

# **Zuckertransport und Phloembeladung in Fagaceae und Salicaceae**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der

Bergischen Universität Wuppertal

angefertigt in der

Arbeitsgruppe für molekulare Pflanzenforschung/Pflanzenbiochemie (Botanik)

vorgelegt von

Elena Dobbelsstein

Wuppertal, im Februar 2019



**BERGISCHE  
UNIVERSITÄT  
WUPPERTAL**

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

2. Gutachterin: Prof'in Dr. Gela Preisfeld, Bergische Universität Wuppertal

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20190430-112440-8

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20190430-112440-8>]

*„Not all those who wander are lost.“*

**Bilbo Beutlin**

# I. Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
2.1	Aufbau des Phloems	7
2.2	Ferntransport	9
2.3	Phloem-Beladungsmechanismen	11
2.3.1	Passive Beladung durch Diffusion	12
2.3.2	Symplastische Beladung	13
2.3.3	Apoplastische Beladung	14
2.4	Saccharose Transporter	15
2.5	Phloembeladung bei Bäumen	17
2.6	Fragestellung	19
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
3.1	Pflanzenmaterial und experimentelle Bedingungen	21
3.2	Aufarbeitung des Pflanzenmaterials	21
3.3	Metabolitextraktion aus dem Pflanzengewebe	22
3.3.1	Zucker-Extraktion	22
3.3.2	Stärke-Extraktion	22
3.3.3	Phloensaft-Gewinnung	22
3.4	Nicht-wässrige-Fraktionierung	23
3.5	Analyse der Fraktionen	24
3.5.1	Proteinextraktion	24
3.5.2	Proteingehalt-Bestimmung nach Bradford	24
3.5.3	Markerenzym für das Cytosol: UDP-Glukose Assay	24
3.5.4	Markerenzym für die Vakuole: $\alpha$ -Mannosidase	25
3.5.5	Marker für die Chloroplasten: Chlorophyllbestimmung	25
3.6	Analyse der extrahierten Metaboliten	25
3.6.1	Zuckeranalyse	25
3.6.2	Stärke-Messung	26
3.7	Analyse der <i>minor vein</i> Struktur	26

3.8 Gewinnung von cDNA aus pflanzlichem Probenmaterial .....	27
3.8.1 RNA-Isolierung nach PINE.....	27
3.8.2 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration .....	28
3.8.3 cDNA-Synthese.....	28
3.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	28
3.10 Primerdesign.....	29
3.11 Agarosegel-Elektrophorese .....	29
3.12 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) .....	29
3.12.1 3'RACE .....	30
3.12.2 5'RACE .....	30
3.13 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR).....	31
3.14 Bakterienstämme und Anzuchtbedingungen.....	32
3.14.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	32
3.14.2 Herstellung von <i>E. coli</i> Dauerkulturen.....	32
3.15 Klonierungsstrategien.....	33
3.15.1 Klonierung in den pGEM-Teasy Vektor .....	33
3.15.2 Klonierung in den NEV-N Vektor.....	33
3.15.3 Plasmide .....	33
3.16 Heterologe Funktionsüberprüfung von FsSUT1 in Hefe .....	33
3.17 Lokalisation der Transporter im Blattgewebe .....	34
3.17.1 Fixierung und Einbettung des Gewebes .....	34
3.17.2 Dünnschnitte am Mikrotom.....	35
3.17.3 Vorbereitung für die Sonden-Synthese.....	36
3.17.4 Sonden-Synthese .....	37
3.17.4.1 Alkalische Hydrolyse .....	38
3.17.5 Hybridisierung der Sonde mit den Gewebeschnitten .....	38
3.17.5.1 Vorbereitung der Gewebeschnitte .....	38
3.17.5.2 Hybridisierung.....	38
3.17.5.3 Antikörper-Färbung.....	39
3.17.5.4 Permanente Einbettung.....	40

3.18	Verwendete Software .....	40
3.19	Statistische Analyse.....	41
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
4.1	<i>Minor vein</i> Anatomie.....	42
4.1.1	<i>Fagus sylvatica</i> .....	43
4.1.2	<i>Quercus robur</i> .....	44
4.1.3	<i>Salix caprea</i> .....	45
4.1.4	<i>Populus x canescens</i> .....	46
4.2	Subzelluläre Zuckerverteilung.....	47
4.2.1	Subzelluläre Zuckerverteilung in <i>Fagus sylvatica</i> .....	47
4.2.2	Subzelluläre Volumina in <i>Fagus sylvatica</i> .....	48
4.2.3	Subzelluläre Zuckerkonzentration in <i>Fagus sylvatica</i> .....	49
4.2.4	Saccharosegradient zwischen Phloem und Cytosol in <i>Fagus sylvatica</i> .....	50
4.3	Identifizierte Saccharosetransporter Sequenzen.....	50
4.4	Charakterisierung von FsSUT1 .....	53
4.4.1	Heterologe Funktionsüberprüfung.....	53
4.4.2	Lokalisation des Transkripts.....	54
4.5	Jahreszeitlicher Einfluss auf NSC-Gehalt und die SUT Expression .....	55
4.5.1	<i>Fagus sylvatica</i> .....	55
4.5.2	<i>Quercus robur</i> .....	57
4.5.3	<i>Salix caprea</i> .....	59
4.5.4	<i>Populus x canescens</i> .....	60
4.6	Einfluss von Licht auf den NSC-Gehalt und die SUT Expression.....	62
4.6.1	<i>Fagus sylvatica</i> .....	62
4.6.2	<i>Quercus robur</i> .....	63
4.6.3	<i>Salix caprea</i> .....	64
4.6.4	<i>Populus x canescens</i> .....	65
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>67</b>
5.1	Phloembeladung in Laubbaumarten.....	67
5.2	Apoplastische Phloembeladung in Fagaceae.....	69

5.3	Mögliche passive Beladung bei Salicaceae .....	70
5.4	Gewebespezifische Expression und mögliche Funktionen der SUTs .....	74
5.5	Expression von SUTs und NSC-Gehalt im Jahresverlauf .....	76
5.6	Regulativer Einfluss von Licht .....	78
<b>6</b>	<b>Fazit und Ausblick.....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>81</b>
7.1	Verwendete Oligonukleotide.....	81
7.2	Teilsequenzen der identifizierten Saccharosetransporter .....	82
7.3	Subzelluläre Zuckerkonzentration in <i>Fagus sylvatica</i> Blättern.....	83
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>Danksagungen.....</b>	<b>95</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>96</b>

## 1 Zusammenfassung

Ein grundlegender Schritt der Nährstoffverteilung in Pflanzen ist die Phloembeladung mit Photoassimilaten. Bäume werden bis heute aufgrund morphologischer und physiologischer Merkmale zu den passiven Phloembeladern durch Diffusion gezählt. Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass diese pauschale Annahme nicht für alle Baumarten gilt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden je zwei Vertreter der Laubbaumfamilien Fagaceae (*Fagus sylvatica* und *Quercus robur*) und Salicaceae (*Salix caprea* und *Populus x canescens*) bezüglich des Zuckertransportes innerhalb des Baumes und ihres Phloembeladungsmechanismus untersucht. Für *Q. robur* wurde bereits gezeigt, dass Diffusion aufgrund des Konzentrationsgradienten zwischen Phloem und Mesophyllzellen auszuschließen ist. In dieser Arbeit konnte durch die nicht-wässrige-Fraktionierung in *F. sylvatica* ebenfalls eine höhere Saccharosekonzentration im Phloem als im Cytosol der Mesophyllzellen festgestellt werden. Bei den beiden Salicaceae konnten keine Ergebnisse durch die nicht-wässrigen-Fraktionierung erzielt werden. Durch ein Screening mit degenerierten Primern wurde im Transkriptom aller Bäume Saccharosetransporter (SUT) Sequenzen gefunden. Ein Transporter aus *F. sylvatica*, FsSUT1, der vermutlich an der Phloembeladung beteiligt ist, wurde für eine weiterführende Charakterisierung ausgewählt. Durch heterologe Expression in Hefe zeigte sich, dass FsSUT1 Saccharose transportiert. Durch RNA *in situ*-Hybridisierung konnte das Transkript von FsSUT1 im Phloem lokalisiert werden.

Mittels quantitativer Echtzeit-PCR wurde die Expression der Transporter im Jahresverlauf und in Licht/Dunkel Verhältnissen untersucht. Es zeigte sich, dass alle Transporter in allen Geweben und zu jeder Jahreszeit unterschiedlich stark exprimiert wurden. Die Ergebnisse des Licht/Dunkel-Experimentes zeigten, dass die Expression der Transporter diurnal vom Licht beeinflusst wird. Gleichzeitig wurde der Zucker- und Stärkegehalt (*non structural carbohydrates*, NSC) der Gewebe bestimmt um Einblicke in das Zusammenspiel zwischen SUT-Expression und NSC zu gewinnen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die allgemeine Annahme, dass Bäume zu den passiven Phloembeladern gehören, zumindest nicht für die Fagaceae gilt. Für diese Familie kann vom apoplastischen Beladungsweg mittels SUT ausgegangen werden. Diese Hypothese wird durch die Charakterisierung von FsSUT1 unterstützt. Für die Salicaceae kann keine Aussage über den Konzentrationsgradienten getroffen werden, in der Literatur verfügbare Studien weisen für diese Familie auf den passiven Beladungsweg hin.

## 2 Einleitung

Bäume decken ihren Kohlenstoffbedarf durch die Fixierung von CO<sub>2</sub> aus der Atmosphäre. Die Fixierung des Kohlenstoffes erfolgt hauptsächlich in den photosynthetisch aktiven Blättern. Das Phloem transportiert diesen Kohlenstoff, zumeist in der Form der chemisch inerten Saccharose, zu anderen Geweben wie Wurzeln oder Samen. Die Versorgung mit Wasser wird durch das Xylem sichergestellt. Zusammen bilden Phloem und Xylem die Leitbündel und stellen die Basis für die Stoffverteilung in Pflanzen dar.

### 2.1 Aufbau des Phloems

Ausdifferenzierte Blätter stellen die wichtigste Kohlenhydratquelle (*source*) für Laubbäume dar. Die Blätter sind durchzogen von einem Adernetzwerk, welches in Ordnungen eingeteilt ist. Die Mittelrippe ist eine Ader 1. Ordnung, alle weiteren großen sichtbaren Adern werden als *major veins* bezeichnet, die sich in Richtung Blattrand immer weiter verzweigen und feiner werden, bis sie schließlich in den *minor veins* (4. bis 8. Ordnung) münden (Gamalei 1989) (Abbildung 1A).

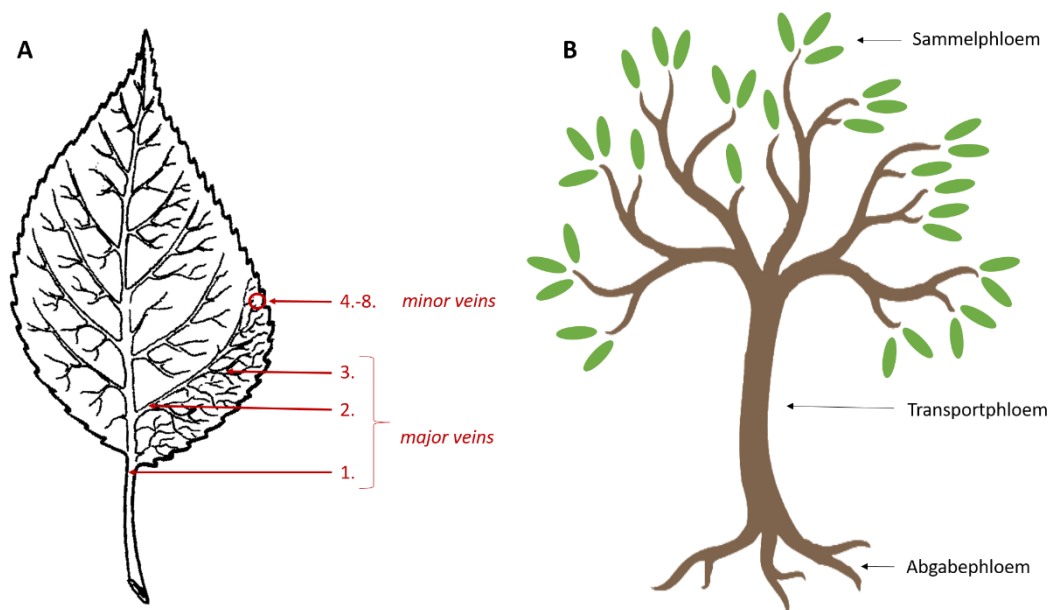


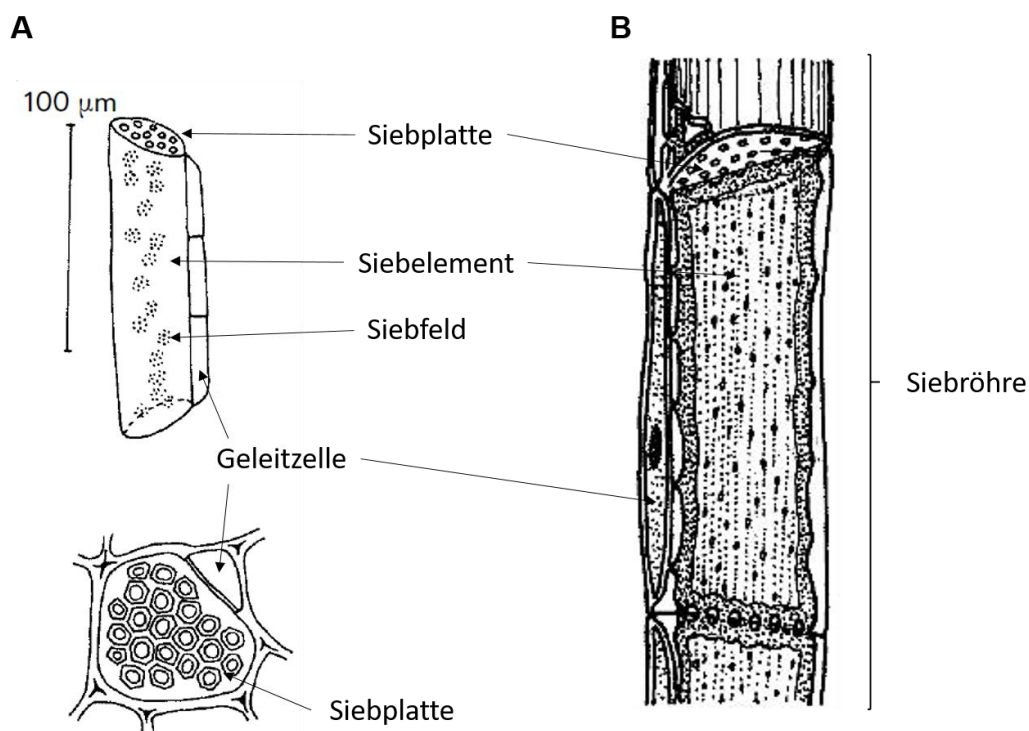
Abbildung 1: Übersicht der Blattnervatur und Gliederung des Phloems. A: Die Mittelrippe wird als Ader 1. Ordnung bezeichnet. Der Ordnungsgrad steigt mit der Verzweigung an. Bild von [biodidac.bio.uottawa.ca/index.htm](http://biodidac.bio.uottawa.ca/index.htm). B: Vereinfachte Darstellung der einzelnen Abschnitte des Phloems. In den Blättern werden Photoassimilate gesammelt (Sammelphloem) und über Äste und den Stamm (Transportphloem) zu den Wurzeln transportiert, wo sie ins Gewebe übergehen (Abgabephloem).

In den *minor veins* findet die Beladung des Phloems mit Photoassimilaten statt. Die Gesamtheit der *minor veins* wird daher als Sammelphloem bezeichnet (Abbildung 1B). An das Sammelphloem schließt sich das Transportphloem an, das eine doppelte Funktion erfüllt. Zum einen werden die Photoassimilate



zu den *sink*-Organen, z.B. der Wurzel transportiert, zum anderen versorgt es die axial liegenden *sink*-Organe mit ausreichend Nährstoffen. In den *sink*-Organen werden die Photoassimilate im Abgabephloem entladen. Zusätzlich zu den Photoassimilaten wird noch eine Vielzahl weiterer Stoffe im Phloem transportiert, wie Aminosäuren, anorganische Ionen, Nukleinsäuren und Proteine (Byrne und Miller 1990, Ohshima et al. 1990, Atkins et al. 2011).

Das Phloem der Angiospermen besteht auf zellulärer Ebene aus dem Siebelement-Geleitzellkomplex (Abbildung 2). In den Siebelementen findet der eigentliche Transport statt. Charakteristisch für diesen Zelltyp ist das Fehlen von Zellkern und Vakuole, andere Zellorganellen wie Mitochondrien und Plastiden sind in ihrer Zahl reduziert und nehmen eine wandständige Position an.

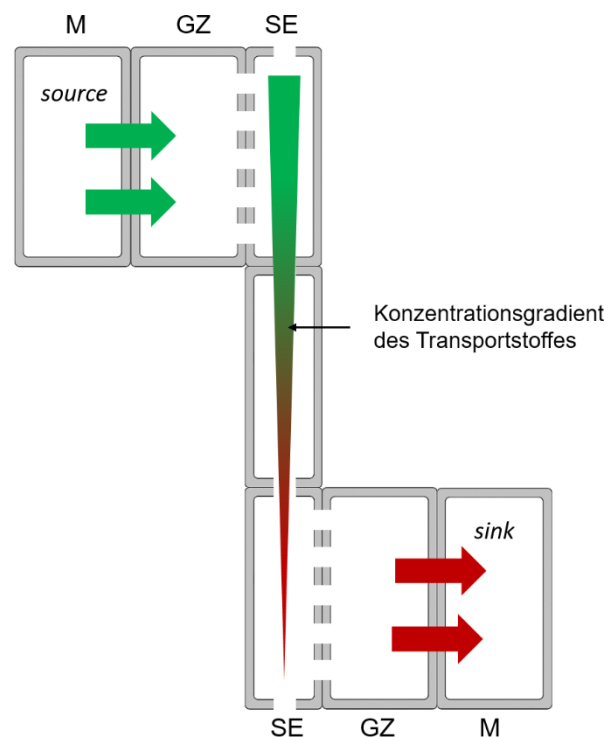


**Abbildung 2: Zellen des Phloems der Angiospermen. A oben: Übersicht eines Siebelementes. A unten: Aufsicht auf die Querwand eines Siebelement-Geleitzellkomplex. Bilder aus Esaus 2006 entnommen und modifiziert. B: Aus mehreren Siebelementen zusammengesetzte Siebröhre. Bild von biodidac.bio.uottawa.ca/index.htm.**

Entlang der Zellwand und in den Querwänden bilden sich Bereiche mit besonders vielen Siebporen (Abbildung 2A). Durch diese Siebfelder steht das Siebelement mit der ihr assoziierten Geleitzelle in Verbindung. Die Geleitzelle versorgt das Siebelement und belädt es mit Photoassimilaten. Sie zeichnet sich durch besonders viele Mitochondrien und einen großen Zellkern aus. Die Siebelemente stehen durch große Siebfelder in ihren Querwänden (Siebplatten) mit anderen Siebelementen in Verbindung und bilden so große durchgängige Siebröhren (Abbildung 2B).

## 2.2 Ferntransport

Die theoretische Grundlage des Stoff-Ferntransportes im Phloem wurden 1930 von Münch in der Druckstromtheorie beschrieben. In dieser wird der Massenstrom im Phloem durch den Unterschied im osmotischen Druck zwischen *source* und *sink* Gewebe aufrechterhalten. In den *source*-Organen wird das Phloem mit osmotisch aktiven Substanzen wie dem Transportzucker beladen. Dadurch steigt der osmotische Druck und das Wasserpotential sinkt, was einen Wassereinstrom und einen erhöhten Turgordruck zur Folge hat, der den Transportstrom durch die Siebelemente strömen lässt. In den *sink*-Organen wird das Phloem entladen und der osmotische Druck sinkt. Das Wasserpotential steigt und Wasser strömt aus. Dadurch entsteht ein Konzentrationsgradient, der den Transportstrom aufrechterhält (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Darstellung der Druckstromtheorie von Münch (1930). Osmotisch aktive Stoffe z.B. Kohlenhydrate, werden in den Mesophyllzellen (M) der *source* Organen produziert und von der Geleitzelle (GZ) in das Siebelement (SE) geladen (grüne Pfeile). In den *sink* Organen wird das Phloem entladen (rote Pfeile). So entsteht ein Konzentrationsgradient in den Siebelementen, der den Transportstrom aufrechterhält.

In den letzten Jahrzehnten wurde über die Theorie von Münch breit diskutiert (Esau et al. 1957, Weatherley und Johnson 1968, Evert 1977, Dale und Sutcliffe 1986, Knoblauch und Peters 2010). Die physikalische Grundlage um Massenströmungen zu beschreiben ist das Hagen-Poiseuille-Gesetz:

$$U = \frac{k \Delta p}{\eta L}$$

mit  $U$ : Flussgeschwindigkeit;  $k$ : Permeabilität des Phloems;  $\Delta p$ : Druckunterschied zwischen *source*- und *sink*-Gewebe;  $\eta$ : Viskosität des Phloemsaftes  $L$ : Länge des Phloems.

Aus dieser Gleichung folgt, dass die Flussgeschwindigkeit mit zunehmender Transportstrecke abnimmt. Der Stofftransport im Phloem über den Massenstrom ist anerkannt, jedoch ließen theoretische Modelle Zweifel an einem ausreichenden Druckunterschied zwischen *source*- und *sink*-Organen aufkommen. Thompson und Holbrook (2003) veröffentlichten eine Studie in der sie berechneten, dass der für die Aufrechterhaltung des Massestroms benötigte Druck den in den Siebröhren generierten Druck übersteigt. Als mögliche Lösung schlugen sie vor, das Phloem nicht als eine zusammenhängende, durchgängige Röhre zu betrachten, sondern als Aneinanderreihung mehrerer Abschnitte, zwischen denen Be- und Entladung stattfindet (Aikmann 1980).

In einer neueren Studie wiesen Knoblauch et al. (2016) daraufhin, dass bei diesen Berechnungen nur zwei der fünf Größen des Hagen-Poiseuille-Gesetzes bekannt sind. Für die Transportlänge wird zumeist die Größe der Pflanze angenommen und die Flussgeschwindigkeit des Phloems kann durch verschiedene Methoden wie z.B. durch den Einsatz von radioaktiv markierten Isotopen (Babst et al. 2005) oder durch die Verfolgung von Farbstoffen (Savage et al. 2013) gemessen werden. Die anderen Größen der Gleichung sind schwierig zu messen, da eine Verletzung des Phloems bei Vorbereitungen für *in vivo* Experimente unvermeidlich ist und der Massenstrom sofort stoppt (Knoblauch et al. 2016). Knoblauch et al. untersuchten den Ferntransport an der Blauen Prunkweide (*Ipomoea nil*) mit neuen Methoden, die es erlaubten auch die anderen Parameter des Gesetzes zu messen. Ihre Ergebnisse stützen die Theorie von Münch. Sie betonten in diesem Zusammenhang, dass mit steigender Transportlänge auch die Permeabilität der Siebröhren aufgrund vergrößerter Siebfelder in den Siebplatten anstieg. Ohne die Messung und den Einbezug dieser morphologischen Anpassung hätten die Ergebnisse dieser Studie der Theorie von Münch widersprochen (Knoblauch et al. 2016). In einer Studie an Blättern von *Populus x canescens* untersuchten Carvalho et al. (2017) das vaskuläre Netzwerk aus Phloem und Xylem und dessen Veränderung in *minor* bzw. *major veins*. Ihre Ergebnisse stützen ebenfalls die Druckstromtheorie. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Theorie von Münch schwierig zu beweisen, aber aufgrund ihrer Einfachheit weitestgehend akzeptiert ist (Knoblauch und Peters 2017).

### 2.3 Phloem-Beladungsmechanismen

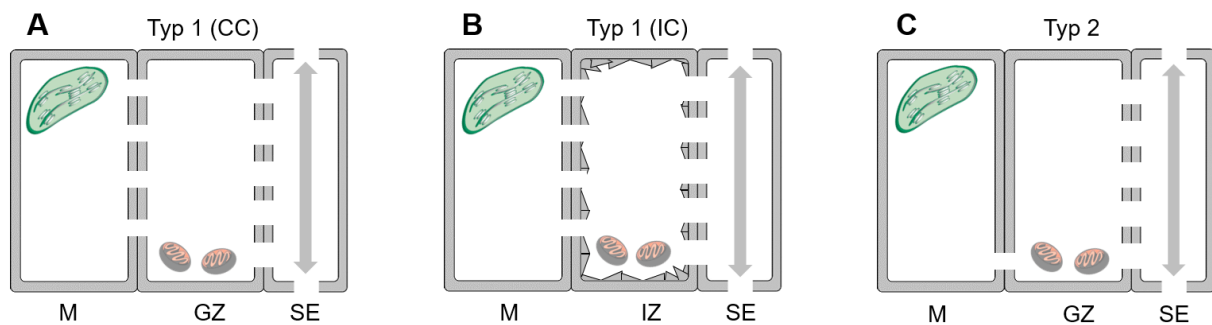
In der Literatur wird die Beladung des Phloems mit Kohlenhydraten durch drei verschiedenen Mechanismen beschrieben. Diese sind abhängig von der Anatomie der *minor veins* (Gamalei 1989), den transportierten Zuckern (Zimmermann und Ziegler 1975), dem Konzentrationsgradienten für den Transportzucker (Nawodnik und Lohaus 2008) und der Beteiligung von Saccharosetransportern (SUT) (Sauer und Stolz 1994):

A) Passiver symplastischer Transport durch Diffusion (Turgeon und Medville 1998)

B) Aktiver symplastischer Transport durch das *polymer-trapping* Modell (Turgeon und Gowan 1990)

C) Aktiver apoplastische Beladung durch Saccharosetransporter (Riesmeier et al. 1992)

Welcher Beladungsmechanismus in einer Pflanze vorherrscht wird in der Literatur typischerweise basierend auf ihrer *minor vein* Anatomie bestimmt. Gamalei definierte 1989 verschiedene *minor vein* Typen und ordnete ihnen Beladungsmechanismen zu.

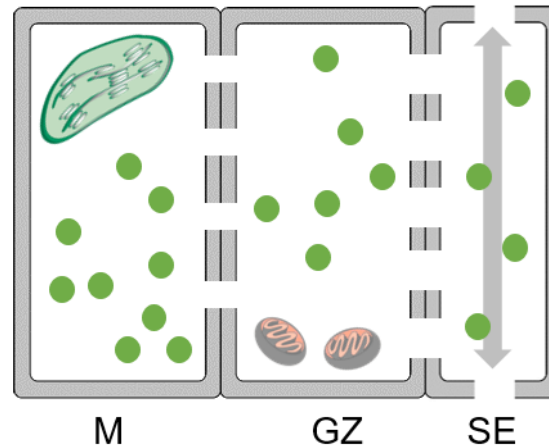


**Abbildung 4:** Übersicht der verschiedenen *minor vein* Typen. A: Offener Typ 1 mit normalen Geleitzellen (GZ). B: Offener Typ 1 mit Intermediärzellen (IZ). C: Geschlossener Typ 2. M: Mesophyllzelle, SE: Siebelement, SUT: Saccharosetransporter.

Im offenen *minor vein* Typ (Typ 1) stehen Mesophyll- und Geleitzellen durch viele Plasmodesmata in Verbindung. Pflanzen von Typ 1 können noch einmal anhand ihrer Geleitzellen in zwei Untergruppen eingeteilt werden (Davidson et al. 2011). Typ 1 (CC) Pflanzen haben normale Geleitzellen (Abbildung 4A), Typ 1 (IC) Pflanzen besitzen zusätzlich spezialisierte Intermediärzellen, in denen die Synthese von Saccharose zu Oligosacchariden erfolgt (Abbildung 4B). Beim geschlossenen *minor vein* Typ 2 bestehen wenig bis keine Verbindungen zwischen Geleit- und Mesophyllzelle (Abbildung 4C).

### 2.3.1 Passive Beladung durch Diffusion

Bei Pflanzen mit Typ 1 (CC) Anatomie und Saccharose als Haupttransportzucker im Phloem wird passive Diffusion als Beladungsmechanismus postuliert. Diese Art der Phloembeladung wird als evolutiv ursprünglich angesehen und stellt die einfachste Form der Phloembeladung dar (De Schepper et al. 2013). Die Saccharose wird am Ort der höchsten Konzentration, dem Cytosol der Mesophyllzellen, synthetisiert und kann von dort aus entlang ihres Konzentrationsgradienten ins Phloem diffundieren (Abbildung 5).



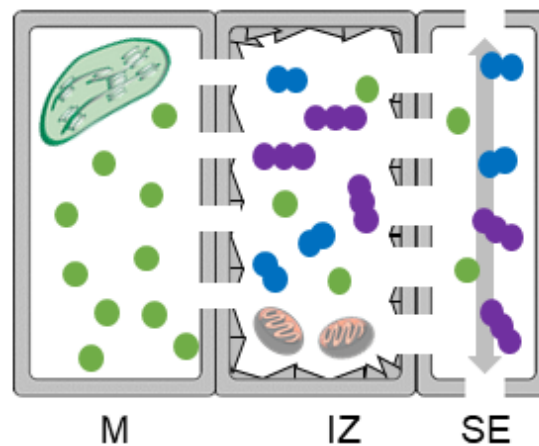
**Abbildung 5: Passive Phloembeladung.** Die Saccharose (grüner Kreis) diffundiert entlang ihres Konzentrationsgradienten aus den Mesophyllzellen (M) durch die Geleitzelle (GZ) in das Siebelement (SE).

Dieser Beladungsmechanismus wurde für Bäume das erste Mal von Turgeon und Medville (1998) beschrieben. Sie führten Plasmolyse-Experimente an *Salix babylonica* durch und stellten fest, dass sich das Plasmalemma im Phloem bei etwa derselben Konzentration des Osmotikums löst, wie das Plasmalemma des Mesophylls. Für Pappel und Kiefer wird die passive Beladung als der zurzeit am wahrscheinlichsten Mechanismus angesehen (Liesche 2017).

Da die passive Beladung durch Diffusion erfolgt, muss eine Regulation an einer anderen Stelle stattfinden. Eine Möglichkeit dafür ist die Kontrolle der cytosolischen Saccharosekonzentration. Die Vakuole ist ein Speicherort für viele Stoffe in der Zelle. In der Tonoplastmembran ist ein Saccharosetransporter lokalisiert, der den Export von Saccharose aus der Vakuole in das Cytosol steuert und somit die Saccharosekonzentration beeinflussen kann (Payyavula et al. 2011). Als einen weiteren regulatorischen Faktor wird die Permeabilität der Plasmodesmata diskutiert. Abhängig von Anzahl und Größe der Plasmodesmata können sie Diffusion erlauben, aber auch blockieren (Liesche 2017).

### 2.3.2 Symplastische Beladung

Pflanzen vom Typ 1 (IC) besitzen zusätzlich zu normalen Geleitzellen auch spezialisierte Intermediärzellen. Neben Saccharose transportieren diese Pflanzen größere Mengen Oligosaccharide der Raffinosefamilie (RFO) wie Raffinose und Stachyose im Phloem. Diese werden in den Intermediärzellen synthetisiert (Voitsekhoskaja et al. 2006). Saccharose diffundiert aus den Mesophyllzellen in die Intermediärzellen und wird dort durch die Addition von einem Galactinol zu Raffinose bzw. zu Stachyose, wenn ein weiteres Galactinol hinzugefügt wird, synthetisiert (Cao et al. 2013) (Abbildung 6). Einigen Arten verlängern bis zur Verbascose (Turgeon und Medville 2010). Diese verlängerten Moleküle können aufgrund ihrer Größe nicht mehr durch die Plasmodesmata zurück diffundieren.

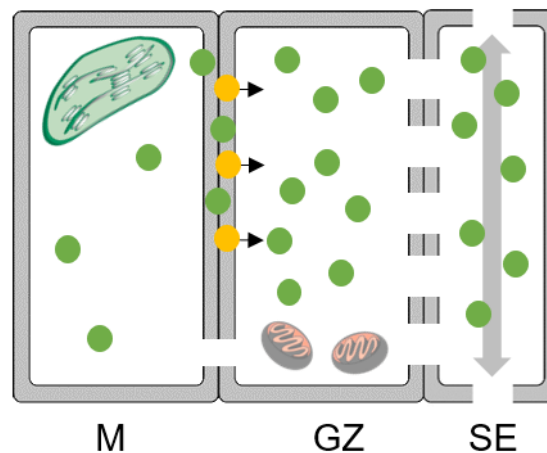


**Abbildung 6: Symplastische Phloembeladung (*polymer-trap*).** Die Saccharose (grün) diffundiert aus den Mesophyllzellen (M) in die Intermediärzellen (IZ) und wird dort zu RFO (blau: Raffinose, Stachyose: lila) umgesetzt. Von dort aus diffundieren sie ins Siebelement (SE).

Die Synthese der RFO-Zucker erfolgt dabei ausschließlich in den Intermediärzellen, da nur diese Zellen über die nötigen Voraussetzungen verfügen. Große Ansammlungen von endoplasmatischem Retikulum (ER) lagern sich an der Zellwand an und geben ihr eine raue Struktur. Die normalen Geleitzellen haben vermutlich die Funktion zusätzlich einen apoplastischen Beladungsweg zu ermöglichen (Knop et al. 2004). Diese Form der gemischten Beladung wurde in *Fraxinus excelsior* nachgewiesen (Öner-Sieben et al. 2015).

### 2.3.3 Apoplastische Beladung

Bei Pflanzen mit geschlossenem *minor vein* Typ 2 ist der symplastischen Weg aufgrund der fehlenden Verbindung zwischen Geleit- und Mesophyllzelle nicht möglich. Die Saccharose muss daher aus den Mesophyllzellen in den Apoplasten exportiert und anschließend in die Geleitzellen aufgenommen werden (Abbildung 7).

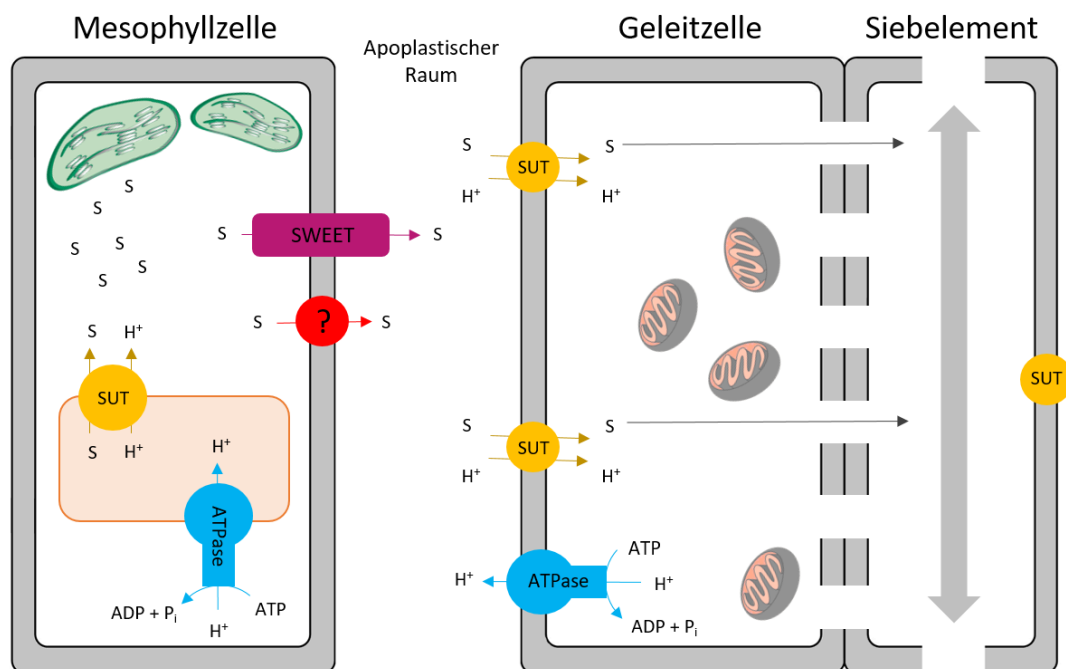


**Abbildung 7: Apoplastische Beladung.** Durch die fehlenden Plasmodesmata zwischen Mesophyllzelle (M) und Geleitzelle (GZ) wird die Saccharose (grün) in den Apoplasten exportiert und durch SUTs (gelb) in die Geleitzellen aufgenommen. Von dort aus diffundiert sie in das Siebelement (SE).

Der Export der Saccharose erfolgt vermutlich durch die SWEET-Transporter (*Sugars Will Eventually be Exported Transporters*), die die Saccharose durch erleichterte Diffusion in den Apoplasten exportieren (Chen et al. 2012). Es ist nicht auszuschließen, dass noch andere Transporter am Export beteiligt sind, da die Vorgänge des Exportes noch nicht vollständig aufgeklärt wurden. Der Import in die Geleitzelle erfolgt durch  $H^+$ -abhängige Saccharosetransporter (SUTs). Die ersten Hinweise auf einen ATP abhängigen aktiven Beladungsprozess wurden in der Rübe (*Beta vulgaris*) gefunden (Sovonick et al. 1974). Darauf aufbauend konnte in weiteren Untersuchungen gezeigt werden, dass in der Plasmamembran lokalisierte Transporter an der Beladung des Phloems beteiligt sind (Riesmeier et al. 1993, Sauer et al. 1994).

## 2.4 Saccharose Transporter

SUTs sind  $H^+$ -abhängige Symporter, die zur Gruppe der *major facilitator superfamily* gehören (Saier et al. 2006). Sie besitzen eine hochkonservierte Struktur, mit 12 Transmembrandomänen (TMD), einem cytoplasmatischen Loop zwischen TMD 6 und TMD 7 und einem cytoplasmatischen C- und N-Terminus (Kühn 2003). Ihre typische Größe beträgt 500-600 Aminosäuren. Die  $K_M$ -Werte der bisher charakterisierten Transporter liegen zwischen 0,07 bis 20 mM Saccharose (Kühn und Grof, 2010). Sie werden von einer kleinen Genfamilie codiert, dessen Vertreter sowohl in primitiven Pflanzen wie den Moosen *Physcomitrella* und *Selaginella* (Lalonde und Frommer 2012, Reinders et al. 2012), als auch in höheren Pflanzen wie *Populus* oder *Quercus* exprimiert werden (Payyavula et al. 2011, Öner-Sieben et al. 2015). Bisher wurden sie in jeder analysierten Landpflanzenart gefunden (Peng et al. 2014).



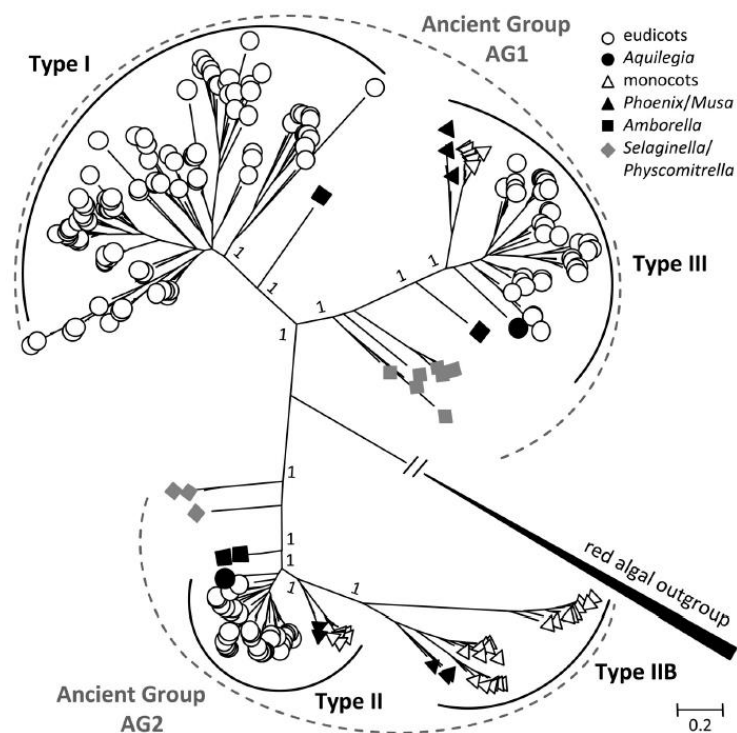
**Abbildung 8:** Schematische Übersicht der Zuckertransporter in den *minor veins*. Unabhängig vom Beladungsmechanismus befindet sich ein SUT in der Tonoplastmembran, der Saccharose (S) aus der Vakuole ins Cytosol exportiert. Der notwendige Protonengradient wird durch eine ATPase aufrechterhalten. Beim geschlossenen Typ 2 wird die Saccharose von SWEET- und möglichen anderen Transportern (rot) aus dem Cytosol in den Apoplasten exportiert. An der Plasmamembran lokalisierte SUTs nehmen die Saccharose in die Geleitzelle auf. Eine ATPase baut den nötigen Gradienten auf. In einigen Arten sind SUTs auch in den Siebelementen lokalisiert.

SUTs werden in der ganzen Pflanze exprimiert und sind je nach Gewebe und Membranlokalisierung an verschiedenen Prozessen in der Saccharose-Verteilung beteiligt. SUTs die an der Phloembeladung beteiligt sind, sind in der Plasmamembran von Geleitzellen und Siebelementen lokalisiert (Riesmeier et al. 1993, Stadler et al. 1995) (Abbildung 8). SUTs die hingegen an der Entladung des Phloems bzw. an Saccharoseaufnahme in ein Gewebe beteiligt sind, werden in typischen *sink*-Organen wie Pollen oder Wurzeln exprimiert (Stadler et al. 1999, Flemetakis et al. 2003). Neben der Be- und Entladung des



Phloems sind SUTs noch weiteren Prozessen beteiligt, wie Stabilisierung der Saccharosekonzentration im Phloem, lateraler Saccharosetransport zwischen Xylemzellen und Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks in verschiedenen Geweben (Riesmeier et al. 1992, Kühn et al. 1997, Decourteix et al. 2006, Payyavula et al. 2011)

In der Literatur gibt es bisher kein einheitliches System SUTs zu kategorisieren. Abhängig von Sequenzhomologien und biochemischer Aktivität werden sie je nach Autor in drei bis fünf Gruppen gegliedert (Sauer 2007, Braun and Slewinski 2009, Reinders et al. 2012, Peng et al. 2014). In dieser Arbeit werden die SUTs nach Peng et al. (2014) eingeteilt, aber nach ihren Homologen in *A. thaliana* benannt. Nach Peng et al. (2014) sind die *SUT* Gene der modernen Angiospermen aus zwei ursprünglichen Gruppen hervorgegangen. Aus den Vorfahren der ersten Gruppe haben sich SUTs von Typ I und Typ III entwickelt, aus den Vorfahren der zweiten Gruppe SUTs vom Typ II und Typ IIB (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Stammbaum von SUTs basierend auf 41 sequenzierten Pflanzengenomen. Aus zwei ursprünglichen Gruppen AG1 und AG2 sind vier distinkte Typen (Typ I, II, IIB und III) hervorgegangen. Die Sequenz aus der Rotalge *Galdiera sulphuraria* dient als Außengruppe. Typ II und Typ III kommen sowohl in monokotylen, als auch eudikotylen Pflanzen vor. Typ I hingegen nur in Eudikotyledonen, Typ IIB nur in Monokotyledonen. Abbildung übernommen aus Peng et al. (2014).

Typ I Transporter wurden bisher ausschließlich in Eudikotyledonen gefunden. Dies spricht dafür, dass der Vorfahre der Typ I Transporter im ursprünglichen monokotylen Genom verloren ging (Peng et al. 2014). Phylogenetische Analysen haben übereinstimmend ergeben, dass Typ I aus Typ III

hervorgegangen ist (Reinders et al. 2012, Peng et al. 2014). Die Differenzierung von Typ I und Typ III SUTs könnte durch die Evolution des Phloems notwendig geworden sein, um den Transport von Photoassimilaten über längere Strecken zu ermöglichen (van Bel 1999). Typ I Transporter sind in der Plasmamembran lokalisiert und vermitteln die aktive Aufnahme von Saccharose in die Geleitzellen bzw. Siebelemente (Riesmeiser et al. 1992, Sauer und Stolz 1994, Knop et al. 2004).

Die Transporter von Typ III kommen sowohl in mono- als auch in eudikotylen Pflanzen vor, wobei die Gruppe der monokotylen SUT III eine distinkte Klasse innerhalb dieses Typs bildet (Abbildung 9). Die meisten SUTs dieses Typs sind in der Tonoplastmembran lokalisiert und sind dort am Saccharose-Export ins Cytosol beteiligt (Endler et al. 2006, Payyavula et al. 2011, Schneider et al. 2012). In den letzten Jahren wurden einige Vertreter dieses Typs auch in der Plasmamembran lokalisiert, wie z.B. StSUT4 aus Kartoffeln. In der Plasmamembran übernehmen SUTs vom Typ III verschiedenste Funktionen (Chincinska et al. 2013).

Typ II Transporter kommen ubiquitär im Pflanzenreich vor. Ihr cytoplasmatischer Loop ist, im Vergleich zu den anderen SUT Typen, länger und ihr durchschnittlicher  $K_M$ -Wert ist höher (Barth et al. 2003). Sie konnten in verschiedenen Geweben lokalisiert werden z.B. in *Plantago major* in den Siebelementen, aber auch in typischen *sink*-Organen (Aoki et al. 2003, Banks et al. 2001, Lalonde und Frommer 2012). Ihre Funktion ist noch nicht eindeutig geklärt. Aufgrund des längeren cytoplasmatischen Loops und des höheren  $K_M$ -Wertes wird eine Funktion als Saccharose-Sensor vermutet, jedoch konnte diese Vermutung bis jetzt nicht bestätigt werden (Kühn et al. 2003, Braun und Slewinski 2009).

Typ IIB Transporter kommen nur in Monokotyledonen vor und übernehmen dort die Aufgabe der Phloembeladung. Sie übernehmen funktionell also dieselbe Aufgabe wie Typ I Transporter aus Dikotylen, bilden aber eine eigene distinkte Gruppe (Braun und Slewinski 2009). Sie sind früh in der Evolution der Monokotylen aus Typ II hervorgegangen (Peng et al. 2014).

## 2.5 Phloembeladung bei Bäumen

Der Phloembeladungsmechanismus wird bis heute vor allem basierend auf der *minor vein*-Anatomie und der Osmolarität in den Blättern bestimmt. Viele Baumarten haben eine offene *minor vein*-Anatomie von Typ 1 (CC) oder Typ 1 (IC) und transportieren entsprechend entweder nur Saccharose oder Saccharose und RFOs im Phloem (Zimmermann und Ziegler 1975, Gamalei 1989, Davidson et al. 2011). Zusätzlich ist die Gesamtosmolarität von Baumblättern im Vergleich zu krautigen Pflanzen sehr hoch, was auf eine hohe Konzentration an gelösten Stoffen hindeutet (Fu et al. 2011). Daher werden Bäume im Allgemeinen als symplastische Belader angesehen und die Bäume vom Typ 1 (CC) als passive Belader klassifiziert. Trotzdem ist der Beladungsmechanismus von Bäumen vom Typ 1 (CC) umstritten (Goggin et al. 2001, Slewinski et al. 2013, Liesche 2017).

Als ein typisches Beispiel für passive Beladung werden die Fagaceae und Salicaceae genannt, da beide Familien die typischen morphologischen und physiologischen Merkmale für passive Beladung zeigen. Sie haben *minor veins* vom Typ 1 (CC) (Russin und Evert 1985, Gamalei 1989, Öner-Sieben und Lohaus 2014, Fink et al. 2018), transportieren hauptsächlich Saccharose im Phloem (Öner-Sieben und Lohaus 2014, Liesche 2017, Fink et al. 2018) und besitzen im Vergleich zu krautigen Pflanzen eine hohe Osmolarität in den Blättern (Fu et al. 2011). Neben diesen grundlegenden Kriterien kann mit der Autoradiographie zwischen symplastischer und apoplastischer Beladung unterschieden werden. Dabei wird untersucht, ob  $^{14}\text{CO}_2$  bzw.  $^{14}\text{C}$ -Saccharose in den Blattadern akkumuliert. Bei einem apoplastischen Beladungsschritt treten durch die Akkumulation der  $^{14}\text{C}$ -Saccharose im Apoplasten die Blattadern hervor. Bei passiver oder symplastischer Beladung verteilt sich die  $^{14}\text{C}$ -Saccharose durch Diffusion im Blatt und es tritt keine sichtbare Akkumulation in den Blattadern auf.

Für zwei Vertreter der Fagaceae *Fagus sylvatica* und *Quercus rubrum* konnte keine Akkumulation von  $^{14}\text{C}$ -Saccharose festgestellt werden, was auf den symplastischen Beladungsweg hindeutet (Rennie und Turgeon 2009). Der symplastisch aktive Weg über die Synthese von RFOs kann als ausgeschlossen gelten, da Fagaceae nur Saccharose im Phloem transportieren, daher wird den Fagaceae der passive Weg über Diffusion zugeschrieben (Slewinski et al. 2013). Eine weitere Eichenart *Quercus coccinea* wurde aufgrund der oben beschriebenen Merkmale ebenfalls zu den passiven Beladern gezählt (Fu et al. 2011).

In einer neueren Studie wurde die Saccharosekonzentration im Phloem von *Quercus robur* mit der im Cytosol der Mesophyllzellen verglichen, wobei eine 14-mal höhere Saccharosekonzentration im Phloem gemessen wurde (Öner-Sieben und Lohaus 2014). An dieser Schnittstelle zwischen Phloem und Mesophyllzellen findet die Phloembeladung statt, daher kann passive Beladung durch Diffusion ausgeschlossen werden. Da der symplastisch aktive Weg ebenfalls ausgeschlossen werden kann, bleibt für *Q. robur* aufgrund dieser Ergebnisse anzunehmen, dass das Phloem auf dem apoplastischen Weg beladen wird (Öner-Sieben und Lohaus 2014). Zudem wurde ein SUT vom Typ I gefunden, der an der apoplastischen Beladung beteiligt ist (Öner-Sieben et al. 2015).

Unter den Vertretern der Salicaceae befindet sich auch die Gattung Pappel, die sich im Laufe der Jahre zum Modellorganismus für die Baum-Forschung entwickelt hat, besonders die vollständige Sequenzierung des Genoms von *Populus trichocarpa* stellte einen wichtigen Meilenstein dar (Jansson und Douglas 2007). Die Salicaceae werden ebenfalls den passiven Beladern zugeordnet. Plasmolyse-Experimente mit der Kanadischen Schwarzpappel (*Populus deltoides*) ergaben, dass die Zellen der Siebelemente bei der gleichen bzw. einer minimal höheren Molarität des Osmotikums plasmolysieren, als die Mesophyllzellen (Russin und Evert 1985). Für eine weitere Pappelart, *Populus alba*, konnte durch Autoradiogramme der apoplastische Weg für Saccharose ausgeschlossen werden, daher wurden sie den passiven Beladern zugeschrieben (Fu et al. 2011). Diese Ergebnisse wurde von Turgeon und Medville (1998) bei einem weiteren Vertreter der Salicaceae der Trauerweide (*Salix babylonica*) erzielt. Hier plasmolysierten Mesophyll- und Phloemzellen bei einer Konzentration des Osmotikums von ca.

1 M. Autoradiographie-Experimente *S. babylonica* zeigten keine Akkumulation von  $^{14}\text{C}$ -Saccharose in den Blattadern (Turgeon und Medville 1998). Neben diesen Experimenten auf physiologischer Ebene, wurde der Beladungsmechanismus in *P. canescens* auf gentechnischer Ebene untersucht. Zhang et al. (2014) brachten dazu eine Invertase in den apoplastischen Raum ein, um zu untersuchen, ob Saccharose über den symplastischen oder apoplastischen Weg transportiert wird. Ihre Ergebnisse deuten darauf hin, dass Saccharose auch in *P. canescens* den symplastischen Weg nimmt.

## 2.6 Fragestellung

Die Verteilung der Photoassimilate von *source* zu *sink* Organen ist ein überlebenswichtiger Prozess in Pflanzen. Die Phloembeladung steht am Anfang dieses Prozesses und stellt darin eine Schlüsselrolle dar. Zwar gibt es bereits Untersuchungen zu diesem Thema an Bäumen, jedoch nur wenige, die die Konzentration von Saccharose an der Schnittstelle der Phloembeladung direkt gemessen haben. In dieser Arbeit wurden zwei Vertreter der Fagaceae (*Fagus sylvatica* L. und *Quercus robur* L.) und Salicaceae (*Salix caprea* L. und *Populus x canescens* SM.) auf ihren Phloembeladungsmechanismus und Zuckermetabolismus untersucht. Dazu wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Welche *minor vein* Anatomie liegt in den Baumarten vor?

Der *minor vein* Typ liefert einen ersten Hinweis, ob der Stoff-Fluss den symplastischen Weg nehmen kann oder ob er durch das Fehlen von Plasmodesmata blockiert ist. Die Form der Geleitzellen zeigt zudem an, ob neben Saccharose auch RFO Zucker transportiert werden. Gamalei veröffentlichte 1989 eine umfangreiche Studie, in der er die *minor vein* Anatomie für verschiedene Familien und Arten postulierte, jedoch ohne mikroskopische Aufnahmen. In dieser Arbeit wurden für die untersuchten Arten Transmissionen-Elektronen-Mikroskop Aufnahmen erstellt.

- Wie ist der Saccharosegradient zwischen Phloem und dem Cytosol der Mesophyllzellen?

Das Konzentrationsverhältnis der Transportzucker an dieser Schnittstelle gibt Aufschluss darüber, ob und in welche Richtung Diffusion möglich ist.

- Exprimieren die untersuchten Baumarten Saccharosetransporter und wenn ja, welchem Typ sind sie zuzuordnen?

Je nach Typ übernehmen SUTs wichtige Aufgaben entlang des Phloems. Im Sammelphloem beladen sie das Phloem, entlang des Transportphloems minimieren sie den Verlust von Saccharose durch Wiederbeladung und in den *sink*-Organen sind sie an der Entladung beteiligt. In *Q. robur* wurde bisher der Typ 1 SUT gefunden (Öner-Sieben und Lohaus 2014). Die Genome der Bäume wurden mit degenerierten Primern auf SUT Sequenzen gescreent und diese

klassifiziert. Bei *P. canescens* war dies nicht nötig, da die Transporterfamilie bereits charakterisiert wurde (Payyavula et al. 2011).

- Welchen Einfluss haben jahreszeitliche Veränderungen und andere Umweltfaktoren auf die SUT-Expression und den Zuckerstoffwechsel?

Laubbaumarten müssen jedes Jahr genügend Kohlenhydrate für den Winter speichern und um im Frühling ihre Laubkrone neu aufbauen zu können. Der jahreszeitliche Wechsel ist daher einer der wichtigsten Umweltfaktoren, an die sie sich anpassen müssen. Um die Auswirkungen der Jahreszeiten auf die SUTs zu bestimmen wurde deren Expression gemessen und zusätzlich der Zucker- und Stärkegehalt (*non structural carbohydrates*, NSC) in verschiedenen Geweben analysiert. Neben diesem globalen Umweltfaktor unterliegen Bäume kurzfristigeren Veränderungen. Der Aufbau von Kohlenhydraten durch die Photosynthese ist direkt abhängig von Licht. Welchen Einfluss das Licht auf die Regulation der SUT Expression hat, wurde in einem Dauerdunkel-Experiment untersucht.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Pflanzenmaterial und experimentelle Bedingungen

In dieser Arbeit wurden zwei Baumarten der Fagaceae (*Fagus sylvatica*, *Quercus robur*) und zwei Arten der Salicaceae (*Salix caprea*, *Populus x canescense*) untersucht. Alle Bäume wurden als 3-jährige Setzlinge von der Baumschule Selders (Haan, Deutschland) bezogen und in einem offenen Kaltgewächshaus gehalten. Um freie Luftzirkulation zu ermöglichen und einen Hitzestau zu vermeiden, wurden einige Seitenwände durch engmaschige Drahtgitter ersetzt und die Dachfenster so weit geöffnet, dass kein Regen eindringen konnte.

Um den jahreszeitlichen Verlauf der Metaboliten Zucker und Stärke und die Expression der SUTs zu untersuchen wurden über zwei Jahre zu jeder Jahreszeit aus verschiedenen Geweben (Blatt, Rinde, Holz und Wurzel) Proben entnommen. Die Probenentnahme erfolgte immer zur selben Tageszeit, in der Mitte der Lichtperiode, und wurde an drei verschiedenen Bäumen durchgeführt.

Zur Untersuchung der Regulation durch Licht wurden von je drei verschiedenen Bäumen Blattproben am ersten Tag am Anfang, in der Mitte und am Ende der Lichtperiode gesammelt. Danach wurden die Bäume ins Dauerdunkel überführt und in den anschließenden 48 h weitere Proben gesammelt. Alle Proben wurden bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.2 Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

Um das gesammelte Pflanzenmaterial für alle weiteren Analysen aufzuarbeiten, wurden die Proben mit einer Kugelmühle (Retsch, Haan, Deutschland) zu einem feinen Pulver gemörsert. Diese Aufarbeitung geschah immer unter Zugabe von flüssigem Stickstoff, um das Auftauen der Probe zu verhindern. Dieses Pulver ist Grundlage für weitere Experimente (Abbildung 10).

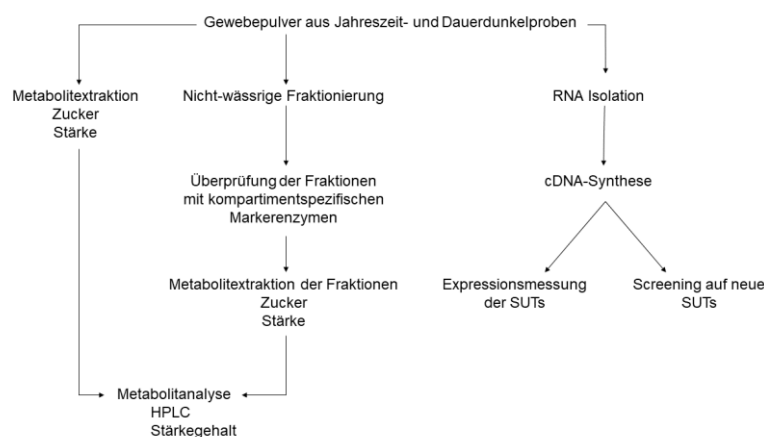


Abbildung 10: Übersicht der Experiment-Abfolge der Jahreszeit- und Dauerdunkelproben.

### 3.3 Metabolitextraktion aus dem Pflanzengewebe

#### 3.3.1 Zucker-Extraktion

Zur Zucker-Extraktion wurden etwa 200 mg Gewebepulver verwendet. Die Zuckerkonzentration wurde in Abhängigkeit vom Frischgewicht berechnet. Das Gewebe wurde mit 5 ml Chloroform/Methanol (3:7 (v/v)) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zucker mit insgesamt 5 ml H<sub>2</sub>O extrahiert und die wässrigen Phasen in einem Rundkolben gegeben. In einem Rotationsverdampfer (RV 10, VWR) wurde das Gemisch getrocknet. Die Zucker wurden abschließend in 1 ml H<sub>2</sub>O gelöst, steril filtriert (Nylonmembran mit 0,2 µm Porengrößen, Roth) und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

#### 3.3.2 Stärke-Extraktion

Die Stärke wurde aus dem Pellet der Zuckerextraktion (3.3.1) isoliert. Das Pellet wurde in 2 ml KOH resuspendiert und in einem Schüttelwasserbad für 3 h bei 80 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der pH-Wert der Lösung mit 1 N Essigsäure auf 4,5-5,0 gesenkt und diese zur Homogenisierung 10 min in ein Ultraschallbad gestellt. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

#### 3.3.3 Phloemsaft-Gewinnung

Die Gewinnung von reinem Phloemsaft ist bis heute schwierig, da die Gefahr von Kontaminationen aus dem Xylem durch die räumliche Nähe der beiden Leiterbahnen sehr groß ist. Eine verlässliche Methode um diese Kontaminationen zu vermeiden, ist der Rückgriff auf Blattläuse. Blattläuse ernähren sich vom Phloemsaft und sind in der Lage mit ihrem Stylus gezielt nur in das Phloem der Blätter zu stechen (Lohaus et al. 1994, Knop et al. 2001).

Für den Versuch wurden zehn Läuse, die sich auf den Pflanzen befunden haben, in einem Käfig gefangen und dieser auf der Blattunterseite fixiert. Der Käfig wurde nach 3-5 h entfernt, als die meisten Läuse ihren Stylus in das Phloem gestochen hatten. Die Läuse wurden so in eine gepolsterte Halterung vor dem Okular eines Laseraufbaus eingespannt und der Stylus mit Hilfe eines 40x Objektivs genau vor dem Strichkreuz positioniert. Die Abtrennung erfolgte mit einem Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 1,06 µm (LG 760, Schott). Nachdem der Stylus abgetrennt wurde, wurde die Laus entfernt und der austretende Phloemsaft mit einer, parallel zur Blattoberfläche liegenden, Mikrokapillare aufgefangen. Der Phloemsaft wurde abschließend in 50 µl *A. dest* gelöst und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

### 3.4 Nicht-wässrige-Fraktionierung

Mit Hilfe dieser Methode werden die Zellkompartimente entlang eines Dichtegradienten aus n-Heptan und Tetrachlorethylen aufgetrennt (Gerhard und Heldt 1984, Nadwodnik und Lohaus 2008). Für diesen Versuch wurden 2 g Blattpulver (3.1) über 5 Tage lyophilisiert (Christ alpha 2-4, Martin Christ). Das getrocknete Pulver wurde in 20 ml Lösung B (leichtes Gemisch aus n-Heptan und Tetrachlorethylen) resuspendiert und die Zellen mit einem Ultraschallstab aufgeschlossen (90 s, 5 s Pulsintervalle, 65 % Intensität; Sonoplus HD 60, Bandelin). Die Suspension wurde mit einem Nylonnetz (Porengröße 20  $\mu\text{m}$ , Roth) gefiltert und um eventuelle Rückstände aufzufangen, wurde das Netz 3x mal mit je 10 ml n-Heptan gespült. Die 50 ml wurden für 10 min bei 3200x g und 4 °C zentrifugiert (5804R, Eppendorf), der Überstand verworfen und das Pellet in 2,5 ml Lösung B resuspendiert. Der Dichtegradient setzte sich aus einem 1:1 Verhältnis von Lösung A (schweres Gemisch aus n-Heptan und Tetrachlorethylen) und Lösung B zusammen. Für *F. sylvatica* lag der Gradient zwischen 1,35 und 1,45 g ml<sup>-1</sup>.

Zur Erstellung des Dichtegradienten wurde ein 15 ml Falcontube so in einen Gradientenmischer eingespannt, dass die Flüssigkeit am Rand herunter rinnt, um Störungen des Gradienten zu vermeiden. Zuerst wurde 2 ml Lösung A als Kissen gegeben. Die zwei Kammern des Gradientenmischer wurden mit je 5 ml Lösung A bzw. Lösung B gefüllt und die Flüssigkeit über einen Teflonschlauch in das vorbereitete Falcon geleitet. Bevor der Gradient mit der Suspension beladen wurde, wurde eine Probe der Gesamtfraktion genommen. Der beladene Gradient wurde für 70 min bei 5000 rpm (*revolutions per minute*) und 4 °C zentrifugiert (Ausschwingrotor A-4-44, Eppendorf). Die Beschleunigungswerte wurden auf das Minimum und die aktive Bremse der Zentrifuge ausgestellt, um den Gradienten nicht durch schnelle Bewegungen zu zerstören. Nach der Zentrifugation hatten sich sichtbar verschiedene Fraktionen gebildet.

Die Chloroplasten befanden sich im oberen Bereich bei niedriger Dichte, das Cytosol bei mittlerer Dichte und die Vakuole befand sich im unteren Bereich bei hoher Dichte. Es wurden sechs Fraktionen unterschieden und diese auf sechs 15 ml Falcontubes aufgeteilt, wobei das genaue Volumen notiert wurde. Die Fraktionen wurden mit n-Heptan auf 10 ml aufgefüllt, für 10 min bei 4 °C und 4200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml n-Heptan resuspendiert. Die Fraktionen wurden abschließend in einem Vakuum-Konzentrator (SpeedVac Concentrator 5301, Eppendorf) getrocknet und bis zur weiteren Analyse in einem Exsikkator unter Luftausschluss aufbewahrt. Die Berechnung der subzellulären Verteilung der Zucker auf die Zellkompartimente Chloroplasten, Cytosol und Vakuole erfolgte, nach Analyse der Fraktionen (3.5), nach einer Berechnung von Riens et al. 1991. Für die weitere Berechnung der Zuckerkonzentration wurden der Wassergehalt und die relativen subzellulären Volumina der Zellkompartimente bestimmt. Für den Wassergehalt wurde 1 g frisches Blattmaterial eingewogen, ü.N. bei 50 °C getrocknet und erneut gewogen. Für die Bestimmung der subzellulären Volumina wurden licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mesophyllzellen analysiert.



### 3.5 Analyse der Fraktionen

Die NWF erlaubt eine visuelle Unterscheidung zwischen Fraktionen mit und ohne Chlorophyll. Eine Unterscheidung zwischen Cytosol und Vakuole ist so aber nicht möglich. Die genauere Bestimmung der Verteilung erfolgt über die Messung Kompartiment spezifischer Markerenzyme bzw. des Chloroplastengehaltes in allen Fraktionen.

#### 3.5.1 Proteinextraktion

Bevor die Bestimmung der Markerenzyme durchgeführt werden konnte, war es notwendig einen Proteinextrakt herzustellen (Stitt et al., 1983). Die getrockneten Fraktionen der NWF wurden in 500 µl Stitt-Puffer resuspendiert und bei 13000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zu seiner Verwendung auf Eis gelagert.

##### Stitt-Puffer pH 7,4

50 mM HEPES

5 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM EDTA

0,1 % Triton-X-100 (v/v)

10 % Glycerol

#### 3.5.2 Proteingehalt-Bestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt der Extrakte wurden mit der Methode nach Bradford quantifiziert (Bradford, 1976). Es wurde 1 ml Bradfordlösung und 1 µl Proteinextrakt gemischt und für 5 min inkubiert. Danach wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Durch eine zuvor erstellte Eichreihe mit definierten Mengen von Bovine Serum Albumin konnte die Konzentration bestimmt werden. Dem Leerwert wurde Stitt-Puffer hinzugefügt.

##### Bradford-Lösung

50 mg Coomassie Brilliant Blue G (Roth)

25 ml Ethanol abs.

50 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (95 %)

ad. 500 ml H<sub>2</sub>O, anschließend filtrieren

#### 3.5.3 Markerenzym für das Cytosol: UDP-Glukose Assay

Als Markerenzym für das Cytosol wurde die UGPase ausgewählt. Um ihre Aktivität sichtbar zu machen wurde die Umsetzung von NADP<sup>+</sup> zu NADPH+H<sup>+</sup> an ihre Reaktion gekoppelt. Im ersten Schritt wird UDP-Glukose mit Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> durch die UGPase zu Glukose-1-phosphat und UTP umgesetzt. Diese Reaktionsprodukte werden von der Phosphoglucomutase zu Glukose-1-phosphat umgewandelt. Im zweiten Schritt oxidiert die Glukose-6-Dehydrogenase Glukose-6-Phosphat und NADP<sup>+</sup> zu Gluconat-6-Phosphat und NADPH+H<sup>+</sup>. Die Zunahme von NADPH+H<sup>+</sup> kann im Photometer bei 334 nm verfolgt

werden. Für die Messung wurde alles bis auf den Reaktionsstarter  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  in eine Küvette gegeben und für ca. 2-3 min die Basislinie aufgenommen. Nachdem Reaktionsstart wurde 15 min gemessen.

#### UDP-Glukose Assay Reaktionslösung

0,1 M Tris

2 mM  $\text{MgCl}_2$

0,25 mM  $\text{NADP}^+$

2 mM NaF

20  $\mu\text{M}$  Glukose-1,6-bisphosphat

70  $\mu\text{l}$  Proteinextrakt

### **3.5.4 Markerenzym für die Vakuole: $\alpha$ -Mannosidase**

Die  $\alpha$ -Mannosidase katalysiert die Spaltung von p-Nitrophenol- $\alpha$ -D-Manno-Pyranosid (PNP-Mannosid) zu Mannose und p-Nitrophenol (p-NP), welches bei 405 nm detektiert werden kann. Für die Messung wurden 500  $\mu\text{l}$  Citratpuffer (100 mM, pH = 4,35) und 50  $\mu\text{l}$  Proteinextrakt bei 37 °C und 800 rpm 10 min inkubiert. Die Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  PNP-Mannosid (10 mM) startete die Reaktion, die nach 65 min durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Boratlösung (800 mM, pH = 9,8) gestoppt wurde. Dem Leerwert wurde erst nach Beendigung 50  $\mu\text{l}$  Proteinextrakt zugesetzt. Abschließend wurde der Gehalt von p-NP bei 405 nm gemessen.

### **3.5.5 Marker für die Chloroplasten: Chlorophyllbestimmung**

Für die Chlorophyllbestimmung wurden die Chloroplasten durch eine Ethanolextraktion mit 1 ml Ethanol (p.A.) aus der getrockneten Fraktion der NWF gelöst und ihr Gehalt bei 652 nm gemessen. Als Leerwert wurde eine Küvette mit reinem Ethanol gemessen.

## **3.6 Analyse der extrahierten Metaboliten**

### **3.6.1 Zuckeranalyse**

Alle Zucker wurden mittels HPLC (Dionex ICS-5000+ HPIC System, Thermo Scientific) nach Lohaus und Schwerdtfeger (2014) analysiert. Die Zucker wurden auf eine Anionen-Austauscher-Säule (Dionex, CarboPac PA10 4\*250 mm; Dionex Corp) geladen und mit 50 mM NaOH eluiert. Um die Säule nicht zu überladen wurden die Proben 1:30 verdünnt. Vor jeder Messung wurde eine Standardreihe (25, 50, 100, 250  $\mu\text{M}$ ) aufgezeichnet. Die Chromatogramme wurden mit einem Integrationsprogramm ausgewertet (Chromeleon 7.2, Dionex Corp).

### 3.6.2 Stärke-Messung

Die quantitative Bestimmung des Stärkegehaltes erfolgte über einen modifizierten photometrischen Nachweis, nach enzymatischer Spaltung der Stärke durch die Amyloglukosidase (Stitt und Heldt, 1981). Es wurden 100 µl der Extraktion (3.3.2) mit 400 µl Spaltungs-Lösung versetzt und bei 55 °C für 4 h in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der klare Überstand zur Analyse verwendet.

Dem quantitativen Nachweis liegt eine zweistufige Reaktion zugrunde. Im ersten Schritt wurde Glukose unter ATP Verbrauch von der Hexokinase zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. Im zweiten Schritt wurde Glukose-6-Phosphat zusammen mit NADP<sup>+</sup> durch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu Gluconat-6-Phosphat oxidiert, dabei entstand NADPH+H<sup>+</sup>. Die Bildung von NADPH+H<sup>+</sup> kann im Photometer bei 334 nm verfolgt werden. Zu 50 µl Probe wurden 690 µl Mastermix zugegeben und die Extinktion zu Anfang gemessen. Durch Zugabe von 0,1 U Hexokinase und 0,1 U Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase wurde die Reaktion gestartet und der Ansatz für 10 min inkubiert. Abschließend wurde die Extinktion bei 334 nm erneut gemessen. Aus der Differenz der beiden Messungen konnte mittels des Lambert-Beer-Gesetzes der Stärkegehalt berechnet werden.

Spaltungs-Lösung pH 4,8

50 mM Natriumacetat

1,4 U Amyloglukosidase

Mastermix Glukosebestimmung pH 8,0

100 mM Tris

3 mM MgCl<sub>2</sub>

1,5 mM ATP

0,5 mM NADP<sup>+</sup>

### 3.7 Analyse der *minor vein* Struktur

Um das Phloem auf einer zellularen Ebene zu untersuchen wurden Ultradünnschnitte mit einem Transmissionen-Elektronen-Mikroskop (TEM) analysiert. Diese Aufnahmen wurden in Kooperation mit Andreas Barbian von der Core Facility Electron Microscopy, UKD, Heinrich-Heine University, Düsseldorf gemacht. Dazu wurden Blattstücke aller untersuchten Bäume über Nacht in Karnovsky-Lösung (Karnovsky 1965) fixiert und in Kunstharz eingebettet.

### 3.8 Gewinnung von cDNA aus pflanzlichem Probenmaterial

#### 3.8.1 RNA-Isolierung nach PINE

Aufgrund des hohen Gehaltes an phenolischen Substanzen in den pflanzlichen Geweben wurde ein abgewandeltes Protokoll von Chang et al. (1993) verwendet. Dazu wurden 200 mg des Gewebepulvers (3.2) bis zur Zugabe von 800 µl 65 °C warmen CTAB-Puffers in flüssigem Stickstoff gelagert, um die Degradation der RNA zu verhindern. Die Proben wurden in einem Thermoschüttler 15 min bei 1400 rpm inkubiert (Thermoschüttler TS1, Biometra) und danach mit je 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) so häufig extrahiert, bis keine Interphase mehr zu sehen war. Die wässrige Phase des letzten Extraktionsschrittes wurde mit einem Viertel Volumenanteil 10 M Lithiumchlorid versetzt, 2-mal invertiert bis sich keine Schlieren mehr bildeten und auf Eis im Kühlschrank bei 4 °C ü.N. inkubiert (maximal jedoch 18 h). Am nächsten Tag wurden die Proben 20 min bei 4 °C, 13000 rpm (Mikro 200 R, Hettich) zentrifugiert, der Überstand sorgfältig entfernt und das Pellet in 400 µl auf 65 °C erhitztem STTE-Puffer bei 42 °C für 10 min bei 1400rpm in einem Thermoschüttler gelöst.

Danach wurde erneut solange mit Chloroform/Isomalyalkohol (24:1) extrahiert, bis keine Interphase mehr zu sehen war, aber mindestens zweimal. Die wässrige Phase des letzten Extraktionsschrittes wurde mit dem doppelten Volumenanteil Ethanol p.A. gemischt, invertiert und 1 h bei -80 °C inkubiert. Danach wurden die Proben 20 min bei 4 °C, 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 70 % Ethanol gewaschen (10 min bei 4 °C und 13000 rpm). Das Pellet wurde nach der vollständigen Entfernung des Ethanols bei 42 °C für ca. 10 min getrocknet und abschließend in 39 µl DEPC-behandeltem Wasser in einem Thermoschüttler (10 min bei 42 °C und 850 rpm) gelöst. Die Integrität der RNA wurde auf einem 1 %igen, mit Ethidiumbromid gefärbten, Agarosegel überprüft (3.11).

#### CTAB-Puffer pH 8,0

100 mM Tris

25 mM EDTA

2 M NaCl

2 % PVP (v/v)

2 % CTAB

2 % β-Mercapthoethanol (frisch zugesetzt)

#### SSTE-Puffer pH 8,0

10 mM Tris

1 mM EDTA

1 M NaCl

Bei der Isolierung von RNA konnten geringe Menge an genomischer DNA nicht vermieden werden. Um diese zu entfernen wurde eine Hydrolyse mit DNase I (DNAase I, RNase free, Thermo Fisher) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.8.2 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer speziellen Mikroliterküvette (LabelGuard™, Implen), die es erlaubte die Messung ohne zusätzliche Verdünnung durchzuführen. Es wurden 3 µl der Nukleinsäurelösung auf die Küvette gegeben und die Absorption bei 260- und 280 nm in einem Photometer (GENESYS 10S, Thermo Fisher) gemessen. Die Konzentration wurde nach folgenden Formeln berechnet:

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

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

Zur Bestimmung der Reinheit wurde der Koeffizient aus  $A_{260}$  und  $A_{280}$  berechnet. Lag dieser zwischen 1,8 und 2,2 wurden die Nukleinsäuren als hochrein angesehen.

### 3.8.3 cDNA-Synthese

Für die Synthese wurde das RevertAid 1<sup>st</sup> cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher) verwendet. Es wurden 1 µg RNA mit 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer und H<sub>2</sub>O auf 12 µl aufgefüllt und 5 min bei 65 °C inkubiert, um eventuell vorhandene Sekundärstrukturen aufzulösen und dem Primer eine bessere Bindung an die mRNA zu ermöglichen. Nach dieser Vorinkubation wurden 4 µl Puffer (5x Puffer), 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl), 2 µl dNTP Mix (10 mM) und 1 µl reverse Transkriptase (200 U/µl, RevertAid) zugegeben und 60 min bei 42 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70 °C für 5 min inaktiviert. Die synthetisierte cDNA wurde 1:10 verdünnt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktionen wurde in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel durchgeführt (Mastercycler Gradient, Eppendorf). Nachfolgend sind die Komponenten eines PCR-Ansatzes und ein typisches PCR-Programm aufgelistet.

<u>Bestandteil</u>	<u>Volumen</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>	<u>Schritt</u>
10x Puffer	2,5 µl	94 °C	3 min	Initialdenaturierung
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl	94 °C	30 s	Denaturierung
dNTPs (10 mM)	0,5 µl	50 - 68 °C *	30 s	Annealing
Forward Primer (10 µM)	0,5 µl	72 °C	30 s - 2 min**	Elongation
Reverse Primer (10 µM)	0,5 µl	Wiederholung des Zyklus 35-45x		
Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl	72 °C	3 - 5 min	finale Elongation
DNA-template	1 µl	4 °C		Lagerung
optionale Zusätze z.B. DMSO	1-10 µl	* Abhängig von den verwendeten Primern		
H <sub>2</sub> O	ad. 25 µl	** Abhängig von der Größe des Amplikons und der Synthese-Geschwindigkeit der Polymerase		

### 3.10 Primerdesign

Um SUT Sequenzen im Transkriptom von Arten zu finden, die noch nicht sequenziert sind, oder von denen noch keine SUT Sequenzen vorliegen, wurden degenerierte Primer verwendet. Diese Primer wurden aus *Alignments* der hochkonservierten ersten und vierten TMD schon bekannter SUTs abgeleitet (Knop et al. 2001). Sie binden also templatespezifisch an eine SUT Sequenz, wobei eingefügte neutrale Basen, z.B. Inosin, mehrere Bindungsmöglichkeiten erlauben. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mithilfe der Software Primer3 erstellt. Eine Liste der verwendeten Primer findet sich im Anhang (7.1).

### 3.11 Agarosegel-Elektrophorese

Durch die Agarosegel-Elektrophorese ist es möglich, Nukleinsäuren anhand ihrer Größe aufzuteilen. Je nach Größe der zu analysierenden Nukleinsäure werden unterschiedliche Prozentigkeiten für das Gel gewählt. Nukleinsäuren bis zu einer Größe von 1 kb wurden auf einem 1 %igem Gel, kleinere Fragmente auf einem 2 %igem Gel aufgetrennt. Zur Herstellung eines Gels wurden Agarose und 1x TAE-Puffer in entsprechenden Mengen gemischt und in einer Mikrowelle aufgekocht. Die Mischung wurde in eine Gelkammer gegossen und je nach Dicke des Gels 20 - 30 min aushärten gelassen. Um sicherzustellen, dass die Proben in die Taschen einsinken, wurden diese mit Lade-Puffer versetzt. Als Größenstandard wurde der O'GeneRuler™ 1kb Plus Ladder (Thermo Fisher) verwendet. Zur eigentlichen Auftrennung wurde das Gel unter Strom gesetzt. Zur Visualisierung der aufgetrennten Nukleinsäuren wurde das Gel nach der Elektrophorese 20 min in 1 %igem Ehtidiumbromidbad inkubiert und auf einem UV-Tisch fotografiert.

#### 50x TAE-Puffer pH 8,0

2 M Tris

1 M TAcetat

50 mM EDTA

### 3.12 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

In 3.10 wurde beschrieben, wie mit degenerierten Primern Teilsequenzen von SUT-Transportern isoliert wurden. Mit Hilfe der RACE Strategie ist es möglich, basierend auf diesen Teilsequenzen die vollständige Sequenz des Gens zu erhalten. Es wurde das 5'/3' RACE-Kit von Roche als Grundlage für diese Experimente genommen. Um gezielt die Sequenz des Transporters zu amplifizieren, ist es notwendig in RACE-PCRs speziell dafür geschriebene cDNA als Template zu verwenden. Anschließend folgen PCR-Reaktionen mit genspezifischen Primern.

### 3.12.1 3'RACE

Die mRNA verfügt am 3'Ende über einen PolyA-Schwanz, der sie vor Abbau schützen soll. Für die cDNA-Synthese wurde eine Oligo(dT)-Primer mit angehängter Ankersequenz verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgt wie in (3.8.3) beschrieben. Um nun gezielt die Transportersequenz zu amplifizieren erfolgte nun eine PCR mit einem genspezifischen Primer und der Ankersequenz als zweitem Primer (SP5 PCR). In einem zweiten Schritt wurde eine *nested*-PCR mit einem weiter innenliegenden genspezifischen Primer (SP6) und dem Anker-Primer durchgeführt (Abbildung 11).

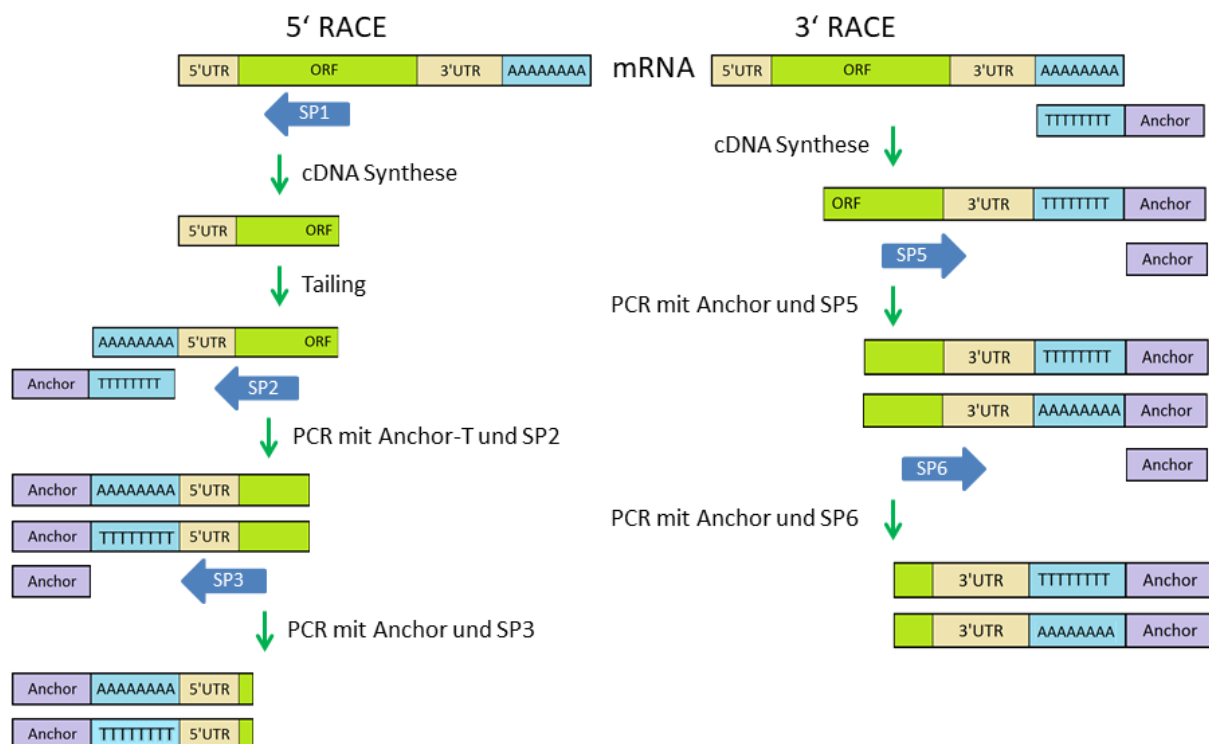


Abbildung 11: Schematische Übersicht des Ablaufs einer RACE-PCR für das 5' und 3'Ende. Die genspezifischen Primern (SP) sind durch blaue Pfeile dargestellt, die gleichzeitig auch die Richtung der Primer anzeigen.

### 3.12.2 5'RACE

Im Gegensatz zur 3'RACE wurde bei der cDNA Synthese für das 5'Ende ein genspezifischer Primer als Ansatzpunkt für die reverse Transkriptase benutzt. Die cDNA Synthese erfolgt wie in (3.8.) beschrieben. Die Verwendung eines genspezifischen Primers stellt sicher, dass nur die mRNA des SUTs in cDNA umgeschrieben wird. Im Gegensatz zum 3'Ende einer mRNA besitzt das 5'Ende keinen PolyA-Schwanz, daher muss dieses enzymatisch durch die terminale Transferase angefügt werden.

Vor dem A-Tailing muss die cDNA für die 5'RACE aufgereinigt werden, da die terminale Transferase jedes Nukleotid einbauen kann und somit kein reiner PolyA-Schwanz entstehen würde. Die Aufreinigung erfolgte mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Dazu wurde die cDNA im Verhältnis 1:1 mit Binde-Puffer gemischt, auf eine Silica-Membran-Säule gegeben und für 1 min bei

13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entsorgt und die Membran mit 700 µl und 500 µl Waschpuffer gewaschen (1 min, 13000 rpm). Nach den Waschschritten wurde die Säule noch einmal zentrifugiert um eventuell vorhandene Waschpuffer-Rückstände vollständig zu entfernen. Die Säule wurde zur Elution in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die cDNA mit 19 µl Elutionspuffer durch Zentrifugation (1 min, 13000 rpm) eluiert. Die gereinigte cDNA wurde sofort für das A-Tailing weiterverwendet.

Zu der gereinigten cDNA wurden 2,5 µl 10x TdT-Reaktionspuffer (Thermo Fisher) und 2,5 µl dATP (2 mM) hinzugegeben und für 3 min bei 94 °C vorinkubiert. Nach Abkühlung des Ansatzes auf Eis wurden 2 µl terminale Transferase (40 U/µl) hinzugegeben und die Probe für 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min gestoppt. Anschließend erfolgte eine weitere Aufreinigung, da im Reaktionspuffer der terminalen Transferase Cobalt(II)-chlorid enthalten ist. Analog zur SP-PCR der 3'RACE wurde auch bei der 5'RACE zuerst eine PCR mit einem spezifischen Primer und anschließend eine *nested*-PCR durchgeführt (Abbildung 11).

### 3.13 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR erlaubt es, die Transkriptmenge des *gene of interest* relativ zu der Transkriptmenge eines unregulierten *house keeping gene* (HKG) anzugeben (Pfaffl et al. 2004). Dazu wird dem PCR-Ansatz SYBR Green zugesetzt. Dieser Farbstoff bindet bevorzugt an doppelsträngige DNA. Der entstehende SYBR Green-DNA Komplex emittiert ein starkes Fluoreszenzsignal, das nach jeder Elongationsphase gemessen wird (Wittwer et al. 1997). Wenn die gemessenen Werte gegen die Zyklenanzahl aufgetragen werden, entsteht ein sigmoidaler Verlauf. Der Ct-Wert (*cycle threshold*) wird an dem Punkt gemessen, an dem die Kurve das Hintergrundsignal übertrifft und in die exponentielle Phase eintritt, da hier die Effizienz der Reaktion fast 100 % beträgt. Eine absolute Bestimmung der Transkriptmenge ist nur unter sehr definierten Bedingungen möglich, daher ist eine Normalisierung auf ein HKG notwendig.



### 3.14 Bakterienstämme und Anzuchtbedingungen

Zur Klonierung der SUT-Fragmente wurde der Stamm *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Woodcock et al. 1989) verwendet.

Genotyp: *F<sup>-</sup> ( $\Phi$ d<sub>lacZ</sub>M15) recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 deoR  $\Delta$ (lacZY-arfF)* U169

Die Bakterien wurden bei einer Temperatur von 37 °C in autoklaviertem LB-Medium angezogen.

<u>LB-Medium</u>	<u>Zusätze</u>
5 g/l Hefeextrakt	50 $\mu$ g/ml Ampicilin
10 g/l Trypton	50 $\mu$ g/ml X-Gal
5 g/l NaCl	
ggf. 1,5% Agar	

#### 3.14.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Da *E. coli* keine natürliche Kompetenz besitzt, wurden die Zellen durch eine chemische Behandlung mit Rubidiumchlorid künstlich kompetent gemacht. Dazu wurden 5 ml Vorkultur von DH5 $\alpha$ -Bakterien ü.N. in LB-Medium bei 37 °C und 250 rpm angezogen. Am nächsten Tag wurden 50 ml Hauptkultur in LB-Medium mit dieser Vorkultur angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD<sub>580</sub> von 0,5 angezogen und durch Zentrifugation (2200x g, 4 °C, 5 min) in einem Ausschwingrotor (A-4-44, Eppendorf) geerntet. Das Zellpellet wurde in 25 ml kaltem Transformationspuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen pelletiert (2200x g, 4 °C, 5 min), in 5 ml Transformationspuffer + 20 % Glycerin (v/v) resuspendiert, in Aliquots zu je 150  $\mu$ l aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

<u>Transformationspuffer</u>
100 mM CaCl <sub>2</sub>
50 mM RbCl
40 mM MnCl <sub>2</sub>
anschließend steril filtrieren

#### 3.14.2 Herstellung von *E. coli* Dauerkulturen

Zuerst wurde eine Vorkultur, die das zu sicherende Vektorkonstrukt trägt, von einer Bakterienkolonie gepickt und in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ü.N. bei 37 °C und 200 rpm angezogen. Am nächsten Morgen wurde eine Hauptkultur mit dieser Vorkultur im Verhältnis 1:10 angeimpft und bis zu einer OD<sub>580</sub> von 0,5 wachsen gelassen. Danach wurden die Zellen 1:1 mit sterilem Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

### 3.15 Klonierungsstrategien

#### 3.15.1 Klonierung in den pGEM-Teasy Vektor

Die Klonierungen in dieser Arbeit gingen immer von einem PCR Produkt aus. In der Regel wurde die PCR mit der Taq-Polymerase durchgeführt. Diese Polymerase baut als letzte Base am Ende des PCR Produktes ein Adenin an. Der pGEM-Teasy Vektor ist schon linearisiert und besitzt zudem T-Überhänge, sodass in diesem Fall eine TA-Klonierung gemacht wurde. Wenn das Insert sequenziert werden sollte, wurde eine PCR mit der Phusion-Polymerase durchgeführt. Diese Polymerase hinterlässt keinen A-Überhang, daher musste vor der Ligation mittels A-Tailing ein Adenin angehängt werden. Die Ligation erfolgte mit der T4 DNA Ligase (Thermo Fisher) nach Herstelleranleitung ü.N. bei 4° C. Mit dieser Ligation wurden anschließend kompetente *E. coli* Zellen nach der Hitzeschock Methode transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Amp + X-Gal Platten ausgestrichen und ü.N. bei 37° C bebrütet. Am nächsten Tag wurden ausgewählte weiße Kolonien gepickt und in 3 ml LB-Amp ü.N. bei 37° C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Plasmid-Isolation (MiniPräp Plasmidkit, Thermo Fisher) und eine Testrestriktion mit dem Enzym EcoRI. Der Verdau wurde mit einem Agarosegel analysiert (3.11).

#### 3.15.2 Klonierung in den NEV-N Vektor

Im Gegensatz zum pGEM-Teasy Vektor ist der NEV-N Vektor geschlossen, daher wurde er zuerst mit NotI aufgeschnitten und dephosphoryliert, um die spontane Religierung zu verhindern. Das Insert muss vor der Klonierung durch geeignete Primer von der NotI Schnittstelle flankiert werden. Das weitere Vorgehen war analog zur Klonierung mit dem pGEM-Teasy Vektor.

#### 3.15.3 Plasmide

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Vektor	Selektionsmarker	Quelle
pGEM-Teasy	Ampicilin, <i>lacZ</i>	Promega
NEV-N	Ampicilin	

### 3.16 Heterologe Funktionsüberprüfung von FsSUT1 in Hefe

Die experimentelle Überprüfung, ob gefundene Vollständigsequenzen einen funktionsfähigen Saccharose-Transporter darstellen, fand in Kooperation mit Herrn Klebel, Molekulare Pflanzenforschung, Universität Erlangen statt. Dafür wurde der Shuttle Vektor NEV-N verwendet, der

sowohl in *E. coli* als auch in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert wird. An den Enden des ORFs wurde zunächst mittel PCR eine NotI Schnittstelle und am 5' Ende vor dem Startcodon die 5' UTR von SP1 aus *A. thaliana* (Stadler et al. 1995) angefügt. Dieses PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel gereinigt und in den NEV-N und in den pGEM-Teasy Vektor ligiert. Mit diesen beiden Konstrukten wurden kompetente *E. coli* Zellen transformiert und auf LB-Amp bzw. LB-Amp+X-Gal Platten ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37 °C ü.N. wurden mit vier weißen Kolonien des pGEM-Teasy Konstrukts und 26 Kolonien des NEV-N Konstrukts ü.N. Kulturen in je 3 ml LB-Amp angezogen. Aus diesen ü.N. Kulturen wurden am nächsten Tag die Plasmide isoliert (MiniPräp Kit, Thermo Fisher) und auf einem Agarosegel überprüft. Zwei der pGEM-Konstrukte wurden zum sequenzieren geschickt (Eurofins) um zu überprüfen, ob die Promotorsequenz und die NotI-Schnittstellen korrekt sind.

Damit die heterologe Hefeexpression gelingt, ist es wichtig zu wissen, in welcher Orientierung das Insert im NEV-N Vektor liegt. Dies erfolgte mittels einer Kombination aus Insert und Vektor spezifischen Primern. Nach dieser PCR wurden je eine Bakterienkolonie, die das Insert in *sense* bzw. *antisense* Richtung trägt in 3 ml LB-Amp angeimpft und ü.N. inkubiert. Nach erneuter Plasmidisolierung wurden die Proben zur Universität Erlangen geschickt, wo die Hefetransformation und Saccharoseaufnahme-Messung durchgeführt wurden.

### **3.17 Lokalisation der Transporter im Blattgewebe**

Eine gängige Methode Transkripte zu lokalisieren ist die RNA *in situ* Hybridisierung. Bei dieser Methode wird das zu untersuchende Gewebe fixiert und in Wachs eingebettet um es sehr dünn aufschneiden zu können. Auf diese Dünnschnitte wird eine Dioxygenin markierte RNA-Sonde gegeben, die komplementär zu dem gesuchten Transkript ist. Mittels eines Antikörpers und einer Farbreaktion werden die Zellen angefärbt, an denen die markierte Sonde gebunden hat.

#### **3.17.1 Fixierung und Einbettung des Gewebes**

Aus frisch geernteten Blättern wurden ca. 5 x 10 mm Blattstücke geschnitten und sofort in 4 %ige Paraformaldehyd-Fixierlösung gegeben. Um sicherzustellen, dass die Fixierlösung auch die Mitte der Gewebestücke erreicht, wurde für 30 min Vakuum angelegt. Die Vakuumstärke wurde schrittweise erhöht, solange bis feine Bläschen rundherum aus dem Gewebe an die Oberfläche nach oben stiegen. Danach wurde die Fixierlösung erneuert und ü.N. bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gewebe durch eine Ethanol-Reihe ansteigender Konzentration dehydriert und ü.N. in 95 % Ethanol mit 0,1 % Eosin angefärbt. Die Eosin-Färbung erleichtert im späteren Verlauf das Wiederfinden der Gewebestücke im Wachs. Am dritten Tag wurde das überschüssige Eosin mit Ethanol ausgewaschen und die Gewebestücke mit einer ansteigenden HistoClear-Reihe auf die Wachseinbettung vorbereitet.

Die Gewebestücke wurden ü.N. in 100 % HistoClear und  $\frac{1}{4}$  Volumen Paraplastwachs bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Am vierten Tag wurden das Gewebe in einen 42° C Schrank gestellt, um das Wachs vollständig zu lösen. Dann wurde noch einmal  $\frac{1}{4}$  Volumen Wachs hinzugegeben und sobald sich das Wachs vollständig gelöst hat, die Temperatur auf 60° C erhöht. Am Abend wurde die HistoClear-Wachs Mischung durch 100 % geschmolzenes Wachs ersetzt und ü.N. bei 60° C inkubiert. Bei diesem Schritt ist zu beachten, dass die Proben nicht höher als 60° C erhitzt werden darf, da sonst das Gewebe beschädigt wird. An den folgenden drei Tagen wurde das Wachs je zweimal durch frisches Wachs ersetzt. Am achten Tag ist das Wachs komplett ins Gewebe eingedrungen und die Proben können in Wachsblöcke gegossen werden um sie am Mikrotom zu schneiden.

Um die Proben in Wachsblöcke zu gießen muss am Tag zuvor ein ausreichender Vorrat an Wachs geschmolzen werden. Eine kleine Schale wurde zunächst mit Wachs gefüllt und für ca. 20 min bei 60° C durchgewärmt. Je nach Größe der Schale wurden drei bis neun Gewebestücke pro Schale eingebettet werden. Wenn Schale und Wachs beide auf 60° C erwärmt wurden, steht für die Positionierung für die Gewebestücke mehr Zeit zur Verfügung. Bei der Positionierung der Gewebestücke ist darauf zu achten, dass diese möglichst senkrecht in der Schale stehen und nicht auf den Boden absinken. Sind die Gewebestücke im Wachs positioniert, wurden das Wachs 3-4 h bei RT aushärten gelassen. Das Gewebe kann in den Wachsblöcken bis zu einem Jahr bei 4° C gelagert werden.

### **3.17.2 Dünnschnitte am Mikrotom**

Um das Gewebe am Mikrotom (RM2125 RTS, Leica) schneiden zu können, wurden aus dem Wachsblock kleine Trapezoeder geschnitten werden. Dabei ist es wichtig, dass in der Mitte ein Gewebestück senkrecht steht. Die Basis des Wachs-Trapezoeders wurde mit einer erhitzten Skalpell-Klinge auf die Halterung für das Mikrotom geklebt, sodass an der Spitze geschnitten werden konnte. Der Wachs-Trapezoeder wurde mit der Halterung in das Mikrotom eingespannt und diese so positioniert, dass die Schnittkante und die Klinge genau parallel zueinanderstehen. Dies ist wichtig, da sich sonst kein gleichmäßiges Wachsband beim Schneiden bildet. Es wurden Dünnschnitte mit einer Stärke von 5  $\mu$ m und einem Schnittwinkel von 0-3° angefertigt. Das Wachsband wurde auf die Länge eines Objektträgers (Superfrost Plus, Roth) zurechtgeschnitten und auf mit DEPC-Wasser benetzten Objektträger gelegt. Diese wurden auf eine 35 °C Wärmeplatte gelegt. Das Wachs dehnt sich auf dem erwärmten Wasser aus und es wird gewährleistet, dass sich keine Falten oder Knicke bilden. Nach 10-15 min muss das Wasser entfernt werden, da sich sonst Luftblasen unter dem Wachsband bilden. Dazu ist es wichtig, das Wasser in einem Schwung zu entfernen, jedoch ohne das Wachsband zu beschädigen. Eventuell verbleibendes Wasser wurde vorsichtig mit einem Papiertuch entfernt. Die Objektträger wurden ü.N. zum Trocknen auf der Wärmeplatte belassen.

### 3.17.3 Vorbereitung für die Sonden-Synthese

Ein zentraler Faktor für den Erfolg der RNA *in situ*-Hybridisierung ist die Sonde. Je länger die Sequenz der Sonde ist, desto spezifischer ist sie und die Gefahr von falsch positiven Signalen sinkt. Mit zunehmender Länge jedoch sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass die Sonde ins Gewebe eindringen und binden kann, was in einem erhöhten Hintergrundsignal resultiert. Sonden die auf einer konservierten Sequenz basieren, zeigen i.d.R. bessere Ergebnisse als Sonden die auf nicht konservierten Sequenzen beruhen. Alle SUTs besitzen 12 TMD, deren Sequenzen hoch konserviert sind. Würde die Sonde ausschließlich auf der Sequenz der TMD beruhen, könnte sie auch an die TMD von anderen SUTs binden. Um einen Kompromiss zwischen Länge und Lage der Sonde zu finden wurden zwei Sonden synthetisiert. Die erste Sonde deckt den Bereich von der 6. TMD über die erste Hälfte des cytoplasmatischen Loops ab, die zweite Sonde deckt die zweite Hälfte des Loops und die 7. TMD Domäne ab.

Neben der Lage und Länge der Sonde muss darauf geachtet werden, welche RNA-Polymerasen auf dem verwendeten Vektor liegen. Auf dem Vektor pGEM-Teasy liegt *upstream* der MSC (*multiple cloning site*) der Promotor für die T7 RNA-Polymerase und *downstream* der MSC der Promotor für die SP6 RNA-Polymerase. Diese beiden Polymerasen brauchen 5' Überhänge oder glatte Enden, 3' Überhänge können zu Fehler bei der Transkription führen. Die Restriktionsenzyme müssen in Hinblick darauf ausgewählt werden. Zudem muss beachtet werden, ob das ausgewählte Restriktionsenzym eine Schnittstelle in der Sequenz der Sonde hat und dass es nur eine Schnittstelle in der MSC hat.

Am Anfang der Sonden-Synthese wurden PCR-Primer designt, die die ausgewählte Sequenz flankieren. Die PCR-Produkte wurden in den pGEM-Teasy Vektor ligiert und anschließend in *E. coli* transformiert. Pro Sonde wurden 15 weiße Kolonien gepickt und damit je eine 3 ml ü.N. Kultur angeimpft. Am folgenden Tag wurde eine Plasmid-Isolation (Mini Präpkit, Thermo Fisher) und ein EcoRI Verdau durchgeführt um zu überprüfen, ob das Insert die richtige Größe hat. Um herauszufinden in welcher Orientierung das Insert im Vektor liegt wurden PCRs mit einer Kombination aus Insert und Vektor spezifischen Primern durchgeführt. Als letzten Kontrollschritt wurden pro Sonde zwei Vektorkonstrukte zur Sequenzierung geschickt, in denen das Insert in *sense*-Richtung im Vektor liegt.

Für die eigentliche Sonden-Synthese wurde pro Sonde erst eine 3 ml Vorkultur angezogen und damit am nächsten Tag eine 50 ml Hauptkultur angeimpft. Diese Kultur wurde am nächsten Tag geerntet, eine Plasmid-Isolation (Midi Präpkit, Thermo Fisher) durchgeführt und die Konzentration am Nanodrop bestimmt. Anschließend muss das Plasmid in zwei Ansätzen linearisiert werden. Da das Insert in *sense*-Richtung eingebaut war, ergibt der Verdau mit einem Restriktionsenzym das am 5' Ende der MSC liegt, nach der Transkription die *antisense*-Sonde. Der Verdau mit einem Restriktionsenzym das am 3' Ende der MSC liegt, ergibt nach der Transkription die *sense*-Sonde.

#### Ansatz für die Linearisierung des Plasmids

5-15 µg Plasmid  
10 µl Puffer  
2 µl Restriktionsenzym  
ad. 100 µl Wasser

Der Verdau wurde bei 37° C ü.N. durchgeführt. Am Morgen wurden die Enzyme durch einen Hitzeschock (30 min, 80° C) deaktiviert. Die Linearisierung des Plasmids sollte zu 100 % vollständig sein, da nur von einem linearisierten Plasmid erfolgreich transkribiert werden kann. Daher wurde der Verdau auf einem Agarosegel überprüft. Der Verdau wurde aufgereinigt (PCR Purification Kit, Thermo Fisher) um die Enzyme und den Puffer zu entfernen und die Konzentration wurde am Nanodrop gemessen.

#### **3.17.4 Sonden-Synthese**

Der linearisierte Vektor dient als *template* für die RNA-Sonden Synthese. Je nachdem mit welchem Enzym geschnitten wurde, kommt eine andere RNA-Polymerase zum Einsatz. Pro Sonde wurden zwei Ansätze pipettiert.

#### Ansatz für die RNA-Transkription

1 g linearisiertes Plasmid  
2 µl DIG-dNTP Mix  
2 µl T7/SP6 Polymerase  
2 µl Transkriptions-Puffer  
1 µl RNase Inhibitor  
ad. 20 µl Wasser

Die Synthese lief für 2 h bei 37° C. Es wurden je 1 µl (*pre*-DNase) zur späteren Analyse auf einem Agarosegel verwahrt. Im nächsten Schritt wurde das DNA-*template* entfernt, um sicherzustellen, dass nur mit der RNA-Sonde weitergearbeitet wird. Der Transkriptionspuffer enthält DTT, was die Aktivität der DNase hemmt. Daher wurde dem verbleibenden Ansatz das Vierfache Volumen an DEPC-Wasser zugesetzt um die Konzentration des DTT ausreichend zu verdünnen. Der Verdau-Ansatz wurde unter Zugabe von 5 µl DNase, 45 min bei 37° C inkubiert. Hiervon wurden ebenfalls je 1 µl verwahrt (*post*-DNase) und zusammen mit den *pre*-DNase Proben auf einem Agarosegel analysiert. Der Verdau war erfolgreich, wenn in den *post*-DNase Proben keine Vektorbande mehr zu sehen waren. Anschließend wurde die Sonde mit einer Ethanol-Lithiumchlorid Extraktion gefällt. Der erste Ansatz einer Sonde wurde in 20 µl deionisiertem Formamid gelöst und bis zur Verwendung bei -80° C gelagert.

### 3.17.4.1 Alkalische Hydrolyse

Um einen Kompromiss bei der Länge der Sonde zu finden, kann die Sonde mittels alkalischer Hydrolyse nachträglich verkürzt werden. Hierzu wurde das Pellet des zweiten Ansatzes einer Sonde in 50 µl 80 mM Carbonat-Puffer (pH 10,2) gelöst und bei 60° C inkubiert. Die Länge kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Zeit} = (\text{Li}-\text{Lf})/(\text{K}*\text{Li}*\text{Lf})$$

mit: Li: initiale Sondenlänge [kb], Lf: finale Sondenlänge [kb], K: 0,11kb/min

Die finale Länge sollte bei beiden Sonden 0,15 kb betragen. Nach Abschluss wurde die Hydrolyse mit 1/20 Volumen 10 %iger Essigsäure gestoppt. Anschließend folgte eine Ethanol-Lithiumchlorid Präzipitation. Der hydrolysierte Ansatz wurde ebenfalls in 20 µl deionisiertem Formamid gelöst und bis zur Verwendung bei -80° C gelagert.

## 3.17.5 Hybridisierung der Sonde mit den Gewebeschnitten

### 3.17.5.1 Vorbereitung der Gewebeschnitte

Für die Hybridisierung sollten frische Gewebedünnschnitte vom Vortag verwendet werden. Bevor die Sonde auf die Dünnschnitte gegeben werden kann, müssen diese auf die Hybridisierung vorbereitet werden. Zuerst wurde das Wachs durch zweimaliges waschen in 100 % Histoclear entfernt. Anschließend wurde das Gewebe mit einer Ethanol-Reihe absteigender Konzentration rehydriert. Um die Zugänglichkeit des Gewebes für die RNA-Sonde zu verbessern wurde mit fixiertes Protein durch einen Pronase-Verdau (20 min bei 37 °C) entfernt. Mit einer 0,2 %igen Glycin-Lösung wurde die Pronase deaktiviert. Durch den Pronase Verdau kann die fixierte RNA geschädigt werden, daher wurde das Gewebe noch einmal in 4 % Paraformaldehyd refixiert. Nach zweimaligem waschen in PBS wurden die Proben 10 min in eine 1 %ige EssigsäureAnhydrid Lösung getaucht. Dieser Schritt verbessert das Verhältnis von Signal zu Hintergrund. Nach zweimaligem waschen in PBS wurde das Gewebe in einer Ethanol-Reihe aufsteigender Konzentration dehydriert.

### 3.17.5.2 Hybridisierung

Für die eigentliche Hybridisierung wurden Hybridisierungspuffer und Sonde im Verhältnis 4:1 gemischt. Wenn zwei Sonden verwendet werden ist das Verhältnis 4:0,5:0,5. Zuvor wurden die Sonden für 2 min bei 80 °C erhitzt, kurz zentrifugiert und sofort auf Eis gestellt.. Pro Objektträger wurden insgesamt 40 µl Puffer/Sondengemisch aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt. Hierbei ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen bilden. Eine flache Plastikbox wurde mit feuchtem Papier ausgelegt. Auf das Papier wurden mit 15 ml Falcontubes Reihen ausgelegt und die Objektträger darauf platziert. Die Box wurde luftdicht verschlossen und ü.N. bei 50 °C inkubiert

<u>Hybridisierungs-Puffer</u>	für 1 Objektträger
10x Salz (3 M NaCl, 0,1 M Tris, 0,1 M NaPO Puffer, 50 mM EDTA)	4 µl
Deionisiertes Formamid	16 µl
tRNA (50 mg/ml)	0,8 µl
50x Denhardt's (Sigma Aldrich)	0,8 µl
50 % Dextran Sulfat	8 µl
Wasser	2,4 µl
Volumen	32 µl

### 3.17.5.3 Antikörper-Färbung

Am nächsten Tag wurden die Objektträger in warmen Waschpuffer getaucht um die Deckgläser zu entfernen und für insgesamt 2 h bei 50 °C in Waschpuffer gewaschen. Zur Reduktion des Hintergrundsignals durch unvollständig oder lose gebundene RNA-Sonden wurden die Objektträger zuerst 10 min in RNase-Puffer, ohne zugesetzte RNase, äquilibriert und anschließend für 30 min in RNase-Puffer mit zugesetzter RNase bei 37 °C inkubiert. Nach der RNase Behandlung wurden die Objektträger 1 h bei 50 °C in Waschpuffer gewaschen und 5 min in PBS-Puffer auf die Antikörper-Färbung vorbereitet.

<u>20x Waschpuffer</u>	<u>10x RNase-Puffer</u>	<u>Blocking Lösung</u>
3 M NaCl	5 M NaCl	0,1 M Tris
0,3 M Na <sub>3</sub> Citrat	0,1 M Tris	0,15 M NaCl
	10 mM EDTA	0,5 % (w/v) Blocking reagent (Sigma Aldrich)
	RNase Zusatz: 20 µg/ml	pH 7,5

Die Objektträger wurden in eine Plastikbox gelegt, der Boden dünn mit Blocking Lösung bedeckt und die Box für 30 min auf eine Schüttelplatte gestellt. Die Blocking Lösung besetzt alle noch freien Protein-Bindestellen, sodass das Hintergrundsignal reduziert wird. Bevor der Antikörper aufgetragen wurde, wurden die Objektträger im entsprechenden Puffer ohne Antikörper 30 min äquilibriert. Pro Objektträger wurden 200 µl einer 1:3000 Verdünnung des Antikörpers aufgetragen und die Box für 90 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Objektträger 80 min in Antikörper-Puffer gewaschen. Um das Signal sichtbar zu machen wurden die Objektträger dünn mit Färberlösung bedeckt und die Box mindestens 16 h im Dunkeln inkubiert. Die Inkubationszeit kann sich verlängern, je nachdem wie lange das Signal braucht um sich zu entwickeln. Jedoch sollte die Inkubationszeit 72 h nicht überschreiten, da sonst das Hintergrundsignal zu intensiv wird.



<u>Antikörper-Puffer</u>	<u>Färberlösung</u>
0,1 M Tris	1 M Tris
0,15 M NaCl	1 M NaCl
1 % BSA	0,5 M MgCl <sub>2</sub>
0,3 % Triton-X-100	75 mg/ml NBT
Antikörper Zusatz: 1:3000	50 mg/ml BCIP
	24 mg/ml Levamisol
	pH 9,5

### 3.17.5.4 Permanente Einbettung

Alle folgenden Arbeiten, bis zur dauerhaften Einbettung wurden in möglichst dunklen Verhältnissen durchgeführt, um das Verblässen des Signals zu verhindern. Die Signalentwicklung wurde regelmäßig unter einem Lichtmikroskop überprüft. Sobald das Signal gut zu sehen war, wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe gewaschen, dehydriert und anschließend in einer absteigenden Ethanol-Reihe rehydriert. Nachdem die Objektträger vollständig getrocknet waren, wurden sie mit 2-3 Tropfen Entellan dauerhaft eingebettet und fotografisch dokumentiert.

## 3.18 Verwendete Software

Alle verwendeten Programme, Software und Webserver sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Software

Name	Ver.	Funktion	URL	Referenz
Bioedit	7.2.25	Sequenzalignment und Analyse	<a href="http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html">www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html</a>	Hall 1999
BLAST		Sequenzvergleich	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>	Altschul et al. 1990
Chromas Pro	1.5	DNA-Sequenzierung	<a href="http://technelysium.com.au/">http://technelysium.com.au/</a>	
Expasy		<i>in silico</i> Translation	<a href="https://web.expasy.org/translate/">https://web.expasy.org/translate/</a>	
MEGA	6.06	Phylogenetischer Stammbaum	<a href="http://www.megasoftware.net/">www.megasoftware.net/</a>	Tamura et al. 2013
MxPro	6.5	qRT-PCR	<a href="http://www.agilent.com">www.agilent.com</a>	
Primer3	4.1.0	Primerdesign	<a href="http://primer3.ut.ee/">http://primer3.ut.ee/</a>	
TMHMM	2.0	Topografievorhersage	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/">www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/</a>	

### **3.19 Statistische Analyse**

Zur statistischen Analyse der SUT Expression wurde ein gepaarter T-Test mit  $p \leq 0,05$  durchgeführt. Der Zucker und Stärkegehalt der Jahreszeiten und der Dauerdunkel-Proben wurde mit einer einfachen Varianzanalyse mit anschließendem Tukey HSD Test analysiert.

## 4 Ergebnisse

Die Phloembeladung ist ein wichtiger Schritt in der Verteilung der Kohlenhydrate innerhalb von Bäumen. Durch die Analyse der *minor vein* Anatomie kann bestimmt werden ob die untersuchten Baumarten normale Geleitzellen oder Intermediärzellen besitzen. Abhängig davon kann ein erster Rückschluss auf den Beladungsmechanismus erfolgen. Um diesen genauer zu bestimmen, wurde anschließend die subzelluläre Metabolitkonzentration ermittelt und zum Vergleich der Phloemsaft analysiert. Beim apoplastischen Weg erfolgt die Beladung durch einen SUT vom Typ I. Daher wurde das Transkriptom der untersuchten Baumarten auf SUT-Sequenzen gescreent und ein ausgewählter SUT1 weitergehend charakterisiert.

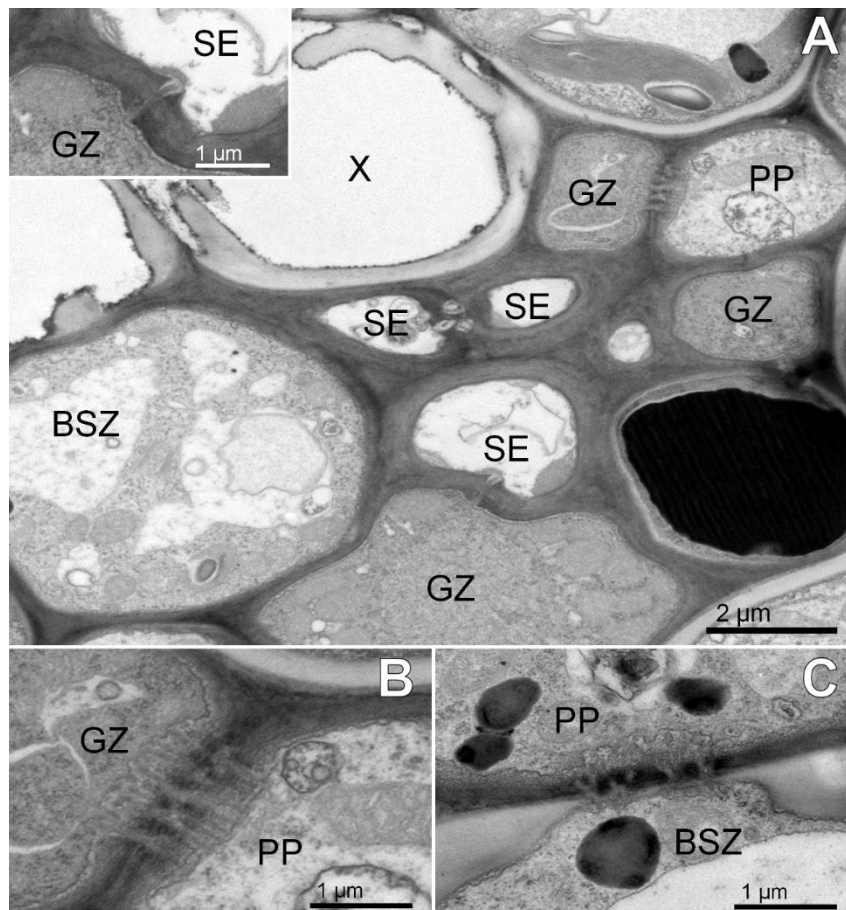
Neben der Phloembeladung sind SUTs an weiteren Prozessen der Kohlenstoff-Verteilung beteiligt. Um Einblicke in das Zusammenspiel zwischen dem Zuckerhaushalt und den SUTs zu erhalten wurde die Expression der identifizierten SUTs und der NSC-Gehalt in den verschiedenen Organen der Laubbäume über einen Zeitraum von zwei Jahren gemessen. Der Aufbau der Kohlenhydrate erfolgt während der Photosynthese und ist wie auch die Verteilung der synthetisierten Kohlenhydrate somit abhängig vom Licht. Wie sich die Expression der SUTs und der NSC-Gehalt in andauernder Dunkelheit verändert, wurde im letzten Schritt untersucht.

### 4.1 *Minor vein* Anatomie

Die *minor vein* Anatomie liefert wichtige Hinweise auf die möglichen Routen der Photoassimilate ins Sammelphloem. Daher wurden bei allen Bäumen mittels Transmissionselektronenmikroskop-Aufnahmen (TEM) die Struktur der *minor veins* analysiert. Alle Geleitzellen konnten den normalen Geleitzellen zugeordnet werden.

#### 4.1.1 *Fagus sylvatica*

Die Bilder stammen von einem voll entwickelten Blatt, das in der Mitte der Vegetationsperiode gesammelt wurde. Die Siebelemente in *F. sylvatica* sind von Geleitzellen und Phloemparenchymzellen umgeben (Abbildung 12A). Plasmodesmata verbinden Geleitzellen und Siebelemente (Einschub Abbildung 12A).



**Abbildung 12:** TEM-Aufnahme des Leitbündels von *F. sylvatica* in den *minor veins*. A: Struktur des Leitbündels, der Einschub zeigt eine vergrößerte Aufnahme eines Plasmodesmata (PL) zwischen einer Geleitzelle (GZ) und einem Siebelement (SE). B: Symmetrische PL zwischen einer GZ und einer Phloemparenchymzelle (PP). C: PL zwischen einer Bündelscheidzelle (BSZ) und einer PP. Dieses Bild stammt von einem anderen Leitbündel, da PL zwischen diesen beiden Zellen im Leitbündel von A nicht sichtbar waren. X: Xylem.

Die Unterscheidung zwischen Phloemparenchymzellen und Geleitzellen kann anhand des Cytoplasmas und der Vakuole gemacht werden. Typischerweise besitzen Geleitzellen ein sehr dichtes Cytoplasma, viele Mitochondrien und kleine Vakuolen. Phloemparenchymzellen hingegen besitzen ein weniger dichtes Cytoplasma und weniger Mitochondrien. Sie stehen mittels Plasmodesmata in Verbindung (Abbildung 12B). Auch Phloemparenchymzellen und Bündelscheidzellen stehen durch Plasmodesmata in Verbindung (Abbildung 12C).

#### 4.1.2 *Quercus robur*

In Abbildung 13A ist zuerst die Übersicht eines Leitbündels, aus einem voll entwickelten Blatt, das in der Mitte der Vegetationsperiode gesammelt wurde, zu sehen. Geleitzellen und Bündelscheidzellen stehen über symmetrisch angeordnete Plasmodesmata in Verbindung (Abbildung 13B). Die Siebelemente sind über Plasmodesmata, die an der Geleitzelle fächerartig verbreitert sind, eng mit dieser verbunden. (Abbildung 13C).

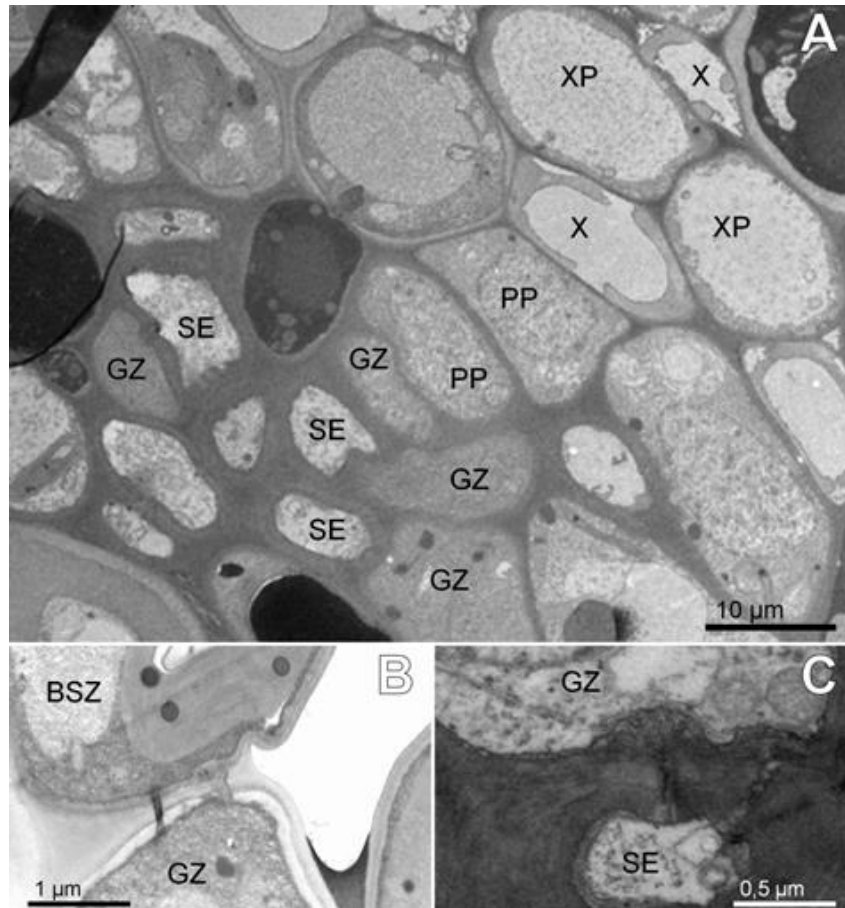


Abbildung 13: TEM-Aufnahme des Leitbündels von *Q. robur* in den *minor veins*. A: Struktur des Leitbündels. B: Zwei PL zwischen einer GZ und einer BSZ. C: PL zwischen GZ und assoziiertem SE. Dieses Bild stammt von einem anderen Leitbündel, da PL zwischen diesen beiden Zellen im Leitbündel von A nicht sichtbar waren. BSZ: Bündelscheidzellen, GZ: Geleitzellen, PL: Plasmodesmata, PP: Phloemparenchymzellen, SE: Siebelement, X: Xylem, XP: Xylemparenchymzelle.

#### 4.1.3 *Salix caprea*

Die Aufnahme stammt von einem voll entwickelten Blatt, das in der Mitte der Vegetationsperiode gesammelt wurde. Dieses untersuchte Leitbündel in *S. caprea* zeichnete sich durch viele Siebelemente und Phloemparenchymzellen aus (Abbildung 14A). Geleitzellen und Siebelemente sind über zahlreiche Plasmodesmata verbunden, aber auch zwischen Siebelementen finden sich vereinzelt Verbindungen (Abbildung 14B). Bündelscheidzellen und Phloemparenchymzellen stehen über eine lokale Ansammlung von Plasmodesmata in Verbindung (Abbildung 14C).

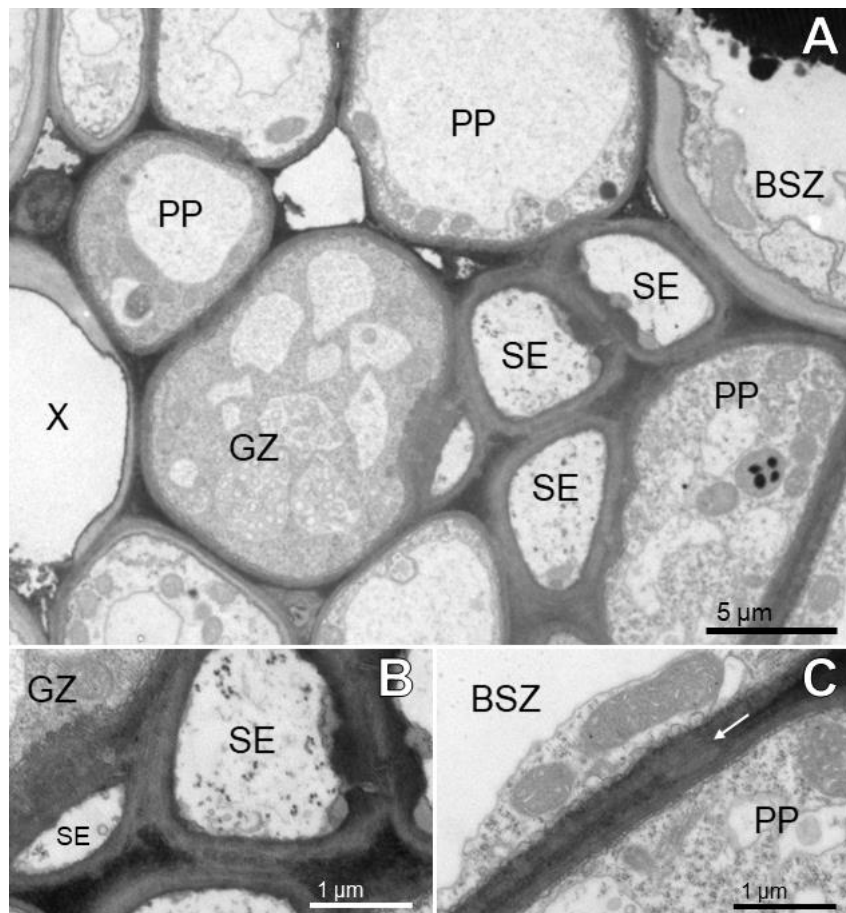


Abbildung 14: TEM-Aufnahme des Leitbündels von *S. caprea* in den *minor veins*. A: Struktur des Leitbündels. B: PL zwischen GZ und assoziiertem SE. C: weißer Pfeil - PL zwischen BSZ und PP. BSZ: Bündelscheidzellen, GZ: Geleitzellen, PL: Plasmodesmata. PP: Phloemparenchymzellen, SE: Siebelement, X: Xylem.

#### 4.1.4 *Populus x canescens*

Die Plasmodesmata in *P. canescens* traten vermehrt als lokale Ansammlungen zwischen einem Siebelement und der assoziierten Geleitzelle (Abbildung 15A) auf. Zwischen Geleit- und Bündelscheidzelle finden sich mehrere Plasmodesmata an einer Verbindungsstelle (Abbildung 15B). Vor allem zwischen Phloemparenchym- und Geleitzelle sind deutlich verzweigte Plasmodesmata zu erkennen (Abbildung 15C).

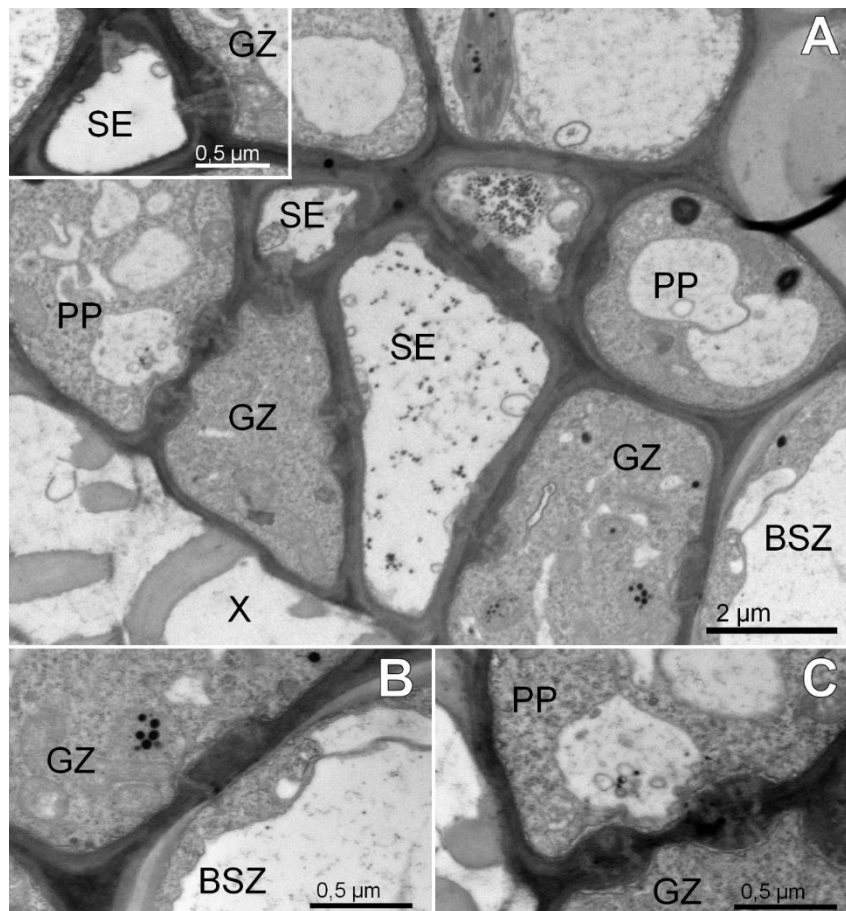


Abbildung 15: TEM-Aufnahme des Leitbündels von *P. canescens* in den *minor veins*. A: Struktur des Leitbündels. Der Einschub zeigt PL zwischen SE und GL. B: PL zwischen GZ und BSZ. Dieses Bild stammt von einer anderen Aufnahme. C: Zwei H-förmige PL zwischen PP und GZ. BSZ: Bündelscheidzellen, GZ: Geleitzellen, PL: Plasmodesmata, PP: Phloemparenchymzellen, SE: Siebelement, X: Xylem.



## 4.2 Subzelluläre Zuckerverteilung

Um Aussagen über den Phloembeladungsmechanismus treffen zu können, ist es wichtig neben der *minor vein* Anatomie auch die Zuckerkonzentration im Cytosol der Mesophyllzellen und im Phloem zu kennen. Mit der NWF kann die durchschnittliche Metabolitverteilung in den subzellulären Kompartimenten bestimmt werden. Für die beiden Salicaceae konnte eine visuell reproduzierbare Auftrennung der Kompartimente erzielt werden, die Bestimmung des cytosolischen Markerenzym lieferte jedoch keine konsistenten Ergebnisse. Dadurch war eine eindeutige Zuordnung des Zuckergehaltes zu den subzellulären Kompartimenten nicht möglich. Für *F. sylvatica* gelang die Aufteilung und Bestimmung der Markerenzyme. Die subzelluläre Zuckerverteilung in *Q. robur* wurde bereits von Öner-Sieben und Lohaus (2014) bestimmt.

### 4.2.1 Subzelluläre Zuckerverteilung in *Fagus sylvatica*

In *F. sylvatica* waren die Hexosen Glukose und Fruktose ausschließlich in der Vakuole vertreten, Saccharose fand sich zu 70 % in der Vakuole, zu 30 % im Cytosol (Abbildung 16).

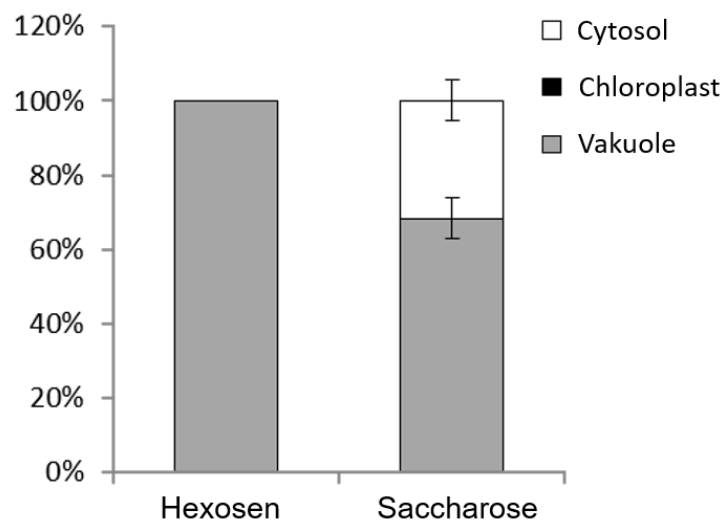


Abbildung 16: Prozentuale Zuckerverteilung in den subzellulären Kompartimenten (n = 3, Mittelwerte  $\pm$  SD).

Um weitergehende Rückschlüsse auf die Zuckerkonzentration in den Kompartimenten ziehen zu können, wurden anschließend die subzellulären Volumina bestimmt.



#### 4.2.2 Subzelluläre Volumina in *Fagus sylvatica*

Zunächst wurden die relativen Anteile der Kompartimente durch morphometrische Analysen von licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestimmt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Relativer Anteil der subzellulären Kompartimente von Mesophyllzellen in *F. sylvatica*.

rel. Volumen [%]	<i>F. sylvatica</i>
Vakuole	42,7 ± 13,7
Chloroplast	32,9 ± 8,9
Cytosol	20,2 ± 5,8
Zellkern	4,2 ± 1,2

Das Gesamtvolumen einer Mesophyllzelle wurde als 100 % genommen. Als Cytosol wurden Cytoplasma, Peroxisomen und Mitochondrien zusammengefasst (n = 20-30, Mittelwerte ± SD).

Den größten Anteil am zellulären Volumen nahm mit 42,7 % die Vakuole ein, gefolgt vom Chloroplast mit 32,9 % und dem Cytosol (Summe aus Cytoplasma, Peroxisomen und Mitochondrien) mit 20,2 %. In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass der Anteil der Peroxisomen und Mitochondrien am Volumen des Cytosols zwischen 13-15 % und der Anteil des Stromas am Chloroplasten bei 48-58 % liegt (Winter et al. 1993). Ebenfalls in dieser Studie wurde gezeigt, dass in Dikotylen der Hauptteil des wässrigen Anteils auf Mesophyllzellen entfällt (Winter et al. 1993).

Um die Volumina der Kompartimente bestimmen zu können, wurde zunächst der durchschnittliche Wassergehalt von *F. sylvatica* Blättern ermittelt, der bei 533 µl g<sup>-1</sup>FG lag. Das Volumen der Vakuole lag also bei 227,6 µl g<sup>-1</sup>FG, das des Stromas bei 87,6 µl g<sup>-1</sup>FG und das des Cytosols bei 91,5 µl g<sup>-1</sup>FG (Tabelle 4).

Tabelle 4: Charakteristika von *F. sylvatica* Blättern (n = 5, Mittelwerte ± SD)

	<i>F. sylvatica</i>
Trockengewicht [mg g <sup>-1</sup> FG]	467 ± 40
Wassergehalt [µl g <sup>-1</sup> FG]	533 ± 43
Vakuole [µl g <sup>-1</sup> FG]	227,6
Stroma [µl g <sup>-1</sup> FG]	87,6
Cytosol [µl g <sup>-1</sup> FG]	91,5

### 4.2.3 Subzelluläre Zuckerkonzentration in *Fagus sylvatica*

Basierend auf der prozentualen Verteilung der Zucker, der Zuckergehalte, der subzellulären Volumina und dem Gesamtzuckergehalt eines Blattes wurde die Konzentration der Zucker in den Kompartimenten berechnet (Abbildung 17 bzw. Tabelle 9 im Anhang).

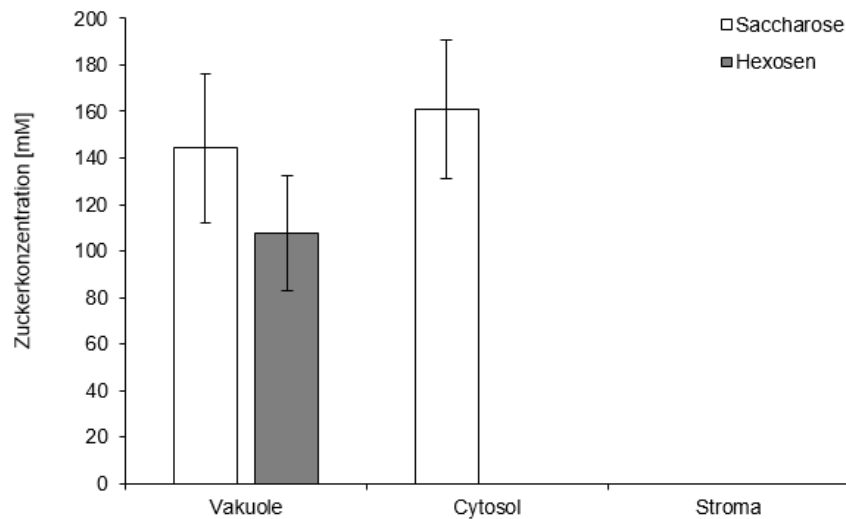
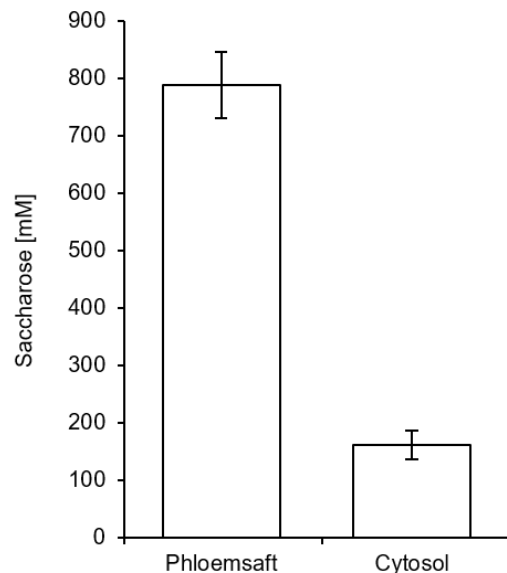


Abbildung 17: Konzentration der Zucker in den subzellulären Kompartimenten (n = 3, Mittelwerte  $\pm$  SD).

In der Vakuole konnten alle drei Zucker nachgewiesen werden. Die Konzentration der Hexosen lag bei 107 mM und die Konzentration von Saccharose bei 144 mM. Im Cytosol lag die Konzentration von Saccharose mit 164 mM in einem ähnlichen Bereich. Hexosen konnten im Cytosol nicht gemessen werden und im Stroma war kein Zucker nachweisbar.

#### 4.2.4 Saccharosegradient zwischen Phloem und Cytosol in *Fagus sylvatica*

Die Zuckerkonzentration im Phloem ist die zweite wichtige Größe, um Rückschlüsse auf den Beladungsmechanismus ziehen zu können. Mit der Laser-Aphid-Technik ist es möglich, reinen Phloemsaft zu gewinnen, da die Blattläuse mit ihrem Rüssel nur das Phloem anstechen. So werden Kontaminationen aus z.B. dem Xylem oder umliegenden Zellen vermieden. Von *F. sylvatica* konnte reiner Phloemsaft gewonnen werden, für die Salicaceae hingegen nicht.



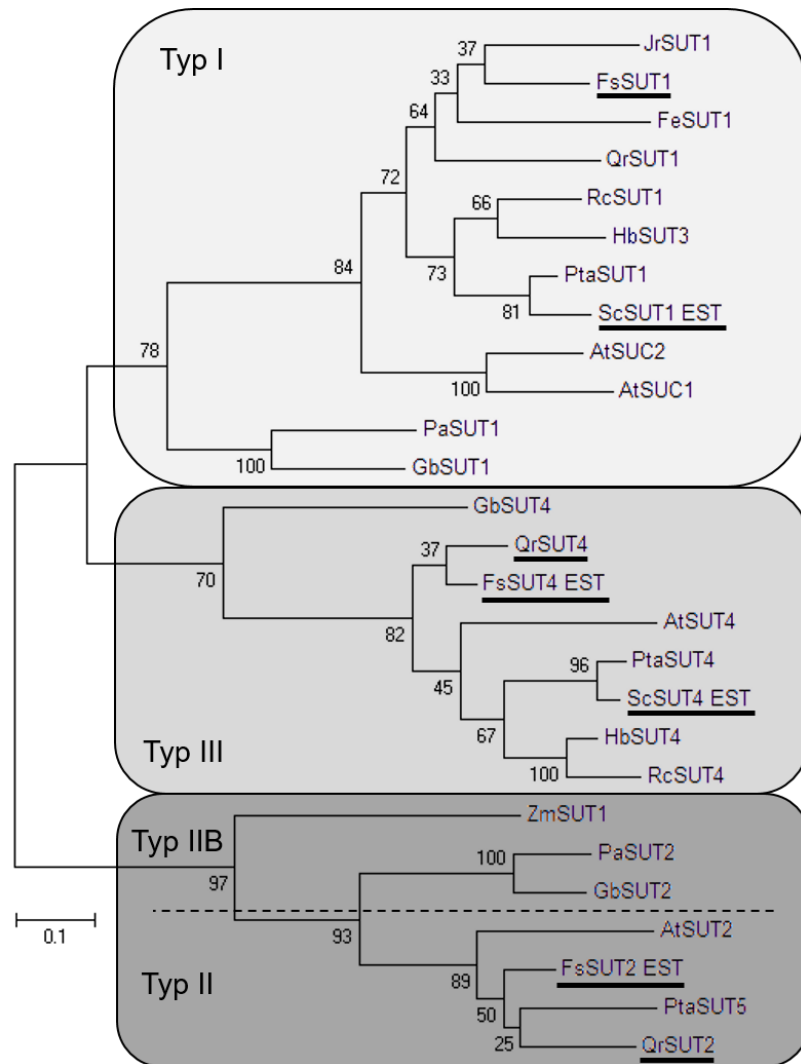
**Abbildung 18:** Saccharosekonzentration im Phloemsaft und im Cytosol von Mesophyllzellen in *F. sylvatica* (n = 3, Mittelwerte  $\pm$  SD).

Saccharose konnte als Hauptzucker im Phloem von *F. sylvatica* identifiziert werden, wohingegen keine oder nur geringe Spuren von Glukose und Fruktose gemessen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Die Saccharosekonzentration im Phloem lag bei knapp 0,8 M. Die Saccharosekonzentration im Cytosol lag mit 0,16 M um den Faktor 5 niedriger (Abbildung 18).

#### 4.3 Identifizierte Saccharosetransporter Sequenzen

In dieser Arbeit konnten insgesamt sechs SUT Sequenzen identifiziert werden. Die Einteilung der SUTs erfolgte nach Peng et al. (2014), die die Transporter nach phylogenetischen Kriterien in 4 Typen kategorisieren. Die Transporter von Typ I kommen ausschließlich in eudikotylen Pflanzen vor und sind mit dem Phloem assoziiert und an dessen Beladung beteiligt. Die Funktion der Transporter von Typ II und Typ IIB ist noch nicht abschließend geklärt. Transporter von Typ III sind hauptsächlich in der Tonoplastenmembran lokalisiert und sind dort am Export von Saccharose aus der Vakuole beteiligt. Die Benennung der Transporter erfolgte nach ihren Homologen in *A. thaliana*. Bei diesem System stimmen Einteilung und Benennung numerisch bei Typ I und Typ II überein. Die Transporter von Typ III werden jedoch in dieser Arbeit als SUT4 bezeichnet, da in *A. thaliana* der vakuoläre Transporter so bezeichnet wurde.

In einer früheren Arbeit wurde bereits der Transporter von Typ I in *Q. robur* gefunden (Öner-Sieben und Lohaus, 2014). In dieser Arbeit wurde zuerst je eine Teilsequenz von Typ II und III durch PCR mit degenerierten Primern identifiziert, die durch Datenbankrecherche vervollständigt werden konnten (QrSUT2 und QrSUT4). In *F. sylvatica* wurde eine Vollständigensequenz vom Typ I (FsSUT1) und eine Teilsequenz von Typ II und III (FsSUT2 EST, FsSUT4 EST) gefunden (Abbildung 19). Aus der vorhandenen Sequenz von FsSUT2 EST konnten keine qPCR-Primer mit ausreichender Effizienz abgeleitet werden. Daher wurde dieser Transporter nicht in die Expressionsanalyse mit einbezogen.



**Abbildung 19:** Phylogenetische Analyse von ausgewählten und in dieser Arbeit identifizierten SUT Sequenzen. Das Proteinalignment wurde mit ClustalW erstellt, das im Programm MEGA 6.06 implementiert ist. Der Stammbaum wurde als Maximum-Likelihood-Modell mit 1000 Bootstraps mit MEGA 6.06 erstellt. Die Nummern geben die Prozente über alle Bootstrap-Wiederholungen an. Der Balken zeigt die evolutionäre Distanz. Die in dieser Arbeit identifizierten Sequenzen sind unterstrichen. AtSUC1, AtSUC2, AtSUT2, AtSUT4 (*Arabidopsis thaliana*: AEE35247, AEC05635, NP\_173685.1, NP\_172467); FsSUT1, FsSUT4 EST (*Fagus sylvatica*: MH650992, JZ977984); FeSUT1 (*Fraxinus excelsior*: AHB33870); GbSUT1, GbSUT2, GbSUT4 (*Ginkgo biloba*: MH650993, MH650994, MH650995); HbSUT3, HbSUT4 (*Hevea brasiliensis*: ABK60190, ABK60191); JrSUT1 (*Juglans regia*: AAU11810); PaSUT1, PaSUT2 (*Picea abies*: MH281472, MH281473); PtaSUT1, PtaSUT4, PtaSUT5 (*Populus tremula x alba*: ADW94615, ADW94617, ADW94618); QrSUT1, QrSUT2, QrSUT4 (*Quercus robur*: AHB33871, MH281474, MH650991); RcSUT1, RcSUT4 (*Ricinus communis*: CAA12256, AAU21439); ZmSUT1 (*Zea mays*: NP\_001292720.1).

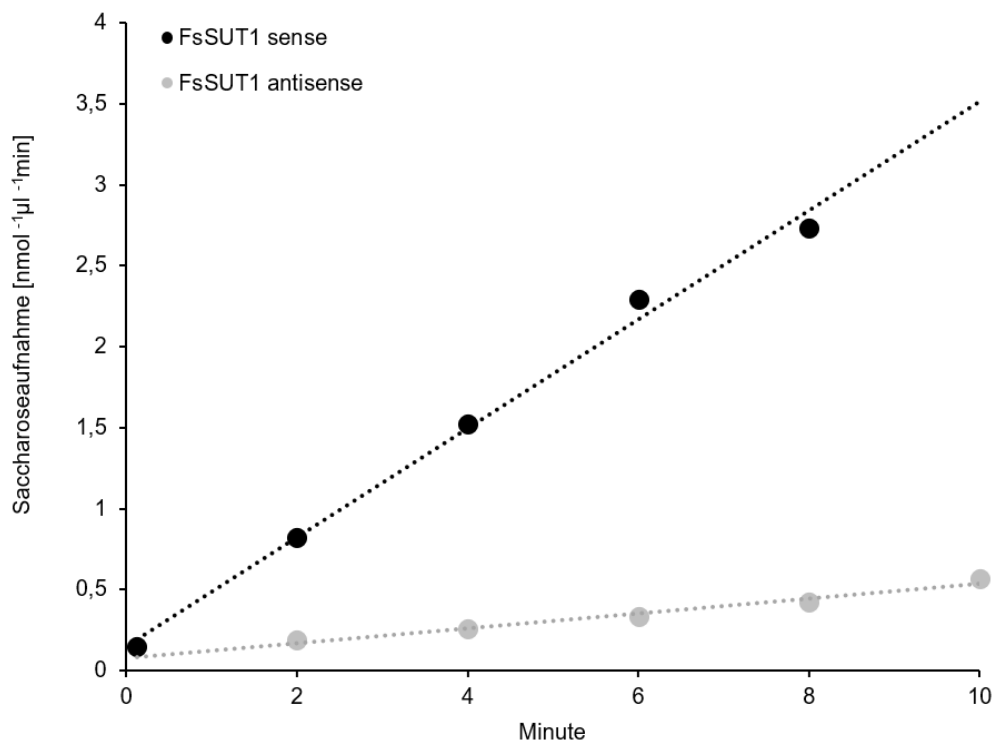
In *S. caprea* wurde je eine Teilsequenz von Typ I und III (ScSUT1 EST und ScSUT4 EST) durch degenerierte Primer identifiziert, jedoch keiner vom Typ 2. Diese kommen ubiquitär in jeder Pflanze vor (Reinders et al. 2012), daher ist davon auszugehen, dass auch *S. caprea* einen SUT2 exprimiert. Die Transporterfamilie aus *P. canescens* wurde zuvor von Payyavula et al. 2011 umfassend beschrieben. Eine Liste mit den gefundenen Teilsequenzen ist im Anhang (7.2) zu finden.

FsSUT1 und QrSUT1 wurden im Stammbaum Typ I zugeordnet, zusammen mit JrSUT1 von *Juglans regia* (Juglandaceae). Alle drei gehören zur Ordnung der Fagales. Das nächste Subcluster bilden die Transporter der Mitglieder aus der Ordnung der Malpighiales. Dieses besteht aus den Transportersequenzen von *Ricinus communis* und *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae) sowie den Sequenzen von *P. canescens* und *S. caprea* (Salicaceae). Die Sequenzen der krautigen Pflanze *Arabidopsis thaliana* und der Gymnospermen *Picea abies* und *Ginkgo biloba* bilden eigene Cluster. Dieses Verteilungsmuster ist auch in Typ III zu finden. In der Gruppe von Typ II bildet die Sequenz aus der monokotylen Maispflanze ZmSUT1 eine eigene Gruppe. In Monokotylen übernehmen die Transporter vom Typ IIB die Aufgaben der Transporter vom Typ I in Eudikotyledonen. Die Sequenzen der beiden Gymnospermen bilden ebenso ein eigenes Cluster, wie die Sequenzen der Angiospermen (Abbildung 19).

## 4.4 Charakterisierung von FsSUT1

### 4.4.1 Heterologe Funktionsüberprüfung

Durch bioinformatische Vergleiche und Analysen kann *in silico* eine Vorhersage darüber getroffen werden, ob das Protein einer identifizierten SUT Sequenz ein Membranprotein ist. Für den experimentellen Beweis, dass diese Sequenz einen funktionsfähigen SUT codiert, wurde die Sequenz von FsSUT1 ausgewählt, da diese die einzige Vollängensequenz vom Typ I ist. Die Sequenz wurde in den Shuttlevektor NEV-N kloniert, der sowohl in *E. coli* als auch in *S. cerevisiae* exprimiert wird. Dieses Vektorkonstrukt wurde in einen Hefestamm eingebracht, der keine Saccharose aufnehmen kann. Die Transporteraktivität des Proteins konnte über die Aufnahme von radioaktiv markierter Saccharose aus dem Wachstumsmedium nachgewiesen werden.



**Abbildung 20:** Vorläufige Aufnahmerate (n =1) von <sup>14</sup>C Saccharose von transformierten Hefekulturen. Die schwarze Linie zeigt die Aufnahmerate des FsSUT1 Proteins dessen Sequenz in *sense* Richtung im NEV-N Vektor lag, die graue Linie die des Proteins dessen Sequenz in *antisense* Richtung auf dem Vektor lag. Die Saccharosekonzentration im Medium betrug 100 mM.

Die Messung der Aufnahmerate ist als vorläufiges Ergebnis zu betrachten, da die Messung nur einmal durchgeführt wurde. Im Hefestamm, in dem die SUT-Sequenz in *sense*-Richtung translatiert wurde, konnte Saccharoseaufnahme gemessen werden (Abbildung 20). Die SUT-Sequenz in *antisense*-Richtung diente als Negativkontrolle.

#### 4.4.2 Lokalisation des Transkripts

Durch Sequenzanalyse und phylogenetische Vergleiche können Transportersequenzen *in silico* den Typen I-III zugeordnet werden, aber einen Rückschluss auf ihre Lokalisation erlaubt dies nicht. Mittels RNA *in situ*-Hybridisierung können Transkripte im Gewebe lokalisiert werden und so weitere Hinweise auf die Funktion des Transporters geben. Hierfür wurde FsSUT1 ausgewählt (Abbildung 21).



Abbildung 21: Vorläufige Lokalisation (n = 1) des Transkripts von FsSUT1 mittels RNA *in situ*-Hybridisierung in Blattgewebe von *F. sylvatica*. Der rote Pfeil zeigt auf das blaue, positive Signal im Bereich des Phloems. Daneben liegt das nicht angefärbte Xylem (grüner Pfeil). Das Leitbündel umgibt eine Sklerenchymscheide, die noch leicht pink durch Eosin angefärbt ist (gelber Pfeil).

Die Hybridisierung erfolgt in Blättern an den *minor veins* der 4. bis 6. Ordnung. Der Antikörper, der an die markierte Sonde bindet, zeigt nach der Behandlung mit Entwicklerlösung eine blaue Färbung. Diese blaue Färbung war im Bereich des Phloems zu sehen. Das benachbarte Xylem, was durch großvolumige Zellen charakterisiert ist, zeigte keinerlei Färbung. Die umgebende Sklerenchymscheide zeigte eine leicht pinke Färbung, die auf das bei der Einbettung verwendete Eosin zurückzuführen ist. Dieses Ergebnis ist als vorläufig zu betrachten. Zum einen wurde die Lokalisation nur einmal durchgeführt, zum anderen zeigte die Positivkontrolle kein Signal. Als Positivkontrolle wurde Aktin gewählt, das als etabliertes HKG in der RT-qPCR eingesetzt wird und damit gut nachweisbar sein sollte (Chen et al. 2013, Konlecher et al. 2013, Öner-Sieben et al. 2015, Dobbstein et al. 2018). Die Sonde in *sense*-Richtung diente als Negativkontrolle. Diese zeigte, wie erwartet, kein Signal, doch im Hinblick auf die Positivkontrolle ist dies kritisch zu bewerten.

#### 4.5 Jahreszeitlicher Einfluss auf NSC-Gehalt und die SUT Expression

Der Transport von Kohlenhydraten von *source* zu *sink* Organen ist für Pflanzen ein physiologisch überlebenswichtiger Prozess, an dessen Anfang die Phloembeladung steht. Je nach Jahreszeit kann es innerhalb eines Organs zur Veränderung des Kohlenhydratbedarfs kommen. Dies gilt besonders für laubabwerfende Baumarten in temperaten Klimazonen. Daher wurde der Einfluss der Jahreszeiten auf den Zucker- und Stärkegehalt, sowie der Expression der SUTs in den vier Baumarten untersucht. Die Expression der Transporter ist relativ zum Kalibrator angegeben. Als Kalibrator wurden die Blattproben im Frühjahr ausgewählt und das gemessene Expressionsniveau für jeden untersuchten Transporter auf eins gesetzt.

##### 4.5.1 *Fagus sylvatica*

Die wichtigsten löslichen Zucker in *F. sylvatica* in allen Organen waren Glukose, Fruktose und Saccharose. Nur in den Winterproben wurden geringe Mengen an RFOs und Maltose gemessen (Daten nicht gezeigt). Der Zuckergehalt in den Blättern lag zwischen 20 und 30 mg g<sup>-1</sup>FG, wobei Saccharose mit einem Anteil von 70 - 95 % dominierte.

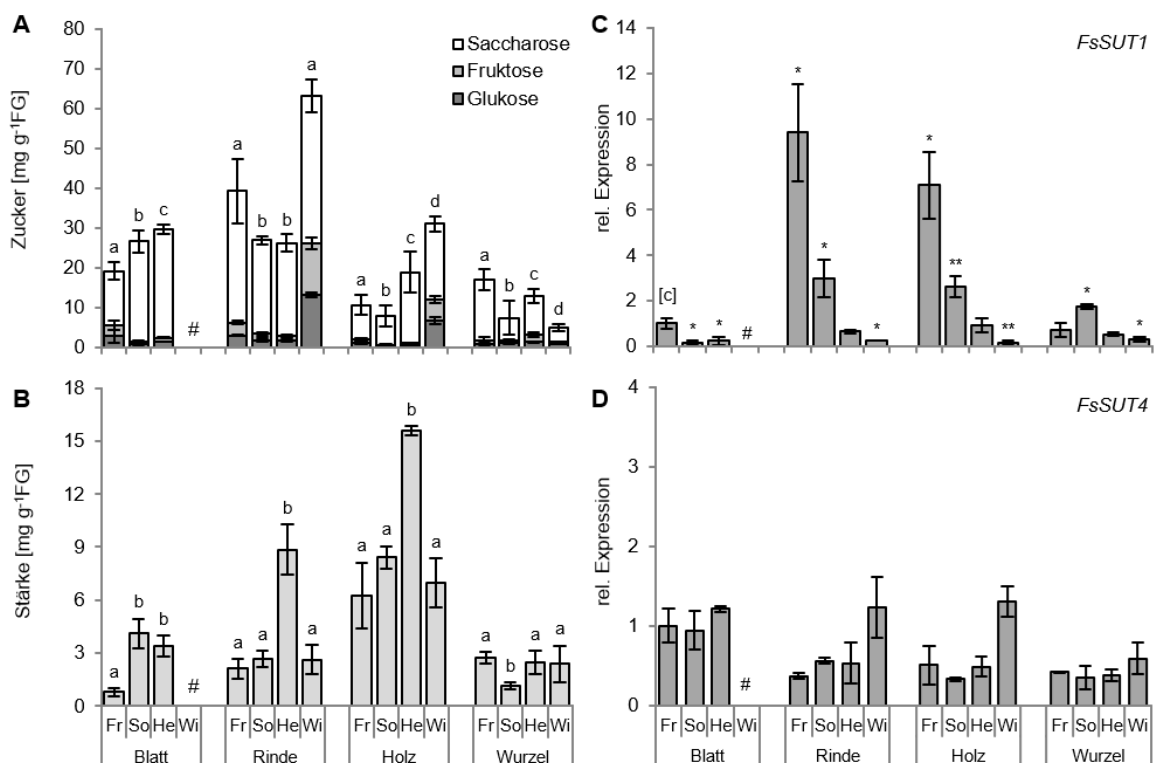


Abbildung 22: Veränderung des Zucker und Stärkegehalt sowie der SUT Expression in verschiedenen Organen von *F. sylvatica* über den Zeitraum eines Jahres. A, B: Organspezifische Verteilung von Zucker und Stärke. Die verschiedenen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in Stärke und Gesamtzuckergehalt innerhalb eines Organs (Tukey's HSD;  $p \leq 0,05$ ). C, D: Die Expression von *FsSUT1* und *FsSUT4* ist relativ zum Kalibrator [c] angegeben. Mit dem T-Test wurde auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum Kalibrator getestet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ). Die Messungen wurden ein zweites Jahr wiederholt und zeigten einen gleichartigen Verlauf. Fr - Frühling, So - Sommer, He - Herbst, Wi - Winter, # - keine Blätter im Winter (n = 3 ± SD).

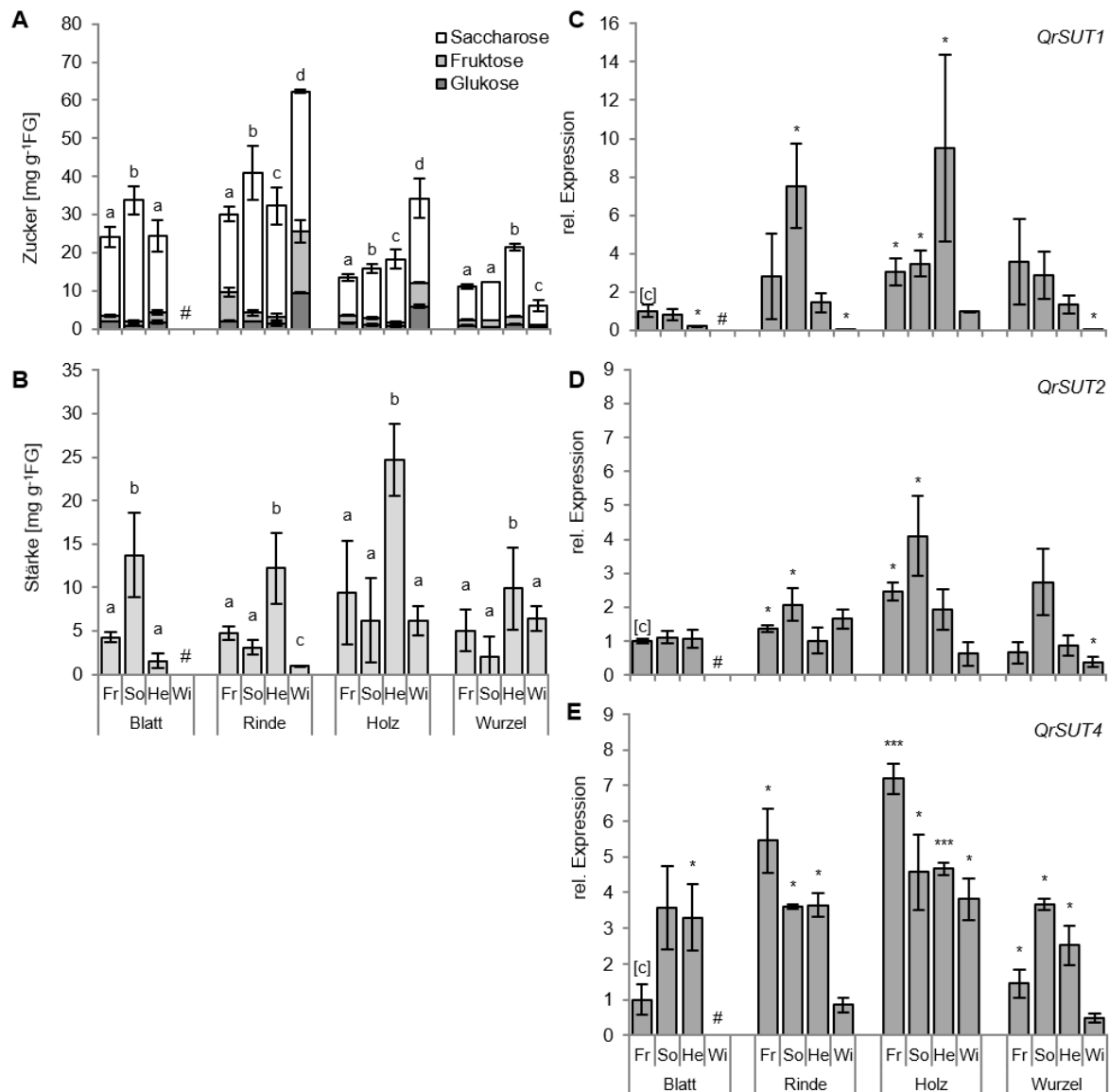


Der Gesamtzucker Gehalt war im Winter in der Rinde mit bis zu 63 mg g<sup>-1</sup>FG am höchsten. Der Anstieg ist vor allem auf höhere Gehalte an Glukose und Fruktose zurückzuführen. Der Zuckergehalt im Holz war das ganze Jahr niedriger als in den Blättern, außer im Winter, wo der Zuckergehalt auf 31 mg g<sup>-1</sup>FG anstieg. Der Anstieg ist ebenfalls auf einen höheren Anteil von Glukose und Fruktose zurückzuführen. Der Zucker- und Stärkegehalt in der Wurzel war im Vergleich zu allen anderen Organen während des ganzen Jahres gering (Abbildung 22A). Der Stärkegehalt blieb in Rinde und Holz im Jahresverlauf unverändert, außer im Herbst, wo er um das drei bzw. zweifache anstieg. In den Blättern verfünffachte sich der Stärkegehalt vom Frühling bis zum Sommer und Herbst (Abbildung 22B).

In *F. sylvatica* wurde die Expression der Vollängensequenz von *FsSUT1* und der Teilsequenz von *FsSUT4* gemessen. Die relative Expression von *FsSUT1* war in den Blättern geringer als in Rinde und Holz. In allen Geweben nahm die Expression im Jahresverlauf ab. Die Expression war im Frühjahr am höchsten mit Werten die bis zu 10-mal höher waren als der Kalibrator und nahm dann kontinuierlich im Lauf des Jahres ab. In der Wurzel war die Expression im ganzen Jahr niedrig, bis auf einen leichten Anstieg im Sommer (Abbildung 22C). Die Expression von *FsSUT4* lag das ganze Jahr etwa auf der Hälfte des Niveaus des Kalibrators, bis auf einen Anstieg in Rinde und Holz im Winter, wo die Expression auf das Niveau des Kalibrators anstieg (Abbildung 22D).

### 4.5.2 *Quercus robur*

Die Zuckergehalte in den Blättern von *Q. robur* und *F. sylvatica* waren ähnlich. Der Zuckergehalt lag zwischen 24 und 34 mg g<sup>-1</sup>FG und Saccharose war ebenfalls der dominierende Zucker. Der Gesamtzuckergehalt war mit bis zu 62 mg g<sup>-1</sup>FG in der Rinde im Winter am höchsten.



**Abbildung 23:** Veränderung des Zucker und Stärkegehalt sowie der SUT Expression in verschiedenen Organen von *Q. robur* über den Zeitraum eines Jahres. **A, B:** Organspezifische Verteilung von Zucker und Stärke. Die verschiedenen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in Stärke und Gesamtzuckergehalt innerhalb eines Organs (Tukey's HSD;  $p \leq 0,05$ ). **C-E:** Die Expression von *QrSUT1*, *QrSUT2* und *QrSUT4* ist relativ zum Kalibrator [c] angegeben. Mit dem T-Test wurde auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum Kalibrator getestet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ). Die Messungen wurden ein zweites Jahr wiederholt und zeigten einen gleichartigen Verlauf. Fr - Frühling, So - Sommer, He - Herbst, Wi - Winter, # - keine Blätter im Winter ( $n = 3 \pm SD$ ).

Im Holz stieg der Zuckergehalt im Jahresverlauf nur leicht an, bis er sich im Winter, wegen des erhöhten Hexosenanteils verdoppelte (Abbildung 23A). In den Blättern wurde der höchste Stärkegehalt im

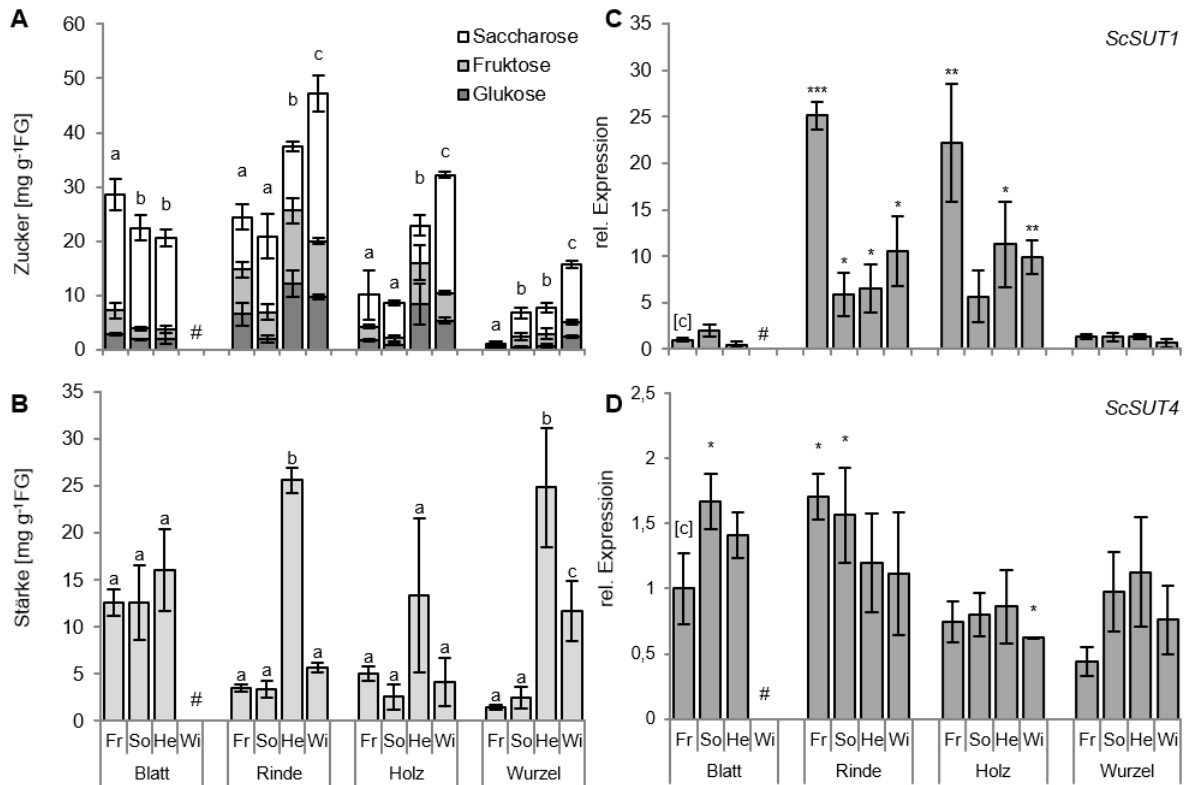
Sommer gemessen, in allen anderen Organen im Herbst. Im Holz wurde im Herbst der höchste Gesamtstärkegehalt mit  $25 \text{ mg g}^{-1}\text{FG}$  gemessen (Abbildung 23B).

Zusätzlich zur Volllänge­sequenz von *QrSUT1*, die von Öner-Sieben und Lohaus (2014) gefunden wurde, wurde die Expression der Volllänge­sequenz von *QrSUT2* (Typ II) und *QrSUT4* (Typ III) gemessen. *QrSUT1* zeigte eine starke gewebespezifische Expression. In den Blättern war die Expression im Frühjahr am stärksten und nahm bis zum Herbst ab. In der Rinde war die Expression im Sommer am höchsten, im Holz im Herbst. In der Wurzel zeigte die Expression einen ähnlichen Verlauf wie in den Blättern (Abbildung 23C).

*QrSUT2* wurde in den Blättern und in der Rinde das ganze Jahr auf einem konstanten Niveau exprimiert, wobei im Sommer in der Rinde ein leichter Anstieg zu verzeichnen war. Im Holz und in der Wurzel lag das Expressionsmaximum jeweils im Sommer und fiel bis zum Winter auf ihr Minimum (Abbildung 23D). Die Expression von *QrSUT4* war im Frühjahr in den Blättern am niedrigsten und stieg auf ein konstantes Niveau in Sommer und Herbst an. In Rinde und Holz war die Expression im Frühjahr am stärksten. In der Rinde fiel sie bis zum Winter auf das Niveau des Kalibrators, wohingegen im Holz die Expression von Sommer bis Winter auf einem ähnlichen Niveau blieb. In der Wurzel stieg die Expression in der Vegetationsperiode an und fiel im Winter auf ihr Minimum (Abbildung 23E).

### 4.5.3 *Salix caprea*

Der Zuckergehalt in den Blättern von *S. caprea* lag mit 21 bis 28 mg g<sup>-1</sup>FG im Bereich der beiden Fagaceae. Saccharose war ebenfalls der dominierende Zucker. In der Rinde und im Holz stieg der Zuckergehalt im Herbst und Winter an, wobei in der Rinde im Winter der höchste Gesamtzuckergehalt mit 48 mg g<sup>-1</sup>FG gemessen wurde.



**Abbildung 24:** Veränderung des Zucker und Stärkegehalt sowie der SUT Expression in verschiedenen Organen von *S. caprea* über den Zeitraum eines Jahres. A, B: Organspezifische Verteilung von Zucker und Stärke. Die verschiedenen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in Stärke und Gesamtzuckergehalt innerhalb eines Organs (Tukey's HSD;  $p \leq 0,05$ ). C, D: Die Expression von *ScSUT1* und *ScSUT4* ist relativ zum Kalibrator [c] angegeben. Mit dem T-Test wurde auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum Kalibrator getestet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ). Die Messungen wurden ein zweites Jahr wiederholt und zeigten einen gleichartigen Verlauf. Fr - Frühling, So - Sommer, He - Herbst, Wi - Winter, # - keine Blätter im Winter ( $n = 3 \pm SD$ ).

Im Vergleich zu den Fagaceae stieg der Hexosenanteil am Gesamtzuckergehalt bereits im Herbst und in der Rinde im Frühjahr an. In der Wurzel war der Zuckergehalt im Frühjahr am niedrigsten und stieg bis zum Winter an. Dieser Anstieg war auf einen höheren Saccharosegehalt zurückzuführen (Abbildung 24A). Der Stärkegehalt in den Blättern lag das ganze Jahr auf einem konstanten Niveau zwischen 12 und 16 mg g<sup>-1</sup>FG. In der Rinde wurde im Herbst mit 26 mg g<sup>-1</sup>FG der höchste Stärkegehalt gemessen. Während des restlichen Jahres lag der Stärkegehalt bei um die 5 mg g<sup>-1</sup>FG. Im Holz lag der Stärkegehalt im Laufe des Jahres ebenfalls um die 5 mg g<sup>-1</sup>FG, es ist jedoch zu bemerken, dass der Anstieg im Herbst aufgrund der hohen Standardabweichung als nicht signifikant anzusehen ist. In der Wurzel ist der Stärkegehalt im Frühjahr und Sommer niedrig, bevor er im Herbst auf 25 mg g<sup>-1</sup>FG anstieg und im Winter wieder absank (Abbildung 24B).

In *S. caprea* wurde die Expression der Teilsequenzen von *ScSUT1* und *ScSUT4* gemessen. Die Expression von *ScSUT1* lag in den Blättern und in der Wurzel das ganze Jahr auf einem konstant niedrigen Niveau. In der Rinde im Frühjahr konnte die höchste Expression gemessen werden, die das 25fache des Kalibrators betrug. Im Sommer bis Winter lag die Expression auf einem gleichbleibenden Niveau, dass das 8-fache des Kalibrators betrug. Der gleiche Expressionsverlauf konnte auch im Holz gemessen werden (Abbildung 24C). Die Expression von *ScSUT4* lag das ganze Jahr in allen Organen zwischen dem 0,5- und dem 1,8-fachen des Kalibrators (Abbildung 24D).

#### 4.5.4 *Populus x canescens*

Der Zuckergehalt in den Blättern von *P. canescens* lag im gleichen Bereich wie bei den drei anderen Baumarten, mit Saccharose als Hauptzucker. In der Rinde, Holz und Wurzel wurde der höchste Zuckergehalt jeweils im Winter gemessen, wobei der Anteil an Hexosen nur in der Rinde erhöht war (Abbildung 25A). Im Winter wurden geringe Menge an RFO in Rinde und Holz gemessen (Daten nicht gezeigt).

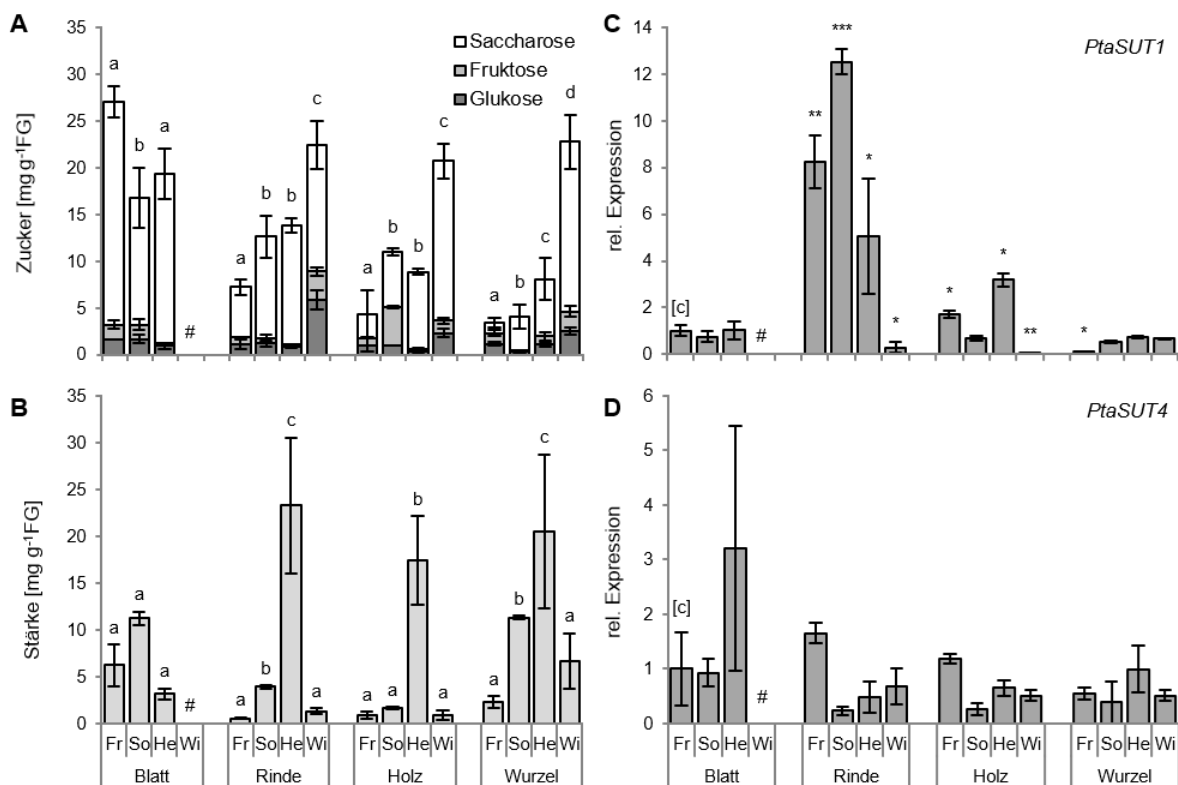


Abbildung 25: Veränderung des Zucker und Stärkegehalt sowie der SUT Expression in verschiedenen Organen von *P. canescens* über den Zeitraum eines Jahres. A, B: Organspezifische Verteilung von Zucker und Stärke. Die verschiedenen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in Stärke und Gesamtzuckergehalt innerhalb eines Organs (Tukey's HSD;  $p \leq 0,05$ ). C, D: Die Expression von *PtaSUT1* und *PtaSUT4* ist relativ zum Kalibrator [c] angegeben. Mit dem T-Test wurde auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum Kalibrator getestet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ). Die Messungen wurden ein zweites Jahr wiederholt und zeigten einen gleichartigen Verlauf. Fr - Frühling, So - Sommer, He - Herbst, Wi - Winter, # - keine Blätter im Winter (n = 3 ± SD).

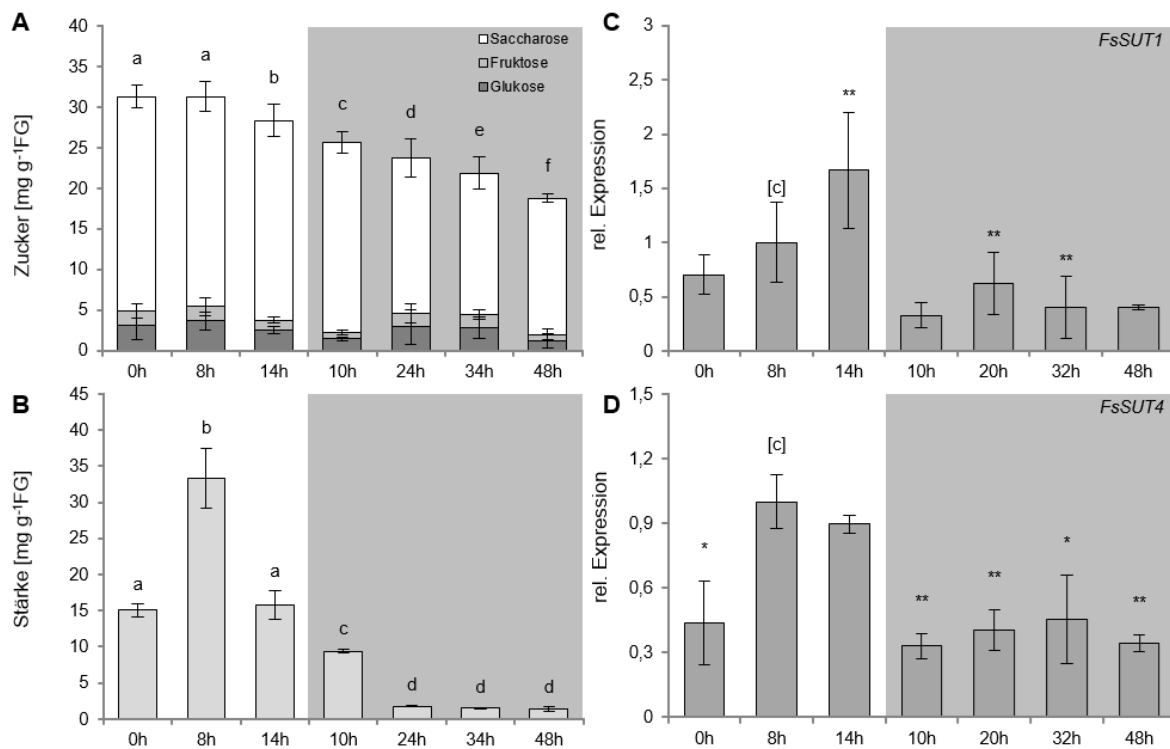
Der Stärkegehalt zeigte in den Blättern keine signifikante Veränderung im Jahr. In Rinde, Holz und Wurzel wurde der höchste Stärkegehalt jeweils im Herbst gemessen (Abbildung 25B). Die Transporterfamilie aus *P. canescens* wurde bereits von Payyavula et al. (2011) beschrieben. Für diese Arbeit wurden die Transporter *PtaSUT1* und *PtaSUT4* ausgewählt und deren Expression gemessen. Die Expression von *PtaSUT1* lag in den Blättern und in der Wurzel im ganzen Jahr auf einem niedrigen Niveau. In der Rinde lag die Expression im Frühjahr um das 8-fache höher als die des Kalibrators, im Sommer um das 13-fache, das gleichzeitig auch den höchsten Expressionswert darstellt. Im Holz wurde die höchste Expression im Herbst gemessen (Abbildung 25C). Die Expression von *PtaSUT4* zeigte das ganze Jahr über keine signifikante Veränderung (Abbildung 25D).

## 4.6 Einfluss von Licht auf den NSC-Gehalt und die SUT Expression

Neben dem saisonalen Einfluss wird der Zuckerhaushalt in Pflanzen durch den Tag-Nacht Rhythmus beeinflusst. Insbesondere die Photosynthese und damit der gesamte Zuckerstoffwechsel ist lichtabhängig. Als Kalibrator wurde für diese Versuchsreihe die Blattprobe in der Mitte der Lichtperiode ausgewählt und das gemessene Expressionsniveau auf eins gesetzt.

### 4.6.1 *Fagus sylvatica*

Die Pflanzen wurden nach einer normalen Lichtphase einer verlängerten Dunkelphase ausgesetzt. Nach 48 h Dauerdunkel war der Zuckergehalt in den Blättern von *F. sylvatica* auf ca. 70 % im Vergleich zum Zuckergehalt im Licht gesunken. Die Zuckerzusammensetzung zeigte keine nennenswerte Veränderung (Abbildung 26A). Im Gegensatz dazu sank der Stärkegehalt in den Blättern nach 48 h Dunkelheit auf 10 % seines Maximalwertes in der Lichtperiode (Abbildung 26B).



**Abbildung 26: Einfluss von Dauerdunkel auf den Zucker- und Stärkegehalt sowie auf die SUT Expression in *F. sylvatica* Blättern.** A, B: Verteilung von Zucker und Stärke in den Blättern. Die verschiedenen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in Stärke und Gesamtzuckergehalt (Tukey's HSD;  $p \leq 0,05$ ). C, D: Die Expression von *FsSUT1* und *FsSUT4* ist relativ zum Kalibrator angegeben [c]. Mit dem T-Test wurde auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum Kalibrator getestet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ). Zu Sonnenaufgang wurde mit der Probenahme begonnen und die letzte Probe bei Sonnenuntergang genommen, was einer Lichtperiode von 14 h entspricht. Danach wurden die Pflanzen ins Dauerdunkel (grauer Hintergrund) gestellt. Die erste Probe wurde nach 10 h genommen und die Probenahme für weitere 38 h weitergeführt, was eine Gesamtversuchszeit von 62 h entspricht ( $n = 3 \pm SD$ ).

Die Expression von *FsSUT1* und *FsSUT4* zeigte einen ähnlichen Verlauf. Sie erreichte das Maximum in der Mitte bzw. der zweiten Hälfte der Lichtperiode und fiel unabhängig von der Dauer Dunkelphase auf ein Drittel des Kalibratorniveaus ab (Abbildung 26C+D).

#### 4.6.2 *Quercus robur*

Der Zuckergehalt in Blättern von *Q. robur* war am Anfang der Lichtperiode mit 26 mg g<sup>-1</sup>FG am höchsten und sank kontinuierlich bis zum Ende der Lichtperiode. Nach 48 h Dunkelheit war der Zuckergehalt um ein Drittel gesunken, ohne Veränderung der Zuckerzusammensetzung (Abbildung 27A).

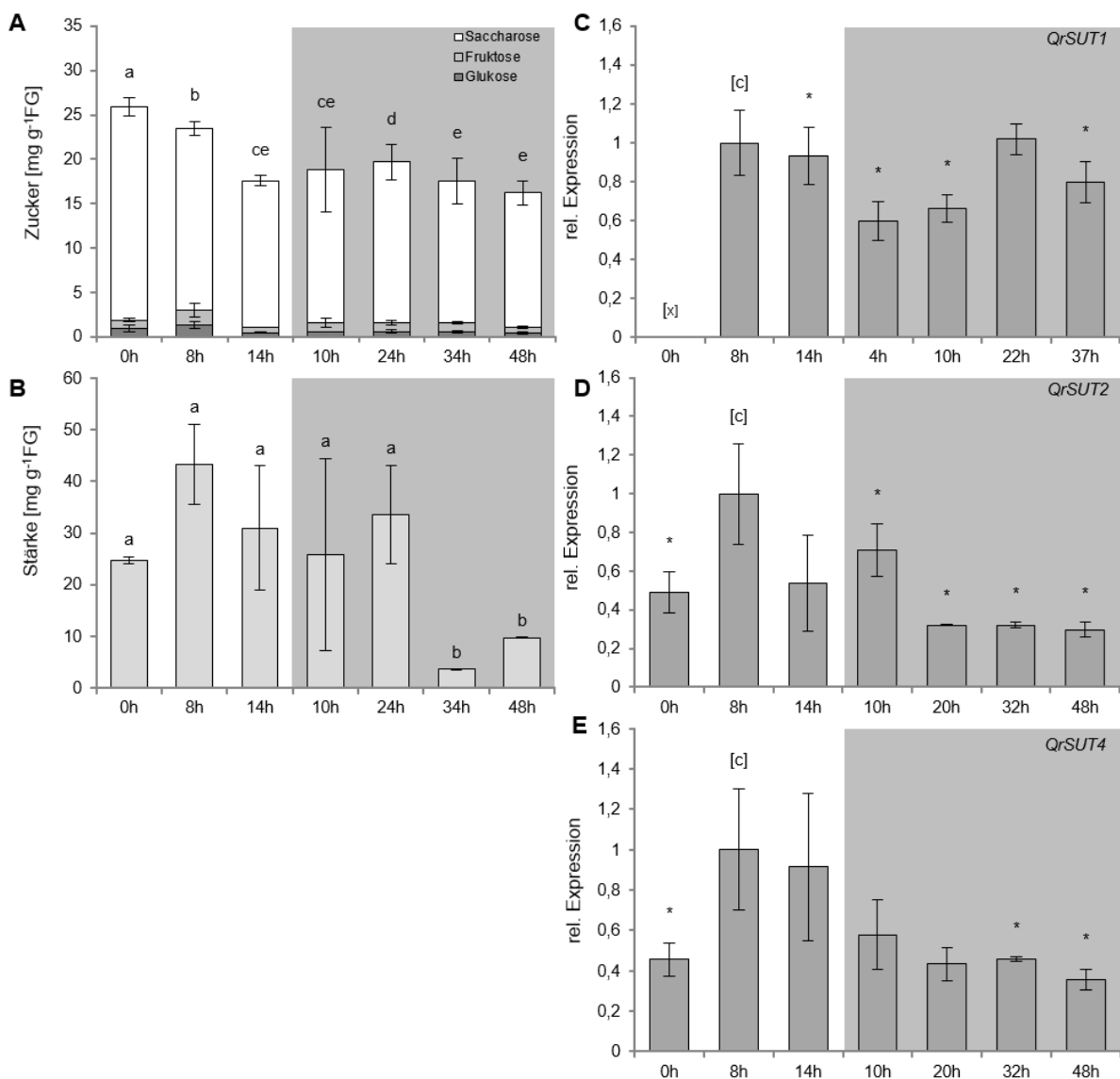


Abbildung 27: Einfluss von Dauerdunkel auf den Zucker- und Stärkegehalt sowie auf die SUT Expression in *Q. robur* Blättern. A, B: Verteilung von Zucker und Stärke in den Blättern. Die verschiedenen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in Stärke und Gesamtzuckergehalt (Tukey's HSD;  $p \leq 0,05$ ). C, D: Die Expression von *QrSUT1*, *QrSUT2* und *QrSUT4* ist relativ zum Kalibrator angegeben [c]. Mit dem T-Test wurde auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum Kalibrator getestet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ). Außer bei *QrSUT1* wurde zu Sonnenaufgang mit der Probenahme begonnen und die letzte Probe bei Sonnenuntergang genommen, was einer



Lichtperiode von 14 h entspricht. Danach wurden die Pflanzen ins Dauerdunkel (grauer Hintergrund) gestellt. Die erste Probe wurde nach 10 h genommen und die Probennahme für weitere 38 h weitergeführt, was eine Gesamtversuchszeit von 62 h entspricht. Bei *QrSUT1* begann die Probennahme in der Mitte der Lichtperiode, was zu einer verkürzten Lichtperiode von 6 h führte. Die erste Probennahme nach dem transferieren der Bäume ins Dauerdunkel erfolgte nach 4 h, die letzte nach weiteren 33 h, was einer Gesamtversuchszeit von 47 h entspricht ( $n = 3 \pm SD$ ).

Der Stärkegehalt erreicht in der Mitte der Lichtperiode sein Maximum. Nach 34 h Dunkelheit fiel der Stärkegehalt auf 25 % des Maximalwertes (Abbildung 27B). Die Expression der Transporter *QrSUT1*, *QrSUT2* und *QrSUT4* zeigten einen typischen Tagesverlauf, mit dem Maximum in der Mitte der Lichtperiode (Abbildung 27C-E). In der Dunkelheit sank das Expressionsniveau von *QrSUT2* und *QrSUT4* auf ein Drittel des Levels des Kalibrators ab (Abbildung 27D+E). Die Expression von *QrSUT1* sank nach 48 h Dunkelheit auf 80 % ihres Maximalwertes im Licht (Abbildung 27E).

#### 4.6.3 *Salix caprea*

In den Blättern von *S. caprea* sank der Zuckergehalt im Dunkeln nicht. Die Zuckerzusammensetzung zeigte jedoch einen höheren Anteil an Hexosen, als die beiden Fagaceae (Abbildung 28A).

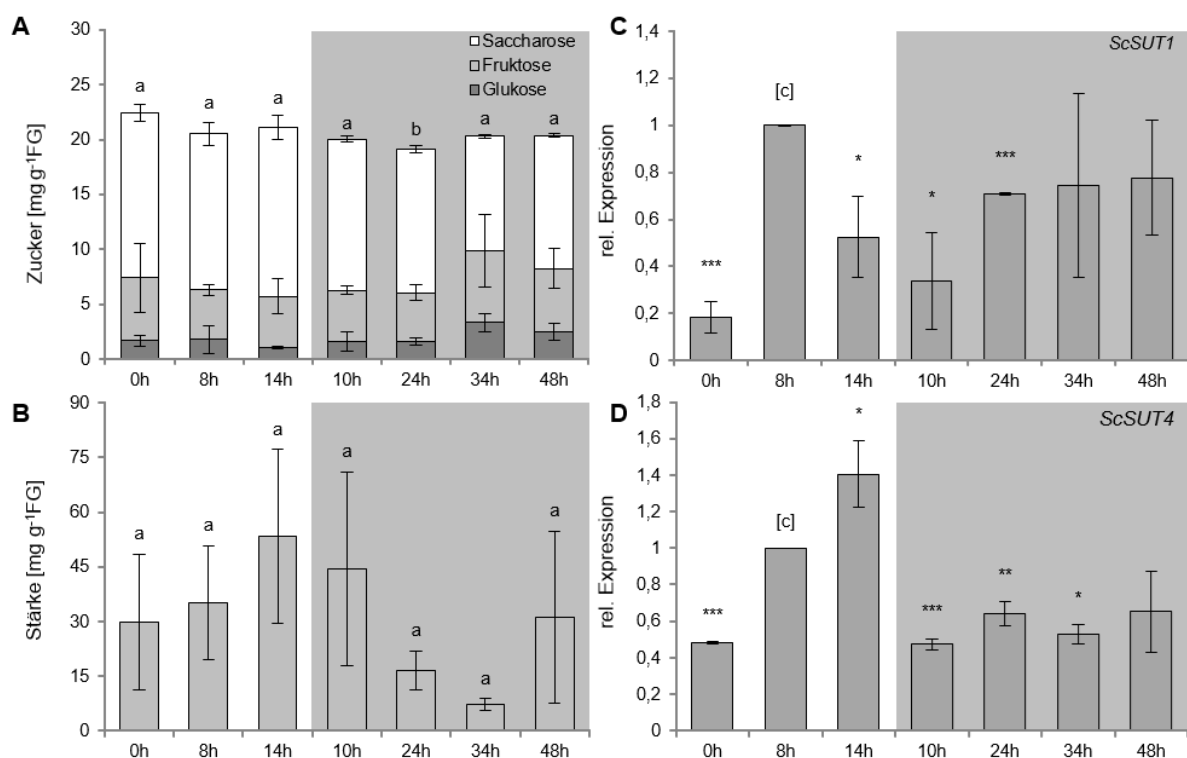
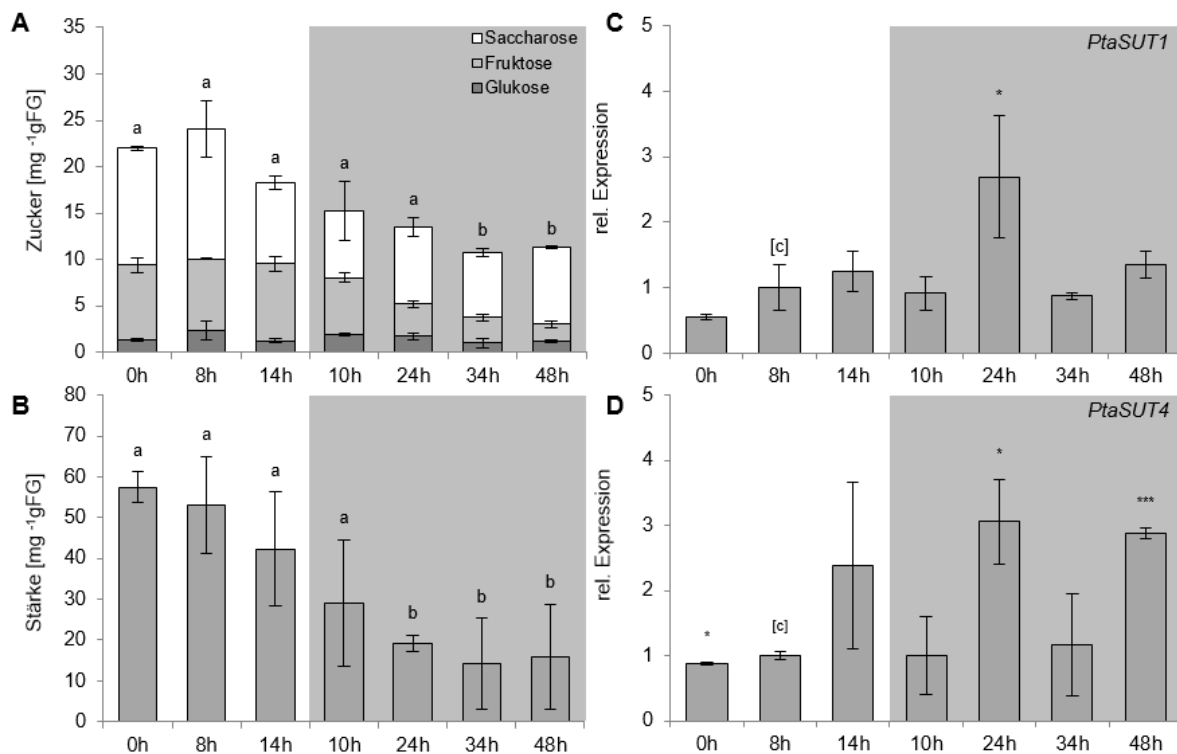


Abbildung 28: Einfluss von Dauerdunkel auf den Zucker- und Stärkegehalt sowie auf die SUT Expression in *S. caprea* Blättern. A, B: Verteilung von Zucker und Stärke in den Blättern. Die verschiedenen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in Stärke und Gesamtzuckergehalt (Tukey's HSD;  $p \leq 0,05$ ). C, D: Die Expression von *ScSUT1* und *ScSUT4* ist relativ zum Kalibrator angegeben [c]. Mit dem T-Test wurde auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum Kalibrator getestet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ). Zu Sonnenaufgang wurde mit der Probennahme begonnen und die letzte Probe bei Sonnenuntergang genommen, was einer Lichtperiode von 14 h entspricht. Danach wurden die Pflanzen ins Dauerdunkel (grauer Hintergrund) gestellt. Die erste Probe wurde nach 10 h genommen und die Probennahme für weitere 38 h weitergeführt, was eine Gesamtversuchszeit von 62 h entspricht ( $n = 3 \pm SD$ ).

Der Stärkegehalt erreichte am Ende der Lichtperiode sein Maximum. Nach 34 h Dunkelheit war er auf 20 % gesunken. Diese Änderung ist aber aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant (Abbildung 28B). Die Expression von *ScSUT1* zeigte einen typischen Tagesverlauf, mit dem Expressionsmaximum in der Mitte der Lichtperiode. Nach 24 h Dunkelheit stabilisierte sich die Expression bei 60 % des Maximums (Abbildung 28C). Die Expression von *ScSUT4* erreicht in der zweiten Hälfte der Lichtperiode ihr Maximum und fiel in der Dunkelheit auf 60 % des Kalibratorlevels (Abbildung 28D).

#### 4.6.4 *Populus x canescens*

Der Zuckergehalt in den Blättern von *P. canescens* zeigte, wie bei *S. caprea*, einen höheren Anteil an Hexosen als die beiden *Fagaceae*. Nach 34 h Dunkelheit sank der Zuckergehalt um 50 %. Dies ist die höchste Abnahme des Zuckergehaltes aller untersuchten Bäume (Abbildung 29A).



**Abbildung 29:** Einfluss von Dauerdunkel auf den Zucker- und Stärkegehalt sowie auf die SUT Expression in *P. canescens* Blättern. A, B: Verteilung von Zucker und Stärke in den Blättern. Die verschiedenen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in Stärke und Gesamtzuckergehalt (Tukey's HSD;  $p \leq 0,05$ ). C, D: Die Expression von *PtaSUT1* und *PtaSUT4* ist relativ zum Kalibrator angegeben [c]. Mit dem T-Test wurde auf signifikante Unterschiede im Vergleich zum Kalibrator getestet (\* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ). Zu Sonnenaufgang wurde mit der Probenahme begonnen und die letzte Probe bei Sonnenuntergang genommen, was einer Lichtperiode von 14 h entspricht. Danach wurden die Pflanzen ins Dauerdunkel (grauer Hintergrund) gestellt. Die erste Probe wurde nach 10 h genommen und die Probenahme für weitere 38 h weitergeführt, was eine Gesamtversuchszeit von 62 h entspricht ( $n = 3 \pm SD$ ).

Der Stärkegehalt sank kontinuierlich im Verlauf des Experiments, jedoch ist diese Veränderung erst nach 24 h Dunkelheit signifikant. Nach dieser Zeit war der Stärkegehalt auf 20 % des Maximalwertes gesunken (Abbildung 29B). Die Expression von *PtaSUT1* zeigte einen signifikanten Anstieg nach 24 h in der Dunkelheit (Abbildung 29C), ebenso wie die Expression von *PtaSUT4*, wobei sich dieser Anstieg nach 48 h Dunkelheit noch einmal wiederholte (Abbildung 29D).

## 5 Diskussion

Die Diskussion ist in zwei Abschnitte gegliedert. Im ersten Abschnitt wird auf die Phloembeladung eingegangen und anhand der vorgestellten Ergebnisse und Literaturhinweisen der Phloembeladungsmechanismus für die Fagaceae und Salicaceae diskutiert. Im zweiten Abschnitt wird die Funktion der identifizierten SUTs im Zusammenhang mit den Zuckergehalten im Jahresverlauf erörtert.

### 5.1 Phloembeladung in Laubbaumarten

Die Annahme, dass Bäume ihr Phloem symplastisch passiv beladen, basiert vor allem auf Plasmolyse-Experimenten, den Ergebnissen aus Autoradiogrammen und der offenen Struktur der *minor veins* (Russin und Evert 1985, Gamalei 1989, Turgeon und Medville 1998, Rennie und Turgeon 2009). Aufgrund der physiologischen Besonderheiten von Bäumen müssen die Ergebnisse, die mit diesen Methoden erzielt werden, kritisch betrachtet werden (Zhang et al. 2014).

Bei der Plasmolyse liegt der Kritikpunkt in der Methodik. Es wird immer nur ein Osmotikum, zumeist Sorbitol oder Mannitol eingesetzt, um das osmotische Potential eines Gewebes zu bestimmen. Da Bäume eine Vielzahl von osmotisch aktiven Substanzen enthalten, kann keine Aussage über den Konzentrationsgradienten eines einzelnen Stoffes daraus abgeleitet werden.

Russin und Evert (1985) untersuchten die osmotischen Verhältnisse in Blättern von *P. deltoides*. Sie ermittelten, ab welcher Konzentration des Osmotikums Mannitol 50 % der Zellen eines Gewebes plasmolysierten ( $C_{50}$ ). Die Mesophyllzellen plasmolysierten bei 0,67 M, die Geleitzellen bei 0,5 M und die Siebelemente bei 0,57 M. Die Autoren schlossen daraus, dass die Beladung der Siebelemente entgegen eines Konzentrationsgradienten verläuft und damit ein aktiver, energieabhängiger Prozess ist. Die Differenz zwischen Siebelement und Geleitzelle ist mit 0,07 M kleiner als das eingesetzte Inkrement des Osmotikums (0,1 M). Daher ist es fraglich, ob diese Differenz wirklich gemessen wurde, oder noch innerhalb der Messunsicherheit liegt (Turgeon und Medville 1998). Auch die Differenz zwischen Mesophyllzellen und Siebelementen (0,1 M) bzw. Mesophyllzellen und Geleitzellen (0,17 M) entspricht genau dem bzw. ist nur weniger höher als das eingesetzte Inkrement. Aussagen zum Beladungsmechanismus aufgrund dieser geringen Unterschiede sollten daher kritisch hinterfragt werden.

Turgeon und Medville (1998) zeigten, dass die Siebelemente und Mesophyllzellen von *S. babylonica* bei der gleichen Konzentration plasmolysieren. Bei einer Konzentration von 1 M Sorbitol waren 53 % der Siebelemente und 47 % der Mesophyllzellen plasmolysiert, bei einer Konzentration von 1,1 M Sorbitol waren alle Zellen vollständig plasmolysiert. Sie schlossen daraus, dass der Stofftransport über kurze

Distanzen z.B. von der Mesophyllzelle ins Siebelement, aufgrund des hohen osmotischen Potentials in den Mesophyllzellen und der subzellulären Kompartimentierung, über Diffusion stattfindet.

Plasmolyse-Experimente mit krautigen Pflanzen wie Kürbis und Zuckerrübe, die zu den apoplastischen Beladern gezählt werden, zeigten, dass die Zellen des Siebelement-Geleitzellkomplexes in Blättern bei der doppelten Konzentration des Osmotikums plasmolysierten, als die Mesophyllzellen (Geiger et al. 1973, Turgeon und Hepler 1989). In Bäumen konnte ein ähnlicher Konzentrationsgradient im Tulpenbaum gemessen werden. Goggin et al. 2001 stellten fest, dass bei einer Konzentration von 0,6 M die Mesophyllzellen vollständig plasmolysierten. Die Zellen im Phloem zeigten hingegen bei 1,2 M noch keine Anzeichen von Plasmolyse.

Bei der Autoradiographie wird überprüft ob sich radioaktiv markiertes  $^{14}\text{CO}_2$  bzw.  $^{14}\text{C}$ -Saccharose in den Blattadern akkumuliert. Bei apoplastischer Beladung des Phloems akkumulieren diese in den Blattadern und sie treten bei der anschließenden Detektion der Radioaktivität deutlich sichtbar hervor. Wird Saccharose auf dem symplastischen Weg transportiert, verteilt sie sich gleichmäßig und die Blattadern treten nicht hervor (van Bel 1994). Für krautige Pflanzen ist diese Methode gut etabliert, bei Bäumen ist die Aussagekraft aufgrund der physiologischen Besonderheiten jedoch beschränkt. Zum einen ist die Epidermis von Baumblättern dicker als die von krautigen Pflanzen, dies führt bei Bäumen zu widersprüchlichen Ergebnissen. So wurde beim Tulpenbaum erst nach der Entfernung der Epidermis eine Akkumulation von Saccharose in den Blattadern festgestellt (Goggin et al. 2001). Zum anderen ist diese Methode bei Pflanzen mit mittlerer bis hoher Saccharosekonzentration in den Blättern fehleranfälliger (Rennie und Turgeon 2009). Neben der, im Vergleich zu krautigen Pflanzen hohen Osmolarität in Blättern, ist der Anteil von Saccharose und Hexosen in Baumblättern bis zu 10-fach höher als in krautigen Pflanzen (Fu et al. 2011, Fink et al. 2018).

Ein weiteres Merkmal, dass mit passiver und symplastischer, aber nicht mit aktiver apoplastischer Beladung assoziiert wird, ist die offene *minor vein* Anatomie. Dieser Zusammenhang wurde bereits von Turgeon und Medville (2004) in Frage gestellt. Sie untersuchten die Phloembeladung beim Amerikanischen Amberbaum (*Liquidambar styraciflua*) und der Japanischen Zimterle (*Clethra barbinervis*). Beide haben eine offene *minor vein* Anatomie. Turgeon und Medville fanden, entgegen ihren Erwartungen, dass beide Bäume das Phloem apoplastisch beladen. Sie stellten in einer detaillierten Untersuchung der Plasmodesmata fest, dass diese große morphologische Ähnlichkeit mit den von RFO transportierenden Arten haben. Zudem konnten sie durch den Einsatz des SUT-Hemmers PCMBs (4-Chloromercuribenzenesulfonat) nachweisen, dass der Transport von Saccharose in beiden Arten über den apoplastischen Weg erfolgt. Daraus schlussfolgerten sie, dass nur bei RFO transportierenden Pflanzen von einer symplastischen Beladung ausgegangen werden kann, bei allen anderen müsse eine apoplastische Beladung, unabhängig von der Anzahl der Plasmodesmata, angenommen werden (Turgeon und Medville 2004). Eichen gelten aufgrund offener *minor vein* Anatomie und dem hohen Zuckergehalt als typische Vertreter der passiven Belader (Slewiniski et al. 2013). Für *Q. robur* konnte

jedoch eine aktive und vermutlich apoplastische Beladungsweise gezeigt werden (Öner-Sieben und Lohaus 2014). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass Saccharose die Plasmodesmata nicht passieren kann, da die Plasmodesmata zu schmal für das Disaccharid sind (Savage et al. 2016) oder die Plasmodesmata sich aufgrund von Turgorunterschieden schließen (Oparka und Prior 1992, Turgeon und Medville 2004). Die Befunde von Plasmolyse-Experimenten, Autoradiogrammen und *minor vein* Anatomie liefern unterschiedliche Ergebnisse, daher sollten zusätzliche Experimente zur Bestimmung des Phloembeladungsmechanismus in Betracht gezogen werden (Liesche 2017).

## 5.2 Apoplastische Phloembeladung in Fagaceae

Die Vertreter der Fagaceae und insbesondere die Eichen werden als typische Vertreter der passiven Beladung angesehen (Slewinski et al. 2013). Für *Q. robur* wurde diese Annahme jedoch widerlegt und gezeigt, dass dieser zu den aktiven und wahrscheinlich apoplastischen Beladern gehört (Öner-Sieben und Lohaus 2014). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass *F. sylvatica* ebenfalls zu den aktiven Beladern zählt. Die Saccharosekonzentration im Phloem ist um das 5-fache höher als die im Cytosol der Mesophyllzelle (Abbildung 18) was die passive Beladung durch Diffusion ausschließt. *F. sylvatica* besitzt normale Geleitzellen (Abbildung 12) und transportiert hauptsächlich Saccharose im Phloem (Abbildung 18). Daher kann die symplastisch aktive Beladung über die Synthese von RFOs ausgeschlossen werden und die Phloembeladung über den apoplastischen Weg kann angenommen werden.

Mit FsSUT1 wurde ein Typ I SUT identifiziert, der an der Phloembeladung beteiligt sein könnte. Bei der heterologen Funktionsüberprüfung von FsSUT1 in *S. cerevisiae* waren die transformierten Hefezellen in der Lage Saccharose zu transportieren (Abbildung 20). Dies spricht dafür, dass FsSUT1 ein Saccharose transportierendes Protein ist. Zur weiteren Charakterisierung wäre die Bestimmung des  $K_M$ -Wertes sinnvoll, um FsSUT1 mit anderen Transportern vom Typ I vergleichen zu können. Durch RNA *in situ*-Hybridisierung konnte das Transkript von FsSUT1 im Phloem nachgewiesen werden. Eine Lokalisation auf zellulärer Ebene ist nicht gelungen, da nicht zwischen den Zelltypen des Phloems unterschieden werden kann (Abbildung 21). Die Ergebnisse zur Charakterisierung von FsSUT1 sollten durch weitere Experimente verifiziert werden.

Der Effekt des SUT-Hemmers PCMBS auf die Zusammensetzung des Phloemexsudates unterstützt die Hypothese, dass das Phloem von *F. sylvatica* apoplastisch beladen wird (Fink et al. 2018). SUTs sind an der apoplastischen, nicht aber der symplastischen Beladung beteiligt, daher kann PCMBS eingesetzt werden um zwischen diesen beiden Arten zu unterscheiden (Turgeon und Gowan 1990). Bei apoplastischer Beladung wird durch PCMBS der SUT blockiert und der Anteil von Saccharose im Exsudat sinkt. Wird das Phloem symplastisch beladen, hat PCMBS keinen oder nur einen geringen Effekt auf das Phloemexsudat. In *F. sylvatica* sank der Saccharoseanteil im Phloemexsudat bei Einsatz von PCMBS auf 15 % gegenüber der Kontrolle (Fink et al. 2018).

Beim zweiten untersuchten Mitglied der Fagaceae wurde der apoplastische Beladungsweg bereits von Öner-Sieben und Lohaus (2014) gezeigt. Sie fanden in *Q. robur* eine 14-fach höhere Saccharosekonzentration im Phloem als im Cytosol der Mesophyllzellen. Dazu konnte der Transporter von Typ I QrSUT1 isoliert und ein  $K_M$ -Wert von 8 mM Saccharose bestimmt werden (Öner-Sieben 2014). Dieser Wert liegt über den bisher beschriebenen Werten für Typ 1 SUTs von 0,1 - 2 mM. Dies könnte eine Anpassung an die physiologischen Unterschiede zwischen Bäumen und krautigen Pflanzen sein. Die Zuckerkonzentration in Baumblättern ist deutlich höher und die Fließgeschwindigkeit des Phloems ist geringer als bei krautigen Pflanzen (Jensen et al. 2012, Öner-Sieben und Lohaus 2014). Daher könnten Typ I SUTs eine niedrigere Substrataffinität besitzen, diese Hypothese konnte aufgrund von fehlenden Vergleichswerten von SUTs aus Bäumen bisher nicht überprüft werden (Öner-Sieben 2014).

Zwar konnte apoplastische Beladung in *Q. robur* und *F. sylvatica* für 3-jährige Bäume gezeigt werden, in älteren *F. sylvatica* und *Quercus rubrum* Bäumen wurde jedoch in autoradiographischen Aufnahmen an Blättern mit abgeschabter Epidermis keine Akkumulation festgestellt (Rennie und Turgeon 2009). Dieser Unterschied muss durch weitere Studien, vorzugsweise an ausgewachsenen Bäumen untersucht werden. Neben dem Alter der Bäume können noch andere Umweltfaktoren die Phloembeladung beeinflussen. In symplastisch aktiv beladenden Kürbisgewächsen aktiviert die Infektion mit dem Gurkenmosaik-Virus den apoplastischen Beladungsweg (Gil et al. 2011). Andere RFO transportierende Arten wurden als gemischt apoplastisch-symplastische Belader charakterisiert (Knop et al. 2004, Voitsekhovskaja et al. 2006, Öner-Sieben et al. 2015). Zwei Beladungsmechanismen bzw. die Möglichkeit zwischen ihnen zu wechseln bietet den Pflanzen eine flexiblere Reaktion auf Umwelteinflüsse. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass unter bestimmten Bedingungen, Eigenschaften wie der Saccharosegradient oder der Turgordruck angepasst werden und so die Beladung aus einer Kombination von aktiv und passiv erfolgt.

### 5.3 Mögliche passive Beladung bei Salicaceae

Bei *S. caprea* und *P. canescens* ist die Einordnung des Beladungsmechanismus aufgrund der erzielten Ergebnisse nicht so eindeutig, wie bei den beiden Fagaceae. Lediglich die aktive symplastische Beladung kann ausgeschlossen werden. Auf den TEM-Aufnahmen waren in beiden Baumarten normale Geleitzellen zu erkennen (Abbildung 14, Abbildung 15). Auf morphologischer Ebene können Geleitzellen und Intermediärzellen anhand ihrer Zellwandstruktur unterschieden werden. Intermediärzellen zeigen eine ausgeprägte Wandproliferation, wohingegen die Zellwand normaler Geleitzellen einen glatten Charakter hat (Esau 2006). Die Untersuchung des Zuckergehaltes der Blätter und der anderen Organe zeigte, dass hauptsächlich Saccharose, Glukose und Fruktose vorhanden waren. Nur im Winter konnten geringe Spuren von RFOs nachgewiesen werden (Abbildung 24, Abbildung 25). Ein hoher Gehalt von RFOs im Phloem korreliert immer mit dem Auftreten von Intermediärzellen

(Turgeon et al. 1993), zudem wurden bis heute nur 8 Familien mit Intermediärzellen identifiziert: Acanthaceae, Celastraceae, Cucurbitaceae, Hydrangaceae, Lamiaceae, Oleaceae, Scrophulariaceae und Verbenaceae (Esau 2006). Da die untersuchten Salicaceae normale Geleitzellen zeigten und nur sehr geringe Spuren von RFOs gemessen werden konnte, kann der symplastisch aktive Weg ausgeschlossen werden.

Phloemsaft konnte von diesen Bäumen nicht gewonnen werden. Die nicht-wässrige Fraktionierung ergab zwar eine visuell reproduzierbare Auftrennung der Kompartimente, jedoch ergab die Bestimmung der Markerenzyme für das Cytosol keine konsistenten Ergebnisse. Daher kann an dieser Stelle keine Aussage über die Saccharosekonzentration im Phloem und dem Cytosol der Mesophyllzellen der beiden Salicaceae getroffen werden. Zur weiteren Beurteilung des Beladungsmechanismus werden daher Befunde aus der Literatur herangezogen. Die Schwierigkeiten der häufig angewendeten Autoradiographie- und Plasmolyse-Experimente aufgrund der physiologischen Besonderheiten von Bäumen wurden in 5.1 dargestellt. Eine andere Möglichkeit Erkenntnisse über den Beladungsmechanismus zu gewinnen, ist die Untersuchung transgener Pflanzen. Zhang et al. (2014) transformierten *P. canescens* und *Medicago sativa* mit einer Invertase aus Hefe und einem Signalpeptid zur Lokalisation an der Zellwand. Die Invertase in der Zellwand spaltet Saccharose im apoplastischen Raum in Glukose und Fruktose und reduziert bzw. verhindert so die Phloembeladung mit Saccharose. Bei dem apoplastischen Belader *M. sativa* zeigten die transgenen Pflanzen abhängig von der Expressionsstärke der Invertase Anzeichen von Chlorose, einer niedrigeren Photosyntheserate und unter Hochlichtbedingungen eine erhöhte Konzentration von Zucker und Stärke in den Blättern. Chlorose ist unter anderem ein phenotypisches Anzeichen für inhibierte Phloembeladung (Zhang et al. 2014). Transgene *P. canescens* Pflanzen zeigten hingegen kein Anzeichen von Chlorose, eine normale Photosyntheserate und auch die Verteilung von Zucker und Stärke war vergleichbar mit dem Wildtyp. Die Autoren schlossen daraus, dass Saccharose in *P. canescens* über den symplastischen und nicht den apoplastischen Weg transportiert wird (Zhang et al. 2014).

Die Transporterfamilie aus *P. canescens* wurde von Payyavula et al. (2011) beschrieben und deren Expression in verschiedenen Geweben untersucht. Das Transkript des hauptsächlich vakuolär lokalisierten Transporters *PtaSUT4* zeigte in allen Geweben die stärkste Expression, vor allem in *source*-Blättern und dem Xylem. Die Transkripte der Transporter *PtaSUT1* und *PtaSUT3* vom Typ I, die hauptsächlich an der Phloembeladung beteiligt sind, wurden nur in geringen Mengen nachgewiesen. Durch RNAi-Experimente wurde das Transkript von *PtaSUT4* reduziert, was in einer erhöhten Saccharosekonzentration in den Blättern resultierte. Die Autoren schlossen daraus, dass *PtaSUT4* den Export von Saccharose aus der Vakuole steuert und so Einfluss auf die Konzentration im Cytosol nimmt (Payyavula et al. 2011). Dieser Zusammenhang zwischen der Aktivität eines SUT4 Transporters und vakuolärem Export wurde *in vitro* bei *LjSUT4* aus *Lotus japonicus* nachgewiesen (Reinders et al. 2008). Payyavula et al. (2011) schlussfolgerten daraus, dass kein aktiver Beladungsschritt erforderlich ist, da bei passiver Phloembeladung die notwendige Regulation durch den vakuolären SUT erfolgt.



Turgeon und Medville (1998) veröffentlichten eine Studie mit Autoradiogrammen von *S. babylonica*. Um den Einschränkungen der dickeren Epidermis zu begegnen, führten sie die Versuche an normalen Blättern, an Blättern mit teilweiser und vollständig entfernter Epidermis sowie unter Einsatz von PCMBs durch. Unter allen Bedingungen zeigte sich keine Akkumulation. Die Messung des osmotischen Potentials ergab, dass sowohl die Siebelemente als auch die Mesophyllzellen bei etwa 1 M plasmolysieren (Turgeon und Medville 1998). Da Sorbitol als Osmotikum eingesetzt wurde, erlaubt die Plasmolyse keine Rückschlüsse auf die Konzentrationsgradienten der einzelnen osmotisch aktiven Substanzen im Blatt. Die Autoradiogramme zeigten unter allen Bedingungen konsistente Ergebnisse, daher kann dies als Hinweis auf passive Beladung gelten.

Da keine Daten vorlagen, um Aussagen über die Konzentrationsverhältnisse von Saccharose im Phloem bzw. in der Mesophyllzelle zu machen, versuchten Turgeon und Medville (1998) mit einem Rechenmodell diese Konzentrationen näherungsweise zu bestimmen. Durch die Plasmolyse-Experimente konnten sie das osmotische Potential der Siebelemente in *S. babylonica* auf 1 M bestimmen. Sie postulierten, dass Saccharose 60 % des Anteils der osmotisch aktiven Substanzen ausmacht und daher in einer Konzentration von 0,6 M im Phloem vorliegt. Über die verbliebenen 40 % der osmotisch aktiven Substanzen im Phloem machten sie keine Angaben.

Neben der Saccharosekonzentration im Phloem, ist die Saccharosekonzentration im Cytosol der Mesophyllzellen die zweite wichtige Größe. Um diese zu bestimmen berechneten Turgeon und Medville (1998) zuerst die Saccharosekonzentration im Blatt von *S. babylonica*. Die Saccharosekonzentration im Blatt zu kennen reicht nicht aus, da die subzelluläre Verteilung von Saccharose zwischen Cytosol und Vakuole einen entscheidenden Einfluss auf die Konzentration hat (Turgeon und Medville 1998). Die Autoren orientierten sich an bekannten subzellulären Verteilungen aus krautigen Pflanzen. So befindet sich im Spinat 26 % der Saccharose im Cytosol und 74 % in der Vakuole (Winter et al. 1994). Im Tabak hingegen ist das Verhältnis umgekehrt, dort ist 83 % der Saccharose im Cytosol und nur 17 % in der Vakuole lokalisiert (Heineke et al. 1994). Neben diesen beiden Extremen, nahmen Turgeon und Medville auch noch eine Gleichverteilung der Saccharose zwischen Cytosol und Vakuole an. Aus der Saccharosekonzentration im Blatt und den Werten aus der subzellulären Verteilung berechneten sie, dass bei der angenommenen Saccharosekonzentration von 0,6 M im Phloem eine Gleichverteilung der Saccharose zwischen Cytosol und Vakuole ausreicht um einen Konzentrationsgradienten aufzubauen, der die Diffusion ermöglicht. Sie schlussfolgerten daraus, dass *S. babylonica* das Phloem passiv belädt (Turgeon und Medville 1998).

Dieser Schlussfolgerung liegt die Annahme zugrunde, dass die Saccharosekonzentration im Phloem 0,6 M ist. Zum damaligen Zeitpunkt lagen noch keine Daten zur Saccharosekonzentration im Phloem aus Bäumen vor, aber in Studien an Spinat bzw. Rübe wurden Saccharosekonzentrationen von 0,7 bzw. 1,3 M gemessen (Winter et al. 1994, Lohaus et al. 1994, Lohaus und Heldt 1997, siehe auch Tabelle 5). Mittlerweile liegen auch Daten zur durchschnittlichen Saccharosekonzentration im Phloem von Bäumen

vor, die bei 0,88 M liegt (Tabelle 5). Bei dieser Saccharosekonzentration im Phloem reicht im Rechenmodell von Turgeon und Medville (1998) eine Gleichverteilung der Saccharose zwischen Cytosol und Vakuole nicht mehr aus um passive Beladung durch Diffusion anzunehmen. Um den notwendigen Konzentrationsgradienten zu schaffen, müssten mindestens 80 % der Saccharose im Cytosol lokalisiert sein. In den bisher untersuchten Bäumen ist nur 50-65 % der Saccharose im Cytosol lokalisiert (Tabelle 5). Alle diese Befunde beruhen auf sehr wenigen Datensätzen und teilweise theoretischen Berechnungen. Sie verdeutlichen aber, dass die Beladungsmechanismen in Salicaceae noch nicht endgültig geklärt sind.

Tabelle 5: Subzelluläre Volumina, subzelluläre Zuckerkonzentration in den Mesophyllzellen, sowieso Saccharosekonzentration im Phloem von ausgewählten krautigen Pflanzen und Bäumen. Tabelle modifiziert übernommen aus Fink et al. (2018).

	subzelluläre Volumina [ $\mu\text{l g}^{-1}\text{FG}$ ]		Konzentration in den Mesophyllzellen [mM]				Phloem- Konzentration [mM]	Ratio von Sac Phloem/MZ
	Vak	Cyt	Hexosen		Saccharose		Sac	
			Vak	Cyt	Vak	Cyt		
krautige Pflanzen								
<i>Solanum tuberosum</i> <sup>a</sup>	616	68	12	2	4	23	891 <sup>h</sup>	39
<i>Spinacia oleracea</i> <sup>b</sup>	572	49			11	56	767	15
<i>Beta vulgaris</i> <sup>c</sup>					9	50	1360	27
<i>Arabidopsis thaliana</i> <sup>d</sup>			4	2	1	15	341	22
<i>Brassica napus</i> <sup>e</sup>			25	0	4	83	1384	17
Mittelwerte $\pm$ SD	594 $\pm$ 31	63 $\pm$ 7	14 $\pm$ 11	1 $\pm$ 1	6 $\pm$ 4	45 $\pm$ 27	949 $\pm$ 437	24 $\pm$ 10
Bäume								
<i>Gnetum gnemon</i> <sup>f</sup>	444	69	87	1	82	133		
<i>Magnolia kobus</i> <sup>f</sup>	502	37	73	0	79	75	850	11
<i>Fagus sylvatica</i> <sup>f</sup>	227	92	108	0	144	164	789	5
<i>Quercus robur</i> <sup>g</sup>	210	95	36	15	36	60	1015	17
Mittelwerte $\pm$ SD	346 $\pm$ 149	73 $\pm$ 27	76 $\pm$ 30*	4 $\pm$ 7	85 $\pm$ 44*	108 $\pm$ 49*	885 $\pm$ 117	11 $\pm$ 6

<sup>a</sup>Leidreiter et al. 1995; <sup>b</sup>Winter et al. 1994, Lohaus und Heldt 1997; <sup>c</sup>Lohaus et al. 1994; <sup>d</sup>Knaupp et al. 2011, Hoermiller et al. 2017, Deeken et al. 2002; <sup>e</sup>Lohaus und Möllers 2000; <sup>f</sup>Fink et al. 2018; <sup>g</sup>Öner-Sieben und Lohaus 2014; <sup>h</sup>G Lohaus, unveröffentlichte Daten. \* = signifikanter Unterschied zwischen krautigen Pflanzen und Bäumen; Vak = Vakuole, Cyt = Cytosol, MZ = Mesophyllzelle, Sac = Saccharose.

Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse kann der passive Beladungsmechanismus für Salicaceae nicht ausgeschlossen werden. Vor allem die Ergebnisse der transgenen Pflanzen, weisen darauf hin, dass Saccharose den symplastischen Weg nimmt (Zhang et al. 2014) und das durch den vakuolären Transporter PtaSUT4 die Saccharosekonzentration im Cytosol reguliert wird (Payyavula et al. 2011). Die Ergebnisse der Autoradiographie können als belastbar angesehen werden, da das Versuchsdesign darauf ausgelegt war, die Einschränkungen dieser Methode bei Bäumen auszuschließen (Turgeon und Medville 1998). Die Plasmolyse-Experimente von Russin und Evert (1985) und Medville und Turgeon (1998) korrelieren mit der Annahme, dass Salicaceae ihr Phloem passiv beladen. Um diese Annahme endgültig zu beweisen, sollte die Saccharosekonzentration im Phloem und im Cytosol der Mesophyllzellen gemessen werden. Dies ist methodisch bisher jedoch nicht möglich.

#### 5.4 Gewebespezifische Expression und mögliche Funktionen der SUTs

In einigen krautigen Pflanzen erfüllen Typ I SUTs mehrere Funktionen. Im Sammelpfloem sind sie an der Phloembeladung beteiligt und im Transportphloem an der Wiederaufnahme von ausgeströmter Saccharose ins Phloem (Sauer 2007, Reinders et al. 2012). Die oben diskutierten Ergebnisse zur Phloembeladung weisen darauf hin, dass Fagaceae ihr Phloem aktiv und apoplastisch durch SUTs beladen, wobei FsSUT1 und QrSUT1 die aussichtsreichsten Kandidaten sind (Dobbelstein et al. 2018). Sie werden das ganze Jahr im Blatt exprimiert (Abbildung 22C, Abbildung 23C) und die Transporteraktivität für QrSUT1 (Öner-Sieben 2014) und für FsSUT1 konnte gezeigt werden (Abbildung 20).

Die Expressionsrate von SUT1 in Blättern ist im Vergleich zu den anderen Geweben niedrig (Abbildung 22C, Abbildung 23C). Dies scheint auf den ersten Blick in einem Widerspruch zu der aktiven Rolle dieser Transporter bei der apoplastischen Beladung zu stehen. Sie lässt sich jedoch mit der Funktion der SUT1 als Belader und der daraus folgenden Lokalisation erklären. Das Transkript von FsSUT1 wurde im Phloem lokalisiert (Abbildung 21) und da dort auch der Ort der Beladung ist, kann davon ausgegangen werden, dass das Protein auch dort verbleibt. Das Phloem hat mit  $\geq 1$  % einen sehr geringen Anteil am Gesamtvolumen eines Blattes (Haritatos et al. 1996). Mit zunehmender Ordnung werden die *minor veins* feiner und damit auch die Anzahl der Zellen im Leitbündel weniger. In den feinsten *minor veins* kann das Phloem nur aus einem Siebelement-Geleitzellkomplex bestehen (Esau 2006). In einem Laubblatt ist die Anzahl der Zellen, die einen SUT1 exprimieren also sehr gering. Dies wird noch deutlicher, wenn die Expression eines SUT1 mit der eines vakuolär lokalisierten SUT4 verglichen wird.

In *S. caprea* und *P. canescens* wurden die SUT1 Transporter das ganze Jahr in den Blättern exprimiert (Abbildung 24C, Abbildung 25C). Da bei den Salicaceae passive Beladung angenommen wird, übernehmen ScSUT1 und PtaSUT1 wahrscheinlich weitere Funktionen. Eine andere mögliche Funktion von SUT1 Transportern ist die Wiederaufnahme von ausgeströmter Saccharose (Öner-Sieben et al. 2015). Entlang des Transportphloems tritt Saccharose aus dem Phloem in den Apoplasten (van Bel 2003) und wird dort von SUTs wieder zurück ins Phloem geladen (Minchin und Thorpe 1987). Das Phloem in der Rinde ist vor allem am Stofftransport beteiligt (De Schepper et al. 2013). Die hohe Expression der untersuchten Transporter von Typ I in der Rinde der vier verschiedenen Baumarten, kann ein Hinweis darauf sein, dass sie auch an der Wiederaufnahme beteiligt sind (Abbildung 22 - Abbildung 25C). Die *major veins* und die Mittelrippe zählen in den Blättern schon zum Transportphloem (Esau 2006) und hier lokalisierte SUT1 könnten an der Wiederaufnahme beteiligt sein.

Auch im Holz wurde ein hohes Expressionsniveau aller *SUT1* gemessen (Abbildung 22C - Abbildung 25C). Holz, aber auch Rinde, fungieren als laterale *sink*-Gewebe und als temporärer Nährstoffspeicher (Richardson et al. 2013, Furze et al. 2018). In *P. canescens* konnte das Transkript eines Typ I SUT (PtaSUT3) mittels RNA *in situ*-Hybridisierung im Xylem und Bast lokalisiert werden (Payyavula et al. 2011). Für dessen Ortholog PttSUT3 aus *Populus tremula* x *Populus tremuloides* wurde durch RNAi-

Experimente eine Beteiligung an der Aufnahme von Saccharose in zellwandbildende sekundäre Holzfasern nachgewiesen (Mahboubi et al. 2013).

Die saisonale Expression von *SUT2* konnte nur in *Q. robur* gezeigt werden. *QrSUT2* wurde über das Jahr in allen Geweben exprimiert. Die Expression stieg im Sommer leicht an, im Rest des Jahres blieb sie auf einem konstant niedrigen Niveau (Abbildung 23D). Dies spricht für eine basale Funktion von *QrSUT2* (Dobbelstein et al. 2018). SUTs vom Typ II sind ebenfalls an der Wiederbeladung des Phloems beteiligt (Srivastava et al. 2008). Daneben wird auch eine Funktion in der Phloementladung diskutiert, da sie in den Siebelementen, aber auch in anderen Zellen von *sink*-Geweben vorkommen (Barth et al. 2003, Sauer 2007). Aufgrund des längeren cytoplasmatischen Loops wurde lange eine Funktion als Saccharose-Sensor angenommen, diese Vermutung konnte aber nicht bestätigt werden (Barker et al. 2000, Meyer et al. 2000, Kühn 2003, Braun und Slewinski 2009).

Die Expression von Typ III SUTs war in allen Bäumen, in allen Geweben, über das ganze Jahr, auf einem ähnlichen Niveau (Abbildung 22D, Abbildung 23E, Abbildung 24D, Abbildung 25D). Viele Typ III SUTs sind in der Tonoplastmembran lokalisiert und vermitteln dort den Saccharose-Export ins Cytosol (Schneider et al. 2012). Wurde das Transkript des vakuolären Transporters *PtaSUT4* aus *P. canescens* durch RNAi reduziert, stieg der Saccharosegehalt in *source*-Blättern (Payyavula et al. 2011), was die Rolle von *SUT4* beim Saccharose-Export aus Blättern verdeutlicht. Neben ihrer Lokalisation in der Tonoplastmembran wurden sie auch in der Plasmamembran gefunden (Chincinska et al. 2013). Der Transporter *PtaSUT4* aus *P. canescens* wurde durch Proteomics in der Plasmamembran nachgewiesen (Nilsson et al. 2010), durch GFP-Fusion in der Tonoplastmembran (Payyavula et al. 2011). Welche Funktion *PtaSUT4* in *P. canescens* in der Plasmamembran erfüllt, ist noch nicht untersucht. Anhaltspunkte dafür bieten Untersuchungen von *SUT4* aus Solanaceae. Für den *SUT4* aus Kartoffel (*StSUT4*) und Tomate (*LeSUT4*) wurde eine Rolle in der Wiederbeladung des Phloems oder in der direkten Aufnahme von Saccharose in *sink*-Zellen postuliert (Weise et al. 2000). Obwohl diese Ergebnisse in Solanaceae erzielt wurden und diese als krautige Pflanzen andere physiologische Eigenschaften und in Bezug auf die Salicaceae auch einen anderen Beladungsmechanismus haben, verdeutlichen sie doch die Komplexität der Stoffwechselprozesse in die SUTs eingebunden sind.

## 5.5 Expression von SUTs und NSC-Gehalt im Jahresverlauf

In allen vier untersuchten Baumarten war der Stärkegehalt im Herbst in Rinde und Holz am höchsten. Diese Gewebe sind die Hauptspeicherorgane der Bäume um Kohlenstoffreserven für den Winter und die Erneuerung der Baumkrone im Frühjahr anzulegen. Im Winter wird die Stärke zu Glukose und Fruktose abgebaut, deren Gehalt ansteigt. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit vorherigen Studien (Hoch et al. 2003, Scartazza et al. 2013).

Auffällig ist, dass in den Salicaceae der Stärkegehalt in den Wurzeln im Herbst stark anstieg (Abbildung 24C, Abbildung 25C). In *Q. robur* fiel dieser Anstieg gering aus, in *F. sylvatica* war keiner zu beobachten (Abbildung 22C, Abbildung 23C). Die Wurzel dient je nach Entwicklungsstadium als Speicherorgan. Mit steigendem Reifegrad des Wurzelsystems steigt auch dessen Bedeutung als Speicherorgan (Hoch et al. 2003). Das spricht dafür, dass bei der Probennahme Wurzeln unterschiedlichen Alters gesammelt wurden.

SUTs wurden in allen Geweben und in allen Jahreszeiten unterschiedlich stark exprimiert. Das Expressionsmuster von *SUT1* zeigte in allen Bäumen, mit Ausnahme von *QrSUT1* im Holz und *PtaSUT1* im Holz, einen ähnlichen Verlauf. Die Expression war im Frühjahr bzw. Sommer am größten und fiel im Verlauf des Jahres ab (Abbildung 22C - Abbildung 25C). Am Anfang bzw. in der Mitte der Vegetationsperiode, wo das Expressionsniveau von *SUT1* hoch war, war der Saccharosegehalt niedrig. Um einen Einblick in den Zusammenhang zwischen SUT-Expression und Saccharosegehalt zu gewinnen, wurden die Korrelationskoeffizienten berechnet (Tabelle 6).

Bei allen untersuchten Baumarten korrelieren der Saccharosegehalt und die *SUT1*-Expression negativ. In *F. sylvatica* in Blatt und Holz und in *S. caprea* in der Wurzel waren diese Korrelationen signifikant. Mit den aktuellen Daten ist es nicht möglich festzustellen, ob der Saccharosegehalt aufgrund der hohen *SUT1* Expression niedrig ist, oder umgekehrt. In *Fraxinus excelsior* korrelierte ein hohes Expressionsniveau von *FeSUT1* ebenfalls mit einem niedrigen Saccharosegehalt (Öner-Sieben et al. 2015). *F. excelsior* ist ein symplastischer Belader, der RFOs transportiert. Abseits davon, nahmen die Autoren an, dass die apoplastische Beladung in Phasen von hoher Exportaktivität und niedrigem Saccharosegehalt induziert wird (Öner-Sieben et al. 2015). Eine gleichbleibend hohe Exportrate bei gleichzeitig sinkendem Expressionsniveau von *SUT1* deutet auf eine geringere Relevanz von *SUT1* in späteren Vegetationsphasen hin (Dobbelstein et al. 2018). Decourteix et al. (2006) zeigten, dass die Expression des *SUT1* aus *J. regia*, *JrSUT1*, im Winter in Xylem assoziierten Zellen am höchsten war. Sie schlossen daraus, dass *JrSUT1* an der Wiederaufnahme von Saccharose in diesen Zellen während einer Tauphase beteiligt ist. Mit Ausnahme von *ScSUT1* zeigte die Expression der untersuchten *SUT1* kein erhöhtes Niveau. Zum Zeitpunkt der Probennahme gab es wahrscheinlich keine Frost-Tau-Zyklen, die die Expression von *SUT1* im Holz verstärkten.

Tabelle 6: Korrelationskoeffizient nach Pearson zwischen *SUT*-Expression und dem Saccharosegehalt (Sac) in den verschiedenen Geweben der untersuchten Bäume. Es wurden die Daten aus Abbildung 22-Abbildung 25 genutzt.

	<i>F. sylvatica</i>		<i>Q. robur</i>		<i>S. caprea</i>		<i>P. canescens</i>	
	Pearson	P-Wert	Pearson	P-Wert	Pearson	P-Wert	Pearson	P-Wert
SUT1 - Sac								
Blatt	-1	<b>0,005</b>	0,3	0,403	0,2	0,890	0,8	0,100
Rinde	0,2	0,494	0,2	0,064	-0,3	0,350	-0,3	0,364
Holz	-0,8	<b>0,039</b>	-0,1	0,594	-0,3	0,370	-0,5	0,266
Wurzel	-0,1	0,690	0,1	0,808	-0,9	<b>0,040</b>	0,6	0,197
SUT2 - Sac								
Blatt			0,5	0,125				
Rinde			0,6	0,053				
Holz			-0,3	0,379				
Wurzel			0,1	0,641				
SUT4 - Sac								
Blatt	0,4	0,388	0,5	0,213	-0,7	0,243	0,0	0,489
Rinde	0,6	<b>0,039</b>	-0,8	<b>0,001</b>	-0,7	0,156	-0,8	0,089
Holz	0,7	<b>0,008</b>	-0,8	<b>0,001</b>	-0,9	0,071	-0,5	0,273
Wurzel	-0,5	<b>0,022</b>	0,6	0,064	0,3	0,335	-0,1	0,474
SUT1 - SUT2								
Blatt			-0,5	<b>0,040</b>				
Rinde			0,7	<b>0,007</b>				
Holz			-0,4	0,174				
Wurzel			0,5	0,124				
SUT1 - SUT4								
Blatt	-0,2	0,817	-0,6	<b>0,048</b>	0,6	0,311	0,6	0,306
Rinde	-0,6	0,036	0,4	0,175	0,6	0,206	-0,3	0,341
Holz	-0,5	0,105	0	0,977	-0,1	0,469	0,4	0,303
Wurzel	-0,5	0,07	0,5	0,124	0,1	0,457	0,4	0,280
SUT2 - SUT4								
Blatt			0,8	<b>0,009</b>				
Rinde			-0,2	0,564				
Holz			0,1	0,691				
Wurzel			0,3	<b>0,001</b>				

P-Werte < 0,05 sind fett gedruckt

*QrSUT2* aus Eiche zeigte eine konstant niedrige Expression in allen Geweben im ganzen Jahr (Abbildung 23B). Ein vergleichbares Expressionsmuster zeigte der SUT2 Transporter *PaSUT2* aus der Gymnosperme *Picea abies* (Dobbelstein et al. 2018). *Populus x canescens* exprimiert zwei SUTs vom Typ II, *PtaSUT5* und *PtaSUT6*. Die Expression beider konnte durch RNA *in situ* Hybridisierung in allen Geweben nachgewiesen werden, das Expressionsniveau war jedoch niedrig (Payyavula et al. 2011). All dies spricht für eine basale Funktion für SUT2, die vom Jahreszeitenwechsel wenig beeinflusst wird (Dobbelstein et al. 2018). Die genaue Funktion von SUT2 ist zurzeit noch ungeklärt (Srivastava et al. 2008).

Ein Typ III Transporter wurden in *F. sylvatica* (FsSUT4) und *Q. robur* (QrSUT4) ganzjährig in allen Geweben exprimiert (Abbildung 22D, Abbildung 23E). Obwohl beide Mitglieder der Fagaceae sind, zeigen sie unterschiedliche Expressionsmuster. Die Expression von *FsSUT4* hat in Rinde und Holz im Winter ihr Maximum, die Expression von *QrSUT4* jedoch im Frühjahr. Auch der Korrelationskoeffizient zwischen der *SUT4*-Expression und dem Saccharosegehalt in den entsprechenden Geweben ist in beiden Arten unterschiedlich (Tabelle 6). In *F. sylvatica* gibt es signifikant positive Korrelationen, in *Q. robur* ist sie signifikant negativ. Ein Unterschied zwischen den beiden Bäumen liegt in der Struktur des Holzes. *Q. robur* gehört zu den ringporösen Hölzern, die nur im Frühjahr großlumige Gefäße bilden. In der Folge ist die Jahreszeitgrenze zwischen großen Gefäßen im Frühholz und englumigen Gefäßen im Spätholz gut zu erkennen. *F. sylvatica* hingegen gehört zu den zerstreutporigen Hölzern. Diese bilden im ganzen Jahr, außer am Ende der Vegetationsperiode, neue großvolumige Gefäße aus. Sie erreichen jedoch nicht die Größe der neuen Gefäße der ringporösen Hölzer. Zerstreutporiges Holz hat daher einen einheitlicheren Charakter, aber die Jahresringgrenze bleibt erkennbar. Das Holz der ringporösen 3-jährigen Eichen zeigte einen höheren Gehalt an Zucker und Stärke, als das Holz von *F. sylvatica* (Abbildung 22A+B, Abbildung 23A+B). Dieser Unterschied gilt auch in ausgewachsenen Bäumen (Barbaroux und Breda 2002). Bevor ringporige Hölzer ihre Blattkrone im Frühjahr erneuern, müssen sie zuerst das alte Xylem durch neues wasserleitendes Gewebe ersetzen (Barbaroux und Breda 2002, Hoch et al. 2003). Die beiden Salicaceae gehören zu den Zerstreutporern, weisen aber eine negative Korrelation zwischen der *SUT4*-Expression und dem Saccharosegehalt auf. Diese ist jedoch nicht signifikant. Weitere Studien müssen klären, ob dieser Unterschied einen Einfluss auf die SUT-Expression hat.

## 5.6 Regulativer Einfluss von Licht

Die Produktions- und Exportrate von Kohlenhydraten aus dem Blatt hängt maßgeblich von der photosynthetischen Aktivität ab, die durch Licht als Schlüsselfaktor beeinflusst wird (Smith und Stitt 2007). Am Tag ist die Versorgung mit Kohlenhydraten durch die Photosynthese gewährleistet, diese Kohlenstoffquelle fällt bei Dunkelheit weg. Im Laufe der Lichtperiode werden daher Stärkereserven angelegt. In der Nacht wird die Stärke zu Saccharose und Hexosen abgebaut, um die Versorgung der Gewebe mit Kohlenhydraten sicherzustellen (Smith und Stitt 2007).

Nachdem die Pflanzen ins Dauerdunkel transferiert wurden, sank der Zucker- und Stärkegehalt in den Blättern, wobei der Rückgang der Stärke ausgeprägter war. In allen Bäumen konnte eine Abnahme des Stärkegehalts auf 10-20 % des Ausgangswertes festgestellt werden (Abbildung 26B - Abbildung 29B). Dieser Rückgang ist vergleichbar mit dem in krautigen Pflanzen. In Spinat und Gerste sank der Stärkegehalt in der Nacht ebenso auf 10 % herab (Riens et al. 1994). Der Zuckergehalt lag in den beiden Fagaceae und in *P. canescens* am Ende der Dunkelperiode immer noch bei 50 - 70 % des Maximalwertes. In *S. caprea* war keine signifikante Abnahme zu messen (Abbildung 26A - Abbildung 29A). In Gerste und Spinat betrug der Saccharosegehalt am Ende der Nacht nur 10 % des

Maximalwertes der Lichtperiode. Sowohl krautige Pflanzen als auch Bäume nutzen Teile ihrer Kohlenhydratreserven in der Dunkelheit zur Aufrechterhaltung des Zuckermetabolismus, wobei in Baumblättern ein höherer Zuckergehalt verbleibt. Studien an Setzlingen von verschiedenen Bäumen (Angio- und Gymnospermen), die mehrere Wochen in Dunkelheit gehalten wurden, kamen zu ähnlichen Ergebnissen (Piper und Fajardo 2016, Wiley et al. 2017, Weber et al. 2018). *Populus tremuloides* Setzlinge, die in Dunkelheit gehalten wurden, bis sie starben, enthielten keine Stärke, aber noch einen wesentlichen Zucker-Anteil (Wiley et al. 2017). Dass holzige Pflanzen ihre Zuckerreserven nicht komplett aufbrauchen, wurde schon zuvor beschrieben (Chapin et al. 1990, Dietze et al. 2014).

Während eines normalen Licht-Dunkel-Zyklus (14 h Licht und 10 h Dunkelheit) war die Expression aller *SUTs* in der Mitte bzw. am Ende der Lichtperiode höher als am Ende der Nacht. Im Dauerdunkel blieb die Expression der Transporter niedrig. Besonders deutlich war dieser Effekt in den beiden Fagaceae und *S. caprea* zu sehen (Abbildung 26C+D, Abbildung 27C-E, Abbildung 28C+D), wobei die Abnahme der Expression in von *QrSUT1* und *ScSUT1* nicht so deutlich war wie bei den anderen Transportern der Fagaceae (Abbildung 27C, Abbildung 28C). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Expression aller Transportertypen diurnal von Licht beeinflusst wird. Der lichtabhängige *turnover* wurde für das SUT1 Protein bzw. die SUT1 mRNA schon in anderen Arten gezeigt (Kühn et al. 1997, Henry et al. 2011). Für Typ II und Typ III Transporter wurden höhere Expressionsraten während des Tages nachgewiesen (Chinsinska et al. 2008). Wenn die Saccharose Exportrate durch Dauerdunkel reduziert war, sank auch das Expressionsniveau der verschiedenen *SUTs*, wenn auch in unterschiedlichem Maße (Dobbelstein et al. 2018).

In *P. canescens* ist dieser Zusammenhang nicht so eindeutig zu erkennen. Die Expression von *PtaSUT1* blieb, mit einer Ausnahme nach 24 h Dunkelheit, auf einem konstanten Niveau. Die Expression von *PtaSUT4* hingegen zeigte einen circadianen Verlauf. Die Expression stieg nach 24 und 48 h Dunkelheit an. *PtaSUT4* ist in der Tonoplastmembran lokalisiert und steuert dort den Saccharose-Export ins Cytosol. Im passiven Belader *P. canescens* wird durch dieses Ventil die Phloembeladung reguliert (Liesche 2017, Xu et al. 2018). Im Hinblick darauf, dass in *P. canescens* die Flussgeschwindigkeit im Phloem auch im Dunkeln konstant bleibt (Windt et al. 2006), kommt der Aufrechterhaltung des Konzentrationsgradienten eine besondere Bedeutung zu. In der Nacht fehlt die Versorgung mit Kohlenhydraten durch die Photosynthese. Bei andauernder Dunkelheit führt dies zu einer Erhöhung der *sink*-Stärke und damit zu einer Erhöhung der Flussrate im Phloem. Überschreitet die Geschwindigkeit einen kritischen Punkt, könnten Organellen oder Proteine aus den Siebelementen ausgeschwemmt werden (Windt et al. 2006). Die Vakuole dient als Saccharosespeicher und eine Erhöhung der Exportrate könnte ein Faktor in der Regulation der Flussgeschwindigkeit sein. Dies steht im Widerspruch zu Payyavula et al. 2011, die für *PtaSUT4* eine diurnale Regulation postuliert haben. In der zweiten untersuchten Salicaceae *S. caprea* zeigten die Transporter eine eher diurnale Regulation. Warum die Expression der *SUTs* sich in diesen beiden passiven Beladern unterscheidet, kann ohne weitere Untersuchung nicht beantwortet werden.



## 6 Fazit und Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass nicht alle Laubbaumarten das Phloem passiv beladen. Die bisher dafür angewandten Kriterien, die *minor vein* Anatomie, Autoradiogramme und Plasmolyse-Experimente, reichen für eine Bestimmung des Beladungsmechanismus nicht aus. Die Messung der subzellulären Saccharosekonzentration, im Vergleich mit der in reinem Phloemsaft bietet ein genaues Bild der molaren Verhältnisse an der Schnittstelle der Phloembeladung. Für *F. sylvatica* und *Q. robur* wurden diese Messungen durchgeführt und zeigten, dass die Saccharose im Phloem um ein vielfaches höher konzentriert ist, als im Cytosol der Mesophyllzellen (Öner-Sieben und Lohaus 2014, Fink et al. 2018). Zudem konnte mit FsSUT1 ein funktionsfähiger SUT1 isoliert werden, der im Phloem lokalisiert ist. Daher kann der apoplastische Beladungsweg für die Fagaceae angenommen werden. Für die beiden Salicaceae waren diese Messungen nicht erfolgreich, jedoch liegen andere Ansätze mit transgenen Pflanzen vor, die die Annahme der passiven Beladung für diese Familie unterstützten. Um den direkten Beweis zu erbringen, sollten die Konzentrationsverhältnisse von Saccharose im Phloem der Salicaceae bestimmt werden.

SUTs spielen im Zuckertransport eine große Rolle. Die Transporterfamilie aus *P. canescens* wurde bereits charakterisiert (Payyavula et al. 2011) und in *Q. robur* wurde der an der Phloembeladung beteiligte Transporter QrSUT1 gefunden (Öner-Sieben et al 2015). In dieser Arbeit konnten durch ein Screening mit degenierten Primern in den untersuchten Arten je ein Transporter eines Typs gefunden werden, außer eines Typ II in Weide. Dieser könnte aber durch ein gezielteres Screening gefunden werden, da SUTs des Typ II ubiquitär in allen Landpflanzen vorkommen (Reinders et al. 2012). Die Sequenzen von FsSUT2, FsSUT4 sowieso ScSUT1 und ScSUT4 liegen als unvollständige ESTs vor. Eine Vervollständigung durch RACE-PCR schafft die Grundlage für weitere Charakterisierung der Transporter, mit der heterologe Funktionsüberprüfung in Hefe. In dieser Arbeit konnte FsSUT1 vorläufig charakterisiert werden, zur Validierung der Ergebnisse sollte in der Zukunft der  $K_M$ -Wert bestimmt und die RNA *in situ*-Hybridisierung optimiert werden, sodass eine Lokalisation auf zellulärer Ebene möglich ist. Die Lokalisation der Transporter ist für ihre Funktionsbestimmung von entscheidender Bedeutung, da derselbe SUT in unterschiedlichen Geweben in unterschiedliche Prozesse eingebunden sein kann (Chincinska et al. 2013). Mit einer Lokalisation auf zellulärer Ebene kann auch die Charakterisierung von QrSUT1 vervollständigt werden. In *S. caprea* kommt hierfür besonders ScSUT4 in Frage, da bei passiven Beladern die Phloembeladung durch den vakuolären Transporter gesteuert wird. Die Messung der SUT-Expression und die Messung des entsprechenden NSC-Gehaltes in unterschiedlichen Geweben zeigten, dass ein direkter Zusammenhang zwischen SUT Expression und Zuckergehalt nur schwer zu erkennen ist. An dieser Stelle könnten *knock-out* Mutanten von FsSUT1 oder QrSUT1 mehr Einblick in die Bedeutung der Transporter für den apoplastischen Beladungsweg geben.

## 7 Anhang

### 7.1 Verwendete Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden bei der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) bestellt.

Tabelle 7: Primer die für die verschiedenen PCR-Reaktionen verwendet wurden.

Name	Sequenz (5'→3')	Zielgen/Quelle/Funktion
degenerierte Primer		
ST1f	GCIGCIGGIRTICARTTYGGITGGGC	SUT, Knop et al., 2001
ST1r	GCIACRTCIARDATCCARAAICC	SUT, Knop et al., 2001
St1lg1r	CCCATCCARTCIGTRTCRWA	SUT, Knop et al., 2001
SUT3deg_fwd	ZAAAYAAYATGACZCARGGZCC	SUT, Gr. 3
SUT3deg_rev	RAAZGGRAACCAZCCDATCCA	SUT, Gr. 3
SUT spezifische Primer		
FsSUT1_f	ATGGAGGTTGAGAATAGAGCAGCAGGT	FsSUT1 ORF, diese Arbeit
FsSUT1_r	TCAATGGAAGGTAGCGATGGTAGAG	
FsSUT1NotI_f	TAAGCGGCCGCAAGCTTGTAAGAAATGGAG GTTGAGAATAGAGCAGCAGGT	Klonierung in NEV-N
FsSUT1NotI_r	TAAGCGGCCGCTCAATGGAAGGTAGCGATGGT AGAG	
FsHKGAct_f	TTGTCCGTGACATGAAGGAG	Aktin, <i>house-keeping-gen</i> , Chen et al., 2013
FsHKGAct_r	GCAACGGAATCTCTCAGCTC	
qFsS1_f	GGCTTTGTCTAAGCGGTCAC	qPCR für FsSUT1, Dobbelstein et al., 2018
qFsS1_r	TTCTCACCACCTTGGCTCTC	
qFsS4_f	CCTCTGCATGCAATGCTAAC	qPCR für FsSUT4_EST, Dobbelstein et al., 2018
qFsS4_r	CCTGTCCCATCTTCAACAGC	
QrHKGubi_f	CATAGGAAACCAGTTGAGG	Ubiquitin, <i>house-keeping-gen</i> , Rasheed-Depardieu et al., 2012
QrHKGubi_r	ACAAGTTTACTGCCACATT	
qQrS1_f	CGCCGTAGACCCTTTATT	qPCR für QrSUT1, Öner- Sieben et al., 2015
qQrS1_r	AAAACCCAACCACAAACA	
qQrS2_f	CTCTTCTGGCCGATCTATC	qPCR für QrSUT2, Dobbelstein et al., 2018
qQrS2_r	GCAAGCACTACTTGTCAGG	
qQrS4_f	TGGAGAAGCTCTGCAGTAAG	qPCR für QrSUT4, Dobbelstein et al., 2018
qQrS4_r	CATTTGGAGGTAGAGCCTTG	
ScHKGAct_f	GAGAGGTTACATGTTACCAC	Aktin, <i>house-keeping-gen</i> , Konlecher et al. 2013
ScHKGAct_r	CTGATATCCACATCACACTTC	
qScS1_f	GATCTTTCAGGGACGGATCA	qPCR für ScSUT1, diese Arbeit
qScS1_r	AGATTTGAGGTTTGCGCAGT	
qScS4_f	ACTGCGGAATCTCAAGTCT	qPCR für ScSUT4, diese Arbeit
qScS4_r	CCGAGTAGCTCCCAGATGAA	

Tabelle 7: Fortführung

PcHKGAct_f	CATCCAGGCTGTCCTTTCCC	Aktin, <i>house-keeping-gen</i> , Regier und Frey, 2010
PcHKGAct_r	AACGAAGGATGGCGTGTGG	
qPtaS1_f	TGGTKTCTGTAGCRRSTGGACCTT	qPCR für PtaSUT1, Payyavula et al., 2011
qPtaS1_r	ACCAGTACCAGTCTTGGAAGGAA	
qPtaS4_f	ATCCTTGGGACTTGGACAAGGGTT	qPCR für PtaSUT4, Payyavula et al., 2011
qPtaS4_r	TGATCGAGGAATACYCAAGATGGC	

## 7.2 Teilsequenzen der identifizierten Saccharosetransporter

Die Sequenzinformationen der Volllänge-sequenzen können über die Accesion Nummer aufgerufen werden.

Tabelle 8: Nukleotidsequenz und Länge der identifizierten Teilsequenzen

Name	Sequenz
FsSUT2_EST 366 nt	TGCAGACATTGGATATATAAATAGGTGATGCAAAGGAGCATTGCAGTTCATACAAAGGTACCCGAACAA GGGCAGCTATTGTCTTTTATTGTTGGTTTTCTGGCTGCTGGATCTTGCCAACAATACAGTGCAGGGACCG GCTCGTGCCCTTTTGGCCGATCTATCAGGTCTGATCAACGTAATTCAGCAAATGCTATATTTGCTC ATGGATGGCTGTTGGAAACATCCTAGGATTCTCTGCTGGTGCTAGTGGAAATTGGCACAGATGGTTTC CATTCTGATGAGTAGAGCTTGTCTGTGAAGCTTGTGGAAATCTCAAAGCAGCATTCTTGTGTCAGTG GTTTTCTGACTCTTGCACTCTGGAC
FsSUT4_EST 461 nt	GAACAATATGACGCAAGGGCCTTGTAGAGCTCTATTAGCTGATCTCACAGGAAAGGATCATAGAAGGA CGCAGTGGCGAATGCGTATTTCTCTCTGTTTATGGCTGTTGGCAATATCTTGGCTTTGCGACTGGA TCATATAGTGGCTGGTTCAAAGTTTTTCGTTTACTTACACCTTGCATGCAATGCAATGCTAAGTATATCGCAA TCTCAAGTCTGCTTTTTTTTATTGATGTTGTGTGCATTGCAATTACTACGTATGTAAGTATATCGGCAG CTCAGGAAGTGCCAATAAGTTTGGAGTATAGATCCACCACCCATGCTGTTGAAGATGGGACAGGAACC TCGGGTCAAGCTGAAGAAGCTTTCCTCTGGGAATTGTTTGGGACTTTTAAATATTTTTCAGGGTCTAT ATGGGTAACTCTGTGTGTTACTGCTTTGAATTGGATCGGCTGGTTCCTTCA
ScSUT1_EST 1029 nt	CATACTGGACCTTCAAACTCCATTGTTGAAAAACCAGGAAAGATTTGAAAGTGTGTTCTAAGATTGA TCATAGCTAACATGGAGAGTGGAGTTAGAAAAGAAAACAACCCCTTCTCTTCTCCAGTCCCTCAA CCACAACCTCCTGCGACAAACCTGCTCCATTGAGAAAAGATCATAGTGGTTGCGTGCATAGCTGCTGG TGTTCAATTTGGCTGGGCCCTGCAGCTTTCTCTGCTAACCCCATATGTGCAGCTTTTAGGCATTCCCTC ACACATGGGCTGCTTTTCATCTGGTTATGTGGCCGATTTCTGGTATGGTGGTCCAGCCAACGGTGGGA TACTACAGTGACCGGTGCACCTCCCGTTTCGGCCGTCGTCGCCCCGTTTATCGCGCGGGGGCTGGTTT TGTTGCCATTGCTGTGTTTCTTATTGGCTATGCTGCTGACATTGGCCATCTCTCTGGTGATTTCTCTCT CAAAAAAGCCAAGCCACGCGCCATTGCTGTGTTTGTGGTAGGGTTCTGGATTCTTGATGTTGCTAAT AACATGCTTCAAGGTCCATGCAGGGCCTTCTAAGTATGCTTTTCAGGGACGGATCAAAAGAGGACTCG AATAGCCAATGCTTTTCTACTCTTTTTTTTATGGCTGTGCGCAATGTTCTTGGCTACGCGAGCTGGGTCTT ACACTCACCTGTACAGAGCCTTTCCATTTTCAAGAACCAAAAGCTTGTGATGTTTACTGCGCAAACCTC AAATCTGTTTCTTCTTTTCCATCGCTTGCTCTTAACTGTTGACAATTTAGCTCTCTCTTACGTACG TGACAAGCCCTGGTTCGCGGAGGGAAGTCCCGGTGACGGAGGCAACGGGGAGGAGAACGGAGAAGCTG AAAAGTCGACGTCGGAGCCATTCTTCGGGGAAATAGTCGCTGCTTTTAAAGAGCTTGGAAAGACCTATG AGGATCTTACTCTTGGTGACGTGTCTAACTGGGTGTCATGGTTTCCTTTCTTGTGATGACACCGA CTGGATGGG
ScSUT4_EST 821 nt	GCGGCGGGGTGCAATTCGGGTGGGCGTTACAGCTCTCTCTTAACTCCCTACGTGCAGGAGCTAGG AATTCTCACAAATGGGCCAGTATTATCTGGTTGTGCGGTCCATTATCGGGATTGTTGCTGCAGCCTC TTGTTGGCGTCATGAGCGATCGGTGCACCAGCCGTTTGAAGACGGAGGCCGTTTATTGTTGCGGGT TCGGTTTTGATTGCGATATCGGTTTTGATAATCGGTCATCCGCTGACATTGGGTGGTGGTTAGGCGA TAGAGGAGATGTTAGACCAAGAGCAATTGGCGCTTTTGTFTTTGGGTTTTGGATTCTCGATGTTGCTA ATAATATGACTCAGGGTCTTGTCTGCTCTCTCTCGCTGATCTTACTGGAAAAGATCATCGCAGAAT AGAGTCGCAAATGCTTATTCTCATAATCATGGCTATTGGCAATATCTTGGTTTTGGCACTGGATC ATTTAATGGGTGGTACAGGTTTTTCTTTTACCATTACTTCTGCATGCAATATTGACTGCGCGAATC TCAAGTCTGCCTTTTATCTCGATGTTGTTTTTATGGCAATTAAGTGCATACATAAGCATCTCAGCAGCT CAAGAATCACCTCTAGATTTGCCTGCCAGATCCATGCTTGTGACGAGGAAATGCCAGGCCAGTCAAA TTCTGAACAAGAGGCTTTCATCTGGGAGCTACTCGGGACTTTTATGATATTTCCCATCGACTGTTTGG TAATATTGCTTGTACTGCTCTAAATGGATTGGTTGGTTTCCATTCTGCTCTACGATACCGACTGG ATGGG

### 7.3 Subzelluläre Zuckerkonzentration in *Fagus sylvatica* Blättern

Tabelle 9: Gesamtzuckergerhalt und Zuckerkonzentration in der Vakuole, im Stroma und im Cytosol von *F. sylvatica*.

	Gesamtzuckergerhalt eines Blattes [ $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FG}$ ]	Konzentration [mM]		
		Vakuole	Stroma	Cytosol
Hexosen	$25,3 \pm 5,9$	$107,7 \pm 29,8$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$
Saccharose	$46,8 \pm 6,9$	$144,2 \pm 32,0$	$0 \pm 0$	$164,3 \pm 29,0$

## 8 Literaturverzeichnis

- Aikman DP.** 1980. Contractile proteins and hypotheses concerning their role in phloem transport. *Canadian Journal of Botany* **58**, 826–832.
- Altschul S,** Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403–410.
- Aoki N,** Hirose T, Scofield G, Whitfeld P, Furbank R. 2003. The sucrose transporter gene family in rice. *Plant and Cell Physiology* **44**, 223–232.
- Atkins C,** Smith P, Rodriguez-Medina C. 2011. Macromolecules in phloem exudates—a review. *Protoplasma* **248**, 165–172.
- Babst BA,** Ferrieri RA, Gray DW, Lerdau M, Schlyer DJ, Schueller M, Thorpe MR, Orians CM. 2005. Jasmonic acid induces rapid changes in carbon transport and partitioning in *Populus*. *The New Phytologist* **167**, 63–72.
- Barbaroux C,** Breda N. 2002. Contrasting distribution and seasonal dynamics of carbohydrate reserves in stem wood of adult ring-porous sessile oak and diffuse-porous beech trees. *Tree Physiology* **22**, 1201–1210.
- Barker L,** Kühn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward J, Frommer W. 2000. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* **12**, 1153–1164.
- Barth I,** Meyer S, Sauer N. 2003. PmSUC3: characterization of a SUT2/ SUC3-type sucrose transporter from *Plantago major*. *The Plant Cell* **15**, 1375–1385.
- Banks J,** Nishiyama T, Hasebe M, Bowman J, Gribskov M, dePamphilis C, Albert V, Aono N, Aoyama T et al. 2011. The *Selaginella* Genome Identifies Genetic Changes Associated with the Evolution of Vascular Plants. *Science* **332**, 960–963.
- Bradford M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Braun DM,** Slewinski TL. 2009. Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. *Plant Physiology* **149**, 71–81.
- Byrne D,** Miller W. 1990. Carbohydrate and Amino-acid-composition of Phloem Sap and Honeydew Produced By *Bemisia-tabaci*. *Journal of Insect Physiology* **36**, 433–439.
- Cao T,** Lahiri I, Singh V, Louis J, Shah J, Ayre B. 2013. Metabolic engineering of raffinose-family oligosaccharides in the phloem reveals alterations in carbon partitioning and enhances resistance to green peach aphid. *Frontiers in Plant Science* **4**, 263.

- Carvalho MR**, Turgeon R, Owens T, Niklas KJ. 2017. The scaling of the hydraulic architecture in poplar leaves. *New Phytologist* **214**, 145–157.
- 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.
- Chapin FS**, Schulze ED, Mooney HA. 1990. The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **21**, 423–444.
- Chen L**, Qu X, Hou B, Sosso D, Osorio S, Fernie A, Frommer W. 2012. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* **335**, 207–211.
- Chen G**, Xing Z, Pan W, Bai L, Ye J, Ma D, Wei Z, Fan J, Guo Z. 2013. Cloning of a novel stearyl-acyl desaturase gene from white ash (*Fraxinus americana*) and evolution analysis with those from other plants. *African Journal of Biotechnology* **10**, 18185–18193.
- Chincinska I**, Liesche J, Krügel U, Michalska J, Geigenberger P, Grimm B, Kühn C. 2008. Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant Physiology* **146**, 515–528.
- Chincinska I**, Gier K, Krügel U, Liesche J, He H, Grimm B, Harren FJM, Cristescu SM, Kühn C. 2013. Photoperiodic regulation of the sucrose transporter StSUT4 affects the expression of circadian-regulated genes and ethylene production. *Frontiers in Plant Science* **4**, 26.
- Dale JE**, Sutcliffe JF. 1986. Phloem transport. In: Steward FC, ed. *Plant Physiology. A Treatise. Volume IX: Water and Solutes in Plants*. Academic Press, Orlando, 455–549.
- Davidson A**, Keller F, Turgeon R. 2011. Phloem loading, plant growth form, and climate. *Protoplasma* **248**, 153–163.
- Deeken R**, Geiger D, Fromm J, Koroleva O, Ache P, Langenfeld- Heyser R, Sauer N, May ST, Hedrich R. 2002. Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of *Arabidopsis*. *Planta* **216**, 334–344.
- Decourteix M**, Alves G, Brunel N, Améglio T, Guillio A, Lemoine R, Pétel G, Sakr S. 2006. JrSUT1, a putative xylem sucrose transporter, could mediate sucrose influx into xylem parenchyma cells and be upregulated by freeze-thaw cycles over the autumn-winter period in walnut tree (*Juglans regia* L.). *Plant, Cell and Environment* **29**, 36–47.
- Dietze MC**, Sala A, Carbone MS, Czimczik CI, Mantooth JA, Richardson AD, Vargas R. 2014. Nonstructural carbon in woody plants. *Annual Review of Plant Biology* **65**, 667–687.
- De Schepper V**, De Swaef T, Bauweraerts I, Steppe K. 2013. Phloem transport: a review of mechanisms and controls. *Journal of Experimental Botany* **64**, 4839–4850.

- Dobbelstein E**, Fink D, Öner-Sieben S, Czempik L, Lohaus G. 2018. Seasonal changes of sucrose transporter expression and sugar partitioning in common European tree species. *Tree Physiology* 10.1093/treephys/tpy120.
- Emr S**, Schekman R, Flessel M, Thorner J. 1983. An Mf Alpha-1-suc2 (alpha-factor-invertase) Gene Fusion For Study of Protein Localization and Gene-expression In Yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-biological Sciences* **80**, 7080–7084.
- Endler A**, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters S, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmidt U. 2006. Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiology* **141**, 196–207.
- Esau K**, Currier HB, Cheadle VI. 1957. Physiology of phloem. *Annual Review of Plant Physiology* **8**, 349–374.
- Esau K**, Evert RF, Eichhorn SE. 2006. Esaus Pflanzenanatomie. Meristeme, Zellen und Gewebe der Pflanzen - ihre Struktur, Funktion und Entwicklung. 3. Auflage. De Gruyter Verlag.
- Evert RF**. 1977. Phloem structure and histochemistry. *Annual Review of Plant Physiology* **28**, 199–222.
- Fink D**, Dobbelstein E, Barbian A, Lohaus G. 2018. Ratio of sugar concentrations in the phloem sap and the cytosol of mesophyll cells in different tree species as an indicator of the phloem loading mechanism. *Planta* **248**, 661–673.
- Flemetakis E**, Dimou M, Cotzur D, Efrose RC, Aivalakis G, Colebatch G, Udvardi M, Katinakis P. 2003. A sucrose transporter, LjSUT4, is up-regulated during *Lotus japonicus* nodule development. *Journal of Experimental Botany*. **54**, 1789–1791.
- Flora L**, Madore M. 1996. Significance of minor-vein anatomy to carbohydrate transport. *Planta* **198**, 171–178.
- Fu Q**, Cheng L, Guo Y, Turgeon R. 2011. Phloem loading strategies and water relations in trees and herbaceous plants. *Plant Physiology* **157**, 1518–1527.
- Furze ME**, Hartmann H, Trumbore S. 2018. Detours on the phloem sugar highway: stem carbon storage and remobilization. *Current Opinion in Plant Biology* **43**, 89–95.
- Gamalei Y**. 1989. Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs. A taxonomic review. *Trees - Structure and Function* **3**, 96–110.
- Geiger DR**, Giaquinta RT, Sovonick SA, Fellows RJ. 1973. Solute Distribution in Sugar Beet Leaves in Relation to Phloem Loading and Translocation. *Plant Physiology* **52**, 585–589.

- Gerhardt R**, Heldt H. 1984. Measurement of subcellular metabolite levels in leaves by fractionation of freeze-stopped material in nonaqueous media. *Plant Physiology* **75**, 542–547.
- Gil L**, Yaron I, Shalitin D, Sauer N, Turgeon R, Wolf S. 2011. Sucrose transporter plays a role in phloem loading in CMV-infected melon plants that are defined as symplastic loaders. *The Plant Journal* **66**, 366–374.
- Goggin FL**, Medville R, Turgeon R. 2001. Phloem loading in the tulip tree. Mechanisms and evolutionary implications. *Plant Physiology* **125**, 891–899.
- Hall T**. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95–98.
- Haritatos E**, Keller F, Turgeon R. 1996. Raffinose oligosaccharide concentrations measured in individual cell and tissue types in *Cucumis melo L.* leaves: Implications for phloem loading. *Planta* **198**, 614–622.
- Heineke D**, Wildenberger K, Sonnewald U, Willmitzer L, Heldt HW. 1994. Accumulation of hexoses in leaf vacuoles: Studies with transgenic tobacco plants expressing yeast derived invertase in the cytosol, vacuole or apoplasm. *Planta* **194**, 29–33.
- Henry C**, Rabot A, Laloi M, Mortreu E, Sigogne M, Leduc N, Lemoine R, Sakr S, Vain A, Pelleschi-Travier S. 2011. Regulation of RhSUC2, a sucrose transporter, is correlated with the light control of bud burst in *Rosa sp.* *Plant, Cell and Environment* **34**, 1776–1789.
- Hoch G**, Richter A, Körner C. 2003. Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. *Plant, Cell and Environment* **26**, 1067–1081.
- Hoermiller II**, Naegele T, Augustin H, Stutz S, Weckwerth W, Heyer AG. 2017. Subcellular reprogramming of metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* **40**, 602–610.
- Jansson S**, Douglas CJ. 2007. *Populus*: A Model System for Plant Biology. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 435–458.
- Karnovsky MJ**. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**, 137–138.
- King RW**, Zeevaart JAD. 1974. Enhancement of phloem exudation from cut petioles by chelating agents. *Plant Physiology* **53**, 96–103.
- Konlecher C**, Türktas M, Langer I, Vaculik M, Wenzel W, Putschenreiter M, Hauser MT. 2013. Expression of zinc and cadmium responsive genes in leaves of willow (*Salix caprea L.*) genotypes with different accumulation characteristics. *Environmental Pollution* **178**, 121–127.



- Knaupp M**, Mishra KB, Nedbal L, Heyer AG. 2011. Evidence for a role of raffinose in stabilizing photosystem II during freeze-thaw cycles. *Planta* **234**, 477–486.
- Knoblauch M**, Peters WS. 2010. Münch, morphology, microfluidics – our structural problem with the phloem. *Plant, Cell and Environment* **33**, 1439–1452.
- Knoblauch M**, Oparka K. 2012. The structure of the phloem - still more questions than answers. *The Plant Journal* **70**, 147–156.
- Knoblauch M**, Knoblauch J, Mullendore DL, Savage JA, Babst BA, Beecher SD, Dodgen AC, Jensen KH, Holbrook MN. 2016. Testing the Münch hypothesis of long distance phloem transport in plants. *eLife* **5**, e15341.
- Knoblauch M**, Peters WS. 2017. What actually is the Münch hypothesis? A short history of assimilate transport by mass flow. *Journal of Integrative Plant Biology* **59**, 292–310.
- Knop C**. 2001. Zur Bedeutung von Saccharose-Transportern in Pflanzen mit offener Phloemanatomie. Dissertation, Universität Göttingen.
- Knop C**, Stadler R, Sauer N, Lohaus G. 2004. AmSUT1, a sucrose transporter in collection and transport phloem of the putative symplastic phloem loader *Alonsoa meridionalis*. *Plant Physiology* **134**, 204–214.
- Kühn C**, Franceschi VR, Schulz A, Lemoine R, Frommer WB. 1997. Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* **275**, 1298–1300.
- Kühn C**. 2003. A comparison of the sucrose transporter systems of different plant species. *Plant Biology* **5**, 215–232.
- Kühn C**, Hajirezaei M, Fernie A, Rössner-Tunali U, Czechowski T, Hirner B, Frommer W. 2003. The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiology* **131**, 102–113.
- Kühn C**, Grof C. 2010. Sucrose transporters of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 288–298.
- Lalonde S**, Frommer W. 2012. SUT Sucrose and MST Monosaccharide Transporter Inventory of the Selaginella Genome. *Frontiers in Plant Science* **3**, 24.
- Leidreiter K**, Kruse A, Heineke D, Robinson DG, Heldt HW. 1995. Subcellular volumes and metabolite concentrations in potato (*Solanum tuberosum* cv. Désirée) leaves. *Botanica Acta* **108**, 439–444.
- Liesche J**. 2017. Sucrose transporters and plasmodesmal regulation in passive phloem loading. *Journal of Integrative Plant Biology* **59**, 311–321.

- Lohaus G**, Burba M, Heldt H. 1994. Comparison of the Contents of Sucrose and Amino-acids In the Leaves, Phloem Sap and Taproots of High and Low Sugar-producing Hybrids of Sugar-beet (*Beta vulgaris* L). *Journal of Experimental Botany* **45**, 1097–1101.
- Lohaus G**, Heldt HW. 1997. Assimilation of gaseous ammonia and the transport of its products in barley and spinach leaves. *Journal of Experimental Botany* **48**, 1779–1786.
- Lohaus G**, Moellers C. 2000. Phloem transport of amino acids in two *Brassica napus* L. genotypes and one *B. carinata* genotype in relation to their seed protein content. *Planta* **211**, 833–840.
- Lohaus G**, Schwerdtfeger M. 2014. Comparison of Sugar, Iridoid Glycosides and Amino Acids in Nectar and Phloem Sap of *Maurandya barclayana*, *Lophosiphum erubescens*, and *Brassica napus*. *PLOS One* **9**, 1–9.
- Mahboubi A**, Ratke C, Gorzsás A, Kumar M, Mellerowicz EJ, Niittylä T. 2013. Aspen SUCROSE TRANSPORTER 3 Allocates Carbon into Wood Fibers. *Plant Physiology* **163**, 1729–1740.
- Meyer S**, Melzer M, Truernit E, Hümmer C, Besenbeck R, Stadler R, Sauer N. 2000. AtSUC3, a gene encoding a new *Arabidopsis* sucrose transporter, is expressed in cells adjacent to the vascular tissue and in a carpel cell layer. *The Plant Journal* **24**, 869–882.
- Minchin PEH**, Thorpe MR. 1987. Measurement of unloading and reloading of photo-assimilates within the stem of bean. *Journal of Experimental Botany* **38**, 211–220.
- Münch E**. 1930. Die Stoffbewegungen in der Pflanze.
- Nadwodnik J**, Lohaus G. 2008. Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta* **227**, 1079–1089.
- Nilsson R**, Bernfur K, Gustavsson N, Bygdell J, Wingsle G, Larsson C. 2010. Proteomics of plasmamembranes from poplar trees reveals tissue distribution of transporters, receptors, and proteins in cell wall formation. *Molecular & Cellular Proteomics* **9**, 368–387.
- Ohshima T**, Hayashi H, Chino M. 1990. Collection and Chemical Composition of Pure Phloem Sap from *Zea mays* L. *Plant and Cell Physiology* **31**, 735–737.
- Oparka KJ**, Prior DAM. 1992. Direct evidence for pressure-generated closure of plasmodesmata. *Plant J* **2**, 741–750.
- Öner-Sieben S**. 2014. Untersuchungen zu Phloembeladungsmechanismen bei Laubbäumen am Beispiel von *Quercus robur* und *Fraxinus excelsior*. Dissertation, Bergische Universität Wuppertal.
- Öner-Sieben S**, Lohaus G. 2014. Apoplastic and symplastic phloem loading in *Quercus robur* and *Fraxinus excelsior*. *Journal of Experimental Botany* **7**, 1905–1916.

- Öner-Sieben S**, Rappl C, Sauer N, Stadler R, Lohaus G. 2015. Characterization, localization and seasonal changes of the sucrose transporter FeSUT1 in the phloem of *Fraxinus excelsior*. *Journal of Experimental Botany* **66**, 4807–4819.
- Palonen P**, Buszard D, Donnelly D. 2000. Changes in carbohydrates and freezing tolerance during cold acclimation of red raspberry cultivars grown *in vitro* and *in vivo*. *Physiologia Plantarum* **110**, 393–401.
- Payyavula RS**, Tay KH, Tsai CJ, Harding SA. 2011. The sucrose transporter family in *Populus*: the importance of a tonoplast PtaSUT4 to biomass and carbon partitioning. *The Plant Journal* **65**, 757–770.
- Peng D**, Gu X, Xue LJ, Leebens-Mack JH, Tsai CJ. 2014. Bayesian phylogeny of sucrose transporters: ancient origins, differential expansion and convergent evolution in monocots and dicots. *Frontiers in Plant Science* **5**, 615.
- Pfaffl M**, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians T. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* **26**, 509–515.
- Piper FI**, Fajardo A. 2016. Carbon dynamics of *Acer pseudoplatanus* seedlings under drought and complete darkness. *Tree Physiology* **36**, 1400–1408.
- Rasheed-Depardieu C**, Parent C, Crevecoeur M, Parelle J, Tatin-Froux F, Le Provost G, Capelli N. 2012. Identification and expression of nine oak aquaporin genes in the primary root axis of two oak species, *Quercus petraea* and *Quercus robur*. *PLoS One* **7**, e51838.
- Reinders A.**, Sivitz A.B., Starker C.G., Gantt J.S. and Ward J.M. 2008. Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar sucrose transporter from *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology* **68**, 289–299.
- Reinders A**, Sivitz AB, Ward JM. 2012. Evolution of plant sucrose uptake transporters. *Frontiers in Plant Science* **3**, 22.
- Regier N.**, Frey B. 2010. Experimental comparison of relative RT-qPCR quantification approaches for gene expression studies in poplar. *BMC Molecular Biology* **11**, 57.
- Rennie EA**, Turgeon R. 2009. A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **106**, 14162–14167.
- Richardson AD**, Carbone MS, Keenan TF, Czimczik CI, Hollinger DY, Murakami P, Schaberg PG, Xu X. 2013. Seasonal dynamics and age of stemwood nonstructural carbohydrates in temperate forest trees. *New Phytologist* **197**, 850–861.
- Riens B**, Lohaus G, Heineke D, Heldt HW. 1991. Amino acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiology* **97**, 227–233.

- Riens B**, Lohaus G, Winter H, Heldt HW. 1994. Production and diurnal utilization of assimilates in leaves of spinach (*Spinacia oleracea* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* **192**, 497–501.
- Riesmeier J**, Willmitzer L, Frommer W. 1992. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO Journal* **11**, 4705–4713.
- Riesmeier J**, Willmitzer L, Frommer W. 1994. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO Journal* **13**, 1–7.
- Russin W**, Evert RF. 1985. Studies On the Leaf of *Populus Deltoides* (Salicaceae) - Ultrastructure, Plasmodesmatal Frequency, and Solute Concentrations. *American Journal of Botany* **72**, 1232–1247.
- Saier Jr M**, Tran C, Barabote R. 2006. TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Research* **34**, D181–D186.
- Sauer N**, Baier K, Gahrtz M, Stadler R, Stolz J, Truernit E. 1994. Sugar transport across the plasma membranes of higher plants. *Plant Molecular Biology* **26**, 1671–1679.
- Sauer N**, Stolz J. 1994. SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine-tagged protein. *The Plant Journal* **6**, 67–77.
- Sauer N**. 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Lett* **581**, 2309–2317.
- Savage JA**, Zwieniecki MA, Holbrook NM. 2013. Phloem transport velocity varies over time and among vascular bundles during early cucumber seedling development. *Plant Physiology* **163**, 1409–1418.
- Scartazza A**, Moscatello S, Matteucci G, Battistelli A, Brugnoli E. 2013. Seasonal and inter-annual dynamics of growth, non-structural carbohydrates and C stable isotopes in a Mediterranean beech forest. *Tree Physiology* **33**, 730–742.
- Siminovitch D**, Wilson CM, Briggs DR. 1953. Studies on the Chemistry of the Living Bark of the Black Locust in Relation to Its Frost Hardiness. V. Seasonal Transformations and Variations in the Carbohydrates: Starch-Sucrose Interconversions. *Plant Physiology* **28**, 383–400.
- Slewinski TL**, Zhang C, Turgeon R. 2013. Structural and functional heterogeneity in phloem loading and transport. *Frontiers in Plant Science* **4**, 244.
- Smith AM**, Stitt M. 2007. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell & Environment* **30**, 1126–1149.
- Schneider S**, Hulpke S, Schulz A, Yaron I, Höll J, Imlau A, Schmitt B, Batz S, Wolf S, Hedrich R, Sauer N. 2012. Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters. *Plant Biology* **14**, 325–336.

- Sovonick S**, Geiger D, Fellows R. 1974. Evidence for active Phloem loading in the minor veins of sugar beet. *Plant Physiology* **54**, 886–891.
- Srivastava A**, Ganesan S, Ismail I, Ayre B. 2008. Functional characterization of the *Arabidopsis* AtSUC2 Sucrose/H<sup>+</sup> symporter by tissue-specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long-distance transport. *Plant Physiology* **148**, 200–211.
- Stadler R**, Wolf K, Hilgart C, Tanner W, Sauer N. 1995. Subcellular localization of the inducible *Chlorella* HUP1 monosaccharide-HC symporter and cloning of a co-induced galactose-HC symporter. *Plant Physiology* **107**, 33–41.
- Stadler R**, Truernit E, Gahrtz M, Sauer N. 1999. The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **19**, 269–278.
- Stitt M**, Heldt H, 1981. Physiological Rates of Starch Breakdown in Isolated Intact Spinach Chloroplasts. *Plant Physiology* **68**, 755–761.
- Stitt M**, Wirtz W, Heldt H. 1983. Regulation of Sucrose Synthesis by Cytoplasmic Fructosebisphosphatase and Sucrose Phosphate Synthase during Photosynthesis in Varying Light and Carbon Dioxide. *Plant Physiology* **72**, 767–774.
- Tamura K**, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725–2729.
- Turgeon R**, Gowan E. 1990. Phloem Loading in *Coleus blumei* in the Absence of Carrier-Mediated Uptake of Export Sugar from the Apoplast. *Plant Physiology* **94**, 1244–1249.
- Turgeon R**, Hepler PK. 1989. Symplastic continuity between minor veins in *Cucurbita pepo* leaves. *Protoplasma* **83**, 217–232.
- Turgeon R**, Medville R. 1998. The absence of phloem loading in willow leaves. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America-physical Sciences* **95**, 12055–12060.
- Turgeon R**, Medville R. 2004. Phloem loading. A reevaluation of the relationship between plasmodesmatal frequencies and loading strategies. *Plant Physiology* **136**, 3795–3803.
- Turgeon R**, Medville R. 2010. *Amborella trichopoda*, plasmodesmata, and the evolution of phloem loading. *Protoplasma* **248**, 173–80.
- van Bel A**, Ammerlaan A, van Dijk A. 1994. A 3-step Screening-procedure To Identify the Mode of Phloem Loading In Intact Leaves - Evidence For Symplasmic and Apoplasmic Phloem Loading Associated With the Type of Companion Cell. *Planta* **192**, 31–39.

- van Bell A.** 1999. Evolution, polymorphology and multifunctionality of the phloem system. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **2**, 163–184.
- van Bel A.** 2003. The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell & Environment* **26**, 125–149.
- Voitsekhovskaja O**, Koroleva OA, Batashev DR, Knop C, Tomos AD, Gamalei YV, Heldt HW, Lohaus G. 2006. Phloem loading in two Scrophulariaceae species. What can drive symplastic flow via plasmodesmata? *Plant Physiology* **140**, 383–395.
- Voitsekhovskaja O**, Rudashevskaya E, Demchenko K, Pakhomova M, Batashev D, Gamalei Y, Lohaus G, Pawlowski K. 2009. Evidence for functional heterogeneity of sieve element-companion cell complexes in minor vein phloem of *Alonsoa meridionalis*. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1873–1883.
- Weber R**, Schwendener A, Schmid S, Lambert S, Wiley E, Landhäusser SM, Hartmann H, Hoch G. 2018. Living on next to nothing: tree seedlings can survive weeks with very low carbohydrate concentrations. *New Phytologist* **218**, 107–118.
- Weatherley P**, Johnson RPC. 1968. The form and function of the sieve tube: A problem in reconciliation. *International Review of Cytology* **24**, 149–192.
- Wiley E**, Hoch G, Landhäusser SM. 2017. Dying piece by piece: carbohydrate dynamics in aspen (*Populus tremuloides*) seedlings under severe carbon stress. *Journal of Experimental Botany* **68**, 5221–5232.
- Windt CW**, Vergeldt FJ, de Jager A, van As H. 2006. MRI of long-distance water transport: a comparison of the phloem and xylem flow characteristics and dynamics in poplar, castor bean, tomato and tobacco. *Plant, Cell & Environment* **29**, 1715–1729.
- Winter H**, Robinson DG, Heldt HW. 1993. Subcellular volumes and metabolite concentrations in barley leaves. *Planta* **191**, 180–190.
- Winter H**, Robinson DG, Heldt HW. 1994. Subcellular volumes and metabolites in spinach leaves. *Planta* **193**, 530–535.
- Wittwer C**, Herrmann M, Moss A, Rasmussen R, others. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* **22**, 130–139.
- Woodcock D**, Crowther P, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith S, Michael M, Graham M. 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research* **17**, 3469–3478.
- Xu Q**, Chen S, Yunjuan R, Chen S, Liesche J. 2018. Regulation of sucrose transporters and phloem loading in response to environmental cues. *Plant Physiology* **176**, 930–945.

**Zhang C**, Han L, Slewinski TL, Sun J, Zhang J, Wang ZY, Turgeon R. 2014. Symplastic Phloem loading in Poplar. *Plant Physiology* **166**, 306–313.

**Zimmermann MH**, Ziegler H. 1975. List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. In: Zimmermann MH, Milburn JA, eds. *Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 1, Transport in Plants: Phloem transport*. New York: Springer, 479–503.

## 9 Danksagungen

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Prof'in Dr. Gertrud Lohaus bedanken. Für Überlassung des Themas, die wissenschaftliche und persönliche Unterstützung und vor allem für Ihre Bereitschaft diejenige einzustellen, die als ihre größte Stärke ihre hervorragenden Schokokekse angepriesen hat.

Prof'in Dr. Gela Preisfeld möchte ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Eine Doktorarbeit ist nie ein Solo-Projekt, daher geht ein besonderer Dank an die Mitglieder der Arbeitsgruppe Botanik. An Laura und Daniel, für die Hilfe bei Laborarbeiten und für viele wissenschaftliche Diskussionen im Büro. An Basel und Thomas für deren Geduld in Bezug auf wirklich alle meine Fragen rund um die HPLC. An Tim für die Hilfe bei der NWF und der Extraktion der Proben. An Rosi für die Korrektur der Paper, auch auf den letzten Drücker. An Antje für die hilfreichen Gespräche im Büro.

Bei Andreas Barbian und Franz Klebl möchte ich mich für die Erstellung der TEM-Aufnahmen bzw. für die heterologe Expressionmessung bedanken.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe der Zoologie und hier besonders bei Sabine Stratmann-Lettner möchte ich danken, dass ich ihre Labore mitbenutzen durfte und immer einen hilfsbereiten Ansprechpartner gefunden habe.

Ich danke Christoph und Henrik für das unbarmherzige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Eltern möchte ich danken, die mich auf diesem Weg unterstützt und immerwährendes Interesse an meiner Arbeit gezeigt haben.

Zum Abschluss möchte ich mich bei Henrik bedanken. Für alles.



## 10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, diese Arbeit selbstständig 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.

---

Elena Dobbstein

(Wuppertal, im Februar 2019)