1$	$3.8 \pm 0.1$	$2.7 \pm 0.2$	$1.8 \pm 0.2$	$1 \pm 0$
8 a.m.	$4.1 \pm 0.1$	$12.4 \pm 0.3$	$24.7 \pm 1.8$	$8.4 \pm 1.2$	$7.4 \pm 0.3$
<b>Blätter</b>					
2 p.m.	$1 \pm 0.2$	$2 \pm 0.1$	$2.7 \pm 0.1$	$2.2 \pm 0.1$	$1.8 \pm 0.2$
8 p.m.	$2 \pm 0.4$	$1.9 \pm 0.4$	$3.5 \pm 0.9$	$2 \pm 0.2$	$2.6 \pm 0.9$
2 a.m.	$1.1 \pm 0.5$	$2.2 \pm 0.3$	$3.2 \pm 1.1$	$1.6 \pm 0.1$	$1.9 \pm 0.8$
8 a.m.	$1.3 \pm 0$	$1.2 \pm 0.1$	$3.3 \pm 0.9$	$1.9 \pm 0.1$	$1.4 \pm 0.6$

### **3.4. Abschnitt IV: Regulation der Zuckerzusammensetzung in Nektar und Nektarien bei *Nicotiana***

In diesem Abschnitt werden die möglichen Mechanismen hinter der Regulation des Zuckerprofils des Nektars beleuchtet.

Die Ergebnisse sind in dem Manuskript „Nectar Sugar Modulation and Cell Wall Invertases in Nectaries of Tobacco Plants (*Nicotiana*)“ dargestellt und am 06.02.2018 zur Veröffentlichung bei Frontiers in Plant Science eingereicht.

## **Nectar Sugar Modulation and Cell Wall Invertases in the Nectaries of Day- and Night- Flowering *Nicotiana***

Authors: Kira Tiedge<sup>1</sup>, Gertrud Lohaus<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Molecular Plant Science/ Plant Biochemistry, University of Wuppertal, Wuppertal, Germany

Running title (5 words): CWINV in Tobacco Nectaries

\* Correspondence:

Prof. Dr. Gertrud Lohaus

lohaus@uni-wuppertal.de

Number of words: 8256

Number of figures: 8

## Abstract

Nectar composition varies between species, depending on flowering time and pollinator type, among others. Various models of the biochemical and molecular mechanisms underlying nectar production and secretion have been proposed. To gain insights into these mechanisms, day- and night-flowering tobacco (*Nicotiana*) species with high or low proportions of hexoses in the nectar were analyzed. Nectar and nectaries were simultaneously collected, throughout the day and night. Soluble sugars and starch were determined and the activity and expression level of cell wall invertase (CW-INV) were measured in nectaries.

Nectaries and nectar of the five *Nicotiana* species contained different amounts of sucrose, glucose, and fructose. CW-INV activity was detected in the nectaries of all *Nicotiana* species and is probably involved in the hydrolysis of sucrose in the nectary tissue and during nectar secretion. The larger differences in the sucrose-to-hexose-ratio between nectaries and nectar in diurnal species compared to nocturnal species can be explained by higher sucrose cleavage within the nectaries in night-flowering species, and during secretion in day-flowering species. However, cell wall invertase alone cannot be responsible for the differences in sugar concentrations.

Within the nectaries of the *Nicotiana* species, a portion of the sugars is transiently stored as starch. In general, night-flowering species showed higher starch contents in the nectaries compared to day-flowering species. Moreover, in night flowering species, the starch content decreased during the first half of the dark period, when nectar production peaks. The sucrose concentrations in the cytoplasm of nectarial cells were extrapolated from nectary sucrose contents. In day-flowering species, the sucrose concentration in the nectary cytoplasm was about twice as high as in nectar, whereas in night-flowering species the situation was the opposite, which implies different secretion mechanisms. The secreted nectar sugars remained stable for the complete flower opening period, which indicates that post-secretory modification is unlikely. On the basis of these results, we present an adapted model of the mechanisms underlying the secretion of nectar sugars in day- and night-flowering *Nicotiana*.

**Keywords (5-8):** Floral nectar; nectaries; cell wall invertase; tobacco; *Nicotiana*; sugar composition; diurnal/nocturnal;

## Introduction

Nectar is a sugar-rich solution which is produced by most angiosperm plants to fulfil extensive functions, e.g., the attraction of pollinators and protection against herbivores (Brandenburg *et al.*, 2009; González-Teuber und Heil, 2009; Adler *et al.*, 2012). Nectar is produced by and secreted from nectaries, which are highly specialized glands, and the surrounding tissue. In *Nicotiana*, all floral nectaries are located at the basal side of the gynoecium (Bernardello, 2007) and during nectary development,  $\beta$ -carotene is expressed, which results in an orange colouring (Horner *et al.*, 2007). The synthesis and secretion of floral nectar has been the subject of several studies, and different models on the biochemical and molecular mechanisms underlying nectar secretion have been proposed (Ge *et al.*, 2000; Horner *et al.*, 2007; Kram *et al.*, 2009; Mosti *et al.*, 2013; Stpiczyńska *et al.*, 2014). But due to the enormous diversity of flowering plants, there are still several variables that warrant further study (Roy *et al.*, 2017). A very basic theory of nectar secretion proposes an apoplastic movement of metabolites from the phloem to the nectary surface (Vassilyev, 2010). However, the metabolite composition differs between the phloem sap and the nectar (Lohaus und Schwerdtfeger, 2014), which does not support the proposed apoplastic method of nectar secretion. Other hypotheses propose that various enzymes and transport proteins are involved in nectar production. For certain plant species, an eccrine secretion mode has been proposed, wherein sucrose is delivered from the phloem to the nectary parenchyma cells, and there the sucrose is transiently converted to starch or exported to the apoplast directly. A plasma membrane-localized sucrose transporter SWEET9 is essential for this transport (Lin *et al.*, 2014). SWEET9 functions as a facilitated diffusion transporter for sucrose, and mutants lacking SWEET9 do not produce nectar, e.g., in *Nicotiana attenuata* (Lin *et al.*, 2014). Once sucrose is exported from the nectary, it is then hydrolysed by an extracellular cell wall invertase into glucose and fructose (Ruhlmann *et al.*, 2010). In a third proposed secretory mechanism, nectar metabolites are transported symplastically to the outer nectary cells and then packed into vesicles, which are produced by the endoplasmic reticulum (ER) or the Golgi complex, to fuse with the plasma membrane and release the nectar metabolites to the nectary surface (Fahn, 1979b; Fahn, 1979a). These three models for nectar secretion are not necessarily mutually exclusive, and other modes of nectar secretion can occur in different plant species.

In some plant species, starch accumulates in the nectaries and peaks approximately 24 h before anthesis and then declines rapidly, which is the basis for the hypothesis that starch is one source of sugars for nectar production before and during nectar secretion (Nepi *et al.*, 1996; Ren *et al.*, 2007a; Ren *et al.*, 2007b; Horner *et al.*, 2007). Genes encoding anabolic enzymes involved in starch synthesis were found to be more highly expressed at the early

stages of nectary development, and genes encoding catabolic enzymes were expressed at later stages (Ren *et al.*, 2007a). However, studies on lychee (*Litchi chinensis*) floral nectaries have shown that the nectar sugar is composed of both phloem sap and products of starch degradation in the nectaries (Ning *et al.*, 2017).

Of the sugars found in nectar, the most prevalent are sucrose and the hexoses glucose and fructose (Percival, 1961; Baker und Baker, 1983; Tiedge und Lohaus, 2017). Given that hexoses are typically not components of the phloem sap (Lohaus und Schwerdtfeger, 2014), the proportion of hexoses in nectar depends on the presence and activity of sucrose-cleaving enzymes. Sucrose cleavage in plants can be catalyzed by at least two types of enzymes: reversible sucrose cleavage is catalysed by sucrose synthase (SuS; EC 2.4.1.13), a glycosyltransferase; and irreversible sucrose cleavage is catalysed by invertases, which catalyse hydrolysis ( $\beta$ -fructofuranosidases; EC 3.2.1.26). Invertases exist in numerous isoforms with various subcellular localizations and biochemical properties (Roitsch und González, 2004). These enzymes can be classified into three groups: vacuolar invertases (V-INVs), extracellular invertases (CW-INVs), and neutral invertases (N-INVs). Whereas N-INVs have an alkaline pH-optimum, V-INVs and CW-INVs are so-called “acidic invertases” because they work most efficiently between pH 4.5 and 5.0. Extracellular invertases are non-soluble proteins that are ionically bound to the cell wall (Sturm, 1999). A separate gene encodes for each of the isoforms, which have a high identity and share common features, e.g. the pentapeptide NDPNG ( $\beta$ F-motif) close to the N-terminus of the mature protein, and WECXDF, an amino acid sequence closer to the C-terminus (Sturm und Chrispeels, 1990; Roitsch und González, 2004).

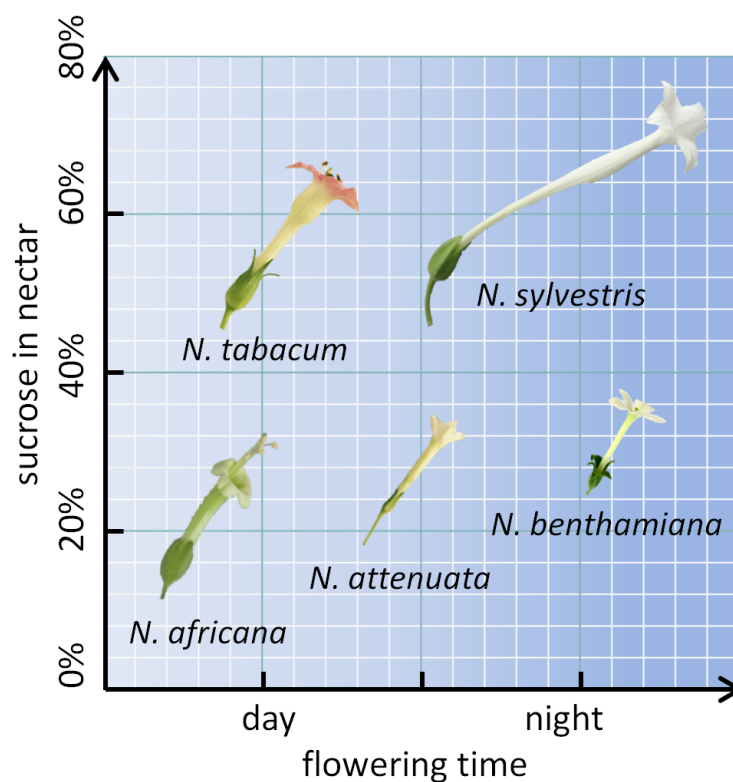
For some plant species, e.g. carrot (*Daucus carota*) and tomato (*Solanum lycopersicum*), different organ- and development-stage-specific expression patterns of acid invertase were shown (Sturm *et al.*, 1995; Godt und Roitsch, 1997). Usually, invertase expression is increased in rapidly-growing tissues with a high demand for hexoses (Weschke *et al.*, 2003). Interestingly, for both carrot and tomato, the mRNA expression of an acidic invertase was found to be specific to flowers and flower buds (Lorenz *et al.*, 1995; Godt und Roitsch, 1997). It was assumed that this flower-specific extracellular invertase is essential for male and female organ development, e.g., to supply the anthers with carbohydrates (Dorion *et al.*, 1996; Godt und Roitsch, 1997). More recently, it was shown that cell wall invertase is also crucial for nectar secretion in *Arabidopsis* (Ruhlmann *et al.*, 2010). AtCWINV4 expression was found to be highly up regulated in nectaries of *A. thaliana* compared to other tissues (Kram *et al.*, 2009). Furthermore, two independent *cwinv4*-mutant lines with greatly diminished activity of total cell wall invertase in whole *Arabidopsis* flowers secreted no

nectar, although the nectary ultrastructure appeared to be similar to that of wild-type plants (Ruhlmann *et al.*, 2010).

The genus *Nicotiana* is highly diverse in terms of flower morphology and pollination mode. In a study involving 20 *Nicotiana* species, the sugar concentration in the nectar of several day- and night flowering species was measured (Tiedge und Lohaus, 2017). The genus *Nicotiana* contains species with sucrose-rich nectars as well as hexose-rich nectars, and the exact nectar composition depends on the pollinator type, flowering time, corolla length and other environmental factors (Tiedge und Lohaus, 2017). The sucrose-to-hexose ratio ranged from 0.1 to 2.0 and was fairly consistent within a given species.

This finding raises the question of whether the sugar composition in nectar is a result of the sugar composition in the nectaries. Alternatively, a lower sucrose content in nectar could reflect higher invertase activity in the nectaries and during nectar secretion. Furthermore, we aimed to investigate potential differences in invertase expression and activity over the course of a day, in consideration of flower opening and nectar production times. In addition to these pre-secretory and secretory processes, post-secretory processes could also be responsible for varying sugar composition. In such a scenario, the nectar itself must contain sugar cleaving enzymes.

To further investigate the mechanism underlying nectar production and secretion, five tobacco species with varying properties were examined. Two day-flowering species (*N. tabacum* and *N. africana*) as well as two night-flowering species (*N. sylvestris* and *N. benthamiana*) were included. Within each category (day- or night-flowering), one species had a high sucrose content and one species had a low sucrose content (Fig. 1).



**Figure 1: *Nicotiana* species arranged by flowering time and sucrose content. The flower sizes are depicted to relative scale.**

For reproduction, these species rely on pollination either by diurnal birds (*N. africana*: sunbirds; *N. tabacum*: hummingbirds), nocturnal moths (*N. sylvestris*), or otherwise the species is primarily autogamous (*N. benthamiana*) (Tiedge und Lohaus, 2017). Additionally, *N. attenuata* was chosen, which opens its flowers at twilight both in the evening and in the morning and is therefore less dependent on a specific pollinator (Kessler und Baldwin, 2007). To investigate whether the nectar sugar content primarily depends on pre-secretory processes, the secretion process, or post-secretional modification, nectar sugars were compared to nectary sugars at multiple time points per day; additionally, the invertase activity and expression were measured, and post-secretional activity was recorded.



## Materials and Methods

### *Plant material*

*N. attenuata* seeds were provided by the Max Planck Institute for Chemical Ecology (Jena, Germany), *N. benthamiana* seeds were provided by the University of Rostock (Germany), *N. africana* and *N. sylvestris* seeds were provided by the Botanical Garden of the University of Bochum (Germany), and *N. tabacum* seeds were provided by NiCoTa (Rheinstetten, Germany). Each plant was potted in a single 5-L pot with compost soil and grown in a greenhouse at the University of Wuppertal. Cultivation was carried out with a 14-h-light/10-h-dark cycle, an irradiance of approximately  $300 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and a temperature regime of 25 °C day/18 °C night.

### *Collection of nectaries and nectar*

Each sample (~100 mg) of nectary tissue comprised 20 to 50 nectaries, depending on the species. At each time point (2 p.m., 8 p.m., 2 a.m., 8 a.m.), three samples were taken. To collect the nectaries, the gynoecia were extracted from the flowers, and the nectary tissue was dissected with a scalpel and rinsed with ultrapure water to remove external sugars. All samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until further analysis. The weight of a single nectary was calculated as follows:

$$\text{Weight per floral nectary [mg]} = 100 \text{ mg} / \text{number of nectaries collected per sample}$$

For each species, at least three nectar samples were taken from three plants at all four time points. The nectar samples were collected with micropipettes and stored at -80 °C until further analysis. The nectar samples used for post-secretional experiments were left at room temperature for 12 h, 24 h and 48 h. The water content of the nectaries and leaves was determined by drying and weighing those tissues. The following calculation was used:

$$\text{Water content} = 1 - (\text{dry weight [mg]} / \text{fresh weight [mg]})$$

### *Analysis of sugars and starch in nectaries and nectar*

For the extraction of soluble metabolites from nectary tissue, a chloroform-methanol-water extraction was performed (Nadwodnik und Lohaus, 2008). The analysis of sugars in nectar and nectaries via HPLC was conducted according to Lohaus and Schwerdtfeger (2014). An ion exchange column (Carbopac™ PA10 4x250mm; Dionex Corp, Sunnyvale, CA, USA)

was eluted isocratically with 80 mM NaOH (JT Baker Chemicals). Sugars were detected with a pulse amperometric detector with a gold electrode (ESA Model 5200, Coulochem II, Bedford MA, USA). The pulse setting was 50, 700 and -800 mV for 400, 540 and 540 ms, accordingly. For external calibration, sugar standards (Sigma-Aldrich, Germany) were measured in parallel. The evaluation of the chromatograms was performed with an integration program (Peaknet version 5.1, Dionex). Starch content of nectaries was determined according to a modified protocol from Riens *et al.* (1994).

#### *Expression of CWINV*

RNA from approximately 50 mg of nectariferous tissue was isolated using a modified protocol from Logemann *et al.* (1987). Synthesis of cDNA was performed using the RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Germany) with oligo(dT)<sub>18</sub> primers. Degenerated primers were designed to amplify cell wall invertase sequences of the different *Nicotiana* species. The obtained sequences were cloned with the pGEM®-T Easy Vector System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) for sequencing, and suitable specific primers for quantitative real-time polymerase-chain-reaction (qRT-PCR) were selected. For verification of the obtained primers and sequences, amplification with proof read polymerase (Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase, Thermo Scientific, MA, USA) and blasting with known sequences from NCBI (National Center for Biotechnology Information, MD, USA) was performed. QRT-PCR analyses were performed using a Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and a Mx3005P qPCR System (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany). Efficiencies of the PCRs were calculated with slopes of standard curves of 2-fold dilutions. For each species two stable reference genes were used for normalization (Vandesompele *et al.*, 2002; Schmidt und Delaney, 2010; Liu *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. For each condition three biological replicates with two technical replicates each were tested. A list of the primers used for each species can be found in the supplementaries (Supplementary Table 1).

#### *Enzyme Assay for CWINV*

Proteins were extracted from 25 mg nectary tissue each as described by Wright *et al.* (1998). Cell wall invertase activity was assayed according to Heineke *et al.* (1992). An aliquot of the protein extracts was added to 0.6 M sucrose and 0.125 M sodium acetate, pH 5.0. After 10 min, the reaction was completely stopped by boiling and subsequently, the amount of glucose released was determined by coupled optical enzyme assay. All enzyme assays were conducted from six biological replicates with two technical replicates each.

## Results

### *Sugar concentrations in nectar and nectaries during the light and dark period*

The sugar content in both nectar and nectaries was primarily composed of glucose, fructose and sucrose. Other sugars, including maltose, were not found in any of the samples. The total sugar concentration in nectar ranged from  $1042 \pm 86$  mM to  $3183 \pm 186$  mM, depending on the species and collection time (Fig. 2). The day-flowering species (*N. africana* and *N. tabacum*) had the highest nectar sugar concentration during the day, which decreased continuously at night. In the case of night-flowering tobacco (*N. benthamiana*, *N. sylvestris*), the lowest sugar concentration in nectar was also found in the first half of the night period, but the concentration increased during the second half of the night period. Day- and night-flowering *N. attenuata* behaved like *N. benthamiana* (Fig. 2).

By measuring the sugar content in the nectaries in micromole per gram fresh weight and the water content of the nectaries, it was also possible to determine the sugar concentration in the nectaries. The total sugar concentration in the nectaries of all species was lower than in the nectar, ranging from  $72 \pm 6$  mM to  $613 \pm 34$  mM (Fig. 2). The mean sugar concentration in the nectar was approximately 3-5-fold higher than in the nectaries of day flowering species, and approximately 8- to 10-fold higher in night flowering species and in *N. attenuata*. In the day-flowering plants, the highest sugar concentration in nectaries occurred either in the middle or at the end of the light period (2 p.m. or 8 p.m.). The same phenomenon applied to the mixed-type *N. attenuata*. In both night-flowering plants, the sugar concentration in nectaries increased sharply in the middle of the night at 2 a.m.

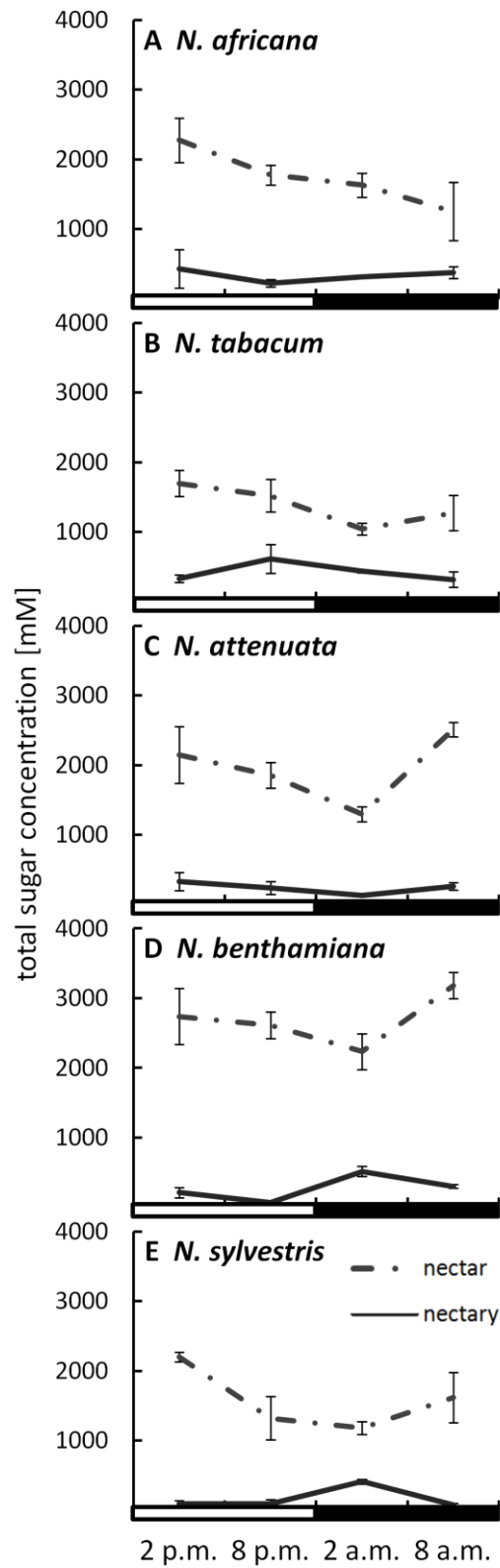
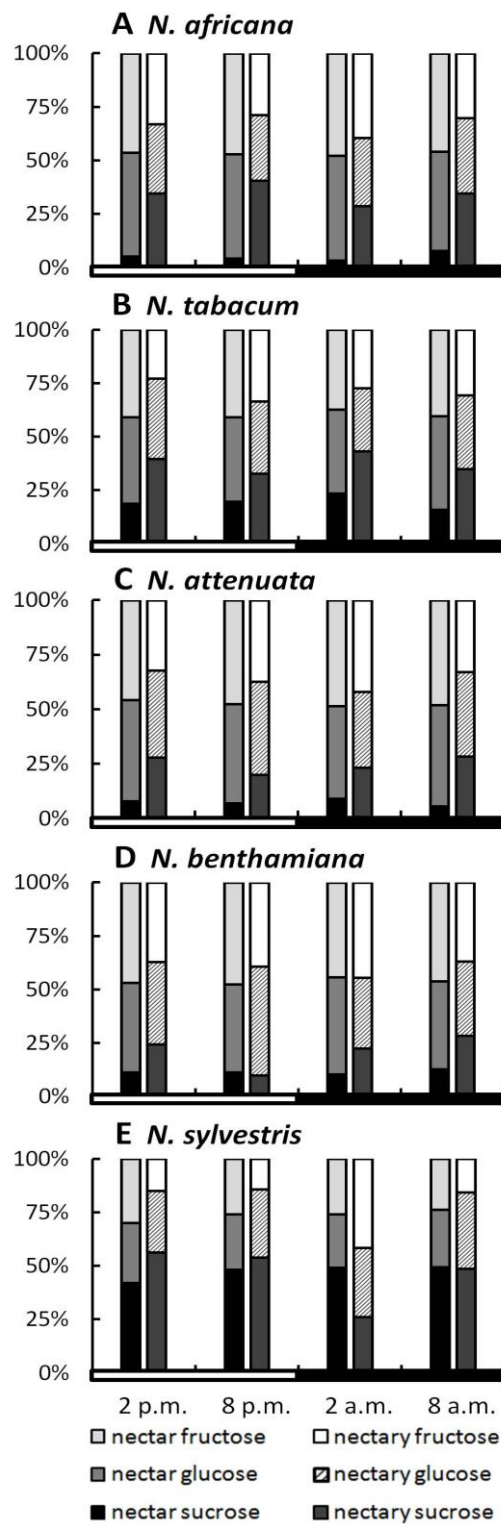


Figure 2: Sugar concentrations in nectaries and nectar. Mean values from all measurements taken at one time point ( $n = 3$ ) and the respective SDs were plotted; light and dark periods are indicated by white and black bars.

The leaves of these tobacco species also contained primarily sucrose, glucose and fructose. Independent of the flowering time, the sugar content in leaves was higher at the end of the light period than at the end of the dark period (Supplementary Fig. 1). When compared to nectaries or nectar, leaves had a significantly lower sugar concentration (10-60 mM). These results were derived from the sugar content per gram fresh weight and the corresponding water content (78% to 94%; data not shown).

#### *Sugar composition in nectar and nectaries during the light and dark period*

While the ratios of the three sugars within a species remained relatively constant, even during different collection times, the sugar ratio between species varied greatly in some cases (Fig. 3). This phenomenon was observed for both nectar and nectaries. In the nectar of *N. africana*, the percentage of sucrose ranged from 3-8%, depending on the time of day. Other species with a low sucrose-to-hexoses ratio in nectar were *N. attenuata* and *N. benthamiana*, for which the proportion of sucrose ranged from 6-9% and 10-13%, respectively. Higher proportions of sucrose were found in *N. tabacum* and *N. sylvestris* (16-23% and 42-49%). In general, glucose and fructose were found to occur in similar proportions within a species.



**Figure 3: Sugar percentages in nectaries and nectar.** All percentages were calculated from mM;  $n = 3$ ; light and dark periods are indicated by white and black bars; one pair of bars indicates one time point of sampling, with the left bar representing nectaries and the right bar representing nectar.

In nectaries, the distribution of sugars was also similar within a species during the light and dark period. In relation to nectar, the percentage of sucrose was higher in nectaries of all *Nicotiana* species, with the exception of *N. sylvestris* at 2 am. The percentage of sucrose was relatively low in *N. attenuata* and *N. benthamiana* (10-28%), medium in *N. africana* and *N. tabacum* (26-43%), and high in *N. sylvestris* (26-56%).

To assess whether a percentage increase of a given sugar in nectar was also reflected in the nectaries, the sugar content in both compartments was correlated. For glucose, no bivariate correlation was found (Pearson's  $r = 0.191$ ,  $p = 0.420$ ), whereas the percentage of both fructose and sucrose between the nectar and nectaries was correlated either highly significantly or significantly (fructose: Pearson's  $r = 0.574$ ,  $p = 0.008^{**}$ ; sucrose: Pearson's  $r = 0.481$ ,  $p = 0.032^*$ ).

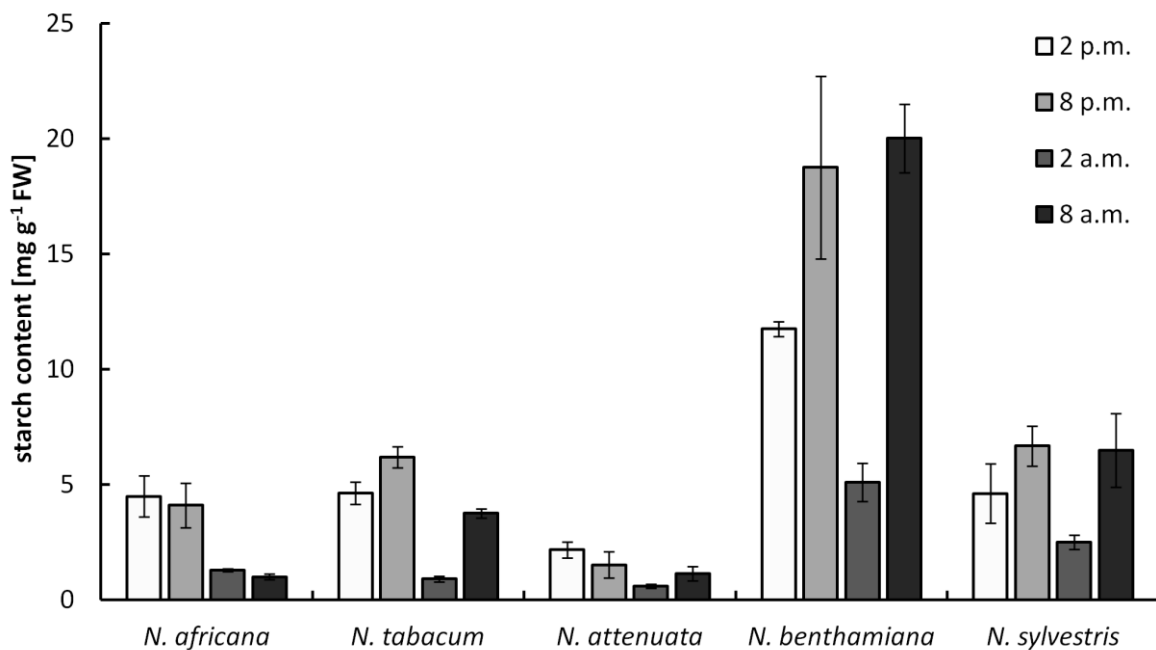
However, in all species, the mean sucrose-to-hexoses ratio was higher in nectaries compared with nectar (Table 1). In general, the difference between the sucrose-to-hexoses ratios in nectaries and nectar was higher in light flowering species ( $\Delta 0.37 - \Delta 0.48$ ) compared with night flowering species ( $\Delta 0.05 - \Delta 0.15$ ).

**Table 1: Nectary- and Nectar-sugar-ratios (calc. from mM) Data were derived from Fig. 2 and 3, the values of all measuring points were averaged.**

Species	Nectary-sugar-ratio [S/(G+F)]	Nectar-sugar-ratio [S/(G+F)]	Difference between the ratios
<i>N. africana</i>	0.54	0.05	0.48
<i>N. tabacum</i>	0.61	0.24	0.37
<i>N. attenuata</i>	0.33	0.08	0.25
<i>N. benthamiana</i>	0.28	0.13	0.15
<i>N. sylvestris</i>	0.94	0.89	0.05

### Starch content in nectaries

The starch content measured in nectaries ranged from  $0.9 \pm 0.1 \text{ mg g}^{-1} \text{ FW}$  up to  $20 \pm 1.5 \text{ mg g}^{-1} \text{ FW}$  (measured as glucose equivalent; Fig. 4). The lowest starch contents during the light and dark period were found in the day-flowering species, as well as in *N. attenuata*. Moreover, in these species, the starch content was lower during the dark period and higher during the light period. In the night-flowering *Nicotiana* species, the highest starch contents were found both in the morning and in the evening (Fig. 4). At 2 a.m., the night-flowering species showed the lowest starch levels; thus, at the same time, the night-flowering species presented the highest sugar concentration. Because starch in plants is synthesized from glucose, it has been tested whether there is a correlation between the glucose and starch content in the nectaries, but no significant correlation was found between glucose and starch content or between fructose or sucrose and starch content.



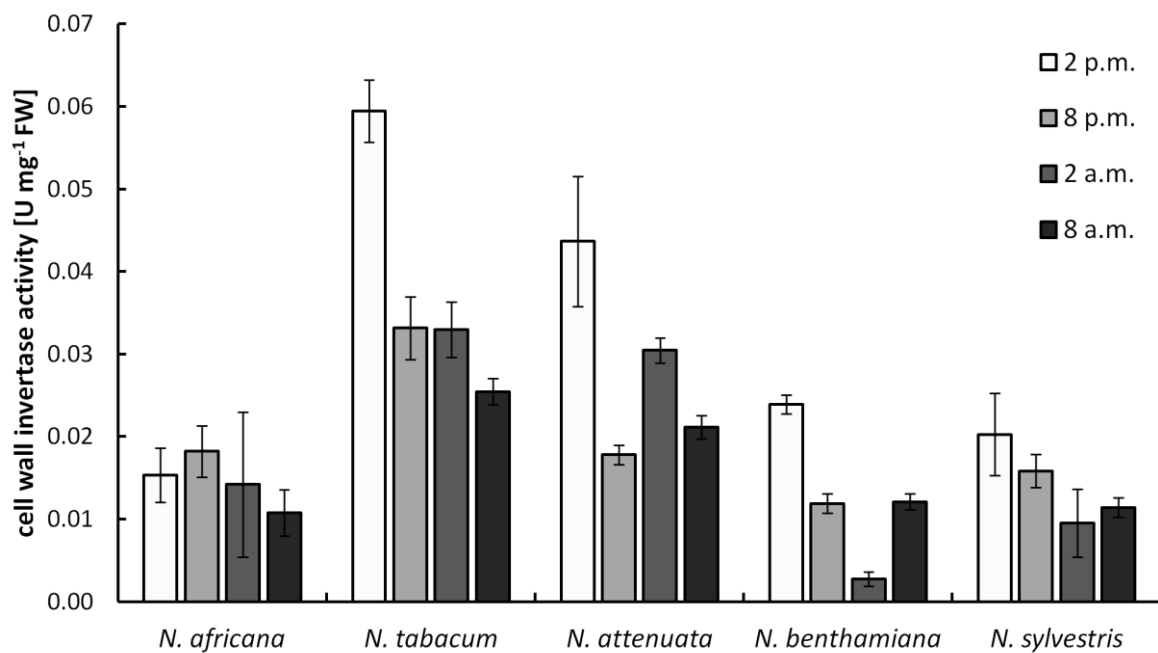
**Figure 4: Starch concentration in nectaries. Mean values from all measurements taken at one time point ( $n = 3$ ) and the respective SDs were plotted.**

Starch content in leaves ranged from  $0.5 \pm 0.1 \text{ mg g}^{-1} \text{ FW}$  to  $40 \pm 4.8 \text{ mg g}^{-1} \text{ FW}$  (measured as glucose equivalent; Supplementary Fig. 2). For all five species, the starch content in the leaves was higher at the end of the light period compared with the end of the dark period (Supplementary Fig. 2). The starch content of nectaries and leaves was not correlated.



*CWINV activity in nectaries*

Cell wall invertases in nectaries were active during the light as well as during the dark period. Measured activity ranged from  $0.003 \pm 0.001 \text{ U mg}^{-1} \text{ FW}$  to  $0.059 \pm 0.004 \text{ U mg}^{-1} \text{ FW}$  (Fig. 5). Except for *N. africana*, the highest activity levels in all species were found at the middle of the light period, and then the activity decreased, regardless of when the plant opens its flowers. The activity of cell wall invertase in nectaries did not correlate with any of the sugars in the nectar or the nectaries.

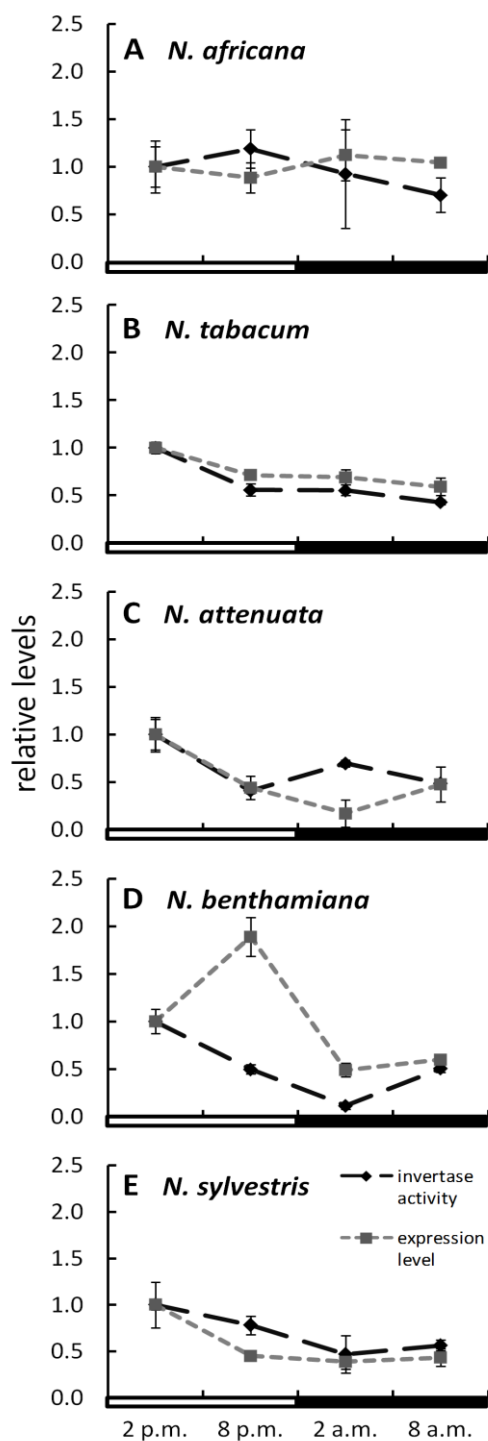


**Figure 5: Cell wall invertase activity in nectary tissue. Mean values from all measurements taken at one time point ( $n = 3$ ) and the respective SD were plotted.**

The cell wall invertase activity in the leaves ranged from  $0.003 \pm 0.001 \text{ U mg}^{-1} \text{ FW}$  to  $0.033 \pm 0.004 \text{ U mg}^{-1} \text{ FW}$  (Supplementary Fig. 3). Therefore, the activity levels were similar to those in the nectaries. Cell wall invertase activity in the leaves fluctuated only slightly between the light and dark periods.

*Expression levels of CWINV*

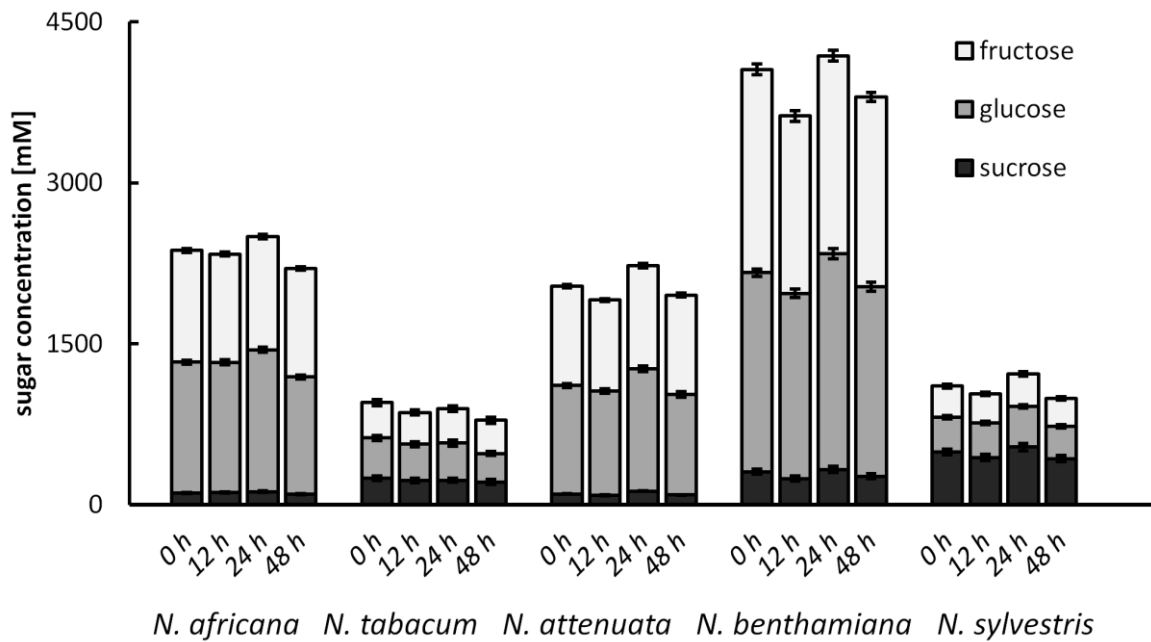
The expression level of cell wall invertases in the nectaries of the five *Nicotiana* species was also measured. Therefore, the expressed sequence tag (EST) of the cell wall invertase of each species was cloned. Specific primers were designed and used for quantitative RT-PCR. In the day-flowering and hexose-rich species, *N. africana*, the relative expression of cell wall invertase was very stable throughout the light and dark periods. In the other *Nicotiana* species, the expression level was slightly higher during the light period compared to the dark period, regardless of flowering time or the percentage of hexoses in the nectar (Fig. 6). In most *Nicotiana* species, the course of the expression level was consistent with the invertase activity, especially for *N. tabacum* and *N. sylvestris* (Fig. 6). A comparison of the invertase expression level with the nectary sugar concentration revealed a non-homogeneous pattern: In *N. attenuata*, nectary sugars correlated strongly but not significantly with expression level (glucose: Pearson's  $r = 0.913$ ,  $p = 0.458$ ; fructose: Pearson's  $r = 0.917$ ,  $p = 0.456$ ; sucrose: Pearson's  $r = 0.917$ ,  $p = 0.455$ ), whereas in *N. benthamiana*, this correlation was strongly negative (glucose: Pearson's  $r = -0.887$ ,  $p = 0.469$ ; fructose: Pearson's  $r = -0.822$ ,  $p = 0.497$ ; sucrose: Pearson's  $r = -0.963$ ,  $p = 0.437$ ). For the remaining species, the correlation was generally lower.



**Figure 6: Invertase activity in comparison to expression level in the nectaries of different *Nicotiana* species** Activity and expression levels are given relative to the calibrator (2 p.m.). Mean values from all measurements taken at one time point ( $n = 6$  for enzyme activity and  $n = 3$  for expression levels) and the respective SD were plotted; light and dark periods are indicated by white and black bars.

*Post-secretional nectar changes*

To test for changes of the nectar sugar composition after secretion, nectar of all species was measured immediately after sampling, as well as 12 hours, 24 hours and 48 hours later. The results showed that the sugar concentrations were not changed significantly during this period (Fig. 7). Minor fluctuations were likely caused by the high dilution factor (1 : 2000) used to measure nectar with the HPLC.



**Figure 7: Post-secretional changes in sugar content in the nectar** All samples were analyzed immediately after collection, as well as 12 h, 24 h, and 48 h after collection;  $n = 3$

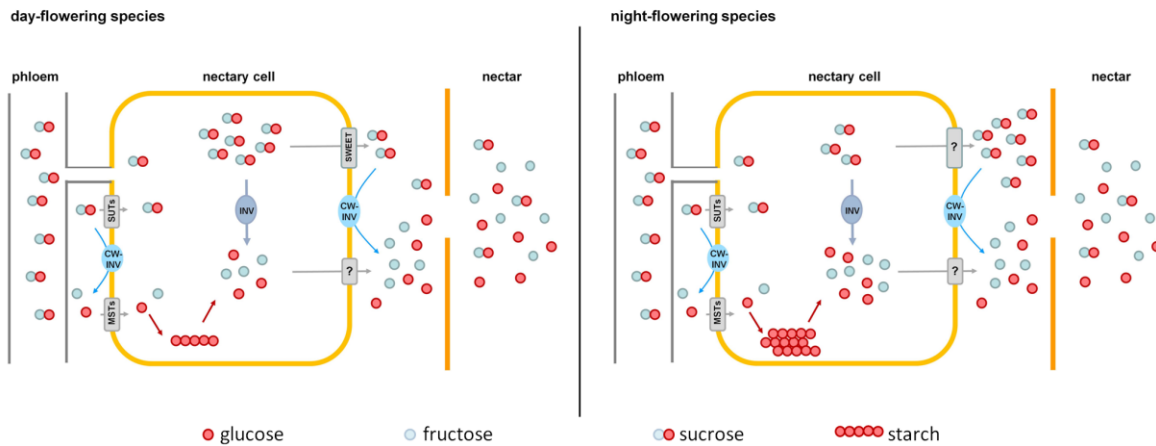
## Discussion

Floral nectar is synthesized and secreted by different types of floral nectaries. Nectar composition varies between species, possibly to reward different types of pollinators. Until now, the plant-specific differences in nectar production and nectar secretion that lead to different nectar composition have not been fully understood.

### *Pre-secretory modifications of nectar sugars*

The phloem supplies the nectaries with sucrose (Lohaus und Schwerdtfeger, 2014). In contrast to phloem sap, where no hexoses are found (Knop *et al.*, 2001; Nadwodnik und Lohaus, 2008), the nectar of the *Nicotiana* species contains substantial amounts of glucose and fructose, in addition to sucrose. Differences in the composition of nectar and phloem may be due to either metabolic processes in the nectaries during nectar secretion or post-secretory modification. To clarify this question, the sugar composition of the nectar and nectaries was compared.

In the case of night-flowering tobacco, the lowest sugar concentration in nectar was observed in the first half of the dark period (Fig. 2). This could be due to the fact that the nectar volume in these species is highest at this time (data not shown), and, therefore, the high water content ensures dilution. However, for day-flowering tobacco, the sugar concentration was also found to be lower during the dark period compared with the light period, even though the highest nectar volume is during the day, which contradicts the previous assumption. At night, phloem transport is reduced to approximately 40% of the daily rate (Riens *et al.*, 1994), which means that less sucrose should arrive to the nectaries in darkness, and this could also be a reason for the observed fluctuations in the nectar sugar concentration. Therefore, it is generally easier for day-flowering plants to supply their nectar with nutrients for their pollinators, because they can process their metabolites directly from the phloem sap; in contrast, night-flowering plants, at least partially, have to store the metabolites (Fig. 8). This finding corresponds to the differences in the starch content observed in the nectaries of day and night flowering species. In general, the night-flowering species had a higher starch content in the nectaries compared with the day-flowering species (Fig. 4). Moreover, in night flowering species, the starch content decreased during the first half of the dark period, the time with high nectar production.



**Figure 8: Model of nectar sugar secretion in day- and night-flowering tobacco.** Day-flowering species (on the left) store less starch in their nectaries and contain more sucrose in the cytoplasm, which could be exported by SWEET-proteins along the concentration gradient. Night-flowering species store more starch in their nectaries and sucrose probably cannot be exported by SWEETs, since the concentration of sucrose in the cytoplasm is lower than in the nectar. In night-flowering species, sucrose cleavage within the nectaries accounts for a higher proportion of the hexose provision than cleavage during secretion, which is the opposite in day-flowering species. MSTs = monosaccharide transporters; SUTs = sucrose transporters; CW-INV = cell wall invertases; INV = invertase; SWEETs = sucrose efflux transporters; ? = unknown processes

Starch accumulation may function as a form of sugar storage before anthesis (Weber *et al.*, 1998), and starch degradation has been observed to occur before flower opening to provide additional sugar (Nepi *et al.*, 1996; Horner *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2007b). In potato tubers (*Solanum tuberosum*), starch breakdown is triggered by decreased sucrose content (Hajirezaei *et al.*, 2003). In this study, no overall correlation between starch and sucrose or hexoses in nectaries was observed, but in the case of nocturnal species, where there is a severe decrease of starch in the middle of the night, the sugar concentration was found to be significantly increased. Apart from that, there was no correlation between the starch content of the nectaries and leaves, thus the starch metabolism in the nectaries appears to function independently from the light-dependent starch metabolism of the plant.

Total nectary sugar concentration is highest at the time of flower opening, so sugar is likely provided for nectar production (Fig. 2). There is a high correlation between the proportion of fructose and sucrose in nectaries and nectar. This suggests that the nectar sugar composition is already partly determined by the nectaries and is only partially adjusted during

secretion. For glucose, this correlation is much lower. This phenomenon may be explained by the fact that some of the glucose is converted into starch and stored in the nectaries until it is used (Ren *et al.*, 2007b).

#### *Modulation during nectar secretion*

The sugar concentration in nectar was 3- to 10- fold higher than in the whole nectarial cells. An increase in concentration due to evaporation can be neglected because the analysed species have very long and narrow flower tubes, which protect the nectar from evaporation (Plowright, 1987; Tiedge und Lohaus, 2017). This suggests that active sugar transport is involved in nectar secretion, perhaps through monosaccharide transporters (MSTs) and/or sucrose transporters (SUTs). A monosaccharide/proton symporter (AtSTP1), which only transports glucose but not fructose, has been found in *Arabidopsis* flowers (Sherson *et al.*, 2003). SUTs have already been found in tobacco, as well, e.g., NtSUT3 in tobacco pollen (Lemoine *et al.*, 1999), but, so far, their occurrence and function in flowers and nectaries is not completely understood.

A class of transporters that are clearly involved in nectar secretion are so-called SWEET sucrose transporters. In *Arabidopsis* and *Nicotiana*, SWEET9 functions as a facilitated diffusion transporter for sucrose (Lin *et al.*, 2014), and there is evidence that this transporter is more responsible for sucrose efflux from nectarial cells than for sucrose uptake. As previously mentioned, the sugar concentration in nectar relative to nectary cells was 3- to 5- fold higher in diurnal species and 8- to 10- fold higher in nocturnal species. Unfortunately, until now, nothing has been reported about the subcellular distribution of sugars in the parenchyma cells of nectaries. Assuming that the subcellular distribution of sucrose in nectarial cells is similar to the distribution in leaves (up to 50% sucrose in the cytosol; Nadwodnik und Lohaus, 2008) and the cytosolic compartment comprises about 20% of the nectarial cells (Wist und Davis, 2006; Gaffal *et al.*, 2007), the sucrose concentration in nectarial cells can be extrapolated (Fig. 2 and 3). In day-flowering species, the maximal sucrose concentration in the cytosol of nectarial cells was approximately 300-400 mM, and the corresponding concentration in nectar was approximately 100-300 mM. Similar results were obtained for *N. attenuata*. Therefore, it is possible that facilitated diffusion transporters for sucrose mediate sucrose efflux from nectarial cells (Fig. 8). In night-flowering species, the calculated concentration of sucrose in the cytosol of nectarial cells was approximately 200 mM, whereas the corresponding concentration in nectar was approximately 300-700 mM. In the latter case, facilitated diffusion of sucrose from the nectarial cells into the nectar is not possible. However, this does not exclude the possibility that different cell types in the nectaries contain different sugar concentrations and that facilitated diffusion of sugars occurs

only in certain nectarial cells, whereas in other cells active sugar secretion may occur. This finding is in line with findings in *Arabidopsis*, where SWEET9 was localized at the basal part of the nectaries (Lin *et al.*, 2014), and the conclusions drawn from other research in this area, which propose a division of nectary parenchyma into functional sub-domains (Roy *et al.*, 2017).

Besides sugar transporters, invertases also appear to be part of the nectar metabolism. For this work, the expression of the cell wall invertase was investigated exclusively in nectary tissue. Not much is known about the regulation of cell wall invertase expression in nectaries, but this enzyme has already been studied in other plant organs. Invertase expression is regulated by multiple factors, for example, by carbohydrates (Koch, 1996), phytohormones (Wu *et al.*, 1993), biotic and abiotic stress-related stimuli (Roitsch *et al.*, 2003), and proteinaceous inhibitors (Krausgrill *et al.*, 1996). So far, it has rarely been examined how nectar-related invertase expression in nectaries is regulated. The invertase found in *N. attenuata* is highly upregulated in parts of early corollas, such as nectaries, ovaries and anthers. When the flowering continues to ripen, the invertase expression decreases (NaDH; (Brockmüller *et al.*, 2017). Most nectar is produced during early flowering, while older flowers sometimes have no nectar at all. This fact also suggests that invertase plays a role in the production of nectar. For other *Nicotiana* species, no organ-specific expression data about cell wall invertases are available yet. Sturm and Chrispeels (1990) found that carrot cell suspension cultures grown on either glucose, fructose, or sucrose have similar  $\beta$ -fructofuranosidase mRNA content, with slightly higher levels of mRNA in cells grown on glucose (Roitsch *et al.*, 1995). In contrast, the expression of different  $\beta$ -fructofuranosidase genes can be repressed by glucose (Kunst *et al.*, 1974; Sarokin und Carlson, 1984; Martin *et al.*, 1987). For tobacco, this phenomenon may only be applicable for *N. benthamiana*, where there is a strong negative correlation between the nectar sugars in general and invertase expression levels. Furthermore, high expression levels resulting in high cell wall invertase activity would have been expected. This seems to be true especially for *N. sylvestris* and *N. tabacum* (Fig. 6).

The activity of CW-INV in the nectaries of different *Nicotiana* species (0.003 to 0.06 U mg<sup>-1</sup> FW; Fig. 5) was similar to the activity of CW-INV measured in other hexose-rich tissues of different plant species (Weschke *et al.*, 2003). Moreover, an increased invertase activity would be expected in plants with a high hexose concentration in the nectar (Ruhlmann *et al.*, 2010). However, for *tobacco*, this assumption is not confirmed by the data, regardless of whether the species is hexose-rich or not. There seems to be other mechanisms that play a role in the sugar composition, for example, the activity of soluble invertases, which needs to be tested. In addition to sucrose cleaving enzymes, sugar synthesis enzymes could also be



involved in nectar production. It has been shown that sucrose phosphate synthase is highly expressed in some nectaries and that its expression can be essential for nectar production (Lin *et al.*, 2014).

For all five *Nicotiana* species, the sucrose proportion of the total sugar concentration was always lower in the nectar compared with the nectaries (Fig. 3), perhaps due to the extracellular hydrolysis of sucrose by cell wall invertases. Differences in the sucrose-to-hexose-ratio between the nectaries and nectar were more pronounced in diurnal species compared with nocturnal species ( $\Delta$  0.37-0.48 vs.  $\Delta$  0.05-0.15). Therefore, the cleavage of sucrose during secretion must be stronger in diurnal species (Fig. 8). Due to the differences in sugar composition between nectaries and nectar, especially in day-flowering species, it can be assumed that the sugar composition is at least partly modified during secretion, either by the selective transport of sugars and/or the activities of sugar cleavage enzymes, like cell wall invertases.

#### *Post-secretory modifications*

No changes in nectar sugar concentration were observed after secretion in the tobacco species analysed in this study (Fig. 7). In acacia, a significant post-secretional modification of extrafloral nectar by invertase has been demonstrated (Heil *et al.*, 2005). Invertase activity in the nectar was also measured in *Cucurbita pepo*, but it was too low to significantly change the sugar profile (Nepi *et al.*, 2012). Although other sugar-cleaving enzymes, such as glucosidase, have been identified in the nectar of *N. attenuata* (Seo *et al.*, 2013), no invertases have been found in the tobacco nectar so far (Zha *et al.*, 2012; Kerchner *et al.*, 2015). This means that the nectar sugar composition must be already determined during the final stage of secretion, rather than undergoing post-secretory modification.

#### *Conclusion*

Nectar sugar composition must be determined by metabolic processes in nectaries as well as during secretion (Fig. 8). Sucrose is transported to the nectaries via the phloem. Within the nectaries, sucrose is hydrolyzed into hexoses, and a portion of the sugars is transiently stored as starch until anthesis, especially in night-flowering species. At anthesis, starch is converted into sucrose and hexoses. Sugars are exported out of the nectarial cells, likely by facilitated diffusion transporters (day-flowering species) or active transporters (night-flowering species). In the nectary tissue as well as during nectar secretion, some of the sucrose is hydrolyzed into glucose and fructose by the activity of cell wall invertases, which explains the higher proportion of hexoses in nectar in comparison to nectaries. Sucrose cleavage is likely higher pre-secretional in night-flowering and during secretion in day-flowering species.

Furthermore, post-secretional modification of the sugar composition in nectar is not probable. However, cell wall invertase alone cannot be responsible for the differences in hexoses concentration, and, therefore, other enzymes seem to play important roles in determining the nectar sugar composition.

### **Acknowledgements**

We would like to thank the Max Planck Institute for Chemical Ecology (Jena, Germany), the Botanical Garden of Bochum (Germany), and the Department of Biochemistry from the University of Rostock (Germany) for the provision of seeds. In addition we would like to thank Lisa Wiesen for critical reading of the manuscript.

## References

- Adler, L. S., Seifert, M. G., Wink, M., Morse, G. E., and Turlings, T. (2012). Reliance on pollinators predicts defensive chemistry across tobacco species. *Ecol Lett* 15, 1140–1148. doi: 10.1111/j.1461-0248.2012.01838.x
- Baker, H. G., and Baker, I. (1983). Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. *Handbook of experimental pollination biology* 117, 141.
- Bernardello, G. (2007). A systematic survey of floral nectaries. *Nectaries and nectar*, 19–128.
- Brandenburg, A., Dell'Olivo, A., Bshary, R., and Kuhlemeier, C. (2009). The sweetest thing: advances in nectar research. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 486–490. doi: 10.1016/j.pbi.2009.04.002
- Brockmüller, T., Ling, Z., Li, D., Gaquerel, E., Baldwin, I. T., and Xu, S. (2017). *Nicotiana attenuata* Data Hub (NaDH): An integrative platform for exploring genomic, transcriptomic and metabolomic data in wild tobacco. *BMC genomics* 18, 79. doi: 10.1186/s12864-016-3465-9
- Dorion, S., Lalonde, S., and Saini, H. S. (1996). Induction of Male Sterility in Wheat by Meiotic-Stage Water Deficit Is Preceded by a Decline in Invertase Activity and Changes in Carbohydrate Metabolism in Anthers. *Plant Physiology* 111, 137–145. doi: 10.1104/pp.111.1.137
- Fahn, A. (1979a). *Secretory tissues in plants*. Academic Press.
- Fahn, A. (1979b). Ultrastructure of nectaries in relation to nectar secretion. *American Journal of Botany*, 977–985.
- Gaffal, K. P., Friedrichs, G. J., and El-Gammal, S. (2007). Ultrastructural evidence for a dual function of the phloem and programmed cell death in the floral nectary of *Digitalis purpurea*. *Annals of Botany* 99, 593–607. doi: 10.1093/aob/mcm002
- Ge, Y.-X., Angenent, G. C., Wittich, P. E., Peters, J., Franken, J., Busscher, M., et al. (2000). NEC1, a novel gene, highly expressed in nectary tissue of *Petunia hybrida*. *The Plant Journal* 24, 725–734. doi: 10.1111/j.1365-313X.2000.00926.x
- Godt, D. E., and Roitsch, T. (1997). Regulation and Tissue-Specific Distribution of mRNAs for Three Extracellular Invertase Isoenzymes of Tomato Suggests an Important Function in Establishing and Maintaining Sink Metabolism. *Plant Physiology* 115, 273–282. doi: 10.1104/pp.115.1.273
- González-Teuber, M., and Heil, M. (2009). Nectar chemistry is tailored for both attraction of mutualists and protection from exploiters. *Plant Signaling & Behavior* 4, 809–813. doi: 10.4161/psb.4.9.9393
- Hajirezaei, M.-R., Bornke, F., Peisker, M., Takahata, Y., Lerchl, J., Kirakosyan, A., et al. (2003). Decreased sucrose content triggers starch breakdown and respiration in stored

- potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Journal of Experimental Botany* 54, 477–488. doi: 10.1093/jxb/erg040
- Heil, M., Rattke, J., and Boland, W. (2005). Postsecretory hydrolysis of nectar sucrose and specialization in ant/plant mutualism. *Science (New York, N.Y.)* 308, 560–563. doi: 10.1126/science.1107536
- Heineke, D., Sonnewald, U., Büssis, D., Günter, G., Leidreiter, K., Wilke, I., et al. (1992). Apoplastic Expression of Yeast-Derived Invertase in Potato. *Plant Physiology*, 301–308.
- Horner, H. T., Healy, R. A., Ren, G., Fritz, D., Klyne, A., Seames, C., et al. (2007). Amyloplast to chromoplast conversion in developing ornamental tobacco floral nectaries provides sugar for nectar and antioxidants for protection. *American Journal of Botany* 94, 12–24. doi: 10.3732/ajb.94.1.12
- Kerchner, A., Darok, J., Bacskay, I., Felinger, A., Jakab, G., and Farkas, A. (2015). Protein and alkaloid patterns of the floral nectar in some solanaceous species. *Acta biologica Hungarica* 66, 304–315. doi: 10.1556/018.66.2015.3.6
- Kessler, D., and Baldwin, I. T. (2007). Making sense of nectar scents: the effects of nectar secondary metabolites on floral visitors of *Nicotiana attenuata*. *The Plant Journal* 49, 840–854. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02995.x
- Knop, C., Voitsekhovskaja, O., and Lohaus, G. (2001). Sucrose transporters in two members of the Scrophulariaceae with different types of transport sugar. *Planta* 213, 80–91. doi: 10.1007/s004250000465
- Koch, K. E. (1996). Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 47, 509–540. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.509
- Kram, B. W., Xu, W. W., and Carter, C. J. (2009). Uncovering the *Arabidopsis thaliana* nectary transcriptome: investigation of differential gene expression in floral nectariferous tissues. *BMC plant biology* 9, 92. doi: 10.1186/1471-2229-9-92
- Krausgrill, S., Sander, A., Greiner, S., Weil, M., and Rausch, T. (1996). Regulation of cell wall invertase by a proteinaceous inhibitor. *Journal of Experimental Botany* 47 Spec No, 1193–1198. doi: 10.1093/jxb/47.Special\_Issue.1193
- Kunst, F., Pascal, M., Lepesant, J.-A., Walle, J., and Dedonder, R. (1974). Purification and Some Properties of an Endocellular Sucrase from a Constitutive Mutant of *Bacillus subtilis* Marburg 168. *Eur J Biochem* 42, 611–620. doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03376.x
- Lemoine, R., Bürkle, L., Barker, L., Sakr, S., Kühn, C., Regnacq, M., et al. (1999). Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS letters* 454, 325–330.

- Lin, I. W., Sosso, D., Chen, L.-Q., Gase, K., Kim, S.-G., Kessler, D., et al. (2014). Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature* 508, 546–549. doi: 10.1038/nature13082
- Liu, D., Shi, L., Han, C., Yu, J., Li, D., and Zhang, Y. (2012). Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected *Nicotiana benthamiana* using quantitative real-time PCR. *PLoS ONE* 7, e46451. doi: 10.1371/journal.pone.0046451
- Logemann, J., Schell, J., and Willmitzer, L. (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry* 163, 16–20. doi: 10.1016/0003-2697(87)90086-8
- Lohaus, G., and Schwerdtfeger, M. (2014). Comparison of sugars, iridoid glycosides and amino acids in nectar and phloem sap of *Maurandya barclayana*, *Lophospermum erubescens*, and *Brassica napus*. *PLoS ONE* 9, e87689. doi: 10.1371/journal.pone.0087689
- Lorenz, K., Lienhard, S., and Sturm, A. (1995). Structural organization and differential expression of carrot  $\beta$ -fructofuranosidase genes: identification of a gene coding for a flower bud-specific isozyme. *Plant molecular biology* 28, 189–194. doi: 10.1007/BF00042049
- Martin, I., Débarbouillé, M., Ferrari, E., Klier, A., and Rapoport, G. (1987). Characterization of the levanase gene of *Bacillus subtilis* which shows homology to yeast invertase. *Molecular and General Genetics MGG* 208, 177–184. doi: 10.1007/BF00330439
- Mosti, S., Ross Friedman, C., Pacini, E., Brighigna, L., and Papini, A. (2013). Nectary ultrastructure and secretory modes in three species of *Tillandsia* (Bromeliaceae) that have different pollinators. *Botany* 91, 786–798. doi: 10.1139/cjb-2013-0126
- Nadwodnik, J., and 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. doi: 10.1007/s00425-007-0682-0
- Nepi, M., Ciampolini, F., and Pacini, E. (1996). Development and Ultrastructure of *Cucurbita pepo* Nectaries of Male Flowers. *Annals of Botany* 78, 95–104. doi: 10.1006/anbo.1996.0100
- Nepi, M., Soligo, C., Nocentini, D., Abate, M., Guarnieri, M., Cai, G., et al. (2012). Amino acids and protein profile in floral nectar: Much more than a simple reward. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 207, 475–481. doi: 10.1016/j.flora.2012.06.002
- Ning, X.-p., Tang, T.-x., and Wu, H. (2017). Relationship between the morphological structure of floral nectaries and the formation, transport, and secretion of nectar in lychee. *Trees* 31, 1–14. doi: 10.1007/s00468-016-1504-4

- Percival, M. S. (1961). Types of Nectar in Angiosperms. *New Phytologist*, 235–281.
- Plowright, R. C. (1987). Corolla depth and nectar concentration: An experimental study. *Can. J. Bot.* 65, 1011–1013. doi: 10.1139/b87-139
- Ren, G., Healy, R. A., Horner, H. T., James, M. G., and Thornburg, R. W. (2007a). Expression of starch metabolic genes in the developing nectaries of ornamental tobacco plants. *Plant Science* 173, 621–637. doi: 10.1016/j.plantsci.2007.08.012
- Ren, G., Healy, R. A., Klyne, A. M., Horner, H. T., James, M. G., and Thornburg, R. W. (2007b). Transient starch metabolism in ornamental tobacco floral nectaries regulates nectar composition and release. *Plant Science* 173, 277–290. doi: 10.1016/j.plantsci.2007.05.008
- Riens, B., Lohaus, G., Winter, H., and Heldt, H.-W. (1994). Production and diurnal utilization of assimilates in leaves of spinach (*Spinacia oleracea* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 192, 497–501.
- Roitsch, T., Balibrea, M. E., Hofmann, M., Proels, R., and Sinha, A. K. (2003). Extracellular invertase: Key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany* 54, 513–524. doi: 10.1093/jxb/erg050
- Roitsch, T., Bittner, M., and Godt, D. E. (1995). Induction of Apoplastic Invertase of *Chenopodium rubrum* by D-Glucose and a Glucose Analog and Tissue-Specific Expression Suggest a Role in Sink-Source Regulation. *Plant Physiology* 108, 285–294. doi: 10.1104/pp.108.1.285
- Roitsch, T., and González, M.-C. (2004). Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* 9, 606–613. doi: 10.1016/j.tplants.2004.10.009
- Roy, R., Schmitt, A. J., Thomas, J. B., and Carter, C. J. (2017). Review: Nectar biology: from molecules to ecosystems. *Plant Science*. doi: 10.1016/j.plantsci.2017.04.012
- Ruhlmann, J. M., Kram, B. W., and Carter, C. J. (2010). CELL WALL INVERTASE 4 is required for nectar production in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 61, 395–404. doi: 10.1093/jxb/erp309
- Sarokin, L., and Carlson, M. (1984). Upstream region required for regulated expression of the glucose-repressible SUC2 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4, 2750–2757. doi: 10.1128/MCB.4.12.2750
- Schmidt, G. W., and Delaney, S. K. (2010). Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Molecular genetics and genomics : MGG* 283, 233–241. doi: 10.1007/s00438-010-0511-1
- Seo, P. J., Wielsch, N., Kessler, D., Svatos, A., Park, C.-M., Baldwin, I. T., et al. (2013). Natural variation in floral nectar proteins of two *Nicotiana attenuata* accessions. *BMC Plant Biol* 13, 101. doi: 10.1186/1471-2229-13-101

- Sherson, S. M., Alford, H. L., Forbes, S. M., Wallace, G., and Smith, S. M. (2003). Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 54, 525–531. doi: 10.1093/jxb/erg055
- Stpiczyńska, M., Nepi, M., and Zych, M. (2014). Nectaries and male-biased nectar production in protandrous flowers of a perennial umbellifer *Angelica sylvestris* L. (Apiaceae). *Plant Syst Evol.* doi: 10.1007/s00606-014-1152-3
- Sturm, A. (1999). Invertases. Primary Structures, Functions, and Roles in Plant Development and Sucrose Partitioning. *Plant Physiology* 121, 1–8. doi: 10.1104/pp.121.1.1
- Sturm, A., and Chrispeels, M. J. (1990). cDNA cloning of carrot extracellular beta-fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *The Plant cell* 2, 1107–1119.
- Sturm, A., Šebková, V., Lorenz, K., Hardegger, M., Lienhard, S., and Unger, C. (1995). Development- and organ-specific expression of the genes for sucrose synthase and three isoenzymes of acid  $\beta$ -fructofuranosidase in carrot. *Planta* 195, 601–610. doi: 10.1007/BF00195721
- Tiedge, K., and Lohaus, G. (2017). Nectar sugars and amino acids in day- and night-flowering *Nicotiana* species are more strongly shaped by pollinators' preferences than organic acids and inorganic ions. *PLoS ONE* 12, e0176865. doi: 10.1371/journal.pone.0176865
- Vandesompele, J., Preter, K. de, Pattyn, F., Poppe, B., van Roy, N., Paepe, A. de, et al. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, research0034.1. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Vassilyev, A. E. (2010). On the mechanisms of nectar secretion: revisited. *Annals of Botany* 105, 349–354. doi: 10.1093/aob/mcp302
- Weber, H., Heim, U., Golombek, S., Borisjuk, L., Manteuffel, R., and Wobus, U. (1998). Expression of a yeast-derived invertase in developing cotyledons of *Vicia narbonensis* alters the carbohydrate state and affects storage functions. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 16, 163–172.
- Weschke, W., Panitz, R., Gubatz, S., Wang, Q., Radchuk, R., Weber, H., et al. (2003). The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *The Plant Journal* 33, 395–411.
- Wist, T. J., and Davis, A. R. (2006). Floral nectar production and nectary anatomy and ultrastructure of *Echinacea purpurea* (Asteraceae). *Annals of Botany* 97, 177–193.
- Wright, D. P., Read, D. J., and Scholes, J. D. (1998). Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell & Environment*, 881–891.

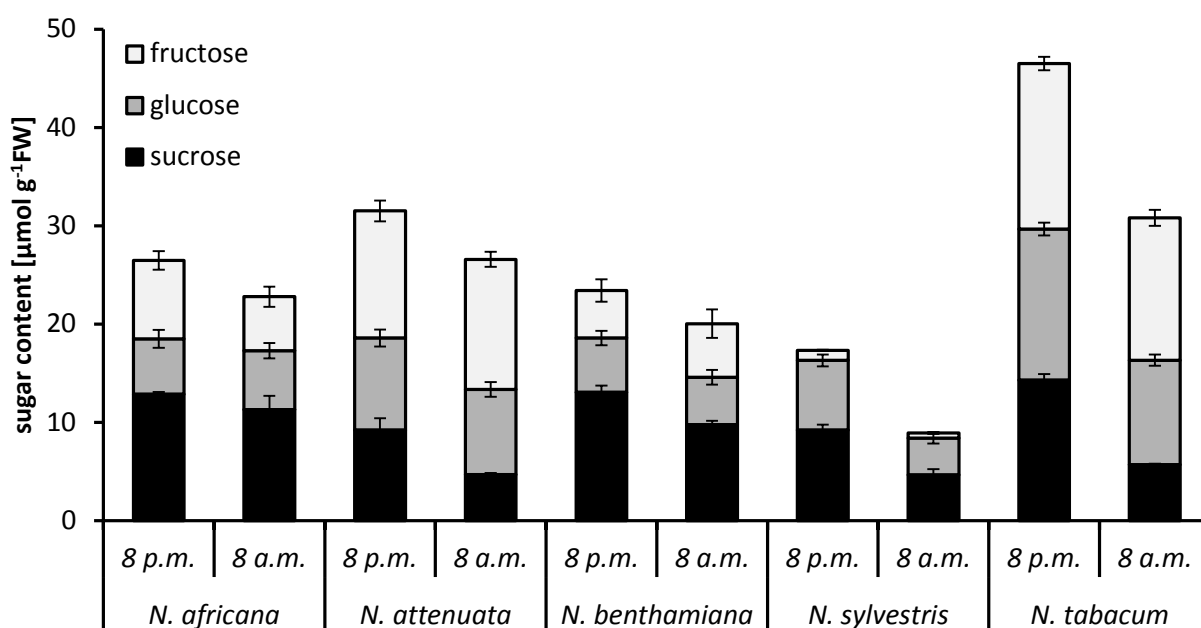
- Wu, L.-L., Mitchell, J. P., Cohn, N. S., and Kaufman, P. B. (1993). Gibberellin (GA<sub>3</sub>) Enhances Cell Wall Invertase Activity and mRNA Levels in Elongating Dwarf Pea (*Pisum sativum*) Shoots. *International Journal of Plant Sciences* 154, 280–289. doi: 10.1086/297108
- Zha, H.-G., Flowers, V. L., Yang, M., Chen, L.-Y., and Sun, H. (2012). Acidic  $\alpha$ -galactosidase is the most abundant nectarin in floral nectar of common tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Annals of Botany* 109, 735–745. doi: 10.1093/aob/mcr321



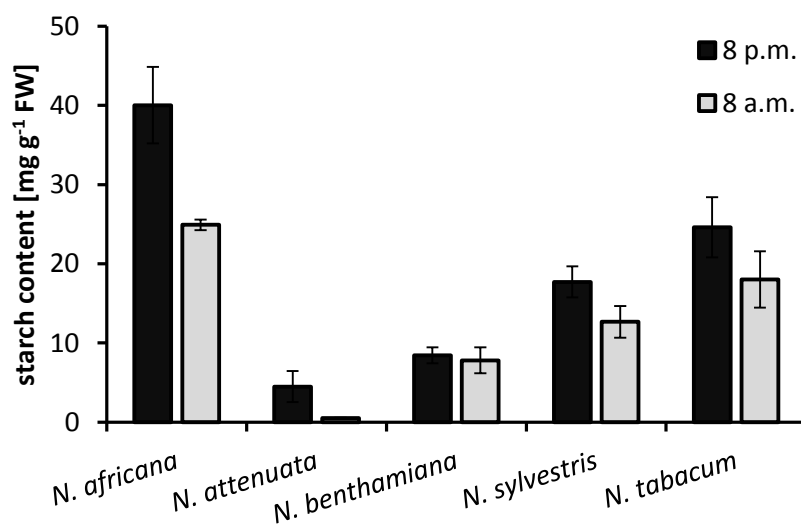
*Supplementary Material*

**Nectar Sugar Modulation and Cell Wall Invertases in  
Nectaries of day- and night- flowering *Nicotiana***

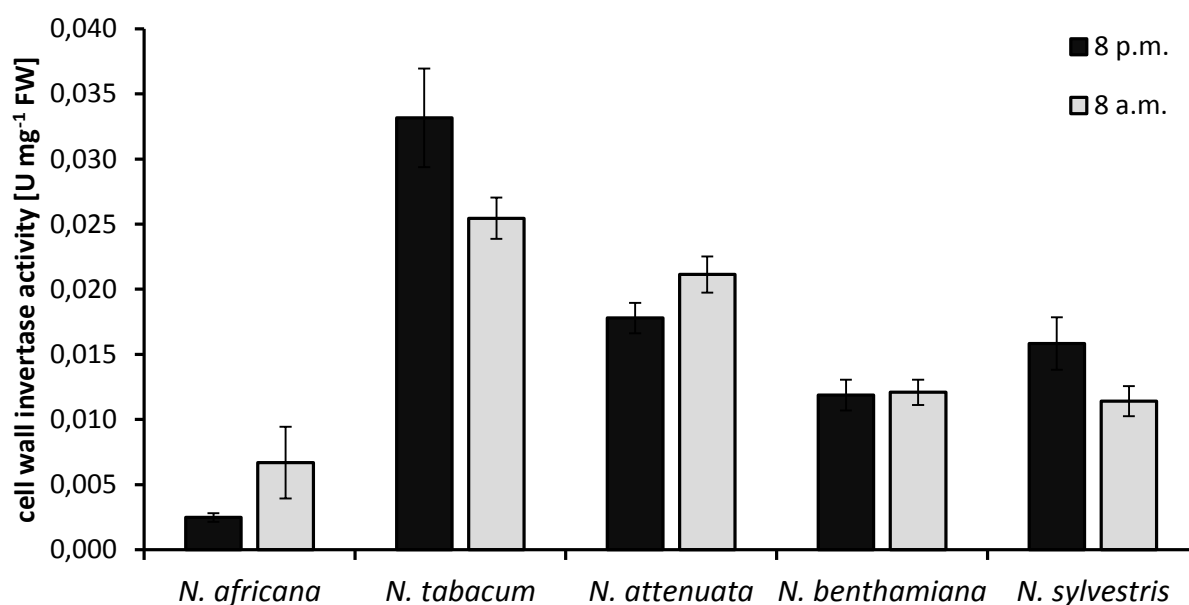
Kira Tiedge, Gertrud Lohaus\*



**Supplementary Figure 8.** Total sugar content in tobacco leaves, which have been collected both at the end of the light period (8 p.m.) and at the end of the dark period (8 a.m.); shown are mean values ( $n = 3$ )  $\pm$  SD



**Supplementary Figure 2.** Starch content of tobacco leaves, which have been collected both at the end of the light period (8 p.m.) and at the end of the dark period (8 a.m.); shown are mean values ( $n = 3$ )  $\pm$  SD



**Supplementary Figure 3.** Cell wall invertase activity in tobacco leaves, which have been collected both at the end of the light period (8 p.m.) and at the end of the dark period (8 a.m.); shown are mean values ( $n = 6$ )  $\pm$  SD

**Supplementary Table S 1: List of primers used in this paper**

Species	Target gene	Primer	Sequence (5' - 3')
<i>N. africana</i>	CW-INV	forward	GTCCAAAACACTACGCGATACC
		reverse	GATTTCTCACACTCCCAACC
	Actin	forward	GACTATGAGCAGGAACTTGAGA
		reverse	TGAACCACCACTAAGAACAATG
	Elongation factor 1 $\alpha$	forward	GGCCCAACACTTCTTGATGCTC
		reverse	CCAACATTGTCACCAGGAAGT
<i>N. attenuata</i>	CW-INV	forward	GAACTCCTTCCCTTCAGC
		reverse	GTTTGACACATTCCCGAC
	Actin	forward	CCCTCCCACATGCTATTCT
		reverse	TCCTGTTTCATAGTCGAGAGC
	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	forward	CTGACTTCAATCCAGTCTTTGCTC
		reverse	GTAACAGATTAAGAGTGCGGG
<i>N. benthamiana</i>	CW-INV	forward	GGCAATGATGAAGCACGATG
		reverse	ACTCCGGGATTGAATCAGG
	Actin	forward	TGTCCTGAGGTCCTTTTCC
		reverse	ATTCTATCAGCGATACCCGG
	Elongation factor 1 $\alpha$	forward	GGCCCAACACTTCTTGATGCTC
		reverse	CCAACATTGTCACCAGGAAGT
<i>N. sylvestris</i>	CW-INV	forward	TGATTCTTCACACTCCCAACCA
		reverse	CACAAGTCCAAAACACTACGCGA
	Actin	forward	GACTATGAGCAGGAACTTGAGA
		reverse	TGAACCACCACTAAGAACAATG
	Elongation factor 1 $\alpha$	forward	GGCCCAACACTTCTTGATGCTC
		reverse	CCAACATTGTCACCAGGAAGT
<i>N. tabacum</i>	CW-INV	forward	CTGCTATGTGCTGATGGATG
		reverse	CAGGCGCTTCACTATTCTC
	Actin	forward	CCCTCCCACATGCTATTCT
		reverse	TCCTGTTTCATAGTCGAGAGC
	Elongation factor 1 $\alpha$	forward	CTGCTTATTGACTCCACCAC
		reverse	CACCTTCCAAACCAGAGATG

## 4. Diskussion

Die Gattung *Nicotiana* eignet sich besonders, um die Regulation der Nektarzusammensetzung auf unterschiedlichen Ebenen zu untersuchen. Die Blütenmorphologie der verschiedenen *Nicotiana*-Arten ist sehr vielfältig, es kommen fast alle wichtigen Bestäubergruppen vor und es gibt sowohl tag- als auch nachtblühende Arten. Auf Grund aktueller molekularbiologischer Untersuchungen sind die Verwandtschaftsverhältnisse der verschiedenen Arten beschrieben. In dieser Arbeit wurden daher 20 verschiedene Tabakarten untersucht, die die verschiedenen Eigenschaften und Merkmale abbilden. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst und im Hinblick auf die Forschungsfragen diskutiert.

### 4.1. Nektarinhaltsstoffe und ihre Anpassung an die Bestäuber

Bei einigen Pflanzenarten wurde in der Vergangenheit ein mikrobieller Befall des Nektars gefunden, welche die Anteile der verschiedenen Zucker im Nektar beeinflussen könnte (Herrera *et al.*, 2009; Lievens *et al.*, 2014). Für *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae) konnte zudem gezeigt werden, dass unterschiedliche Bestäuber bei der gleichen Pflanzenart eine veränderte Nektarzuckerzusammensetzung hervorrufen können, indem sie die Blüte mit bestimmten Hefen kontaminieren (Canto *et al.*, 2008). Daher wurde zu Beginn der Untersuchungen ein möglicher mikrobieller Befall der Nektarproben untersucht. Im Nektar der getesteten Arten konnten keine Bakterien oder Hefen nachgewiesen werden, mit Ausnahme einer Probe von der Art *N. africana*. Möglicherweise liegt dieses geringe Vorkommen daran, dass die Pflanzen im Gewächshaus generell geschützt vor Befall sind, da sie von weniger Bestäubern besucht werden, welche die Blüten mit Mikroben infizieren könnten. Zusätzlich ist Tabaknektar durch Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) geschützt, welches im sogenannten Nectar-Redox-Cycle produziert wird (Carter und Thornburg, 2004a; Carter *et al.*, 2007). Wasserstoffperoxid wirkt auf viele Pflanzenpathogene toxisch (Carter *et al.*, 2007). Der Nectar-Redox-Cycle wurde bislang nur in *Nicotiana* beschrieben und es ist unklar, ob er auch bei anderen Gattungen vorkommt. Das Screening des Nektars zeigt, dass die gefundenen Unterschiede in der Nektarzusammensetzung nicht durch mikrobielle Kontaminationen hervorgerufen wurden. Es kann vielmehr davon ausgegangen werden, dass andere Faktoren die Nektarzusammensetzung beeinflussen, z.B. der Bestäubertyp, der Verwandtschaftsgrad der *Nicotiana*-Arten oder der Zeitpunkt der Blütenöffnung.

Anhand der morphologischen Beobachtungen der Blüten und den biochemischen Nektaranalysen kann verglichen werden, inwiefern die Bestäubungssyndrome bei *Nicotiana* zutreffend sind.

Die Bestäuber tagblühender Tabakarten sind Kolibris, Bienen und Nektarvögel, wobei die Mehrzahl primär von Kolibris (*Trochilidae*) bestäubt wird. Die Blüten der Kolibri-bestäubten Arten waren zwar tatsächlich verhältnismäßig groß und robust, aber nicht alle besaßen eine auffällige Färbung. So war die Blütenfärbung von *N. attenuata*, *N. palmeri* und *N. paniculata* weiß. *N. attenuata* öffnet ihre Blüten allerdings in der Dämmerung und es wurden neben Kolibris auch Motten (*Sphingidae*) als Bestäuber beobachtet (Kessler und Baldwin, 2007), welche weniger durch die Blütenfarbe sondern eher über Duftstoffe angelockt werden. Das Saccharose-zu-Hexose-Verhältnis war ähnlich im Nektar von Kolibri- und Bienen-bestäubten Arten höher als im Nektar von Blüten, welche durch Nektarvögel bestäubt werden (siehe 3. Ergebnisse Abschnitt II Fig. 2B). Anhand von künstlichem Nektar konnte experimentell von Waller (1972) gezeigt werden, dass Bienen eine Präferenz für Fructose-reichen Nektar haben. Dies wurde auch durch einen hohen Fructoseanteil bei beiden Bienen-bestäubten Arten *N. nudicaulis* und *N. rustica* deutlich. In Abhängigkeit von der Pflanzenart enthält Nektar neben Zuckern auch Aminosäuren, die in unterschiedlicher Zusammensetzung und Konzentration vorkommen können. Bienen präferieren zum einen Prolin-reichen Nektar (Carter *et al.*, 2006) und zum anderen Nektar, der einen erhöhten Anteil an für Bienen essentielle Aminosäuren aufweist (Hendriksma *et al.*, 2014). Dies spiegelte sich jedoch nicht in der Aminosäurezusammensetzung der Bienen-bestäubten Tabakarten wider (siehe 3. Ergebnisse Abschnitt II Tab. 3). Insgesamt ist die Präferenz von Insekten für Aminosäuren und die Aminosäurezusammensetzung von Nektar jedoch noch nicht ausreichend untersucht.

*N. africana* ist die einzige Tabakart, welche von Nektarvögeln bestäubt wird. Da Nektarvögeln vermutlich die Enzyme zur Saccharosespaltung fehlen (Marlin *et al.*, 2016) sind sie auf Saccharose-arme Nektare spezialisiert. Dies zeigte sich auch im sehr niedrigen Saccharose-zu-Hexose-Verhältnis im Nektar von *N. africana*, welches geringer ist als im Nektar der anderen untersuchten Tabakarten (siehe 3. Ergebnisse Abschnitt II Fig. 2B). Die Aminosäurekonzentration im Nektar von *N. africana* war höher als im Nektar aller anderen untersuchten Tabakarten. Daher kann vermutet werden, dass Nektarvögel die Aminosäuren als zusätzliche oder alleinige Stickstoffquelle nutzen (siehe 3. Ergebnisse Abschnitt II Fig. 2C).

Neben der Zusammensetzung unterscheidet sich auch die Menge des Nektars bei den verschiedenen Arten in Abhängigkeit von der Bestäubergruppe. Das Nektarvolumen der

Kolibri-bestäubten Arten war größer (1-20  $\mu\text{l}$ ) als bei den bienenbestäubten Arten (0,5–1  $\mu\text{l}$ ). Das größte Nektarvolumen von allen untersuchten Arten zeigte die einzige in Afrika beheimatete Art *N. africana*. Hier wird deutlich, dass das Nektarvolumen mit der Körpergröße und damit dem Nahrungsbedarf der Bestäuber korreliert. Bei Nektarvögeln in der afrikanischen Namib-Wüste kommt hinzu, dass sie wahrscheinlich auf Nektar als Flüssigkeitsquelle angewiesen sind. Pflanzen mit größeren Bestäubern müssen entsprechend mehr Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen sowie Wasser für die Nektarproduktion bereitstellen (Nicolson *et al.*, 2007).

Von den nachtblühenden Arten wird ein Großteil von Schwärmern (*Sphingidae*) bestäubt. Bei den meisten der untersuchten Schwärmer-bestäubten Arten waren die Blütenröhren so lang und schmal, dass eine Bestäubung durch andere Tiere ausgeschlossen werden kann, da nur Sphingiden mit ihren Rollrüsseln den tief verborgenen Nektar (bis zu 80 mm) erreichen können (siehe 3. Ergebnisse Abschnitt II Tab. 1). Die Blütenfärbung war entsprechend des Bestäubungssyndroms weißlich und ein starker Duft war nachts während der Blütenöffnung vernehmbar. Besonders auffällig war der hohe Saccharose-Anteil bei Schwärmer-bestäubten Arten (3. Ergebnisse Abschnitt II Fig. 2B), welcher stark positiv mit der Blütenröhrenlänge korrelierte. Saccharose-reiche Nektare evaporieren auf Grund ihres niedrigeren osmotischen Potentials schneller als Hexose-reiche Nektare mit dem gleichen Zuckergehalt. Verborgen in den langen Blütenröhren ist Saccharose-reicher Nektar jedoch weitgehend vor Verdunstung geschützt (Witt *et al.*, 2013). Dadurch wurde eine Koevolution zwischen langrüsseligen Motten und langblütigen Tabakpflanzen mit Saccharose-reichen Nektaren begünstigt.

Beide überwiegend autogamen Tabakarten *N. benthamiana* und *N. plumbaginifolia* öffneten ihre Blüten nachts. Auch ihre Blüten waren weiß, allerdings mit kürzeren Blütenröhren als die der anderen Nachtblüher und damit auch zugänglich für ein breiteres Spektrum an potentiellen Bestäubern. Da sie nicht auf Fremdbestäubung angewiesen sind, ist es sozusagen effizient, dass sie nur wenig Nektar produzieren und die Zucker- und Aminosäurekonzentration im Nektar gering ist (siehe 3. Ergebnisse Abschnitt II Fig. 3).

Die Blüten von *N. otophora* wiesen als einzige nachtblühende Art eine gelbliche anstelle einer weißen Färbung auf. Mit einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$  pro Blüte produzierte diese Art mit Abstand den meisten Nektar. Dies ist vermutlich eine Anpassung der Pflanze an ihre speziellen Bestäuber, die relativ großen Fledermäuse. Allerdings war die Nektarzuckerkonzentration eher gering, sodass eine Aufnahme von ausreichend Nährstoffen allein aus Nektar nicht gewährleistet wird und der Nektar den Fledermäusen nur als zusätzliche Futterquelle dient (Howell, 1974).

Insgesamt lässt sich sagen, dass eine Einteilung der Blütenpflanzen in Bestäubungssyndrome auch bei *Nicotiana* überwiegend zutreffend ist. Dies spricht für die Theorie des „pollinator shift“, also eine gezielte Spezialisierung der Pflanzen auf bestimmte Bestäubergruppen (Chase *et al.*, 2010; Peter und Johnson, 2014). Als Gegenstrategie haben sich die sogenannten Generalisten ausgebildet, welche durch wenig Spezialisierung für möglichst viele Bestäuber attraktiv sind (Waser und Ollerton, 2006). Bei dieser Gruppe würde die unterschiedliche Nektarzusammensetzung bei den verschiedenen Arten eher durch andere Faktoren bestimmt werden, z.B. durch die phylogenetischen Verhältnisse der Arten zueinander. Um zu testen, welche der beiden Gruppierungen bei Tabakpflanzen zutreffender ist, wurden statistische Berechnungen anhand aller gemessenen Nektarkomponenten durchgeführt. Unter anderem wurde eine Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis; PCA) zur Reduktion der großen Datenmenge und zur Ermöglichung einer grafischen Darstellung angewendet. Bei der PCA zeigte sich, dass sich die Nektarproben eher innerhalb ihrer Bestäubertypen als innerhalb ihrer Sektionen gruppieren (siehe 3. Ergebnisse Abschnitt II Fig. 4). Ein ähnliches Ergebnis ergab auch eine Studie von Petanidou *et al.* (2006) mit 73 Pflanzenarten aus dem Mittelmeerraum, bei denen ganz ähnliche Nektarparameter erfasst wurden.

Um die grafische Auswertung mit Zahlen zu hinterlegen, wurde anschließend an die PCA eine permutative multivariate Varianzanalyse (permutational multivariate analysis of variance; PERMANOVA) gerechnet. Bezog man alle Stoffgruppen (Zucker, Aminosäuren, anorganische Anionen, anorganische Kationen und organische Säuren) mit in die Berechnung ein, erklärten die Zugehörigkeit zu einer Bestäubergruppe und die Sektionszugehörigkeit einen ähnlich großen Anteil der Varianz der Daten (Bestäuber: 27%; Sektionen: 24%). Sobald allerdings nur die Zucker und Aminosäuren in die Berechnung mit einbezogen wurden, war der Einfluss der Bestäuber mehr als dreimal so hoch wie der Einfluss der Sektionszugehörigkeit (Bestäuber: 66%; Sektionen: 19%). Betrachtete man die verbleibenden Stoffgruppen (anorganische Anionen, anorganische Kationen und organische Säuren), so war der Einfluss beider Gruppierungsoptionen wieder ungefähr gleich (Bestäuber: 26%; Sektionen: 24%).

Daraus lässt sich folgern, dass Zucker und Aminosäuren eher an die Bestäuber angepasst sind als andere Nektarkomponenten. Dies könnte zum einen daran liegen, dass diese Inhaltsstoffe wichtiger für Anlockung und Ernährung der Bestäuber sind und von diesen in speziellen Konzentrationen benötigt werden. Zum anderen könnte die Pflanzen die Zucker- und Aminosäurezusammensetzung im Nektar zum Beispiel durch spezielle Transporter gezielt regulieren, während anorganische Ionen unkontrolliert entlang eines Konzentrationsgradienten in den Nektar diffundieren. In diesem Fall müssten entsprechende

Transportproteine für Zucker und Aminosäuren im Nektariengewebe vorhanden sein. Für *Arabidopsis thaliana*, *Brassica rapa* und *Nicotiana attenuata* konnte bereits ein Transporter aus der Familie der SWEET-Proteine in den Nektarien nachgewiesen und lokalisiert werden, welcher für den Saccharoseexport aus den Zellen verantwortlich ist (Lin *et al.*, 2014). Andere Transportproteine wurden bislang nicht gezielt untersucht, obwohl deren Lokalisation und Aktivität sehr interessant für die Nektarproduktion wäre.

## 4.2. Proteine im Nektar

Nektar enthält neben Zuckern, Aminosäuren, Ionen und anderen Metaboliten auch geringe Mengen an Proteinen. Erste Untersuchungen von Baker und Baker (1975) ergaben, dass nur bei 17% von 129 untersuchten Pflanzenarten Proteine im Nektar nachgewiesen werden konnten. Bei *Nicotiana* hingegen sind bislang bei jeder untersuchten Art Nektarproteine gefunden worden (Liu *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2013; Kerchner *et al.*, 2015). Dieser Unterschied könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei aktuelleren Studien sensitivere Nachweismethoden verwendet oder negative Ergebnisse nicht veröffentlicht wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Proteingehalt anhand des Protein-Molekulargewichtsmarkers abgeschätzt. Dabei wurden Gesamtproteingehalte von ca. 200 µg/ml im Nektar der verschiedenen Tabakarten ermittelt. Carter *et al.* (1999) fanden ähnliche Gesamtproteingehalte für Nektar aus *Nicotiana spec.* und Peumans *et al.* (1997) für Nektar aus Lauch (*Allium porrum*).

Das Proteinprofil im Nektar war bei allen untersuchten Tabakarten unterschiedlich (siehe Kapitel 3.3 und Kerchner *et al.*, 2015), selbst wenn die Arten die gleichen Bestäuber hatten. Die Identität und Funktion von Nektarproteinen ist bisher noch nicht weitreichend untersucht. Nicht auszuschließen ist, dass manche Proteine ungezielt in den Nektar diffundieren und dort keine spezifischen Funktionen erfüllen. Für die meisten Proteine wird jedoch postuliert, dass sie entweder zur Anlockung von Bestäubern (z.B. Invertasen im extrafloralen Nektar von *Acacia*; Heil *et al.*, 2005), zur Abwehr von Nektarräubern (Peumans *et al.*, 1997) oder als Teil der Pathogenabwehr (Nectar Redox Cycle) fungieren (Park und Thornburg, 2009; Zha *et al.*, 2012; Kerchner *et al.*, 2015).

Invertasen im Nektar sind von besonderem Interesse, da sie eine Spaltung von Saccharose in Glucose und Fructose katalysieren und somit für die unterschiedliche Zuckerzusammensetzung im Nektar eine Rolle spielen könnten. Zellwandinvertase in Tabak hat eine Größe von 63 kDA (Weil und Rausch, 1990; Konno *et al.*, 1993), wobei diese bisher im Nektar nicht nachgewiesen wurde. Daher könnte zwar eine der Proteinbanden, welche



bei der SDS-PAGE im Nektar von *N. alata* sichtbar wurde, eine Zellwandinvertase sein, allerdings ist wahrscheinlicher, dass es sich hierbei um die Nektarproteine Nectarin IV und Nectarin V handelte, da diese in großen Mengen in Tabaknektar vorhanden sind und ebenfalls eine Größe von 61–65 kDa aufweisen (Carter und Thornburg, 2004c). Zur genaueren Identifikation der Nektarproteine sind weitere Analysen notwendig, zum Beispiel immunochemische Nachweise mit spezifischen Antikörpern oder massenspektrometrische Analysen (Shevchenko *et al.*, 1996; Carter *et al.*, 1999).

### **4.3. Mechanismen der Nektarzuckerproduktion bei tag- und nachtblühenden Tabakarten**

Auf Grund der vorherigen Ergebnisse stellt sich die Frage, welche Mechanismen die unterschiedliche Zuckerszusammensetzung, insbesondere den unterschiedlichen Hexose-Anteil im Nektar, bewirken und ob ein Zusammenhang mit dem Blütezeitpunkt besteht.

Floraler Nektar wird in Nektarien produziert. Das Phloem versorgt die Nektarien mit Saccharose (Lohaus und Schwerdtfeger, 2014). Im Gegensatz zum Phloemsaft, welcher keine Hexosen enthält (Knop *et al.*, 2001; Nadwodnik und Lohaus, 2008), sind im Nektar neben Saccharose teilweise erhebliche Mengen an Glucose und Fructose vorhanden (Tiedge und Lohaus, 2017). Unterschiede in der Zusammensetzung von Nektar und Phloem müssen deshalb entweder auf Stoffwechselforgänge in den Nektaren vor oder während der Nektarsekretion oder auf post-sekretionale Modifikationen zurückzuführen sein.

Das Phloem beliefert vermutlich sowohl die Nektarien von tag- als auch von nachtblühenden Pflanzen mit Saccharose, jedoch ist der Phloemtransport nachts stark reduziert (Riens *et al.*, 1994). Dadurch müssen nachtblühende Arten einen Teil der tagsüber angelieferten Zucker in Speicherformen überführen und können diese dann nachts wieder für die Zuckerproduktion verwenden. Zucker werden beispielsweise transient in Form von Stärke gespeichert (Ren *et al.*, 2007b). Tatsächlich war der Stärkegehalt in den Nektarien bei nachtblühenden Arten höher als bei tagblühenden und verringerte sich zu Beginn der Nektarproduktion, d.h. in der ersten Hälfte der Nachtperiode (3. Ergebnisse Abschnitt IV Fig. 4). Gleichzeitig war die Zuckerkonzentration in den Nektarien zu diesem Zeitpunkt am höchsten (3. Ergebnisse Abschnitt IV Fig. 2). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass Stärke insbesondere bei den nachtblühenden Tabakarten in den Nektarien als Kohlenstoffspeicher für die Bereitstellung von Nektarzuckern genutzt wird (3. Ergebnisse Abschnitt IV Fig. 8).

Da Stärke aus  $\alpha$ -D-Glucose-Einheiten zusammengesetzt ist, wäre zu erwarten gewesen, dass der Stärkegehalt negativ mit der Glucosekonzentration korreliert. Allerdings konnte

keine Korrelation zwischen Stärke und Glucose oder einem der anderen Zucker festgestellt werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass in den Nektarien Umbauprozesse der Zucker stattfinden, z.B. die Isomerisierung von Fructose aus Glucose (Ståhlberg *et al.*, 2012).

Beim Vergleich der prozentualen Anteile der einzelnen Zucker im Nektar und in den Nektarien korrelierte der prozentuale Anteil von Glucose im Nektar und den Nektarien nur gering. Allerdings ergab sich eine hohe Korrelation sowohl bei Fructose als auch bei Saccharose. Deshalb scheint das Zuckerprofil des Nektars teilweise schon in den Nektarien vorgegeben zu sein. Eine weitere Modifikation der Zucker findet wahrscheinlich während der Sekretion des Nektars statt.

Je nach Art und Uhrzeit war die Zuckerkonzentration im Nektar von tagblühenden Arten 3- bis 5-fach und bei nachtblühenden Arten 8- bis 10-fach höher als in den Nektarien (3. Ergebnisse Abschnitt IV Fig. 2). Über die subzelluläre Verteilung des Zuckers in den Parenchymzellen der Nektarien ist bisher nichts bekannt. Wenn man allerdings annimmt, dass die subzelluläre Verteilung der Saccharose in den Nektarienzellen der Verteilung in den Blättern ähnelt (bis zu 50% Saccharose im Cytoplasma; Nadwodnik und Lohaus, 2008) und das Cytoplasma etwa 20% der Nektarzellen ausmacht (Wist und Davis, 2006; Gaffal *et al.*, 2007), kann die Saccharosekonzentration im Cytoplasma der Nektarienzellen abgeschätzt werden. Bei tagblühenden Arten lag die berechnete maximale Saccharosekonzentration im Cytoplasma der Nektarienzellen bei ca. 300–400 mM und die entsprechende Konzentration im Nektar bei ca. 100–300 mM. Dies bedeutet, dass die Saccharosekonzentration im Nektar geringer ist als im Cytoplasma der Nektarien und Saccharose aus den Nektarien durch einfache oder erleichterte Diffusion heraus transportiert werden kann. Eine Gruppe von Zuckertransportern sind sogenannte SWEETs (kurz für: Sugars Will Eventually Be Exported). Dies sind Transportproteine für erleichterte Diffusion und transportieren Saccharose entlang eines Konzentrationsgradienten (Chen *et al.*, 2015). In *N. attenuata* wurde SWEET9 bereits gefunden und in *Arabidopsis* konnte SWEET9 in den Nektarien lokalisiert werden (Lin *et al.*, 2014). Daher ist es möglich, dass SWEETs auch in den Saccharoseexport aus den Nektarienzellen bei tagblühenden Tabakarten involviert sind (3. Ergebnisse Abschnitt IV Fig. 8).

Bei nachtblühenden Arten betrug die berechnete Saccharosekonzentration im Cytosol der Nektarienzellen ca. 200 mM, während die entsprechende Konzentration im Nektar ca. 300–700 mM betrug. In diesem Fall ist eine durch SWEETs erleichterte Diffusion von Saccharose aus den Nektarien in den Nektar nicht möglich. Dieser Konzentrationsgradient kann nur durch aktiven Transport aufgebaut werden. Eine Gruppe von Transportern, die Saccharose

gegen einen Konzentrationsgradienten transportieren können sind sogenannte SUTs (sucrose uptake transporters). In Pollen von Tabakpflanzen wurde bereits ein SUT identifiziert (Lemoine *et al.*, 1999), allerdings nicht in Nektarien.

Bei *Arabidopsis* wurde SWEET9 nur im basalen Teil der Nektarien lokalisiert (Lin *et al.*, 2014). Es ist also nicht ausgeschlossen, dass es im Nektarparenchym verschiedene funktionelle Teilbereiche gibt, welche unterschiedliche Zuckerkonzentrationen und Sekretionsmechanismen aufweisen. Die weitere Identifizierung oder Lokalisation von Zuckertransportern im nektarproduzierenden Gewebe von *Nicotiana* wäre deshalb ein nächster Schritt zur Aufklärung der Regulation der Zuckerzusammensetzung und Konzentration im Nektar. Weitere Erkenntnisse könnten Daten über die subzellulären Metabolitkonzentrationen in den Nektarienzellen liefern. Die subzelluläre Fraktionierung ist in diesem Fall allerdings schwierig, da für die bisher verwendeten Methoden größere Mengen an Gewebe benötigt werden (Nadwodnik und Lohaus, 2008; Öner-Sieben und Lohaus, 2014; Findling *et al.*, 2015) und Nektariengewebe nur in sehr geringen Mengen gewonnen werden kann.

Das Saccharose-zu-Hexose-Verhältnis in den Nektarien bzw. im Nektar ist u.a. von der Aktivität zuckerspaltender Enzyme abhängig. Da bereits bekannt ist, dass die Zellwandinvertase CWINV4 in *Arabidopsis* notwendig für die Nektarproduktion ist (Ruhlmann *et al.*, 2010), wurde der Fokus in dieser Arbeit auf die Expression und Aktivität der Zellwandinvertasen in Tabaknektarien gelegt. Es konnte gezeigt werden, dass besonders bei Arten mit einem hohen Saccharoseanteil im Nektar (*N. sylvestris* und *N. tabacum*) das Expressionslevel mit der Enzymaktivität korrelierte (3. Ergebnisse Abschnitt IV Fig. 6). Allerdings wurde keine erhöhte Invertaseaktivität bei Pflanzen mit einem hohen Hexoseanteil im Nektar gefunden, wie zu erwarten gewesen wäre (Ruhlmann *et al.*, 2010). Daher muss davon ausgegangen werden, dass noch andere Enzyme eine Rolle bei der Bildung des Nektarzuckerprofils spielen, zum Beispiel lösliche Invertasen oder Enzyme, welche zur Zuckersynthese beitragen, beispielsweise die Saccharose-6-Phosphat-Synthase (SPS). Während es über lösliche Invertasen in Nektarien noch keine Studien gibt, ist die essentielle Funktion der SPS bei der Nektarproduktion bereits bekannt (Lin *et al.*, 2014).

Ein weiterer Unterschied zwischen tag- und nachtblühenden *Nicotiana*-Arten ergab sich aus den unterschiedlichen Saccharose-zu-Hexose-Verhältnissen in Nektar und in den Nektarien. Zwar war bei allen Arten der Anteil an Saccharose an der Gesamtzuckerkonzentration im Nektar niedriger als in den Nektarien, die Differenz des Saccharose-zu-Hexose-Verhältnisses zwischen Nektar und Nektarien waren aber bei tagaktiven Arten deutlich ausgeprägter (3. Ergebnisse Abschnitt IV Tab. 1). Daraus folgt, dass während der Sekretion

die Spaltung von Saccharose bei tagaktiven Arten vermutlich stärker ist als bei nachtaktiven Arten, beispielsweise durch extrazelluläre Hydrolyse von Saccharose durch Zellwandinvertasen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zuckerzusammensetzung während der Sekretion zumindest teilweise verändert wird, entweder durch den selektiven Transport von Zuckern und/oder die Aktivität von Zucker-spaltenden Enzymen, wie z.B. Zellwandinvertasen (3. Ergebnisse Abschnitt IV Fig. 8).

Es kann davon ausgegangen werden, dass nach der Sekretion keine weiteren post-sekretionalen Modulationsprozesse ablaufen, da nach zwei Tagen keine Veränderung der Zuckerzusammensetzung im Nektar der untersuchten Tabakarten nachgewiesen werden konnte (3. Ergebnisse Abschnitt IV Fig. 7). Dieses Ergebnis wird dadurch gestützt, dass auch bei der SDS-PAGE keine Invertasen im Nektar gefunden wurden (3. Ergebnisse Abschnitt III; Zha *et al.*, 2012; Kerchner *et al.*, 2015).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Nektarzuckerzusammensetzung sowohl bei tag- als auch bei nachtblühenden Tabakarten bereits vor oder während der Sekretion festgelegt wird. Das Ausmaß der einzelnen Prozesse, die zur unterschiedlichen Nektarzuckerzusammensetzung führen, unterscheidet sich jedoch bei tag- und nachtblühenden Arten.

## Literatur

- Abrahamczyk S, Kessler M, Hanley D et al.** 2017. Pollinator adaptation and the evolution of floral nectar sugar composition. *Journal of Evolutionary Biology* **30**, 112–127.
- Adler LS, Seifert MG, Wink M, Morse GE, Turlings T.** 2012. Reliance on pollinators predicts defensive chemistry across tobacco species. *Ecology Letters* **15**, 1140–1148.
- Alvarez-Perez S, Herrera CM.** 2013. Composition, richness and nonrandom assembly of culturable bacterial–microfungal communities in floral nectar of Mediterranean plants. *FEMS Microbiology Ecology* **83**, 685–699.
- Anderson MJ.** 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral ecology* **26**, 32–46.
- Baker HG.** 1961. The adaptation of flowering plants to nocturnal and crepuscular pollinators. *Quarterly Review of Biology*, 64–73.
- Baker HG, Baker I.** 1973. Amino-acids in Nectar and their Evolutionary Significance. *Nature* **241**, 543–545.
- Baker HG, Baker I.** 1975. Studies of nectar-constitution and pollinator-plant coevolution. *Coevolution of animals and plants* **100**, 591–600.
- Baker HG, Baker I.** 1982. Chemical constituents of nectar in relation to pollination mechanisms and phylogeny. *Biochemical aspects of evolutionary biology* **131**, 171.
- Baker HG, Baker I.** 1983. Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. *Handbook of experimental pollination biology* **117**, 141.
- Baker HG, Baker I.** 1990. The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator types. *Israel Journal of Botany*, 157–166.
- Barlow CA, McCully ME.** 1972. The ruby laser as an instrument for cutting the stylets of feeding aphids. *Canadian Journal of Zoology* **50**, 1497–1498.
- Bernardello G.** 2007. A systematic survey of floral nectaries. *Nectaries and nectar*, 19–128.
- Blum H, Beier H, Gross HJ.** 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93–99.
- Blüthgen N, Fiedler K.** 2004. Preferences for sugars and amino acids and their conditionality in a diverse nectar-feeding ant community. *Journal of Animal Ecology* **73**, 155–166.
- Brandenburg A, Dell'Olivo A, Bshary R, Kuhlemeier C.** 2009. The sweetest thing: advances in nectar research. *Current opinion in plant biology* **12**, 486–490.
- Brockmüller T, Ling Z, Li D, Gaquerel E, Baldwin IT, Xu S.** 2017. *Nicotiana attenuata* Data Hub (NaDH): An integrative platform for exploring genomic, transcriptomic and metabolomic data in wild tobacco. *BMC genomics* **18**, 79.

- Calder WA.** 1979. On the temperature-dependency of optimal nectar concentrations for birds. *Journal of Theoretical Biology* **78**, 185–196.
- Canto A, Herrera CM, Medrano M, Pérez R, García IM.** 2008. Pollinator foraging modifies nectar sugar composition in *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae): An experimental test. *American Journal of Botany* **95**, 315–320.
- Cardoso-Gustavson P, Davis AR.** 2015. Is nectar reabsorption restricted by the stalk cells of floral and extrafloral nectary trichomes? *Plant biology (Stuttgart, Germany)* **17**, 134–146.
- Carter CJ, Graham RA, Thornburg RW.** 1999. Nectarin I is a novel, soluble germin-like protein expressed in the nectar of *Nicotiana sp.* *Plant molecular biology* **41**, 207–216.
- Carter CJ, Healy RA, O'Tool NM et al.** 2007. Tobacco nectaries express a novel NADPH oxidase implicated in the defense of floral reproductive tissues against microorganisms. *Plant Physiology* **143**, 389–399.
- Carter CJ, Shafir S, Yehonatan L, Palmer RG, Thornburg RW.** 2006. A novel role for proline in plant floral nectars. *Die Naturwissenschaften* **93**, 72–79.
- Carter CJ, Thornburg RW.** 2004a. Is the nectar redox cycle a floral defense against microbial attack? *Trends in Plant Science* **9**, 320–324.
- Carter CJ, Thornburg RW.** 2004b. Tobacco Nectarin III is a Bifunctional Enzyme with Monodehydroascorbate Reductase and Carbonic Anhydrase Activities. *Plant molecular biology* **54**, 415–425.
- Carter CJ, Thornburg RW.** 2004c. Tobacco Nectarin V Is a Flavin-Containing Berberine Bridge Enzyme-Like Protein with Glucose Oxidase Activity. *Plant Physiology* **134**, 460–469.
- 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.
- Chase MW, Paun O, Fay MF.** 2010. Hybridization and speciation in angiosperms: a role for pollinator shifts? *BMC biology* **8**, 45.
- Chen L-Q, Cheung LS, Feng L, Tanner W, Frommer WB.** 2015. Transport of sugars. *Annual review of biochemistry* **84**.
- Chiang P-W, Song W-J, Wu K-Y et al.** 1996. Use of a fluorescent-PCR reaction to detect genomic sequence copy number and transcriptional abundance. *Genome research* **6**, 1013–1026.
- Clarkson JJ, Knapp S, Garcia VF, Olmstead RG, Leitch AR, Chase MW.** 2004. Phylogenetic relationships in *Nicotiana* (Solanaceae) inferred from multiple plastid DNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **33**, 75–90.

- Dorion S, Lalonde S, Saini HS.** 1996. Induction of Male Sterility in Wheat by Meiotic-Stage Water Deficit Is Preceded by a Decline in Invertase Activity and Changes in Carbohydrate Metabolism in Anthers. *Plant Physiology* **111**, 137–145.
- Durkee LT.** 1983. The ultrastructure of floral and extrafloral nectaries. *The biology of nectaries* **1**, 26.
- Eisenberg JF, Redford KH.** 1989. *Mammals of the Neotropics, Volume 3: Ecuador, Bolivia, Brazil*. University of Chicago Press.
- Fahn A.** 1979a. *Secretory tissues in plants*. Academic Press.
- Fahn A.** 1979b. Ultrastructure of nectaries in relation to nectar secretion. *American Journal of Botany*, 977–985.
- Fenster CB, Armbruster, W. Scott, Wilson P, Dudash MR, Thomson JD.** 2004. Pollination Syndromes and Floral Specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **35**, 375–403.
- Findling S, Zanger K, Krueger S, Lohaus G.** 2015. Subcellular distribution of raffinose oligosaccharides and other metabolites in summer and winter leaves of *Ajuga reptans* (Lamiaceae). *Planta* **241**, 229–241.
- Fisher DB, Frame JM.** 1984. A guide to the use of the exuding-stylet technique in phloem physiology. *Planta* **161**, 385–393.
- Fleming TH, Sahley CT, Holland JN, Nason JD, Hamrick JL.** 2001. Sonoran Desert columnar cacti and the evolution of generalized pollination systems. *Ecological Monographs* **71**, 511–530.
- Frey-Wyssling A.** 1955. The phloem supply to the nectaries. *Acta botanica neerlandica* **4**, 358–369.
- Gaffal KP, Friedrichs GJ, El-Gammal S.** 2007. Ultrastructural evidence for a dual function of the phloem and programmed cell death in the floral nectary of *Digitalis purpurea*. *Annals of Botany* **99**, 593–607.
- Ge Y-X, Angenent GC, Wittich PE et al.** 2000. NEC1, a novel gene, highly expressed in nectary tissue of *Petunia hybrida*. *The Plant Journal* **24**, 725–734.
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM.** 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome research* **6**, 995–1001.
- Godt DE, Roitsch T.** 1997. Regulation and Tissue-Specific Distribution of mRNAs for Three Extracellular Invertase Isoenzymes of Tomato Suggests an Important Function in Establishing and Maintaining Sink Metabolism. *Plant Physiology* **115**, 273–282.
- González-Teuber M, Heil M.** 2009. Nectar chemistry is tailored for both attraction of mutualists and protection from exploiters. *Plant Signaling & Behavior* **4**, 809–813.

- Goodspeed TH.** 1954. *The Genus Nicotiana: Origins, Relationships and Evolution of its Species in the light of their Distribution, Morphology and Cytogenetics*. Waltham, Massachusetts, USA: Chronica Botanica.
- Görg A, Postel W, Westermeier R.** 1978. Ultrathin-layer isoelectric focusing in polyacrylamide gels on cellophane. *Analytical Biochemistry* **89**, 60–70.
- Hajirezaei M-R, Bornke F, Peisker M et al.** 2003. Decreased sucrose content triggers starch breakdown and respiration in stored potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Journal of Experimental Botany* **54**, 477–488.
- Hanahan D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**, 557–580.
- Haydak MH.** 1970. Honey bee nutrition. *Annual review of Entomology* **15**, 143–156.
- Heil M.** 2011. Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science* **16**, 191–200.
- Heil M, Rattke J, Boland W.** 2005. Postsecretory hydrolysis of nectar sucrose and specialization in ant/plant mutualism. *Science (New York, N. Y.)* **308**, 560–563.
- Heineke D, Sonnewald U, Büssis D et al.** 1992. Apoplastic Expression of Yeast-Derived Invertase in Potato. *Plant Physiology*, 301–308.
- Helversen O von.** 1993. Adaptions of flowers to the pollination by glossophagine bats. In: Barthlott W., ed. *Animal plant interaction in tropical environments*. Bonn: Museum König, 41–59.
- Hendriksma HP, Oxman KL, Shafir S.** 2014. Amino acid and carbohydrate tradeoffs by honey bee nectar foragers and their implications for plant–pollinator interactions. *Journal of insect physiology* **69**, 56–64.
- Herrera CM, García IM, Pérez R.** 2008. Invisible Floral Larcenies: Microbial Communities degrade Floral Nectar of Bumble Bee-Pollinated Plants. *Ecology* **89**, 2369–2376.
- Herrera CM, Vega C de, Canto A, Pozo MI.** 2009. Yeasts in floral nectar: a quantitative survey. *Annals of Botany* **103**, 1415–1423.
- Hess D.** 1987. Die Blüte. Eine Einführung in Struktur und Funktion, Ökologie und Evolution der Blüten. Verlag Eugen Ulmer. *Review by PR Bell in New Phytol* **105**, 524–525.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R.** 1993. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nature Biotechnology* **11**, 1026–1030.
- Hilje B, Calvo-Alvarado J, Jiménez-Rodríguez C, Sánchez-Azofeifa A.** 2015. Tree species composition, breeding systems, and pollination and dispersal syndromes in three forest successional stages in a tropical dry forest in Mesoamerica. *Tropical Conservation Science* **8**, 76–94.



- Horner HT, Healy RA, Ren G et al.** 2007. Amyloplast to chromoplast conversion in developing ornamental tobacco floral nectaries provides sugar for nectar and antioxidants for protection. *American Journal of Botany* **94**, 12–24.
- Howell DJ.** 1974. Bats and pollen: Physiological aspects of the syndrome of chiropterophily. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **48**, 263–276.
- Ippolito A.** 2000. Systematics, floral evolution and speciation in *Nicotiana*. *PhD. diss. University of Missouri, Columbia, MO.*
- Jacquemyn H, Lenaerts M, Tyteca D, Lievens B.** 2013. Microbial diversity in the floral nectar of seven *Epipactis* (Orchidaceae) species. *MicrobiologyOpen* **2**, 644–658.
- Jersáková J, Johnson SD.** 2006. Lack of floral nectar reduces self-pollination in a fly-pollinated orchid. *Oecologia* **147**, 60–68.
- Kaczorowski RL.** 2007. *Nectar in Nicotiana: Pollinator associations, sources of variations, and evolutionary consequences.*
- 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.
- Kerchner A, Darok J, Bacskay I, Felinger A, Jakab G, Farkas A.** 2015. Protein and alkaloid patterns of the floral nectar in some solanaceous species. *Acta biologica Hungarica* **66**, 304–315.
- Kessler D, Baldwin IT.** 2007. Making sense of nectar scents: the effects of nectar secondary metabolites on floral visitors of *Nicotiana attenuata*. *The Plant Journal* **49**, 840–854.
- Knapp S, Chase MW, Clarkson JJ.** 2004. Nomenclatural changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (Solanaceae). *Taxon*, 73–82.
- 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.
- Koch KE.** 1996. Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **47**, 509–540.
- Koenen M, Rütter U, Müller-Hill B.** 1982. Immunoenzymatic detection of expressed gene fragments cloned in the *lac Z* gene of *E. coli*. *The EMBO journal* **1**, 509–512.
- Konno Y, Vedvick T, Fitzmaurice L, Mirkov TE.** 1993. Purification, characterization, and subcellular localization of soluble invertase from tomato fruit. *Journal of plant physiology* **141**, 385–392.
- Kram BW, Carter CJ.** 2009. *Arabidopsis thaliana* as a model for functional nectary analysis. *Sexual Plant Reproduction* **22**, 235–246.

- Kram BW, Xu WW, Carter CJ.** 2009. Uncovering the *Arabidopsis thaliana* nectary transcriptome: investigation of differential gene expression in floral nectariferous tissues. *BMC plant biology* **9**, 92.
- Krausgrill S, Sander A, Greiner S, Weil M, Rausch T.** 1996. Regulation of cell wall invertase by a proteinaceous inhibitor. *Journal of Experimental Botany* **47 Spec No**, 1193–1198.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M et al.** 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* **27**, 95–125.
- Kugler H.** 1970. *Blütenökologie*. Stuttgart: Gustav Fischer.
- Kunst F, Pascal M, Lepesant J-A, Walle J, Dedonder R.** 1974. Purification and Some Properties of an Endocellular Sucrase from a Constitutive Mutant of *Bacillus subtilis* Marburg 168. *European Journal of Biochemistry* **42**, 611–620.
- La Barrera E de, Nobel PS.** 2004. Nectar: properties, floral aspects, and speculations on origin. *Trends in Plant Science* **9**, 65–69.
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Leins P, Erbar C.** 2000. *Blüte und Frucht: Aspekte der Morphologie, Entwicklungsgeschichte, Phylogenie, Funktion und Ökologie*. Stuttgart: Schweizerbart.
- Lemoine R, Bürkle L, Barker L et al.** 1999. Identification of a pollen-specific sucrose transporter-like protein NtSUT3 from tobacco. *FEBS letters* **454**, 325–330.
- Lenaerts M, Goelen T, Paulussen C et al.** 2017. Nectar bacteria affect life history of a generalist aphid parasitoid by altering nectar chemistry. *Functional Ecology* **80**, 591.
- Liang Q, Richardson T.** 1992. A simple and rapid method for screening transformant yeast colonies using PCR. *Biotechniques* **13**, 730-2, 735.
- Lievens B, Hallsworth JE, Pozo MI et al.** 2014. Microbiology of sugar-rich environments: diversity, ecology and system constraints. *Environmental microbiology*.
- Lin IW, Sosso D, Chen L-Q et al.** 2014. Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature* **508**, 546–549.
- Liu D, Shi L, Han C, Yu J, Li D, Zhang Y.** 2012. Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected *Nicotiana benthamiana* using quantitative real-time PCR. *PLoS ONE* **7**, e46451.
- Liu G, Ren G, Guirgis A, Thornburg RW.** 2009. The MYB305 transcription factor regulates expression of nectarin genes in the ornamental tobacco floral nectary. *The Plant cell* **21**, 2672–2687.
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L.** 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry* **163**, 16–20.

- 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, Schwerdtfeger M.** 2014. Comparison of sugars, iridoid glycosides and amino acids in nectar and phloem sap of *Maurandya barclayana*, *Lophospermum erubescens*, and *Brassica napus*. *PLoS ONE* **9**, e87689.
- Lohaus G, Winter H, Riens B, Heldt HW.** 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. *Plant biology (Stuttgart, Germany)* **108**, 270–275.
- Lorenz K, Lienhard S, Sturm A.** 1995. Structural organization and differential expression of carrot  $\beta$ -fructofuranosidase genes: identification of a gene coding for a flower bud-specific isozyme. *Plant molecular biology* **28**, 189–194.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry* **193**, 265–275.
- Marlin D, Nicolson SW, Sampson JD, Krüger K.** 2016. Insights into the pollination requirements of the only African wild tobacco, *Nicotiana africana* (Solanaceae) from the Namib Desert. *Journal of Arid Environments* **125**, 64–67.
- Martin I, Débarbouillé M, Ferrari E, Klier A, Rapoport G.** 1987. Characterization of the levanase gene of *Bacillus subtilis* which shows homology to yeast invertase. *Molecular and General Genetics MGG* **208**, 177–184.
- Mayfield MM, Waser NM, Price MV.** 2001. Exploring the ‘most effective pollinator principle’ with complex flowers: Bumblebees and *Ipomopsis aggregata*. *Annals of Botany* **88**, 591–596.
- Merxmüller H, Buttler KP.** 1975. *Nicotiana* in der afrikanischen Namib - ein pflanzengeografisches und phylogenetisches Rätsel. *Mitteilungen der botanischen Staatssammlung München*, 91–104.
- Michener CD.** 2000. *The bees of the world*: JHU press.
- Mosti S, Ross Friedman C, Pacini E, Brighigna L, Papini A.** 2013. Nectary ultrastructure and secretory modes in three species of *Tillandsia* (Bromeliaceae) that have different pollinators. *Botany* **91**, 786–798.
- Muchhala N.** 2003. Exploring the boundary between pollination syndromes: Bats and hummingbirds as pollinators of *Burmeistera cyclostigmata* and *B. tenuiflora* (Campanulaceae). *Oecologia* **134**, 373–380.
- Müller A, Diener S, Schnyder S, Stutz K, Sedivy C, Dorn S.** 2006. Quantitative pollen requirements of solitary bees: Implications for bee conservation and the evolution of bee–flower relationships. *Biological Conservation* **130**, 604–615.

- Müller-Jahncke W-D, Friedrich C, Meyer U.** 2005. *Arzneimittelgeschichte*: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Mullis KB, Faloona FA.** 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* **155**, 335–350.
- Mushtaq M, Jamal A, Nahar S.** 2007. Biodiversity of yeast mycoflora in nectar of *Hibiscus rosa-sinensis* and *Ixora coccinea* flowers. *Pakistan Journal of Botany* **39**, 1367–1376.
- 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.
- Naqvi SS, Harper A, Carter C et al.** 2005. Nectarin IV, a Potent Endoglucanase Inhibitor Secreted into the Nectar of Ornamental Tobacco Plants. Isolation, Cloning, and Characterization. *Plant Physiology* **139**, 1389–1400.
- Nepi M, Ciampolini F, Pacini E.** 1996. Development and Ultrastructure of *Cucurbita pepo* Nectaries of Male Flowers. *Annals of Botany* **78**, 95–104.
- Nepi M, Soligo C, Nocentini D et al.** 2012. Amino acids and protein profile in floral nectar: Much more than a simple reward. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **207**, 475–481.
- Nicolson SW, Nepi M, Pacini E.** 2007. *Nectaries and Nectar*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Ning X-p, Tang T-x, Wu H.** 2017. Relationship between the morphological structure of floral nectaries and the formation, transport, and secretion of nectar in lychee. *Trees* **31**, 1–14.
- Oksanen J, Kindt R, Legendre P et al.** 2008. The vegan package. *Community ecology package* **10**.
- Ollerton J, Alarcón R, Waser NM et al.** 2009. A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of Botany* **103**, 1471–1480.
- Ollerton J, Watts S.** 2000. Phenotype space and floral typology: Towards an objective assessment of pollination syndromes. *Det Norske Videnskaps-Akademi. I. Matematisk-Naturvidenskapelige Klasse, Skrifter, Ny Serie* **39**, 149–159.
- Öner-Sieben S, Lohaus G.** 2014. Apoplastic and symplastic phloem loading in *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior*. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1905–1916.
- Pacini E, Nepi M, Vesprini JL.** 2003. Nectar biodiversity: A short review. *Plant Systematics and Evolution* **238**, 7–21.
- Paiva ÉAS, Andrade Buono R, Neves Delgado M.** 2007. Distribution and structural aspects of extrafloral nectaries in *Cedrela fissilis* (Meliaceae). *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **202**, 455–461.

- Palmer LJ, Palmer LT, Pritchard J, Graham RD, Stangoulis JCR.** 2013. Improved techniques for measurement of nanolitre volumes of phloem exudate from aphid stylectomy. *Plant methods* **9**, 18.
- Park S, Thornburg RW.** 2009. Biochemistry of Nectar Proteins. *Journal of Plant Biology* **52**, 27–34.
- Pate JS, Peoples MB, Storer PJ, Atkins CA.** 1985. The extrafloral nectaries of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) II. Nectar composition, origin of nectar solutes, and nectary functioning. *Planta* **166**, 28–38.
- Percival MS.** 1961. Types of Nectar in Angiosperms. *New Phytologist*, 235–281.
- Petanidou T, van Laere A, Ellis WN, Smets E.** 2006. What shapes amino acid and sugar composition in Mediterranean floral nectars?, 155–169.
- Peter CI, Johnson SD.** 2014. A pollinator shift explains floral divergence in an orchid species complex in South Africa. *Annals of Botany* **113**, 277–288.
- Peumans WJ, Smeets K, van Nerum K, van Leuven F, van Damme EJM.** 1997. Lectin and alliinase are the predominant proteins in nectar from leek (*Allium porrum* L.) flowers. *Planta* **201**, 298–302.
- Pfaffl MW.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, e45–e45.
- Pfaffl MW.** 2006. Relative quantification. *Real-time PCR* **63**, 63–82.
- Plowright RC.** 1987. Corolla depth and nectar concentration: An experimental study. *Canadian Journal of Botany* **65**, 1011–1013.
- Pozo MI, Herrera CM, Bazaga P.** 2011. Species richness of yeast communities in floral nectar of southern Spanish plants. *Microbial ecology* **61**, 82–91.
- Pozo MI, Lachance M-A, Herrera CM.** 2012. Nectar yeasts of two southern Spanish plants: The roles of immigration and physiological traits in community assembly. *FEMS Microbiology Ecology* **80**, 281–293.
- Prinzinger R, Lübben I, Schuchmann K-L.** 1989. Energy metabolism and body temperature in 13 sunbird species (*Nectariniidae*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **92**, 393–402.
- Pyke GH.** 1991. What does it cost a plant to produce floral nectar? *Nature* **350**, 58–59.
- Raguso RA, Levin RA, Foose SE, Holmberg MW, McDade LA.** 2003. Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination “syndromes” in *Nicotiana*. *Phytochemistry* **63**, 265–284.
- Ren G, Healy RA, Horner HT, James MG, Thornburg RW.** 2007a. Expression of starch metabolic genes in the developing nectaries of ornamental tobacco plants. *Plant Science* **173**, 621–637.

- Ren G, Healy RA, Klyne AM, Horner HT, James MG, Thornburg RW.** 2007b. Transient starch metabolism in ornamental tobacco floral nectaries regulates nectar composition and release. *Plant Science* **173**, 277–290.
- Rexroth S, Meyer zu Tittingdorf JMW, Krause F, Dencher NA, Seelert H.** 2003. Thylakoid membrane at altered metabolic state: Challenging the forgotten realms of the proteome. *Electrophoresis* **24**, 2814–2823.
- Riens B, Lohaus G, Heineke D, Heldt H-W.** 1991. Amino Acid and Sucrose Content Determined in the Cytosolic, Chloroplastic, and Vacuolar Compartments and in the Phloem Sap of Spinach Leaves. *Plant Physiology*, 227–233.
- Riens B, Lohaus G, Winter H, Heldt H-W.** 1994. Production and diurnal utilization of assimilates in leaves of spinach (*Spinacia oleracea* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* **192**, 497–501.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT.** 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **245**, 154–160.
- Roitsch T, Balibrea ME, Hofmann M, Proels R, Sinha AK.** 2003. Extracellular invertase: Key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany* **54**, 513–524.
- Roitsch T, Bittner M, Godt DE.** 1995. Induction of Apoplastic Invertase of *Chenopodium rubrum* by D-Glucose and a Glucose Analog and Tissue-Specific Expression Suggest a Role in Sink-Source Regulation. *Plant Physiology* **108**, 285–294.
- Roitsch T, González M-C.** 2004. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* **9**, 606–613.
- Routley MB, Bertin RI, Husband BC.** 2004. Correlated evolution of dichogamy and self-incompatibility: A phylogenetic perspective. *International Journal of Plant Sciences* **165**, 983–993.
- Roy R, Schmitt AJ, Thomas JB, Carter CJ.** 2017. Review: Nectar biology: from molecules to ecosystems. *Plant Science*.
- Ruhmann JM, Kram BW, Carter CJ.** 2010. CELL WALL INVERTASE 4 is required for nectar production in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **61**, 395–404.
- Sarokin L, Carlson M.** 1984. Upstream region required for regulated expression of the glucose-repressible SUC2 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **4**, 2750–2757.
- Schmidt GW, Delaney SK.** 2010. Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Molecular genetics and genomics MGG* **283**, 233–241.

- 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. *Genome research* **4**, 234–238.
- Schueller SK.** 2004. Self-pollination in island and mainland populations of the introduced hummingbird-pollinated plant, *Nicotiana glauca* (Solanaceae). *American Journal of Botany* **91**, 672–681.
- Seo PJ, Wielsch N, Kessler D et al.** 2013. Natural variation in floral nectar proteins of two *Nicotiana attenuata* accessions. *BMC Plant Biology* **13**, 101.
- Sherson SM, Alford HL, Forbes SM, Wallace G, Smith SM.** 2003. Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **54**, 525–531.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M.** 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry* **68**, 850–858.
- Smets E.** 1988. La présence des "nectaria persistentia" chez les Magnoliophytina (Angiospermes). *The occurrence of the "nectaria persistentia" in the Magnoliophytina (Angiospermae)*. *Candollea* **43**, 709–716.
- Ståhlberg T, Woodley JM, Riisager A.** 2012. Enzymatic isomerization of glucose and xylose in ionic liquids. *Catalysis Science & Technology* **2**, 291–295.
- Stebbins GL.** 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: Pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1**, 307–326.
- Stehmann JR, Semir J, Ippolito A.** 2002. *Nicotiana mutabilis* (Solanaceae), a new species from southern Brazil.
- Stpiczyńska M, Nepi M, Zych M.** 2014. Nectaries and male-biased nectar production in protandrous flowers of a perennial umbellifer *Angelica sylvestris* L. (Apiaceae). *Plant Systematics and Evolution*.
- Sturm A.** 1999. Invertases. Primary Structures, Functions, and Roles in Plant Development and Sucrose Partitioning. *Plant Physiology* **121**, 1–8.
- Sturm A, Chrispeels MJ.** 1990. cDNA cloning of carrot extracellular beta-fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *The Plant cell* **2**, 1107–1119.
- Sturm A, Šebková V, Lorenz K, Hardegger M, Lienhard S, Unger C.** 1995. Development- and organ-specific expression of the genes for sucrose synthase and three isoenzymes of acid  $\beta$ -fructofuranosidase in carrot. *Planta* **195**, 601–610.
- Teulier I, Weber JM, Crevier J, Darveau CA.** 2016. *Proline as a fuel for insect flight: Enhancing carbohydrate oxidation in hymenopterans*: The Royal Society.

- Tiedge K, Lohaus G.** 2017. Nectar sugars and amino acids in day- and night-flowering *Nicotiana* species are more strongly shaped by pollinators' preferences than organic acids and inorganic ions. *PLoS ONE* **12**, e0176865.
- van der Pijl L.** 1961. Ecological aspects of flower evolution. II. Zoophilous flower classes. *Evolution* **15**, 44–59.
- Vandesompele J, Preter K de, Pattyn F et al.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**, research0034.1.
- Vassilyev AE.** 2010. On the mechanisms of nectar secretion: revisited. *Annals of Botany* **105**, 349–354.
- Waller GD.** 1972. Evaluating Responses of Honey Bees to Sugar Solutions Using an Artificial-Flower Feeder. *Annals of the Entomological Society of America* **65**, 857–862.
- Waser NM, Ollerton J.** 2006. *Plant-pollinator interactions: From specialization to generalization*. Chicago: University of Chicago Press.
- Weber H, Heim U, Golombek S, Borisjuk L, Manteuffel R, Wobus U.** 1998. Expression of a yeast-derived invertase in developing cotyledons of *Vicia narbonensis* alters the carbohydrate state and affects storage functions. *The Plant journal for cell and molecular biology* **16**, 163–172.
- Weil M, Rausch T.** 1990. Cell Wall Invertase in Tobacco Crown Gall Cells: Enzyme Properties and Regulation by Auxin. *Plant Physiology* **94**, 1575–1581.
- Weschke W, Panitz R, Gubatz S et al.** 2003. The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *The Plant Journal* **33**, 395–411.
- Wessel D, Flügge UI.** 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry* **138**, 141–143.
- Wilson CM.** 1983. Staining of proteins on gels: Comparisons of dyes and procedures. *Methods in enzymology* **91**, 236–247.
- Wist TJ, Davis AR.** 2006. Floral nectar production and nectary anatomy and ultrastructure of *Echinacea purpurea* (Asteraceae). *Annals of Botany* **97**, 177–193.
- Witt T, Jürgens A, Gottsberger G.** 2013. Nectar sugar composition of European Caryophylloideae (Caryophyllaceae) in relation to flower length, pollination biology and phylogeny. *Journal of Evolutionary Biology* **26**, 2244–2259.
- Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ.** 1997. The LightCycler™: A microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* **22**, 176–181.
- Wong ML, Medrano JF.** 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* **39**, 75–88.



- Woodcock DM, Crowther PJ, Doherty J et al.** 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 DP, Read DJ, Scholes JD.** 1998. Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell & Environment*, 881–891.
- Wright JP, Fisher DB.** 1980. Direct measurement of sieve tube turgor pressure using severed aphid stylets. *Plant Physiology* **65**, 1133–1135.
- Wu L-L, Mitchell JP, Cohn NS, Kaufman PB.** 1993. Gibberellin (GA<sub>3</sub>) Enhances Cell Wall Invertase Activity and mRNA Levels in Elongating Dwarf Pea (*Pisum sativum*) Shoots. *International Journal of Plant Sciences* **154**, 280–289.
- Zha H-G, Flowers VL, Yang M, Chen L-Y, Sun H.** 2012. Acidic  $\alpha$ -galactosidase is the most abundant nectarin in floral nectar of common tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Annals of Botany* **109**, 735–745.

## Appendix

### Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Firma
Acrylamid/Bisacrylamid (A/B 29:1)	Roth
Adenosin-5'-triphosphat (ATP) Dinatriumsalz	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem
Ampicillin	Roth
Australian Liquid Smoke Hickory Natural	Sydney & Frances
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Roth
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Roth
Chloroform	VWR
Coomassie Brilliant Blue R250	AppliChem
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Bio&SELL
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol 96 %	Chemsolute
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid (Fmoc-Cl)	Sigma
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Sigma-Aldrich
Formaldehyd	Roth
6x Gelladepuffer (HP04.1)	Roth
D(+)-Glucose	Merck
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
Hefe-Extrakt	Roth
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Sigma
Isoamylalkohol	Roth

---

Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumnatriumtartrat Tetrahydrat	Roth
Kupfer(II)sulfat (CuSO <sub>4</sub> )	Merck
Lithiumchlorid (LiCl)	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth
Manganchlorid (MnCl <sub>2</sub> )	Roth
Methanol	Roth
β-Mercaptoethanol	Merck
N,N,N',N',Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem
Natriumacetat	Roth
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Grüssing
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumthiosulfat (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Roth
Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP) Dinatriumsalz	Roth
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Fluka
Reinstwasser	Millipore Milli-Q® Anlage
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth
RNase AWAY®	Molecular Bio-Products
Roti-Mark Proteinstandard	Roth
D(+)Saccharose	Roth
Salzsäure (HCl)	VWR
Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> )	Chempur
Stickstoff, flüssig	Linde
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Trypton	Roth
Triton X-100	Fluka

---

**Auflistung der verwendeten Materialien**

Material	Firma
Cryovial® (T309-1A; 1,2 mL)	Simport
Restriktionsenzym Eco R1	Thermo Fisher
E-Cup-Mikropistill, PP	Eppendorf
Falcon Tubes (15 mL)	Sarstedt
Falcon Tubes (50 mL)	Roth
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific
Mikrolitermesszelle (LabelGuard)	Implen
Mikroreagiergefäß (1,5 mL; 2 mL; SafeSeal)	Sarstedt
Multiply®-Pro Gefäß (0,2 mL)	Sarstedt
Pipettenspitzen (5 mL, 1000 µL, 200 µL, 20 µL, 10 µL)	Sarstedt
pGEM-T-easy Vektor	Promega
Rotilabo®-Einmal-Küvetten, PS (Halbmikro; 1,6 mL)	Roth
Rührspatel, PS	Roth
Skalpell (inkl. Klinge Typ 21)	Roth
Spitzenfilter Nylonmembran (0,2 µm Porengröße)	Roth

**Auflistung der verwendeten Laborgeräte**

Gerät	Modell	Firma
Autoklav	Varioklav® Typ 400	H+P Labortechnik
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Biorad
Feinwaage	PA 112	Ohaus Corporation
Geldokumentation	Transilluminator, Kamera, PC, Drucker	INTAS UV-Systeme
Grobwaage	PA 2102	Ohaus Corporation
Kolbenhubpipette	5 mL	VWR
	1000 µL	VWR
	200 µL	Gilson Pipetman
	20 µL	Gilson Pipetman
	10 µL	VWR
Kühlzentrifuge	Mikro 200R	Hettich
	Micro Star 17R	VWR
Luftbefeuchter	BH860E	Honeywell
Magnetrührer	RSM-10HS	Phoenix Instrument

Minizentrifuge	T464.1	Roth
NanoDrop	NanoDrop Lite	Thermo Scientific
Thermocycler	Mastercycler® personal	Eppendorf
	Mastercycler® gradient	Eppendorf
pH-Meter	FiveEasy	Mettler Toledo
Photometer	Genesys 10S UV/VIS Spectrophotometer	Thermo Scientific
NanoDrop	NanoDrop Lite	Thermo Scientific
qPCR System	Mx3005p	Stratagene
Rotationsverdampfer	RV 10	VWR
Schütteltruhe	G25	New Brunswick Scientific
Spannungsgeber	E143	Consort
Sterilarbeitsbank	Anthos LAF-Sicherheitsbank 48	Antares
Thermo-Schüttler	PHMT	Grant-bio
	TS1 Thermoshaker	biometra
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus
	Centrifuge 5424	Eppendorf
	Micro Star 17	VWR
Trockenschrank	Modell 200	Memmert
	RD115	Binder
Vortex-Schüttler	VV3	VWR
Wasserbad	VWB2	VWR

### Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
c	konzentration
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat

---

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	expressed sequence tag
F	Fructose
Fig.	Abbildung
FG	Frischgewicht
G	Glucose
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
GOI	gene of interest
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HKG	housekeeping gene
HK/G6P-DH	Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
l	Liter
LB	lysogeny broth (Nährmedium)
m	Milli
M	Molar [mol/l]
min	Minute
μ	Mikro
MW	Molekülmasse
n	Anzahl der Messungen
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionen-Aktivität
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
S	Saccharose

---

---

SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit) [ $\mu\text{mol}$ Substrat/min]
v/v	Volumenanteil
w/v	Gewichtsanteil
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

---

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium der Konrad-Adenauer-Stiftung gefördert.

Ganz herzlich möchte ich Frau Prof'in Dr. Gertrud Lohaus danken für die Möglichkeit die Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen, die intensive Betreuung und die Freiheit, eigene Ideen in der Forschung umzusetzen.

Des Weiteren möchte ich Frau Prof'in Dr. Gela Preisfeld und Sabine Stratmann-Lettner für die Möglichkeit danken, dass ich das Labor der Zoologie mitbenutzen durfte.

Für die Bereitstellung der Tabaksamen danke ich dem Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena, der Universität Rostock und dem Botanischen Garten der Ruhr-Universität Bochum.

Meiner Arbeitsgruppe danke ich für die vielen tollen gemeinsamen Stunden im Labor und außerhalb, für die Vorschläge und Korrekturen. Auch wegen euch bin ich immer gerne zur Arbeit gegangen. Besonders Daniel Fink möchte ich für die vielen praktischen Tipps vom Profi danken.

Tim Kreuzer danke ich für seine vielseitige technische Assistenz und Lea van Alst für die zusätzlichen Messungen der Invertase-Aktivität.

Mein riesiger Dank gilt Eddi Tiedge-Arnold. Ich danke dir von ganzem Herzen für deine Hilfe und dein Verständnis. Auf jeden Fall wäre die Datenanalyse und Statistik ohne dich wohl eine andere geworden.

Zum Abschluss möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir immer den Rücken freigehalten und meine Neugier erhalten haben.



## **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.

---

Kira Juliane Tiedge

(Wuppertal, im Februar 2018)